

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Car Peterko

**PREDIKTIVNA I PROGNOŠTIČKA VRIJEDNOST
TUMORSKOG INFILTRATA LIMFOCITA, EKSPRESIJE
IMUNOSUPRESIVNIH MARKERA I PROTEINA
TOPLINSKOG ŠOKA 70 U IMUNOSNIM STANICAMA
KARCINOMA DOJKE**

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Car Peterko

**PREDIKTIVNA I PROGNOŠTIČKA VRIJEDNOST
TUMORSKOG INFILTRATA LIMFOCITA, EKSPRESIJE
IMUNOSUPRESIVNIH MARKERA I PROTEINA
TOPLINSKOG ŠOKA 70 U IMUNOSNIM STANICAMA
KARCINOMA DOJKE**

Doktorski rad

Potpis mentorice rada, izv. prof. dr. sc. Manuela Avirović _____

Potpis komentora rada, izv. prof. dr. sc. Franjo Lovasić _____

Rijeka, 2025.

**UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE**

Ana Car Peterko

**PREDICTIVE AND PROGNOSTIC VALUE OF TUMOUR-
INFILTRATING LYMPHOCYTES, IMMUNOSUPPRESSIVE
MARKER EXPRESSION, AND HEAT SHOCK PROTEIN 70
IN BREAST CANCER-ASSOCIATED IMMUNE CELLS**

Doctoral thesis

Mentor's signature, assoc. prof. Ph. D. Sc. Manuela Avirović _____

Co-mentor's signature, assoc. prof. Ph. D. Sc. Franjo Lovasić _____

Rijeka, 2025.

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Manuela Avirović, dr. med.

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Franjo Lovasić, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____
_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Rad ima _____ listova

UDK: _____

PREDGOVOR

Istraživanje je provedeno pod pokroviteljstvom projekta “Prediktivna i prognostička uloga stanica imunskog sustava, PD-1, PD-L1 i heat shock proteina 70 u bolesnica s trostruko negativnim, HER-2 pozitivnim i neoadjuvantno liječenim karcinomom dojke”, pod šifrom uniri-biomed-18-259 na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Manuli Avirović i svojem komentoru izv. prof. dr. sc. Franji Lovasić na edukaciji i kontinuiranom poticaju tijekom provedbe istraživanja, na svom trudu i vremenu uloženom u izradu doktorskog rada, nesebičnoj pomoći, brojnim savjetima i sugestijama.

Zahvaljujem i članovima povjerenstva u sastavu izv. prof. dr. sc. Tamara Gulić, izv. prof. dr. sc. Natalija Dedić Plavetić i izv. prof. dr. sc. Emina Babarović, koji su svojim stručnim savjetima unaprijedili istraživanje i izradu doktorskog rada.

Laboratorijskim tehničarima Zavoda za patologiju i patološku anatomiju zahvaljujem na njihovoj tehničkoj pomoći.

Renati Turković Kasumović, prof., zahvaljujem na lekturi rada.

Svojoj obitelji zahvaljujem na beskrajnom strpljenju, neograničenom razumijevanju i potpori.

Iz doktorskog rada publicirani su radovi:

Peterko AC, Rajković-Molek K, Gulić T, Vujaklija DV, Lovasić IB, Lovasić F, Mustać E, Avirović M. HSP70 In triple negative breast cancer: Prognostic value and clinical significance. *Pathol Res Pract.* 2022;238:154127.

Car Peterko A, Rajković Molek K, Savić Vuković A, Gulić T, Valković Zujić P, Cini Tešar E, Juranić D, Pirjavec Mahić A, Lovasić F, Đorđević G, Avirović M. Quantitative and qualitative variations of TILs in risk stratification and patient selection for neoadjuvant chemotherapy of luminal B and triple-negative breast cancer immunophenotype. *Sci* 2025, 7, 69.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Tumorski infiltrat limfocita (TIL) predstavlja trenutni lokalni imunosni odgovor na tumor. U istraživanju polazimo od hipoteze da su kvantitativne i kvalitativne varijacije TIL-a i ekspresije HSP70 u TIL-u trostruko negativnog (TN) i luminalnog B (LB) raka dojke povezane s kliničkim ishodima oboljelih i odgovorom tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju (NAKT). Osnovni cilj istraživanja je identifikacija imunosnih varijabli temeljem kojih se u rutinskoj kliničkoj praksi mogu optimizirati stratifikacija rizika i selekcija pacijenata za NAKT. **Ispitanici i metode:** U istraživanje smo uključili dvije različite skupine ispitanika. U prvu, adjuvantnu skupinu uključeno je 68 pacijentica s TN rakom dojke kod kojih je kirurški zahvat prethodio sistemskom onkološkom liječenju. U drugu, neoadjuvantnu skupinu uključeno je 89 pacijentica s TN ili LB imunofenotipom raka dojke koje su kirurški liječene nakon NAKT. Klinički su podaci prikupljeni retrospektivno, a za analizu TIL-a korišteni su arhivski materijali tumorskog tkiva. Udio TIL-a određen je na cijelim hematoksilin-eozin obojanim rezovima, a imunohistokemijska bojenja CD8, CD4, FOXP3, CD11c, PD-L1, CTLA-4 i HSP70 očitana su na tkivnim mikroarejama. Analizirane su međusobne korelacije imunosnih varijabli te njihova povezanost s tradicionalnim prognostičkim parametrima, onkološkim ishodima liječenja i odgovorom tumora na NAKT. **Rezultati:** U adjuvantnoj TN kohorti multivarijatnom analizom potvrđena je povezanost kraćeg vremena preživljenja pacijenata s višim udjelom CD4+T limfocita (cut-off 25 %, $P = 0,043$, RR 2,36, HR95 % 1,03 – 5,41) i PD-L1+ imunosnih stanica (cut-off 5 %, $P < 0,001$, RR 7,83, HR95 % 2,32 – 26,39) u invazivnoj tumorskoj fronti (ITF). Temeljem broja HSP70+ imunosnih stanica u centralnom dijelu (TC) TN tumora može se razlučiti između pN (+) i pN (-) statusa (AUC 0,783, $P < 0,001$). U LB tumorima su viši udio TIL-a i veći broj FOXP3+ limfocita povezani s višim nuklearnim gradusom ($P = 0,049$, $P = 0,023$) i višim kliničkim prognostičkim stadijem bolesti ($P = 0,033$, $P = 0,007$), a viša ekspresija PD-L1 i HSP70 u TIL-u s višim proliferacijskim indeksom ($P = 0,018$, $P = 0,040$), cN2-3 statusom ($P = 0,002$, $P = 0,026$) i višim stadijima bolesti ($P = 0,001$, $P = 0,020$). Bolji je odgovor LB tumora na NAKT povezan s većim brojem HSP70+ imunosnih stanica ($P = 0,045$) i višim udjelom CD8+ limfocita ($P = 0,012$). **Zaključak:** Viši udio CD4+ limfocita i PD-L1+ imunosnih stanica u ITF TN tumora, odnosno viši udio TIL-a s većim brojem FOXP3+ stanica i/ili višom ekspresijom PD-L1 i HSP70 u TIL-u LB tumora ukazuju na pacijente višeg rizika kod kojih je poželjna eskalacija sistemskog liječenja. Određivanje udjela CD8+ limfocita i broja HSP70+ imunosnih stanica u TIL-u LB tumora može optimizirati selekciju pacijenata za NAKT, a evaluacija broja HSP70+ imunosnih stanica u TC TN raka dojke može pridonijeti prilikom donošenja odluke o opsegu kirurškog zahvata u pazušnoj jami.

Ključne riječi: HSP70 Proteini Toplinskog Šoka, Limfociti, Tumor-Infiltrirajući; Neoadjuvantna Terapija; Neoplazme Dojke; Prognoza

SUMMARY

Objective: The tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) represents the current local immune response to the tumour. The research is based on the hypothesis that quantitative and qualitative variations of TILs and the expression of HSP70 in TILs in triple negative (TN) and luminal B (LB) breast cancer are associated with patient clinical outcomes and tumour response to neoadjuvant chemotherapy (NAC). The main objective is identification of immune parameters that may improve risk stratification and patient selection for NAC in routine clinical practice. **Patients and methods:** Two different cohorts of patients were included in this trial. 68 TN breast cancer patients, in whom surgical procedure was performed prior to chemotherapy were included in the first, adjuvant, cohort. 89 TN and LB breast cancer patients, in whom surgery was performed following NAC, were included in the second, neoadjuvant, cohort. Clinical data were collected retrospectively and TILs were analysed on archival materials. The proportion of TILs was determined on whole hematoxylin-eosin tissue sections and immunohistochemical stains, CD8, CD4, FOXP3, CD11c, PD-L1, CTLA-4 and HSP70, were evaluated on tissue microarrays. The intercorrelations of immune variables were analysed, as well as the associations of those variables with traditional prognostic parameters, patient oncological outcomes and tumour response to NAC. **Results:** The associations of shorter overall survival with higher proportions of CD4+ T cells (cut-off 25 %, $P = 0,043$, RR 2,36, HR95 % 1,03 – 5,41) and PD-L1+ immune cells (cut-off 5 %, $P < 0,001$, RR 7,83, HR95 % 2,32 – 26,39) at the invasive tumour front (ITF) of TN breast cancer are confirmed by multivariate analysis. In TN breast cancer, pN (+) and pN (-) status can be anticipated upon the number of HSP70+ immune cells in central part (TC) of the tumour (AUC 0,783, $P < 0,001$). Within LB cohort, a higher proportion of TILs and a higher number of FOXP3+ lymphocytes are associated with a higher nuclear grade ($P = 0,049$, $P = 0,023$) and a higher clinical prognostic stage of the disease ($P = 0,033$, $P = 0,007$), while a higher expression of PD-L1 and HSP70 in TILs are associated with a high proliferation index ($P = 0,018$, $P = 0,040$), cN2-3 status ($P = 0,002$, $P = 0,026$) and higher stages of the disease ($P = 0,018$, $P = 0,040$). A better response to NAC is associated with a higher number of HSP70+ immune cells ($P = 0,045$) and a higher proportion of CD8+ cells ($P = 0,012$) in LB tumours. **Conclusion:** A higher proportion of CD4+ and PD-L1+ immune cells at the ITF of TN tumours, and a higher proportion of stromal TILs with a higher number of FOXP3+ T lymphocytes and/or a higher expression of PD-L1 and HSP70 in TILs of LB tumours indicate a higher-risk patients, in whom systemic treatment escalation is desirable. The evaluation of the proportion of CD8+ lymphocytes and the number of HSP70+ immune cells in LB tumours can improve the patient selection for NAC. Determination of HSP70+ immune cells in TC of TN tumours may optimize the decision on the extent of axillary surgery.

Keywords: Breast Neoplasms; HSP70 Heat-Shock Proteins; Lymphocytes, Tumour-Infiltrating; Neoadjuvant Therapy; Prognosis

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Epidemiologija karcinoma dojke.....	1
1.2. Etiologija i patogeneza karcinoma dojke.....	1
1.3. Molekularne hipoteze nastanka invazivnog raka dojke.....	2
1.4. Dijagnostika i liječenje karcinoma dojke.....	3
1.5. Histomorfološka klasifikacija karcinoma dojke.....	7
1.6. Molekularna (genska) klasifikacija karcinoma dojke i imunohistokemijski surogati.....	8
1.6.1. Imunohistokemijski profil tumora.....	8
1.6.2. Molekularni (multigenski) profil tumora.....	9
1.7. Prognostička i prediktivna vrijednost imunohistokemijskih markera u ER+ i ER- raku dojke.....	10
1.8. Tumorska stroma i tumoru pridružen imunosni infiltrat potencijalni su izvor novih prognostičkih i prediktivnih markera.....	12
1.9. Imunosni odgovor organizma na tumor.....	13
1.10. Terminacija imunosnog odgovora fiziološkim mehanizmima negativne povratne sprege i imunoregulacija posredovana imunosnim preslagivanjem u tumoru.....	15
1.10.1. Ligand receptora programirane stanične smrti (PD-L1, od engl. <i>programmed cell death receptor 1 ligand</i>).....	16
1.10.2. Regulacijski T limfociti (Treg).....	18
1.10.3. Citotoksičnom T limfocitu pridruženi protein 4 (CTLA-4, od engl. <i>cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i>).....	18
1.10.4. Dendritičke stanice u tumoru.....	19
1.11. Protein toplinskog šoka 70 (HSP70, od engl. <i>heat shock protein 70</i>).....	19
1.12. Prognostički i prediktivni značaj upalnog infiltrata u luminalnom i trostruko negativnom raku dojke.....	23

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza istraživanja.....	24
2.2. Glavni ciljevi istraživanja.....	24
2.3. Specifični ciljevi istraživanja.....	24

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici.....	26
3.2. Materijal biopsije.....	27
3.3. Metode.....	27

3.3.1. Određivanje tradicionalnih prognostičkih čimbenika.....	27
3.3.2. Oblikovanje tkivnih mikroareja (TMA, od engl. <i>tissue microarrays</i>).....	28
3.3.3. Imunohistokemijska bojenja.....	30
3.3.4. Očitavanje TIL-a i imunohistokemijskih bojenja.....	30
3.3.5. Statistička obrada podataka.....	31
3.3.6. Etički aspekti istraživanja.....	32
 4. REZULTATI	
4.1. Rezultati prve (adjuvantne) studijske kohorte.....	34
4.1.1. Kliničko-patološke karakteristike prve studijske kohorte.....	34
4.1.2. Rezultati kvantitativne i kvalitativne analize TIL-a u adjuvantnoj TN skupini.....	35
4.1.3. Odnos kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a i tradicionalnih kliničko-patoloških prognostičkih parametara u TN raku dojke.....	37
4.1.4. Međusobne korelacije TIL-a i IH ekspresije imunskih markera u TIL-u ITF i TC u TN raku dojke.....	39
4.1.5. Odnos ekspresije HSP70 proteina u imunskom infiltratu centralnog dijela tumora i tradicionalnih kliničko-patoloških prognostičkih parametara u TN raku dojke.....	41
4.1.6. Prognostički značaj kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a u TN raku dojke....	45
4.2. Rezultati druge (neoadjuvantne) studijske kohorte.....	48
4.2.1. Kliničko-patološke karakteristike druge studijske kohorte.....	48
4.2.2. Rezultati kvantitativne i kvalitativne analize TIL-a u neoadjuvantnoj LB i TN skupini.....	50
4.2.3. Odnos kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a i tradicionalnih kliničko-patoloških prognostičkih parametara u LB raku dojke.....	52
4.2.4. Međusobne korelacije TIL-a i IH imunskih markera u TIL-u LB i TN raka dojke neoadjuvantne kohorte.....	54
4.2.5. Prediktivni značaj kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a u LB raku dojke.....	56
 5. RASPRAVA.....	62
6. ZAKLJUČCI.....	73
7. LITERATURA.....	76
 ILUSTRACIJE	
Popis slika.....	87
Popis tablica.....	88
 POPIS POKRATA.....	90
ŽIVOTOPIS.....	93

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Epidemiologija karcinoma dojke

Invazivni karcinom dojke je najčešće dijagnosticiran maligni tumor u žena (25,8 %), ali i među tri najčešća primarna sijela malignih tumora u općoj populaciji (12,5 %), s više od dva milijuna novootkrivenih slučajeva godišnje [1]. Uvođenje mamografskog populacijskog probira, bolje razumijevanje biologije bolesti i otkriće novih učinkovitih lijekova unaprijedili su prognozu oboljelih, pa kumulativna 10-godišnja stopa ukupnog preživljenja u razvijenim zemljama doseže 70 – 80 % [2]. Razlike u mortalitetu na globalnoj razini prvenstveno odražavaju razlike u dostupnosti programa mamografskog populacijskog probira, specifične ciljne terapije i multidisciplinarnih centara koji osiguravaju optimalno multidimenzionalno zbrinjavanje oboljelih u svim stadijima bolesti i svim etapama liječenja [3]. Individualne razlike u prognozi reflektiraju biološku heterogenost bolesti. Karcinom dojke je zajednički naziv za cijeli spektar tumora koji se razvijaju u mliječnoj žlijezdi, s različitim morfološkim, molekularnim i kliničkim karakteristikama, različitim odgovorom na terapiju i različitim prognozom. Suvremeni personalizirani pristup u liječenju karcinoma dojke omogućuje identifikacija čimbenika temeljem kojih se oboljele može klasificirati u različite prognostičke i/ili prediktivne skupine i/ili čimbenika koji su molekularni markeri za specifičnu ciljanu antineoplastičnu terapiju.

1.2. Etiologija i patogeneza karcinoma dojke

Etiologija raka dojke je multifaktorijalna. Identificirani su brojni čimbenici rizika za nastanak raka dojke [4], a važnost svakog pojedinog određena je mjerom relativnog rizika (RR). RR predstavlja omjer stope oboljelih u populaciji izloženoj rizičnom čimbeniku i stope oboljelih u neizloženoj populaciji. Najznačajniji rizični čimbenik je ženski spol s RR 100. U čimbenike visokog rizika ($RR > 4$) spadaju starija životna dob (> 65 godina), osobna anamneza raka dojke, proliferativne lezije dojke s atipijom, terapijsko zračenja prsnog koša i naslijeđene visokorizične mutacije gena BRCA 1 i 2, TP53, PTEN, STK11 i CDH1. Ovdje treba naglasiti da se na hereditarni rak dojke s dokazanom naslijeđenom visokorizičnom genskom mutacijom odnosi tek 5 – 10 % slučajeva, odnosno da je sporadični rak dojke znatno učestaliji (85 %). Iako i pozitivna obiteljska anamneza za rak dojke također predstavlja rizični čimbenik, bez dokazane visokorizične genske mutacije RR je znatno manji (1,5 – 2), ali se povećava porastom broja zahvaćenih rođaka i/ili mlađom životnom dobi oboljelog srodnika. Ostali čimbenici rizika s RR manjim od 4 povezani su s povišenom izloženosti estrogenu (rana menarha, kasna menopauza, prva

trudnoća u starijoj životnoj dobi, uzimanje oralnih kontraceptiva i hormonske nadomjesne terapije), nedostatnom fizičkom aktivnosti, konzumacijom alkohola i pretilošću.

1.3. Molekularne hipoteze nastanka invazivnog raka dojke

Rak nastaje višestrukim oštećenjima na razini DNA, pri čemu stanica dobiva nove biološke osobine koje omogućuju proces karcinogeneze. Prema Hanahan i Weinbergu te su biološke osobine zajedničke svim karcinomima (*hallmarks of cancer*), a različiti ih tipovi tumora stječu na različite načine i u različitom trenutku tumorogeneze [5, 6, 7]. Genska nestabilnost i upala koja promovira tumorogenezu u podlozi su svih temeljnih bioloških obilježja karcinoma; neregulirane produkcije i otpuštanja mitogenih signala, izbjegavanja negativne kontrole proliferacije (izbjegavanja inhibitora rasta), inhibicije apoptoze, deregulacije staničnog metabolizma, izbjegavanja imunskog odgovora, neograničenog potencijala diobe (besmrtnost), indukcije angiogeneze, invazivnosti i metastaziranja. Prema ovom konceptu karcinom se razvija iz stanice koja je nasumičnom mutacijom (aktivacijom protoonkogeni ili inaktivacijom tumorsupresorskog gena) stekla prednost i nekontrolirano proliferira. Genska nestabilnost osigurava ovim proliferirajućim stanicama da u daljnjem tijeku onkogeneze akumuliraju dodatne mutacije koje će im omogućiti stjecanje ostalih bioloških osobina potrebnih za razvoj tumora, a promjene u stromalnim stanicama pridruženim tumoru osigurat će suportivni mikrookoliš za rast i progresiju tumora.

Prema hipotezi sporadične klonalne selekcije bilo koja epitelna stanica dojke s nasumičnom mutacijom može biti ishodišna u inicijaciji raka dojke, a naknadne pridružene genske mutacije i epigenetičke promjene dat će prednost progresiji određenog klona tijekom procesa tumorogeneze. Alternativna hipoteza ističe da su isključivo bipotentne mamarne matične stanice i multipotentne progenitorske stanice ishodišne u nastanku i progresiji karcinoma dojke [8]. Treća teorija povezuje obje i sugerira da su progenitorske luminalne stanice ishodišne stanice za nastanak svih podtipova raka dojke, ali da finalni tumorski podtip dominantno određuju pridružene genske mutacije akumulirane tijekom evolucije tumora, a ne karakteristike ishodišne stanice [9, 10].

Molekularne studije su pridonijele boljem razumijevanju onkogeneze karcinoma dojke. Pokazale su da se najznačajnije molekularne promjene na razini genske ekspresije u epitelnim i neepitelnim komponentama tumora događaju u premalignim lezijama i bez značajnijih alteracija prenose kroz više stadije bolesti. Također su ukazale na dva divergentna molekularna puta u nastanku invazivnog karcinoma dojke koja su snažno povezana sa stupnjem diferencijacije i s molekularnim profilom tumora [9]. Morfološke, epidemiološke, imunohistokemijske, genske i transkriptomске studije podupiru ovu teoriju prema kojoj su ravna epitelna atipija (FEA), atipična duktalna hiperplazija (ADH), duktalni karcinom in situ (DCIS) i invazivni duktalni karcinom niskog gradusa te atipična lobularna hiperplazija (LIN I), in situ lobularni karcinom (LIN II-III) i invazivni lobularni karcinom na jednom evolucijskom (molekularnom)

kontinuumu, a mikroglandularna adenoza, DCIS visokog gradusa i invazivni duktalni karcinom visokog gradusa na drugom evolucijskom kontinuumu. Pritom među pojedinim stadijima istog molekularnog puta nema značajnijih promjena genske ekspresije. Budući da tumori niskog i visokog gradusa imaju pridružene različite genske mutacije, ove opservacije ujedno negiraju teoriju linearne klonalne evolucije u razvoju tumora visokog gradusa iz tumora niskog gradusa, odnosno u razvoju agresivnijih molekularnih podtipova raka dojke iz onih manje agresivnih.

1.4. Dijagnostika i liječenje karcinoma dojke

Suvremena dijagnostička obrada pacijenta sa sumnjom na dijagnozu raka dojke utemeljena je na tzv. trostrukoј evaluaciji (engl. *triple assessment*); kliničkom pregledu dojki i pazušnih jama, radiološkoј (mamografskoј i sonografskoј) procjeni dojki i regionalnih limfnih čvorova i patohistološkoј potvrdi dijagnoze na uzorku tkiva dobivenom širokoiglenom biopsijom dojke. Histološka potvrda dijagnoze i određivanje kliničkog prognostičkog stadija bolesti nezaobilazni su inicijalni koraci prilikom planiranja bilo kakvog liječenja.

Klinički i patološki TNM sustav kategorizira bolesnike s histološki potvrđenim rakom dojke u četiri osnovne, različite anatomske prognostičke skupine [11, 12]. Anatomski stadij bolesti određen je različitim kombinacijama tri prognostički značajna čimbenika; veličinom primarnog tumora (T), statusom regionalnih limfnih čvorova (N) i prisustvom ili odsustvom udaljenih metastaza (M).

U svrhu određivanja primarnog cilja liječenja, optimalnog terapijskog algoritma, opsega kirurškog zahvata u dojci i pazušnoj jami i radioterapijskog plana u svakodnevnoj se kliničkoј praksi koristimo pojednostavljenom kliničkom klasifikacijom. Ova je klasifikacija također utemeljena na TNM statusu i kategorizira pacijente u pet osnovnih skupina; in situ bolest (Tis), rani operabilni rak dojke (T1-2 N0 M0), lokalno uznapredovali operabilni rak dojke (T3, N1), lokalno uznapredovali inoperabilni rak dojke (T4, N2-3) i metastatski rak dojke (M1). U metastatskom stadiju bolesti, gdje su primarni ciljevi liječenja prevencija daljnje progresije (stabilizacija) bolesti i palijacija simptoma, sistemsko onkološko liječenje je temeljni modalitet liječenja. U svim ostalim stadijima primarni cilj liječenja je eradicacija maligne bolesti, koja se nastoji postići kombinacijom lokoregionalnog i sistemskog tretmana [13]. Pritom klinički stadij bolesti determinira optimalni inicijalni modalitet liječenja. Za in situ i rani operabilni stadij raka dojke liječenje započinje kirurškim zahvatom u dojci i pazušnoj jami, najčešće uz adjuvantno zračenje zahvaćene dojke i područja regionalne limfne drenaže i sistemsko onkološko liječenje. Inoperabilni lokalno uznapredovali stadij bolesti nalaže drugačiji terapijski algoritam. Preoperativnom (neoadjuvantnom) sistemskom terapijom nastoji se bolest konvertirati u niži stadij kako bi se omogućio ili olakšao kirurški zahvat u dojci i pazušnoj jami. U novije vrijeme neoadjuvantni pristup se preporuča i u operabilnim stadijima bolesti, osobito kada je riječ o biološki agresivnijim podtipovima karcinoma dojke

[14]. Međutim, u ovoj skupini konverzija u niži stadij bolesti radi smanjenja opsega kirurškog zahvata nije jedini cilj liječenja. Istraživanja su pokazala da odgovor tumora na neoadjuvantnu terapiju ima visok stupanj korelacije s prognozom pacijenata [15]. Validiran je sustav bodovanja koji temeljem preostale bolesti u dojci i regionalnim limfnim čvorovima nakon neoadjuvantne kemoterapije (NAKT) izračunava kontinuirani skor rezidualnog opterećenja tumorom (RCB score, od engl. *residual cancer burden score*) [16] na način prikazan na Slici 1.

* ¹ U sva polja treba upisati vrijednosti kako bi izračunati rezultati bili točni	
(1) Ležište primarnog tumora	
Područje ležišta primarnog tumora	(mm) X (mm)
Ukupna celularnost tumora	(%)
Udio in situ komponente u tumoru	(%)
(2) Limfni čvorovi	
Broj pozitivnih limfnih čvorova	
Dijametar najveće metastaze	(mm)
Poništi Izračunaj	
RCB skor	
RCB grupa	

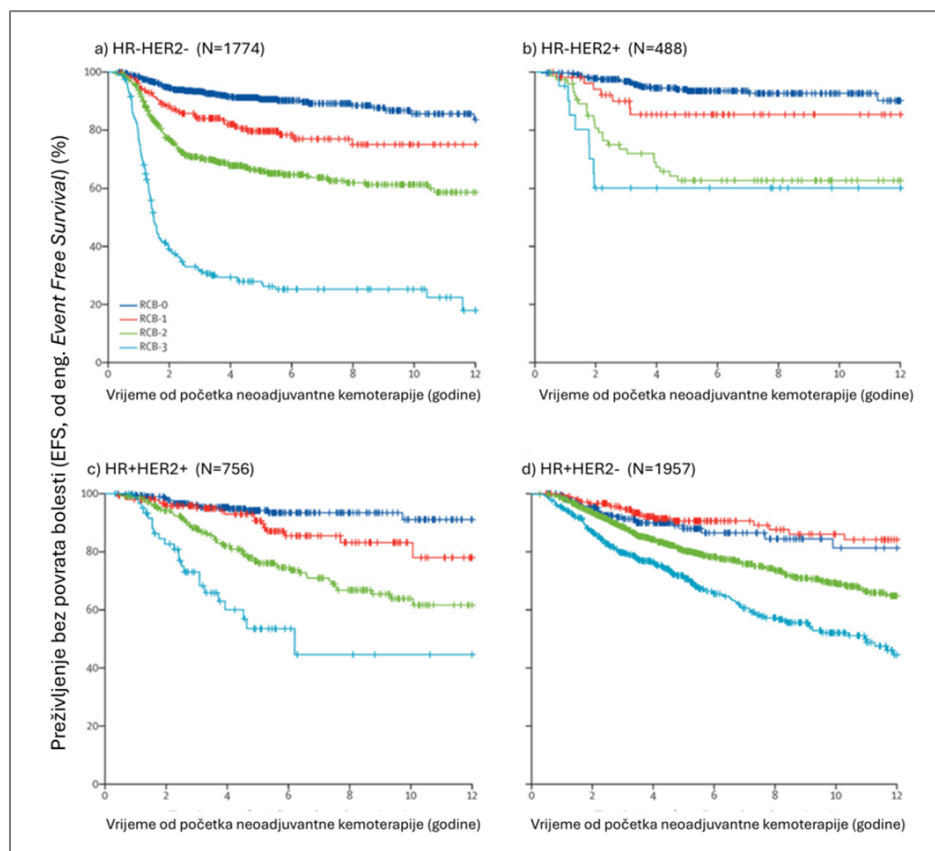
Slika 1. MD Anderson RCB online kalkulator izračunava kontinuirani skor rezidualnog opterećenja tumorom (RCB, od engl. *Residual Cancer Burden*) i RCB grupu temeljem veličine rezidualnog tumorskog ležišta u dojci, celularnosti ostatnog tumora, udjela in situ komponente u tumoru, broja metastatski promijenjenih limfnih čvorova i veličine najveće metastaze nakon neoadjuvantne kemoterapije.

Slika preuzeta i adaptirana s <https://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert3> [16].

Autorska prava pripadaju Upravnom odboru Sveučilišnog sustava u Teksasu i koriste se uz odobrenje MD Anderson Centra za Rak Sveučilišta u Teksasu.

Na temelju RCB skora sve se bolesnike nakon NAKT može kategorizirati u četiri prognostički različite skupine RCB 0-RCB 3. Pritom RCB 0 predstavlja kompletni patološki odgovor (pCR) u dojci (ypT0/ypTIS) i regionalnim limfnim čvorovima (yp0), a viši skor parcijalni odgovor (RCB 1, RCB 2) ili izostanak odgovora na provedeno sistemsko liječenje (RCB 3). Znanstveno je potvrđena snažna povezanost između RCB skupina i prognoze pacijenata, osobito onih s trostruko negativnim (TN) tumorima i tumorima koji pojačano izražavaju receptor humanog epidermalnog faktora rasta (HER2+, od

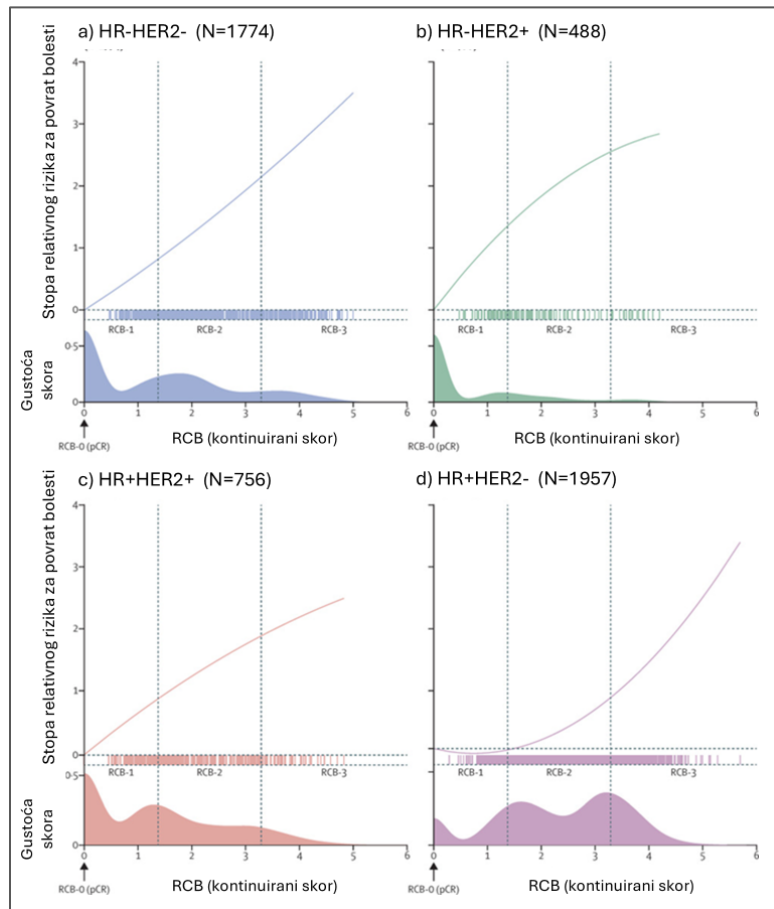
engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), prikazano grafovima a-c na Slici 2 [15]. Pritom je RCB 0 skupina povezana s najboljim, a RCB 3 skupina s najlošijim onkološkim ishodima pacijenata. I u ER+HER2- raku dojke različite su RCB grupe povezane s različitom prognozom pacijenata (Slika 2/d). Iako su između RCB 0 i RCB 1 skupina detektirane minimalne razlike, što se pripisuje povoljnom učinku adjuvantne endokrine terapije na mali opseg rezidualne bolesti, za pacijente RCB 2 i RCB 3 skupina ishodi liječenja su evidentno lošiji.



Slika 2. Krivulje preživljenja bez povrata bolesti (EFS, od engl. event free survival) stratificirane prema RCB grupama za a) TN rak dojke, b) ER-HER2+ rak dojke, c) ER+HER2+ rak dojke i d) ER+HER2- rak dojke. Za razliku od TN i HER2+ raka dojke (a-c), u ER+HER2- skupini (d) gotovo da nema razlike u EFS krivuljama između pacijenata RCB 0 i RCB 1 grupe. Međutim, EFS je značajno lošiji kod pacijenata RCB 2 i RCB 3 skupine. Pokrate: ER = estrogen receptor, HER2 = receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (od engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), TN = trostruko negativni, RCB = rezidualno opterećenje tumorom (od engl., *residual cancer burden*)

Slika preuzeta i adaptirana iz: Yau C, Osdoit M, van der Noordaa M, Shad S, Wei J et al. Residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy and long-term survival outcomes in breast cancer: a multicentre pooled analysis of 5161 patients. *Lancet Oncol.* 2022 Jan; 23(1):149-160. [15] Licenca za korištenje: Creative Commons Attribution – NonCommercial – NoDerivs (CC BY-NC-ND 4.0)

Za razliku od TN i HER2+ raka dojke, među kojima više od 50 % pacijenata liječenih neoadjuvantnom kemoterapijom postiže pCR (RCB 0) (Slika 3/a-c), u skupini pacijenata s ER+HER2- rakom dojke taj je udio značajno manji, odnosno najveći broj pacijenata ima tek djelomičan odgovor (RCB 1-2) ili uopće nema odgovor na NAKT (RCB 3) (Slika 3/d).



Slika 3. Raspodjela pacijenata prema RCB skoru i rizik povrata bolesti kao funkcija RCB skora za a) TN rak dojke, b) ER-HER2+ rak dojke, c) ER+HER2+ rak dojke i d) ER+HER2- rak dojke

U gornjem dijelu svake slike grafički je prikazan rizik povrata bolesti kao funkcija RCB skora, a u donjem dijelu raspodjela pacijenata prema RCB skoru za svaki podtip raka dojke. U komparaciji s trostruko negativnim i HER2+ rakom dojke, u ER+HER2- raku dojke značajno je manji udio pacijenata u RCB 0 i RCB 1 grupi.

Pokrate: ER = estrogen receptor, HER2 = receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (od engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), TN = trostruko negativni, RCB = rezidualno opterećenje tumorom (od engl., *residual cancer burden*)

Slika preuzeta i adaptirana iz: Yau C, Osdoit M, van der Noordaa M, Shad S, Wei J et al. Residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy and long-term survival outcomes in breast cancer: a multicentre pooled analysis of 5161 patients. *Lancet Oncol.* 2022 Jan; 23 (1):149-160. [15] Licenca za korištenje: Creative Commons Attribution – NonCommercial – NoDerivs (CC BY-NC-ND 4.0)

Kod bolesnica s operabilnim rakom dojke histološka potvrda dijagnoze i određivanje TNM statusa više nisu dostatni za određivanje optimalnog plana liječenja, već je potrebno uzeti u obzir i druge prognostičke i prediktivne čimbenike poput histološkog tipa i histološkog gradusa diferencijacije (G), indeksa proliferacije (Ki67), statusa estrogenih (ER), progesteronskih (PR) i HER2 receptora. Određivanje tih biomarkera ključno je i za odabir optimalnog modaliteta sistemske terapije. Suvremeno patohistološko izvješće predstavlja sveobuhvatnu sinoptičku histološku (morfološku) i molekularnu gensku ili imunohistokemijsku (IH) karakterizaciju tumora, odnosno temelj za donošenje optimalnog plana liječenja.

1.5. Histomorfološka klasifikacija karcinoma dojke

Histološka (morfološka) karakterizacija karcinoma dojke ima ključnu ulogu u dijagnostici raka dojke i temelj je svih ostalih sustava klasifikacije jer predstavlja histološku potvrdu (dijagnozu) primarnog tumora dojke. Temelji se na evaluaciji citoloških i arhitekturnih karakteristika proliferirajućih tumorskih stanica i tumorske strome na hematoksilin-eozin (HE) obojanim rezovima uz dodatak specifičnih IH bojanja u slučajevima u kojima su neizostavna za postavljanje histološke dijagnoze. Primarni maligni tumor dojke u većini se slučajeva razvija iz epitelnih stanica terminalne duktalno-lobularne jedinice (karcinom), odnosno u tek jedan posto slučajeva potječe iz stromalnih elemenata dojke (sarkom). Proliferativne lezije s atipijom stanica i intraduktalni in situ karcinom neobligatorni su prekursori invazivnog karcinoma dojke, razvijaju se unutar kanalića ili lobulusa i imaju određeni potencijal progresije u invazivni karcinom ako se ne liječe. Za razliku od preinvazivnih lezija, invazivni karcinom dojke raste i širi se izvan granica duktusa i lobulusa, urasta u okolnu stromu dojke i ima potencijal limfogenog i hematogenog širenja izvan granica dojke u regionalne limfne čvorove i udaljene organe, najčešće u kosti, jetru, pluća i mozak. Morfološkom procjenom histološkog stupnja i tipa diferencijacije invazivni se karcinom dojke može klasificirati u nekoliko biološki i klinički različitih kategorija [17, 18]. Histološki gradus (G) ili stupanj diferencijacije tumora predstavlja mjeru sličnosti između tumorskih stanica i normalnih epitelnih stanica terminalne duktalno-lobularne jedinice dojke i odražava agresivnost tumora. Određuje se semikvantitativnom evaluacijom tri morfološki značajne karakteristike; stupnjem formiranja tubula ili žlijezda, nuklearnim pleomorfizmom i proliferativnom aktivnosti tumora (brojem mitoz) [17]. Pritom su tumori niskog gradusa najslikovitiji normalnim diferenciranim stanicama i najmanje agresivni, a tumori visokog gradusa slabo diferencirani i biološki najagresivniji. Histološki tip diferencijacije tumora određuju specifične citološke i arhitekturne karakteristike tumora poput načina rasta, arhitekture i sekretorne aktivnosti te karakteristike tumorske strome. Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO klasifikacija) [19, 20] predstavlja zlatni standard histološke

klasifikacije tumora i razlikuje dva temeljna histološka tipa diferencijacije adenokarcinoma dojke; duktalni i lobularni, te dva temeljna histološka puta diferencijacije puno rjeđeg, metaplastičnog karcinoma dojke; skvamozni i mezenhimalni [21]. Invazivni duktalni karcinom nespecijalnog tipa (NST) definiran je odsustvom morfoloških karakteristika bilo kojeg specijalnog podtipa (tubularni, medularni, mucinozni, papilarni, kribriformni i dr.) i najčešći je histološki tip diferencijacije karcinoma dojke (80 %), a specijalni su podtipovi invazivnog duktalnog karcinoma puno rjeđi. Drugi po učestalosti je invazivni lobularni karcinom (10 – 15 %) koji se, zbog pridružene mutacije gena za e-kadherin, morfološki i klinički bitno razlikuje od duktalnog karcinoma; stanice su diskohezivne, raste između kanalića i ne stvara tumorsku masu pa može biti klinički i radiološki okultan i u kasnijim stadijima bolesti [22]. Iako su pojedini specijalni histološki podtipovi definirani stupnjem diferencijacije i dobro koreliraju s određenim molekularnim potpisima [23], invazivni duktalni karcinom NST predstavlja vrlo heterogenu skupinu tumora, može biti diferenciran u rasponu od niskog do visokog gradusa i može imati bilo koji molekularni potpis.

U suvremenoj kliničkoj praksi histološki tip diferencijacije ima ograničenu prediktivnu i prognostičku vrijednost, koja se donekle može poboljšati u kombinaciji s histološkim gradusom i kliničkim/patološkim TNM statusom. Međutim, klinički i histomorfološki markeri ne reflektiraju u cijelosti biološku heterogenost karcinoma dojke, jer tumori sličnog kliničkog/patološkog prognostičkog stadija i slične morfologije jako variraju u kliničkom ponašanju i odgovoru na terapiju, osobito u slučaju najzastupljenijeg histološkog tipa. Molekularne karakteristike primarnog tumora omogućavaju precizniju karakterizaciju bioloških osobina tumora i procjenu benefita određenog terapijskog protokola.

1.6. Molekularna (genska) klasifikacija karcinoma dojke i imunohistokemijski surogati

Molekularna klasifikacija invazivnog karcinoma dojke bazira se na evaluaciji gena ili/i njihovih produkata RNA i proteina, individualno ili u kombinaciji (molekularni profil tumora).

Određivanje statusa estrogenih receptora (ER), progesteronskih receptora (PR), receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2, od engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) i indeksa proliferacije (Ki67) u tumoru ima prediktivnu i prognostičku vrijednost i esencijalni je dio dijagnostičke obrade karcinoma dojke.

1.6.1. Imunohistokemijski profil tumora

U rutinskoj kliničkoj praksi najčešće se koristi imunohistokemijsko (IH) određivanje statusa ER, PR, HER2 i Ki67, pri čemu su ER i PR definirani postotkom tumorskih stanica s pozitivnim jezgrinim bojanjem, status HER2 receptora postotkom i intenzitetom membranskog bojanja, a Ki67 udjelom proliferirajućih stanica u tumoru. Kombinacija ekspresije ovih biomarkera određuje klinički fenotip

tumora, odnosno približno određuje surogat intrinzičkog (genskog) profila karcinoma dojke. Prema IH profilu svaki je karcinom dojke kategoriziran u jednu od četiri osnovne, fenotipski različite skupine, sukladno preporuci utemeljenoj 2015. godine na konsenzusu eksperata u St. Gallenu i AJCC [24, 12] na način prikazan u Tablici 1.

Tablica 1. Imunohistokemijski surogati molekularnih podtipova karcinoma dojke

IH profil	ER ekspresija	PR ekspresija	HER2	Ki67	G
LA	0 (10) – 100%	20 – 100%	-	<20%	1-2
LB	0 (10) – 100%	< 20%	-/+	≥20%	3
HER2+	0%	0%	+		
TN	0%	0%	-		

Pokrate: IH = imunohistokemijski, LA = luminalni A, LB = luminalni B, HER2 = receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (od engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), TN = trostruko negativan, ER = estrogeni receptor, PR = progesteronski receptor, G = histološki gradus diferencijacije tumora, Ki67 = indeks proliferacije

1.6.2. Molekularni (multigenski) profil tumora

Karcinom dojke je molekularno klasificiran 2000. godine analizom mRNA [25]. Profil genske ekspresije (multigenski potpis, genski portret, molekularni profil, intrinzični podtip) predstavlja jedinstveni obrazac sveukupne genske ekspresije ili ekspresije odabranog seta gena u uzorku tumora i povezan je sa specifičnim biološkim karakteristikama tumora. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke utemeljena je na analizi ekspresije nekoliko skupina gena koji su povezani s luminalnim, bazalnim i HER2 obogaćenim fenotipom te analizi gena povezanih s proliferativnom aktivnosti tumora. Razlike u obrascima ekspresije ovih gena određuju pet temeljnih intrinzičnih podtipova raka dojke; luminalni A i B, HER2 obogaćeni, bazalni i karcinom dojke sličan normalnim stanicama.

Luminalni A (LA) molekularni podtip određen je visokom ekspresijom gena za ER i PR, niskom ekspresijom proliferacijskih gena i odsutnošću izražaja ERBB2 i bazalnih gena. Ukupno 40 % svih karcinoma dojke ima ovaj molekularni profil. Klinički su to spororastući tumori koji su kemorezistentni, ali dobro odgovaraju na hormonsku terapiju i dugoročno imaju najbolju prognozu. Karcinom dojke sličan normalnim stanicama molekularno i fenotipski vrlo nalikuje luminalnom A profilu, iako ima nešto lošiju prognozu.

Luminalni B (LB) podtip odnosi se na 20 % svih karcinoma dojke koji izražavaju gene za ER. Međutim, geni za PR ne moraju biti izraženi ili su značajno slabije izraženi u odnosu na LA podtip, a proliferacijski su geni jače izraženi. Također, ovi tumori mogu izražavati i bazalne i HER2-vezane gene. Biološki su

agresivniji od LA tumora, brže rastu, često su rezistentni na standardnu hormonsku terapiju tamoksifenom i imaju lošiju prognozu.

HER2 obogaćeni tumori imaju visoku ekspresiju ERBB2 i proliferacijskih gena uz nisku ekspresiju luminalnih i bazalnih gena. Ova skupina obuhvaća 10 – 15 % svih karcinoma dojke, a karakterizira ih brzi rast i izrazito loša prognoza bez ciljane anti-HER2 terapije. HER2 obogaćeni molekularni profil nije sinonim za imunohistokemijski HER2+ fenotip, budući da 50 % tumora s HER2+ fenotipom pripada luminalnom molekularnom podtipu, a 30 % HER2 obogaćenih tumora IH nema HER2+ status unatoč amplifikaciji ERBB2 gena.

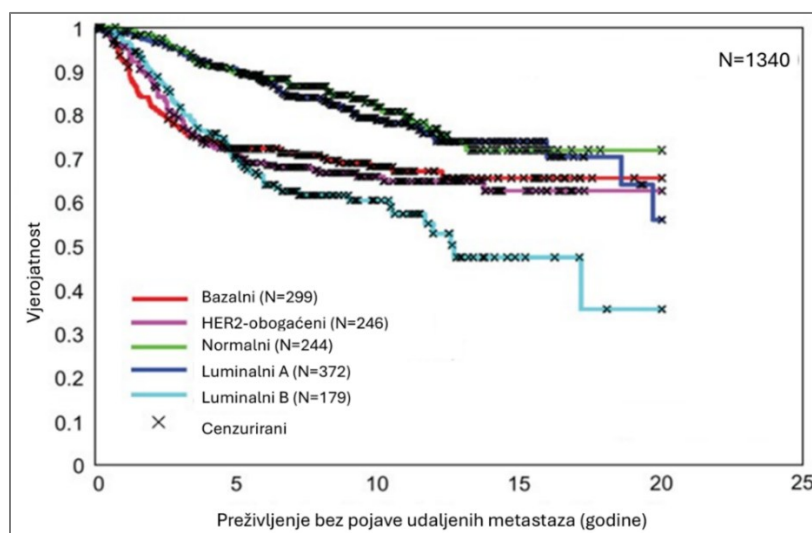
Bazalne tumore molekularno karakterizira visoka ekspresija bazalnih i proliferacijskih gena te odsustvo izražaja luminalnih i ERBB2 gena, a klinički brz rast, nedostatak specifične terapije i loša prognoza. Trostruko negativni (TN) fenotip, na koji se odnosi 20 % svih karcinoma dojke, u 60 – 90 % slučajeva korelira s bazalnim intrinzičnim podtipom. Iako su molekularno okarakterizirani i drugi, ne-bazalni podtipovi TN karcinoma dojke (claudin-low, metaplastični, mezenhimalni, interferon-obogaćeni i TN koji izražavaju androgeni receptor), ova subklasifikacija nije značajno utjecala na postojeću kliničku praksu. Nastavno na klasifikaciju prema molekularnom profilu tumora, temeljem različite ekspresije odabranog seta gena otkriveno je i nekoliko multigenskih prognostičkih i prediktivnih potpisa [26, 27, 28]. Iako sustavi koji testiraju ekspresiju više gena u teoriji imaju prednost nad sustavima utemeljenim na ekspresiji jednog gena, multigenski potpisi još uvijek nisu zamijenili tradicionalne prognostičke i prediktivne IH biomarkere u rutinskoj kliničkoj praksi.

1.7. Prognostička i prediktivna vrijednost imunohistokemijskih markera u ER+ i ER- raku dojke

Pri odabiru optimalnog modaliteta sistemske terapije u kliničkoj praksi najznačajnija je klasifikacija karcinoma dojke utemeljena na IH ekspresiji ER i HER2, kojom se tumori dojke kategoriziraju u tri različite osnovne skupine; ER+HER2-, ER-HER2+ i ER-HER2-. Dodatna klinička vrijednost genskog profiliranja nad standardnim IH određivanjem produkata pojedinih gena je vrlo ograničena jer će, bez obzira na genski profil, svi ER+ tumori dobiti hormonsku terapiju, HER2+ tumori specifičnu anti-HER2 terapiju, a TN tumori citotoksičnu kemoterapiju.

ER+ rak dojke je heterogena skupina tumora u kojima IH ekspresija ER i PR varira od 1 do 100 %, a razina ekspresije ima prognostičku i prediktivnu vrijednost. Kod tumora ovisnih o signalu proliferacije ER, hormonska terapija tamoksifenom najviše doprinosi u cjelokupnoj dobrobiti sistemske terapije. Međutim, 30 – 50 % ER+ tumora ne postiže očekivano dobar odgovor na ovaj tip terapije i identifikacija čimbenika na temelju kojih će se izdvojiti ova podskupina od izuzetnog je kliničkog značaja. Niska IH ekspresija PR može ukazivati na postojanje aberantnog signalnog puta u ER+ tumoru i na primarnu rezistenciju na hormonsku terapiju.

Gensko profiliranje raka dojke potvrdilo je da ER+ tumori imaju dva biološki različita molekularna podtipa bolesti; luminalni A i B podtip. LB rak dojke je biološki agresivnija bolest koju treba uzeti u obzir kod svih ER+ tumora dojke s ekspresijom PR < 20 % ili/i indeksom proliferacije > 20 % [24], visokim histološkim gradusom i lošim odgovorom na hormonsku terapiju. Ovi su tumori i na razini genske ekspresije bitno različiti od LA tumora, pojačano izražavaju bazalne i proliferacijske gene i imaju nisku ekspresiju gena pridruženih ER, a signal proliferacije često im ovisi o aberantnim signalnim putovima (PIK3CA, EGFR, IGF, HER2) koji amplificiraju ili zaobilaze klasični ER-ovisni mitogeni signalni put. Iako u IH klasifikaciji mogu biti HER2+, na molekularnoj razini najčešće nemaju visoku ekspresiju ERBB2 gena [29]. Unatoč mogućnosti da predstavljaju ER+/ER-neovisnu bolest i što su po molekularnom i mutacijskom profilu bliskiji bazalnom nego LA intrinzičnom tipu, u rutinskoj kliničkoj praksi još uvijek se liječe kao ER+ bolest. Međutim, onkološki ishodi pacijenata s LB tumorima značajno su lošiji od luminalne A skupine, odnosno komparabilni su, čak i lošiji od HER2+ i trostruko negativnog raka dojke. Na Slici 4. grafički su prikazane krivulje preživljenja bez pojave udaljenog recidiva, stratificirane po molekularnom podtipu raka dojke.



Slika 4. Krivulje preživljenja bez pojave udaljenih metastaza za sve molekularne podtipove raka dojke

Već u prvih pet godina krivulje se razdvajaju između pacijenata s luminalnim A i normalnim profilom tumora, koji imaju najmanje zabilježenih slučajeva progresije bolesti i tumora s HER2 obogaćenim, bazalnim i luminalnim B potpisom, koji imaju značajno više slučajeva udaljenih metastaza. Daljnjim praćenjem do ukupno 20 godina najlošiji su ishodi povezani sa skupinom luminalnih B tumora.

Pokrate: HER2 = receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (od engl. *human epidermal growth factor receptor* 2)

Slika preuzeta i adaptirana iz: Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics*. 2012; 6:289-97. [29] Licenca za korištenje: unrestricted noncommercial use

Iako izražavaju ER, LB tumori nisu tek agresivnija forma LA tumora već jedinstveni biološki podtip karcinoma dojke koji je po molekularnom i mutacijskom profilu bliskiji bazalnom nego LA intrinzičkom profilu [29, 30, 31]. Prema tome, hipoteza linearne klonalne evolucije ne objašnjava porijeklo LB tumora i vjerojatnija je hipoteza u kojoj ti tumori imaju zaseban put inicijacije i progresije [17]. I visok histološki gradus diferencijacije, koji definira LB tumore, također upućuje na to da ovi tumori ne dijele isti evolucijski put s LA tumorima.

ER- tumori nemaju benefit od hormonske terapije. Otkriće specifične ciljane anti-HER2 terapije izuzetno je unaprijedilo onkološke ishode pacijenata s HER2+ rakom dojke i svi su ostali biomarkeri u ovoj skupini od sporednog kliničkog značaja. Nasuprot tome, u ER-HER2- skupini intenzivno se i dalje istražuju mogućnosti specifične ciljane terapije, specifični prediktivni i prognostički markeri.

Unatoč velikom napretku u razumijevanju i tretmanu bolesti, TN i LB rak dojke i dalje predstavljaju izazov kliničarima i znanstvenicima diljem svijeta. Zbog agresivne biologije, nedostatka specifičnih prognostičkih i prediktivnih markera i nedostatka ciljane terapije, tumori s ovim potpisom imaju najlošiju kliničku prognozu. Otkriće novih čimbenika, na temelju kojih bi se pacijenti s LB i TN rakom dojke mogli kategorizirati u klinički relevantne prognostičke ili prediktivne skupine, značajno bi unaprijedilo liječenje ovih pacijenata.

1.8. Tumorska stroma i tumoru pridružen imunosni infiltrat potencijalni su izvor novih prognostičkih i prediktivnih markera

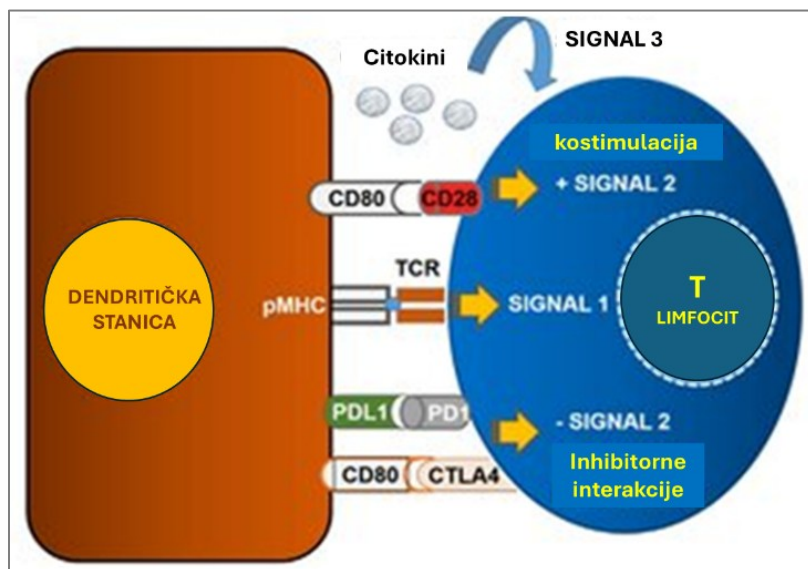
Tumor je kompleksno tkivo od više različitih staničnih linija koje međusobno komuniciraju. Stanice tumorske strome aktivni su sudionici u tumorogenezi, a geni koji upravljaju tumorogenezom u stanicama raka, posredstvom multiplih regulatornih mreža, utječu na tumorski mikrookoliš (TMO) i na oblikovanje imunosnog odgovora u tumoru [32]. Tumoru pridružen upalni infiltrat potencijalni je izvor novih prognostičkih i prediktivnih markera u imunogeničnim podtipovima raka dojke.

Tumorski infiltrat limfocita (TIL) reflektira trenutačni imunosni odgovor domaćina na tumor. S obzirom na gustoću TIL-a definirane su tri osnovne kategorije TMO-a. Imunosno pusti (hladni) tumori nemaju limfocitnog infiltrata, a imunosno topli (upalni) tumori imaju obilan upalni infiltrat u stromi i među tumorskim stanicama. U imunosno isključenim tumorima upalni je infiltrat prisutan isključivo u peritumorskoj stromi i nije u interakciji s tumorskim stanicama. Svaka od navedenih TMO kategorija surogat je specifične interakcije između genotipa tumora i imunosnog sustava domaćina. Tumori s većim mutacijskim opterećenjem imaju gušći imunosni infiltrat, ali specifičnost mutacija u tumoru određuje prirodu imunosnog odgovora [33]. U kontekstu karcinoma dojke molekularni podtip determinira specifičnost interakcija između tumorskih i imunosnih stanica, pa TIL može biti kvalitativno ili/i funkcionalno heterogen unutar iste TMO kategorije.

Većina dosadašnjih istraživanja bila je fokusirana na prognostički i prediktivni značaj upalnog infiltrata u TN i HER2+ raku dojke, jer se ER+ karcinom dojke smatrao manje imunogeničnim. Budući da i veliki broj ER+ tumora ima pridružen upalni infiltrat [34], identifikacija imunogeničnog podtipa i evaluacija značaja TIL-a u kontekstu ER+ raka dojke također bi mogli biti klinički relevantni.

1.9. Imunosni odgovor organizma na tumor

U ranom stadiju bolesti TIL predstavlja specifični imunosni odgovor domaćina protiv stanica raka, u kojem ključnu ulogu imaju citotoksični CD8+ T limfociti (CTL). Za aktivaciju učinkovitog odgovora CTL potrebna je pravovremena integracija tri molekularna signala na način prikazan shematski na Slici 5. [35].



Slika 5. Imunosna sinapsa između antigen prezentirajuće dendritičke stanice i T limfocita

Za učinkovitu aktivaciju T limfocita potrebna je pravovremena integracija tri molekularna signala. Prvi je signal posredovan vezanjem specifičnog staničnog receptora T limfocita (TCR, od engl. *T cell receptor*) i antigenskog peptida (p) izloženog na membrani dendritičke stanice u kompleksu s MHC molekulom. Drugi, kostimulacijski signal osigurava vezanje kostimulacijskih molekula porodice B7 (CD80 i CD86) na dendritičkoj stanici i CD28 na T limfocitu, a treći signal dolazi iz okoliša i posredovan je citokinima. Inhibitorne molekule PD-L1 i CTLA-4 različitim mehanizmima interferiraju sa signalima aktivacije T limfocita.

Pokrate: MHC = glavni sustav tkivne podudarnosti (od engl. *Major histocompatibility complex*), p = proteinski antigen

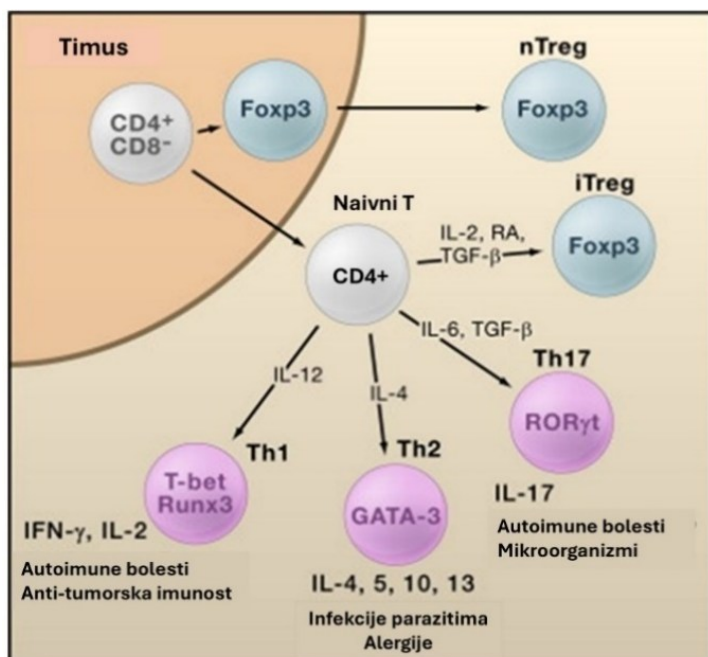
Slika preuzeta i adaptirana iz: Arasan H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, Escors D. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*. 2017 Apr 19; 8(31):51936-51945. [35] Licenca za korištenje: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Na molekularnoj razini signal TCR provodi se kaskadnom aktivacijom kinaza koje u konačnici aktiviraju gene za proliferaciju, diferencijaciju, mobilnost, preživljavanje i efektorske funkcije T limfocita.

Stimulacija antigenom u odsutnosti kostimulacijskog signala rezultirat će imunosnom tolerancijom, odnosno perifernom diferencijacijom regulacijskih T limfocita, anergijom ili apoptozom CD8⁺ T limfocita. Treći signal dolazi iz okoliša i dodatno pojačava, modificira ili utišava odgovor efektorskih T limfocita, a posredovan je citokinima koje luče aktivirane dendritičke stanice (DC, od engl. *dendritic cell*), odnosno aktivirani pomoćnički CD4⁺ Th1/2/17 i regulacijski T limfociti u kasnijoj fazi imunosnog odgovora.

Aktivaciji specifičnog imunosnog odgovora prethodi aktivacija stanica prirođenog imunosnog sustava. U antitumorskoj imunosti dendritičke stanice predstavljaju sponu između prirođenog i specifičnog imunosnog odgovora. Nezrele DC u TMO fagocitiraju promijenjene tumorske stanice, prerađuju tumorske antigene peptide i vežu ih u komplekse s MHC molekulama. Pod utjecajem molekularnih signala opasnosti (DAMPs, od engl. *danger associated molecular patterns*) koji potječu direktno iz TMO i proupalnih citokina, DC se aktiviraju i sazrijevaju. Zrele DC imaju manji kapacitet fagocitoze, ali u membrani pojačano izlažu komplekse antigenskih peptida i MHC molekula, kostimulacijske molekule i kemokinski receptor CCR7. Posljednji olakšava migraciju zrelih DC u drenažne limfne čvorove i osigurava bliski kontakt s naivnim CD4⁺ i CD8⁺ T limfocitima potreban za aktivaciju istih prethodno opisanim mehanizmom (Slika 5.). Aktivacija naivnog CD8⁺T limfocita rezultira proliferacijom specifičnog efektorskog i memorijskog klona CTL. Kod aktivacije naivnih CD4⁺ T limfocita, citokini iz okoliša usmjeravaju diferencijaciju klona u jedan od pomoćničkih (Th, od engl. *T helper*) ili regulacijski (Treg) fenotip na način prikazan shematski na Slici 6. Aktivirani efektorski i memorijski CD4⁺ i CD8⁺ T limfociti potom migriraju u TMO gdje obavljaju svoje izvršne funkcije. Izvršna uloga CTL posredovana je molekulama koje imaju citolitički i proapoptotički učinak na tumorske stanice, a koje prethodno aktivirani CTL otpuštaju nakon prepoznavanja specifičnog tumorskog antigena.

U ranom stadiju maligne bolesti TIL je proupalnog profila i ima antitumorski učinak. Međutim, u daljnjem tijeku tumorogeneze dolazi do kvantitativnih i kvalitativnih promjena TIL-a u odnosu na rani stadij. Slabije imunogenične tumorske stanice, koje imunosni sustav nije uspio prepoznati i/ili uništiti ne potiču novi antitumorski odgovor i moduliraju postojeći upalni odgovor. Povećanom ekspresijom inhibitornih molekula na tumorskim stanicama, upalnim i stromalnim stanicama, TIL postepeno poprima imunosupresivna obilježja. Fiziološki mehanizmi negativne povratne sprege, koji osiguravaju imunosnu homeostazu i koji se aktiviraju paralelno s aktivacijom imunosnog odgovora, brz rast tumora i sposobnost tumorskih stanica da mijenjaju imunosni odgovor u svoju korist omogućuju tumoru bijeg od imunosnog nadzora, a zatim progresiju i metastatsko širenje odbjeglog malignog klona.



Slika 6. Citokinima regulirana diferencijacija CD4+ T limfocita

U aktivaciji naivnih CD4+ limfocita citokini iz okoliša aktiviraju transkripcijske faktore T-bet ili Runx3, GATA3, ROR γ t i FOXP3 koji usmjeravaju diferencijaciju klona u pomoćnički (Th1, Th2, Th17) ili regulacijski fenotip (Treg).

Pokrate: nTreg = prirodni regulacijski T limfociti (od engl. *natural*), iTreg = inducirani (periferni) regulacijski T limfociti, RA = retinoična kiselina (od engl. *retinoic acid*)

Slika preuzeta i adaptirana iz: Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30; 133(5):775-87. [40] uz odobrenje Elsevier.

Autorska prava (2025), Elsevier (<http://www.sciencedirect.com/science/journal/cell>)

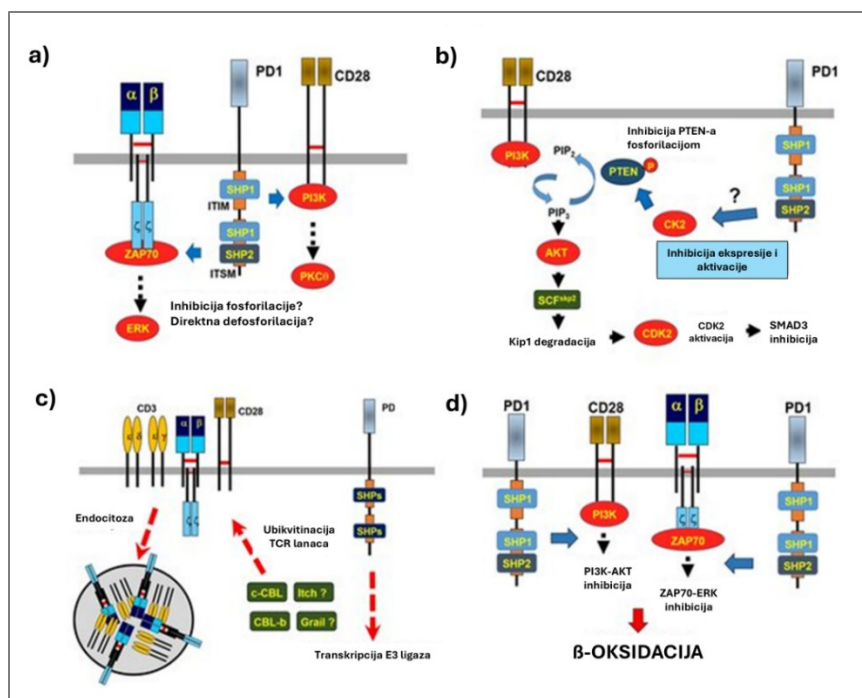
1.10. Terminacija imunskog odgovora fiziološkim mehanizmima negativne povratne sprege i imunoregulacija posredovana imunskim preslagivanjem u tumoru

Nekoliko proteina i imunskih stanica dosadašnjim istraživanjima je već povezano s procesom imunskog uređivanja (od engl. *immunoediting*), bijega tumora imunskom sustavu i progresijom raka; članovi B7 porodice kosignalnih molekula PD-L1 (od engl. *programmed cell death receptor 1 ligand*) i CTLA-4 (od engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*), regulacijski T limfociti (Treg, od engl. *regulatory T lymphocyte*), imunosupresivne stanice mijeloidnog porijekla (MDSC, od engl. *myeloid-derived suppressor cell*), toleragene dendritičke stanice (TolDC) i alternativno aktivirani makrofagi M2 polarizacije pridruženi tumoru (TAMs, od engl. *tumour associated macrophages*).

1.10.1. Ligand receptora programirane stanične smrti (PD-L1, od engl. *programmed cell death receptor 1 ligand*)

Receptor programirane stanične smrti PD-1 (od engl. *programmed cell death receptor 1*) pripada porodici transmembranskih receptora, a izražavaju ga T i B limfociti i prirodno ubilačke (NK, od engl. *natural killer*) stanice. PD-L1, specifični ligand PD-1 receptora, član je B7 porodice kosignalnih molekula koje izražavaju brojne imunosne stanice, ali također i stanice raka i tumorske strome. Vezanje PD-L1 na PD-1 receptor T limfocita snažno antagonizira CD80-CD28 kostimulacijski signal i interferira sa signalnim putem aktivacije naivnog T limfocita. Aktivacija PD-1 signala u već aktiviranom, efektorskom T limfocitu dovodi do prekida signala TCR, inhibicije signala proliferacije i pokretanja programa apoptoze ili pak do metaboličkog reprogramiranja limfocita koji time poprimaju karakteristike memorijskih T stanica. PD1-ovisni inhibitorni mehanizmi u T limfocitu prikazani su shematski na Slici 7./a-d. Dugotrajno vezanje PD-L1 za PD-1 receptore limfocita u TMO rezultira internalizacijom TCR i nemogućnošću pokretanja specifičnog citotoksičnog odgovora na tumorske antigene, odnosno do iscrpljivanja T limfocita i periferne tolerancije [35].

Povišena ekspresija gena za PD-L1 na razini mRNA povezana je s povišenom ekspresijom proupalnih gena, marker je aktivacije CTL i nije povezana s lošijim ishodima pacijenata [36]. Međutim, IH ekspresija PD-L1 molekule u citoplazmi i membrani imunosnih stanica, kao i u membrani stanica karcinoma dojke povezana je s nižom ekspresijom hormonskih receptora, visokim proliferacijskim indeksom, visokim histološkim gradusom, visokim udjelom TIL-a, kraćim periodom remisije i lošijim preživljenjem pacijenata [37, 38, 39].



Slika 7. PD1-ovisni inhibitorni mehanizmi u T limfocitu

a) Direktni inhibitorni mehanizam signala TCR posredovan je privlačenjem SHP1 i SHP2 fosfataze koje inhibiraju aktivnost ZAP70 i PI3K kinaza, što rezultira prekidom intracelularnog signala aktivacije T limfocita. b) Indirektni inhibitorni mehanizam signala TCR i proliferacije T limfocita posredovan je regulacijom ekspresije i aktivnosti CK2. Lijevo na slici je prikazan PI3K-ovisan signalni put koji dovodi do aktivacije CDK2 i inhibicije SMAD3. Ovaj je signalni put negativno reguliran PTEN fosfatazom koja degradira PIP3. Tijekom aktivacije TCR, CK2 fosforilira PTEN i inhibira njezinu aktivnost. PD-1 signal inhibira ekspresiju i aktivnost CK2 i rezultira aktivacijom PTEN, degradacijom PIP3 i prekidom nizvodnog signala aktivacije AKT. c) Regulacija ekspresije TCR na površini PD-1 signalom posredovana je povišenom ekspresijom E3 ubikvitinske ligaze porodice CBL, koja ubikvitinira TCR lance i PI3K, što ima za posljedicu internalizaciju TCR, a T stanica više ne može odgovoriti na antigenu stimulaciju. d) PD-1 signal mijenja metabolizam T stanice iz glikolize u β-oksidaciju, pa T limfociti metabolički nalikuju dugoživućim memorijskim stanicama. Ovo je posredovano inhibicijom ZAP70-ERK i PI3K-AKT aktivnosti.

Pokrate: TCR = T stanični receptor, od engl. *T cell receptor*; PD-1, od engl. *programmed cell death receptor 1*; PIP₂, od engl. *phosphatidylinositol (4,5) – biphosphate*; PIP₃, od engl. *phosphatidylinositol (3,4,5) – trisphosphate*; CK2, od engl. *casein kinase 2*; PI3K, od engl. *phosphoinositide 3 kinase*; CDK2, od engl. *cyclin dependent kinase 2*; SHP1/SHP2 = fosfataze s SH1/SH2 domenom; SMAD3 = porodica proteina za intracelularni prijenos signala; PTEN, od engl. *phosphatase and tensin homolog*; ZAP70, od engl. *zeta-chain-associated protein kinase 70*; ERK, od engl. *extracellular signal-regulated kinase*; AKT = protein kinaza B (serin-treonin kinaza)

Slika preuzeta i adaptirana iz: Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*. 2017 Apr 19;8(31):51936-51945. [35] Licenca za korištenje:

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

1.10.2. Regulacijski T limfociti (Treg)

Regulacijski T limfociti (nazvani i Treg) predstavljaju imunosupresivnu skupinu T limfocita, čije su osnovne fiziološke uloge održavanje imunosne nereaktivnosti na vlastite antigene i modulacija intenziteta imunosnog odgovora. Prirođeni Treg razvijaju se u timusu i tipično su locirani u drenažnim limfnim čvorovima gdje se aktiviraju na specifični antigen posredstvom DC-a, a zatim proliferiraju i migriraju u područje upale zajedno s efektorskim T limfocitima i kontroliraju njihovu funkciju. Za razliku od efektorskih T limfocita, za aktivaciju Treg potrebna je manja količina antigena, pa ih mogu aktivirati već i nezrele DC s niskom ekspresijom MHC kompleksa i CD80 molekula [40]. Specifični biomarker ovih stanica, FOXP3 (od engl. *forkhead box protein 3*) transkripcijski faktor glavni je regulacijski i razvojni čimbenik Treg koji kontrolira izražaj CD25 (IL2-R) i CTLA-4 molekula i smanjuje produkciju proupalnih citokina IL2, INF γ i IL4. Naivni FOXP3- CD4⁺ T limfociti na periferiji mogu poprimiti FOXP3 ekspresiju i regulacijsku funkciju pod utjecajem TGF β i IL2. U fiziološkim se uvjetima 10 – 15 % perifernih CD4⁺ T limfocita diferencira u Treg, a pod utjecajem imunosupresivnog TMO udio Treg raste. Inhibicija imunosnog odgovora regulacijskim T limfocitima posredovana je različitim mehanizmima; sekrecijom imunosupresivnih citokina IL10, TGF β i IL35, ubijanjem efektorskih T limfocita i NK stanica granzim i perforin ovisnim mehanizmom, isporukom negativnog signala koji inhibira proliferaciju T limfocita i sekreciju proupalnih citokina, funkcionalnom inaktivacijom antigen prezentirajućih dendritičkih stanica CTLA-4 molekulom i konzumacijom IL2 iz okoliša receptorom visokog afiniteta, pri čemu nedostatak IL2 pokreće program apoptoze u efektorskim T limfocitima [41].

Najznačajniji imunosupresivni mehanizmi djelovanja Treg očituju se u inhibiciji prvog kontakta naivnih CD8⁺T limfocita s antigenom i njihove specifične aktivacije (engl. *priming*) te u inhibiciji efektorske citotoksične funkcije prethodno aktiviranih CD8⁺T stanica, CD4⁺Th1 stanica i NK stanica.

Visoki je udio Treg u TIL-u povezan s mutacijom TP53 gena, s višom ekspresijom PD-L1 i CTLA-4 gena u ER⁺ i TN raku dojke te s nižom stopom pCR u TN raku dojke [42].

1.10.3. Citotoksičnom T limfocitu pridruženi protein 4 (CTLA-4, od engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*)

CTLA-4 molekula kompetitivni je inhibitor CD28 kostimulacijske molekule s jačim afinitetom vezanja za CD80/CD86 kostimulacijske receptore DC. Konvencionalni T limfociti u membrani konstitutivno izražavaju CD28, a CTLA-4 je lokalizirana intracelularno. Mehanizmom negativne povratne sprege, kojom se fiziološki regulira intenzitet imunosnog odgovora, 48 sata nakon signala aktivacije limfocita intracelularni se CTLA-4 lokalizira u membrani. Veza između CTLA-4 i CD80/CD86 ne aktivira nikakav intracelularni signalni put, odnosno učinak vezivanja je isključivo ekstrinzični [43]. Budući da jačim afinitetom veže B7 kostimulacijske receptore, smanjuje dostupnost veznih mjesta za CD28 i time

onemogućava kostimulacijski signal, esencijalan za aktivaciju naivnih T limfocita. Nasuprot konvencionalnim limfocitima, CTLA-4 je konstitutivno izražena u membrani FOXP3⁺Treg pa za imunosupresivni učinak posredovan ovom molekulom nije potrebna njihova prethodna aktivacija. Dugotrajno vezanje CTLA-4 i CD80/CD86 rezultira internalizacijom kostimulacijskih receptora u Tregs, a DC postaju tolerogene budući da više ne mogu aktivirati konvencionalne T limfocite [44, 45].

1.10.4. Dendritičke stanice u tumoru

Dendritičke stanice monocitnog porijekla (CD11c⁺ mDC) posljednja su stanična komponenta TMO u našem istraživanju. U nefiziološkim uvjetima poput maligne bolesti većina se tumorskih DC i tumoru pridruženih makrofaga (TAMs) diferencira iz cirkulirajućih monocita periferne krvi. CD11c⁺ mDC mogu biti inflamatornog (iDC) ili tolerogenog (TolDC) fenotipa i stimulirati CTL odgovor, odnosno diferencijaciju Treg [46].

Tumor ima sposobnost konvertirati iDC u regulatorne TolDC pa tumoru pridružene DC doprinose imunosupresiji. TolDC pojačano produciraju imunosupresivne citokine i imaju povišenu ekspresiju gena koji reguliraju imunosupresivne funkcije, pa su u tumoru inhibirani i prirođeni imunosni odgovor na lokalne signale opasnosti i maturacija nezrelih DC. Iako nezrele tumorske DC slabo stimuliraju CTL odgovor, mogu stimulirati diferencijaciju Treg [47].

DC u tumoru imaju i oštećenu sposobnost križne prezentacije antigena. Opisan je mehanizam u kojem se oksidativno oštećeni trigliceridi nakupljaju u membrani lipidnih tjelešca u tumorskim DC pa dolaze u kontakt s citosolnim proteinima i svojim reaktivnim grupama kovalentno vežu HSP70 molekulu čime je funkcionalno inaktiviraju. Budući da je HSP70 ključna molekula u križnoj prezentaciji antigena, MHC kompleksi s antigenskim peptidima u tumorskim se DC ne usmjeravaju prema membrani već prema lizosomima [48].

1.11. Protein toplinskog šoka 70 (HSP70, od engl. *heat shock protein 70*)

Porodica proteina toplinskog šoka (staničnog stresa) od 70 kDa (HSP70) skupina je proteina visoko konzervirane homologije među svim živim organizmima. U ljudskom se organizmu nalaze u svim odjeljcima stanice, a u specifičnim okolnostima (tumor, upala) prisutni su i u staničnoj membrani i u ekstracelularnom prostoru [49].

Dvije su osnovne izoforme HSP70 proteina, konstitutivni i inducibilni [50]. Konstitutivne izoforme olakšavaju pravilno svijanje novostvorenih proteina i transport polipeptida kroz membranu. Ovi su proteini prisutni u jezgri tijekom S-faze staničnog ciklusa, a u ostalim fazama staničnog ciklusa u svim odjeljcima citoplazme: u citosolu HSP70-1 i HSP70-2 (HspA1 i HspA2), u endoplazmatskom retikulumu Hsp70-5 (HspA5, BiP, Grp78), Hsp70-8 (HSPA8, Hsc70, Hsp73) i mitohondriju Hsp70-9 (HSPA9).

Stresom inducirane izoforme HSP70-1 i HSP70-2 (HSPA1A/B), Hsp70-6 (HspA6, HSP70B), HSPA7, Hsp70-14 (HSPA14, Hsp70L1), također su prisutne u citosolu, ali ih imunosne i tumorske stanice mogu izražavati i u membrani ili secernirati u ekstracelularni prostor.

Osnovna (kanonička) uloga HSP70 proteina vezana je za proteinostazu. Ovi su proteini uključeni u sve aspekte regulacije homeostaze proteina. U fiziološkim uvjetima zdrava stanica izražava isključivo konstitutivne izoforme koje vežu HSF1 transkripcijski faktor i time inhibiraju ekspresiju gena inducibilnih izoformi HSP70. Tijekom staničnog stresa pokreće se biokemijska signalna kaskada koja dovodi do otpuštanja HSF1 od Hsc70, aktivacije HSF1 transkripcijskog faktora i sinteze inducibilnih izoformi HSP70 [51]. Odgovor na toplinski stres univerzalni je citoprotektivni odgovor stanice na stres bilo koje etiologije; okolišni (kemijski i fizički stresni podražaji, teški metali, aminokiseline, citostatici, COX inhibitori, acetilsalicilna kiselina, oksidativni stres, zračenje), fiziološki stres (upala i aktivacija imunosnog odgovora, rast i diferencijacija stanica, razvoj tkiva, starenje, hormonalna stimulacija). Primarni cilj je zaštita oštećenih staničnih proteina od agregacije i zaštita stanice od apoptoze inducirane poremećajem homeostaze proteina. Pritom HSP70 obilježava oštećene proteine za popravak ili degradaciju u proteasomu, čime se sprječava pokretanje programa apoptoze u stanici. Međutim, osim u kontekstu proteinostaze, intracelularni HSP70 štiti stanicu u stresu inhibicijom apoptoze i na svim ostalim regulatornim nivoima [52], a stanični odgovor na stres s aktivacijom HSF1 transkripcijskog faktora i indukcijom ekspresije HSP70 integriran je i u signalne putove koji u osnovi nemaju veze s homeostazom proteina, poput onkogenih signalnih putova, upale i imunosnog odgovora [53, 54, 55].

Genske mutacije i onkogeni signalni putovi, aberantni tumorski proteini i nekontroliran signal proliferacije u malignoj stanici, hipoksija i deprivacija nutrijenata u TMO, citotoksična terapija i zračenje signali su koji induciraju aktivaciju HSF1 i pojačanu ekspresiju inducibilnog HSP70 u tumorskoj stanici. Povišena ekspresija inducibilnog endogenog HSP70 u stanicama karcinoma dojke povezana je s agresivnijim fenotipom raka dojke, negativnim statusom ER i PR, visokim histološkim gradusom diferencijacije, višim indeksom proliferacije, višim T i N statusom, rezistencijom na hormonsku terapiju i radioterapiju i lošijim ishodima liječenja. Iako HSP70 nije onkogen, na molekularnom je nivou aktivno uključen u održavanje promijenjenog staničnog metabolizma, podržava onkogenu transformaciju, inhibira apoptozu induciranu onkogenim signalima, promovira epitelo-mezenhimalnu tranziciju (EMT), angiogenezu, invaziju, metastaziranje i bijeg tumora imunosnom sustavu [56]. Intracelularni HSP70 štiti stanice raka dojke od imunosnog napada. Vezanje TNF α za membranski receptor stanice luminalnog A raka dojke pokreće vanjski put apoptoze, pri čemu dolazi do ubikvitinacije i proteasomske degradacije anti-apoptotičkog HSP70 proteina. Paradoksalni učinak vezanja TNF α u membrani TN i agresivnijih formi luminalnog raka dojke posredovan je indukcijom ekspresije A20 proteina, koji inhibira ubikvitinaciju i proteasomsku degradaciju HSP70. Budući da je time inhibiran signal apoptoze umjesto

očekivane citotoksične smrti tumorske stanice dolazi do indukcije inflamatornog STAT3 signalnog puta i pokretanja programa EMT. Osim toga, povišena ekspresija HSP70 u tumorskoj stanici dovodi do aktivacije STAT3 upalnog signalnog puta koji promovira inflamatorni profil tumora, EMT i dediferencijaciju stanica u stanice nalik matičnim stanicama raka [57, 58].

Tijekom aktivacije i proliferacije imunskih stanica u kontekstu imunskog odgovora također se pokreće stanični odgovor na stres [59]. Pritom povišena aktivnost HSF1 u imunskoj stanici inducira ekspresiju HSP70 i suprimira ekspresiju proupalnih gena. Stanični odgovor na stres u imunskoj stanici predstavlja još jedan od mehanizama negativne povratne sprege u regulaciji intenziteta imunskog odgovora, kojima se imunska stanica i organizam štite od oštećenja [60, 61, 62, 63].

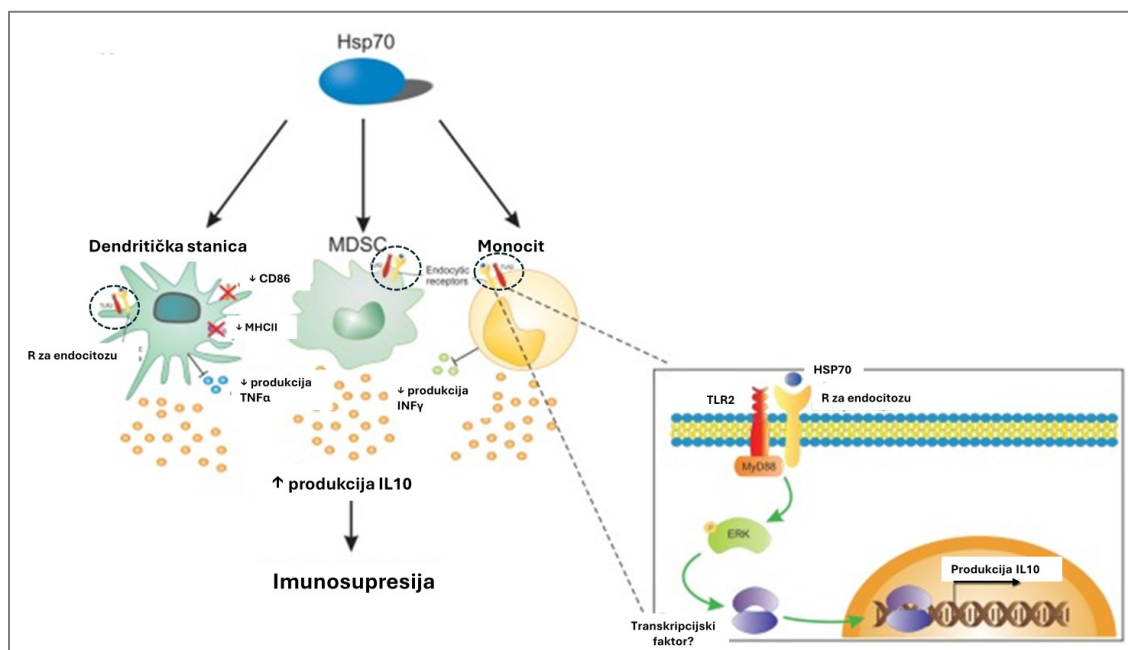
Tijekom staničnog odgovora na stres, imunske i tumorske stanice imaju sposobnost izražavati inducibilni HSP70 u staničnoj membrani i secernirati ga u ekstracelularni prostor u egzosomima ili kao slobodne solubilne molekule. U ekstracelularnom prostoru HSP70 poprima nove biološke funkcije i u ulozi signalnog glasnika (citokina, chaperokina) doprinosi oblikovanju nespecifičnog i specifičnog imunskog odgovora [64, 65]. Nakon vezanja za specifične receptore koje izražavaju imunske stanice, aktivira signalni put koji može rezultirati proupalnim ili antiupalnim odgovorom. Tip odgovora ovisi prvenstveno o podtipu imunske stanice i vrsti receptora na koji se je vezao, ali i o statusu imunske stanice i o imunskom kontekstu mikrookoliša [66, 67, 68].

Proupalni učinci egzogenog HSP70 posredovani su signalima koji slijede nakon vezivanja u membrani NK stanica i T limfocita, a očituju se pojačanom proliferativnom i citotoksičnom aktivnosti i povećanom sekrecijom proupalnih citokina [69, 70]. Nekoliko je proupalnih mehanizama posredovano interakcijom između DC i egzogenog HSP70. U aktivaciji prirodnog imunskog odgovora HSP70 djeluje kao molekularni signal opasnosti i veže se na membranske receptore monocita i DC. Ovo pokreće signal koji dovodi do translokacije NF κ B u jezgru, sinteze i otpuštanja proupalnih citokina TNF α , IL1, IL6 i maturacije DC [71, 72]. Dio egzogenog HSP70 vezano je za antigene peptide i sudjeluje u aktivaciji specifičnog imunskog odgovora. U ulozi molekularnog chaperona olakšava endocitozu antigena posredovanu receptorom za HSP70 na DC, a zatim i procesuiranje i križnu prezentaciju antigena [73, 74]. Međutim, opisani su i regulatorni učinci [75, 76, 77] nakon vezanja egzogenog HSP70 za receptore DC, MDSC i Treg. Imunosupresivni mehanizmi posredovani interakcijom egzogenog HSP70 sa stanicama mijeloidne loze prikazani su shematski na Slici 8.

U DC, MDSC i monocitima egzogeni HSP70 može aktivirati STAT3-ERK signalni put te povećati produkciju i sekreciju IL10 i TGF β . Stimulacija antigenom u imunosupresivnom mikrookolišu usmjerava diferencijaciju perifernih CD4⁺ FOXP3⁺ T limfocita u Treg fenotip, odnosno inducira se periferna tolerancija. Također se i zbog niske ekspresije kostimulacijskih molekula u toleragenim DC tijekom

antigene prezentacije inducira aktivacija prirodnih Treg. Neovisno o podrijetlu Treg, imunosupresivni mehanizmi djelovanja su jednaki. I u direktnoj vezi s membranskim receptorima Treg, HSP70 potencira regulatorne funkcije ovih stanica [77].

Različiti učinci posredovani vezanjem HSP70 za receptore stanica mijelomonocitnih linija objašnjeni su različitim statusom imunskih stanica, različitim imunskim kontekstom mikrokoliša i postojanjem receptorskog para Siglec 5 i Siglec 14 koji imaju jednako vezno mjesto za HSP70, međutim posreduju signal suprotnog učinka i uravnotežuju intenzitet prirodnog imunskog odgovora [78].



Slika 8. Imunosupresivni mehanizmi posredovani interakcijom egzogenog HSP70 s receptorima stanica mijeloidne loze

Vezanje HSP70 za membranski receptor DC smanjuje izražaj MHC II i CD86 kostimulacijskih molekula, odnosno DC poprima tolerogeni fenotip. Vezivanje HSP70 za receptore svih stanica mijeloidne loze inhibira produkciju proupalnih citokina TNF- α i INF- γ , a aktivira STAT3- ERK signalni put i transkripciju gena za IL10.

Pokrate: R = receptor, HSP70 = protein toplinskog šoka 70 (od engl. *Heat shock protein 70*), MDSC = supresivne stanice mijeloidnog porijekla (od engl. *myeloid-derived suppressor cells*), MHC II = glavni sustav tkivne podudarnosti 2 (od engl. *Major histocompatibility complex 2*), CD86 = kostimulacijske molekule iz porodice B7, TLR2 = T stanični receptor (od engl. *T cell receptor*), IL10 = interleukin 10, TNF α = čimbenik tumorske nekroze α (od engl. *Tumour necrosis factor α*), INF γ = interferon γ .

Slika preuzeta i adaptirana iz: Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, Broere F, van der Zee R, Bonorino C, van Eden W. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol.* 2012 May 4;3:95. [75] Licenca za korištenje: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>

1.12. Prognostički i prediktivni značaj upalnog infiltrata u luminalnom i trostruko negativnom raku dojke

U ranom stadiju TN raka dojke gušći imunosni infiltrat povezan je s boljom prognozom pacijenata i boljim odgovorom tumora na NAKT [33, 79, 80, 81, 82]. Međutim u višim stadijima bolesti literaturni podaci nisu konkluzivni budući da je viši udio TIL-a povezan i s boljim i s lošijim ishodima pacijenata. Rezultati dosadašnjih istraživanja TIL-a u luminalnom raku dojke također nisu konzistentni, najvjerojatnije posljedično neadekvatnoj metodologiji koja ne uzima u obzir gensku i mutacijsku heterogenost ER+ skupine. Viši je udio TIL-a u ER+ raku dojke povezan s lošijim ishodima pacijenata ili uopće nije detektirana asocijacija s ishodima [83, 84]. Povezanost mitogenog signala ER i imunosupresivnog profila TIL-a, s većim udjelom Th2 CD4+ limfocita i Treg, nižom ekspresijom MHC II molekula, višom ekspresijom PD-L1 i slabijom citotoksičnom funkcijom CD8+ limfocita, moguće je objašnjenje lošijih ishoda pacijenata s višim udjelom TIL-a u ER+ skupini. Slabija imunogeničnost ER+ tumora, među kojima biološki agresivniji podtipovi imaju veće mutacijsko opterećenje, odnosno veću imunogeničnost i viši udio TIL-a, također može objasniti povezanost TIL-a s lošijim ishodima pacijenata. Ovome u prilog idu i asocijacije s udjelom CD8+ T limfocita u luminalnim tumorima. Naime, viši je udio CD8+ T limfocita na nivou cjelokupne ER+ skupine povezan s agresivnijom bolesti i lošijim prognozom (OS i DFS), ali je unutar LB skupine povezan s boljom prognozom pacijenata (DDFS) i boljim odgovorom tumora na NAKT.

Određivanje udjela stromalnog TIL-a [79] i udjela PD-L1+ imunosnih stanica u tumoru [85] od nedavno su dio standardnog patohistološkog izvješća za TN karcinom dojke jer imaju prediktivni i prognostički značaj, osobito u ranom stadiju bolesti. Za istražiti je imunogeničnost LB raka dojke [86] te prognostičku i prediktivnu vrijednost TIL-a u ovoj podskupini luminalnih tumora, jer u rutinskoj kliničkoj praksi postoji potreba za optimizacijom prognostičke klasifikacije (stratifikacije rizika), terapijskih protokola i selekcije pacijenata za NAKT unutar ove skupine pacijenata. Također je za dodatno istražiti značaj TIL-a u višim stadijima TN raka dojke, utjecaj spacijalne distribucije TIL-a na tumorogenezu TN raka dojke i prognozu pacijenata [80, 87] te doprinos pojedinih imunosnih stanica u TIL-u za prognozu pacijenata [88] u LB i TN karcinomu dojke.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza istraživanja

Zbog fenomena imunosnog preslagivanja tijekom tumorogeneze i dualnog, antitumorskog i protumorskog učinka upale na tumor, očekujemo da će visoki udio CD8+T limfocita u TIL-u biti povezan s nižim stadijima bolesti, boljim odgovorom tumora na NAKT i boljom prognozom pacijenata, a visoki udio CD4+ limfocita, PD-L1+ imunosnih stanica i CD11c+ dendritičkih stanica, te veći broj FOXP3+ limfocita, CTLA-4+ i HSP70+ imunosnih stanica s višim stadijima bolesti i lošijom prognozom pacijenata.

2.2. Glavni ciljevi istraživanja

Kvantitativna i kvalitativna analiza TIL-a prema imunohistokemijskoj (IH) ekspresiji imunosnih markera (CD8, CD4, FOXP3, CD11c, PDL1, CTLA4 i HSP70) u odnosu na lokaciju TIL-a (invazivna tumorska fronta, središnji dio tumora, metastaza u regionalnom limfnom čvoru) i imunofenotip raka dojke (TN i LB HER2- rak dojke) te analiza dobivenih rezultata u odnosu prema tradicionalnim kliničkim i histopatološkim prognostičkim čimbenicima, onkološkim ishodima pacijenata i odgovoru tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju.

2.3. Specifični ciljevi istraživanja

1. Analizirati udio TIL-a i ekspresiju IH markera CD8, CD4, FOXP3, CD11c, PD-L1, CTLA-4 i HSP70 u adjuvantnoj skupini u primarnom tumoru dojke TN imunofenotipa i u metastazi iz regionalnog limfnog čvora te u stromi dobroćudnih promjena dojke kontrolne skupine.
2. Odrediti i usporediti udio TIL-a i ekspresiju IH markera CD8, CD4, FOXP3, CD11c, PD-L1, CTLA-4 i HSP70 u području invazivne tumorske fronte (ITF) i centralnog dijela (TC) primarnog tumora TN imunofenotipa.
3. Dobivene rezultate kvantitativne i kvalitativne analize TIL-a u području ITF i TC analizirati u odnosu prema tradicionalnim prognostičkim čimbenicima i tumorogenezi TN raka dojke (G, pT i pN status, anatomske i patološke prognostičke stadije bolesti) i onkološkim ishodima pacijenata (ukupno preživljavanje (OS, od engl. *overall survival*) i preživljenje bez povrata bolesti (DFS, od engl. *disease-free survival*)).
4. Istražiti korelacije između imunosnih varijabli u području ITF i TC primarnog tumora TN imunofenotipa adjuvantne kohorte.

5. Analizirati udio TIL-a i ekspresiju IH markera CD8, CD4, FOXP3, PD-L1, CTLA-4 i HSP70 u primarnom tumoru TN i LB imunofenotipa neoadjuvantne skupine prije početka NAKT i u stromi dobroćudnih promjena dojke kontrolne skupine.
6. Odrediti i usporediti udio TIL-a i ekspresiju IH markera CD8, CD4, FOXP3, PD-L1, CTLA-4 i HSP70 prije početka NAKT u primarnom tumoru LB imunofenotipa i primarnom tumoru TN imunofenotipa unutar neoadjuvantne skupine.
7. Dobivene rezultate kvantitativne i kvalitativne analize TIL-a prije početka NAKT u LB skupini analizirati u odnosu prema tradicionalnim prognostičkim čimbenicima (nuklearni gradus (NG), Ki67, cN status, anatomske i kliničke prognostičke stadij bolesti) i onkološkim ishodima pacijenata (DFS).
8. Istražiti korelacije između imunosnih varijabli u primarnom tumoru LB imunofenotipa neoadjuvantne kohorte.
9. U neoadjuvantnoj LB i TN skupini identificirati imunosne varijable čije su varijacije u primarnom tumoru prije početka NAKT povezane s odgovorom tumora na NAKT (skor rezidualnog opterećenja tumorom (RCB skor) i RCB grupa).

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Veličina uzorka određena je *G-power* analizom, pri čemu je ustanovljeno da je za veliku snagu testa (s veličinom efekta Cohen $d = 0,83$ uz $P = 0,05$) za razlikovanje srednjih vrijednosti između dviju podskupina potrebno uključiti ukupno 68 ispitanika u skupinu. U ispitivanje su uključene dvije različite skupine pacijentica s dijagnosticiranim invazivnim karcinomom dojke. U prvoj (adjuvantnoj) skupini kirurški je zahvat bio prije, a u drugoj (neoadjuvantnoj) skupini nakon provedene kemoterapije. Statistička analiza između adjuvantne i neoadjuvantne skupine nije predviđena protokolom istraživanja. Prva skupina formirana je od 68 uzastopno kirurški liječenih bolesnica u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Rijeka od 2008. do 2016. godine zbog TN karcinoma dojke, kod kojih je provedeno adjuvantno onkološko liječenje prema smjernicama aktualnim za period u kojem su liječene [89]. Navedeno je razdoblje odabrano kako bi se uključio dovoljan broj ispitanica s terapijski naivnim TN rakom dojke u kirurškom materijalu, budući da materijali iglenih biopsija nisu dostatni za predviđenu analizu, a da je većina pacijenata dijagnosticiranih s TN rakom dojke nakon 2016. u KBC Rijeka liječena neoadjuvantnom kemoterapijom. Također, bilo je važno da sve uključene ispitanice imaju period praćenja od minimalno 5 godina za analizu ukupnog preživljenja i preživljenja bez povrata bolesti. Isključene su bolesnice za koje nisu bili dostupni svi protokolom predviđeni klinički podaci, dijagnosticirane u IV. stadiju bolesti ili s recidivnim tumorom dojke, one koji su primile preoperativnu sistemsku terapiju ili kod kojih je dijagnosticirana bilo koja druga maligna bolest uz TN rak dojke. U drugu skupinu uključeno je 89 pacijentica s dijagnosticiranim LB ($N = 53$) ili TN ($N = 36$) karcinomom dojke između 2016. i 2021. godine, u II. A ili višem anatomskom stadiju bolesti, koje su prije kirurškog zahvata primile neoadjuvantnu kemoterapiju po sljedećem protokolu: 4 ciklusa doksorubicina i ciklofosfamida i 12 ciklusa paklitaksela. Iz ove su skupine isključene bolesnice za koje nije bilo dostupno tkivo širokoiglene biopsije dojke (dijagnosticirane u drugoj ustanovi), dijagnosticirane s metastatskom bolesti (stadij IV), HER2+ karcinomom dojke ili kod kojih nije do kraja provedeno neoadjuvantno sistemske onkološko liječenje. Kontrolnu skupinu je predstavljalo 36 uzoraka tkiva, dobivenih vakuum-asistiranim biopsijom dojke, histološki kategoriziranih kao benigna promjena dojke (B2). Ova je skupina bila negativna kontrola za IH bojenja.

3.2. Materijal biopsije

Materijal biopsije je tumorsko tkivo karcinoma dojke TN imunofenotipa i metastaza karcinoma dojke u regionalnom limfnom čvoru, dobiveni kirurškom resekcijom terapijski naivnih pacijentica prve kohorte, te tumorsko tkivo karcinoma dojke TN i LB imunofenotipa, dobiveno širokoiglenom biopsijom dojke prije početka neoadjuvantne kemoterapije pacijentica druge kohorte.

Iz patološke su baze podataka Vegasoft slijedom izlistani slučajevi prve i druge kohorte, nakon čega je slijedilo pretraživanje arhivskog materijala Biobanke Zavoda za opću patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Rijeka, pregledavanje HE stakalca i konstrukcija tkivnih mikroareja iz „donorskih“ parafinskih kocki.

3.3. Metode

Iz Integriranog bolničkog informatičkog sustava (IBIS) KBC-a Rijeka i patološke baze podataka Vegasoft retrospektivno su prikupljeni klinički i tradicionalni histopatološki podaci pridruženi slučajevima prve i druge kohorte; klinički i patološki T i N status, histološki tip i histološki stupanj diferencijacije tumora, nuklearni gradus tumora, IH ekspresija ER, PR, status HER2 receptora i indeks proliferacije tumora Ki67, dob pacijentica u vrijeme postavljanja dijagnoze i u vrijeme početka terapije, podaci o komorbiditetima, podaci o provedenom kirurškom i onkološkom liječenju i specifičnim ishodima liječenja (odgovoru tumora na NAKT, pojavi lokalnog i regionalnog recidiva, progresiji bolesti sa sistemskom diseminacijom). Podaci o preživljenju pacijentica prve kohorte prikupljeni su iz dokumentacije Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

3.3.1. Određivanje tradicionalnih prognostičkih čimbenika

Postojeći podaci su revidirani prema TNM sustavu klasifikacije tumora dojke [20] pri čemu je svakom slučaju pridodan pripadni klinički/patološki T i N status, anatomski stadij bolesti i klinički/patološki prognostički stadij bolesti. Anatomski stadij bolesti određen je na temelju T, N i M statusa, a za klinički i patološki prognostički status su uz ove parametre uzeti u obzir još i histološki gradus diferencijacije i status ER, PR i HER2 receptora prema AJCC klasifikaciji [11]. Tumori prve kohorte su gradirani prema histološkom stupnju diferencijacije sukladno Bloom i Richardsonovom histološkom gradusu, modificiranom prema Elston i Ellisonovoj klasifikaciji [17], a tumori druge kohorte prema nuklearnom gradusu diferencijacije. Pri tome su postojeći podaci iz patološke baze Vegasoft revidirani.

IH ekspresija ER i PR definirana je intenzitetom i postotkom tumorskih stanica označenih pozitivnim jezgrinim bojenjem protutijelima koja prepoznaju ER i PR u ukupnom uzorku tumorskih stanica u preparatu [90, 91]. HER2 status tumora određen je intenzitetom i postotkom membranskog bojenja IH obojenih tumorskih stanica protutijelom koje prepoznaje HER2 receptor, a u slučaju dvojnog IH nalaza

SISH analizom amplifikacije ERBB2 gena. Indeks proliferacije definiran je postotkom jezgrinog obojenja IH bojenjem koje prepoznaje Ki67 protein u ukupnom uzorku tumorskih stanica. Imunofenotip tumora (surogat molekularnog podtipa raka dojke) određen je prema preporukama konsenzusa iz St. Gallena iz 2015. [24]. TN rak dojke definiran je odsustvom IH ekspresije ER, PR i HER2 receptora, a LB HER2-rak dojke IH ekspresijom ER, ekspresijom PR manjom od 20 % ili/i Ki67 većom od 20 % te odsustvom ekspresije HER2 receptora.

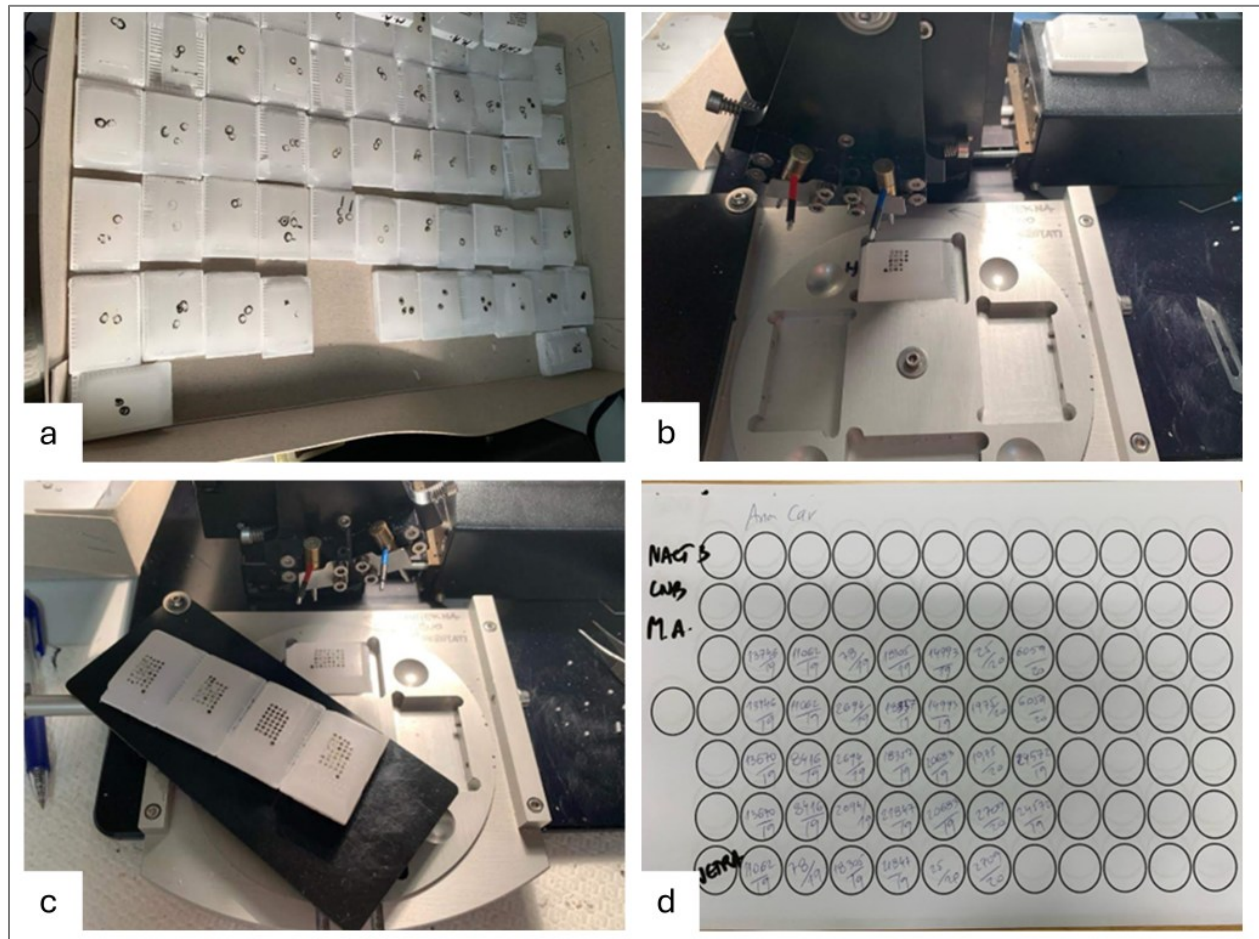
Lokalni recidiv je definiran povratom bolesti u ipsilateralnu ili kontralateralnu dojku, a preživljenje bez pojave lokalnog recidiva (LRFS, od eng. *local recurrence free survival*) kao broj mjeseci od datuma postavljanja dijagnoze do datuma detekcije lokalnog recidiva ili do datuma posljednje kliničke kontrole. Regionalni recidiv je definiran progresijom bolesti u ipsilateralne ili kontralateralne regionalne limfne čvorove nakon već provedenog liječenja, a preživljenje bez pojave regionalnog recidiva (RRFS, od engl. *regional recurrence free survival*) kao broj mjeseci od datuma postavljanja dijagnoze do datuma detekcije regionalnog recidiva ili do datuma posljednje kliničke kontrole. Udaljeni (distalni) recidiv je definiran detekcijom sistemske progresije bolesti nakon već provedenog liječenja, a preživljenje bez pojave udaljenih metastaza (DDFS, od engl. *distant disease-free survival*) kao broj mjeseci od datuma postavljanja dijagnoze do datuma detekcije metastatske bolesti ili do datuma posljednje kliničke kontrole. Preživljenje bez pojave bilo kojeg recidiva (DFS, od engl. *disease-free survival* ili EFS, od engl. *event free survival*) definirano je brojem mjeseci od datuma postavljanja dijagnoze do datuma detekcije bilo kojeg tipa recidiva ili do datuma posljednje kliničke kontrole, a ukupno preživljenje (OS, od engl. *overall survival*) brojem mjeseci od datuma postavljanja dijagnoze do datuma smrti bilo kojeg uzroka ili do datuma posljednje kliničke kontrole.

Pokazatelji odgovora na provedenu neoadjuvantnu kemoterapiju ypT, ypN i pRCB određeni su za sve pacijentice druge kohorte na kirurškom materijalu dojke i odstranjenih limfnih čvorova. ypT je definiran veličinom najduljeg promjera rezidualnog tumora u kirurškom preparatu dojke nakon provedene NAKT, a ypN brojem metastatski zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova i veličinom najvećeg metastatskog depozita u limfnom čvoru nakon NAKT [12]. Skor rezidualnog opterećenja tumorom (RCB, od engl. *residual cancer burden*) i RCB grupa nakon NAKT, određeni su za svaki slučaj druge kohorte online kalkulatorom dostupnim na internetskim stranicama MD Anderson Centra [15, 16].

3.3.2. Oblikovanje tkivnih mikroareja (TMA, od engl. *tissue microarrays*)

Od tkiva pohranjenog u parafinskim kockama izrađene su tkivne mikroareje (TMA) za potrebe ovog istraživanja. Iz „donorskih“ parafinskih kocki uzeti su dijelovi tkiva uz pomoć ručnog uređaja za izgradnju TMA (Alphelys, Plaisir, France), koji su potom transferirani u novu „primateljsku“ parafinsku

kocku. U novoj parafinskoj kocki smješten je veći broj tkivnih uzoraka i orijentiran uz pomoć koordinatnog sustava prema osi x i y. Na Slici 9/a-d prikazani su koraci u izradi TMA.



Slika 9. Izrada tkivnih mikroareja

- Donorske parafinske kocke s označenim područjima tkiva za transfer
- Uzimanje tkiva od interesa iz donorske parafinske kocke i transfer u primateljsku kocku uz pomoć ručnog uređaja za izradu tkivnih mikroareja
- Primateljske parafinske kocke s transferiranim tkivnim mikroarejama
- Schema rasporeda tkivnih mikroareja u primateljskoj kocki prema osi x i y koordinatnog sustava

TMA korespondiraju histološki pregledanom materijalu. Ovakvim je postupkom osigurana ujednačenost IH bojenja u istraživanju budući da se sva bojenja odvijaju istovremeno, u jednakim uvjetima. Također, štede se antitijela za IH bojenja, odnosno financijski resursi istraživanja, kao i arhivski tumorski materijal za potrebe budućih istraživanja i molekularnih analiza u dijagnostičke svrhe.

Nedostatak istraživanja na TMA odnosi se prvenstveno na ograničenu količinu tumorskog tkiva dostupnog za analizu. Kako bi nadišli problem intratumorske heterogenosti, za svaki je tumor izrađen duplikat ili triplikat TMA. Pri tome je svaka biopsija tumora prve kohorte predstavljena s dva cilindra tkiva primarnog tumora promjera 2 mm, od kojih jedan cilindar tkiva predstavlja područje invazivne fronte tumora (ITF, od engl. *Invasive tumour front*), a drugi cilindar tkiva korespondira s centralnim dijelom tumora (TC, od engl. *tumour centre*). ITF je definirana kao trakasto područje širine 1 mm, površinskog dijela invazivnog karcinoma, koji je u neposrednom kontaktu sa susjednim netumorskim tkivom dojke. Preostalo tumorsko tkivo, uključujući i tumorsku stromu, koje nije u kontaktu s netumorskim tkivom dojke predstavlja TC [92]. U slučajevima adjuvantne kohorte, kod kojih je u regionalnom limfnom čvoru pronađena metastaza TN raka dojke, uzet je i dodatni, treći cilindar za analizu. Za svaki slučaj druge kohorte korištena su dva cilindra tkiva primarnog tumora promjera 1,5 mm, s obzirom na to da je materijal „donorske” parafinske kocke dobiven širokoiglenom biopsijom koja je prosječne širine 1,5 mm. Benigno tkivo dojke kontrolne skupine zastupljeno je jednim cilindrom tkiva promjera 2 mm po svakoj biopsiji.

Parafinske kocke s uklopljenim TMA serijski su narezane na rezove debljine 4 μ . S obzirom na to da su rijetki cilindri izgubljeni u procesu narezivanja, broj pregledanih uzoraka se minimalno razlikuje među pojedinim varijablama.

3.3.3. Imunohistokemijska bojenja

TMA rezovi su deparafinizirani u otopini ksilena (Tissue Clear firme Sakura) i rehidrirani etilnim alkoholom. Da bi se antigeni epitopi eksponirali, rezovi su tretirani topline. Za dokazivanje CD11c antigena korišten je Tris/EDTA pufer, u vodenoj kupelji na 98°C tijekom 15 minuta. Za dokazivanje CD8, CD4, FOXP3, CTLA-4 i HSP70 antigena korišten je PT link aparat pri temperaturi 97°C tijekom 20 minuta. Za detekciju antigena je korištena "EnVision" jednostruka IH metoda u automatskom imuno-bojaču (DakoCytomation, Autostainer Plus, Glostrup, Denmark®), sukladno protokolima proizvođača. Specifikacije imunohistokemijskih bojenja prema preporukama proizvođača prikazane su u Tablici 2.

3.3.4. Očitavanje TIL-a i imunohistokemijskih bojenja

TIL je očitavan kao kontinuirana varijabla na cijelim HE obojanim rezovima, odnosno kao udio tumorske strome infiltriran mononuklearnim imunosnim stanicama, sukladno preporukama Internacionalne radne skupine za očitavanje TIL-a (eng. *International TILs Working Group*) iz 2014. [93]. Imunofenotip upalnih stanica određen je na način opisan u daljnjem tekstu. Udio CD4+, CD8+ i CD11c+ stanica vizualno je procijenjen u cijeloj tkivnoj areji (TMA) i očitavan kao kontinuirana varijabla pod povećanjem svjetlosnog mikroskopa 200x. Ekspresija PD-L1 određena je prema protokolu proizvođača za očitavanje

PD-L1, klon SP142, u TN raku dojke, odnosno kao udio površine TMA koju zauzimaju PDL1+ imunosne stanice [94]. Ekspresija FOXP3, CTLA-4 i HSP70 očitana je kao kontinuirana varijabla, odnosno ukupan broj pozitivnih limfocita u cijeloj tkivnoj areji, pod povećanjem svjetlosnog mikroskopa 400x. IH bojenja kontrolne skupine očitana su vizualnom procjenom udjela ili broja imunosnih stanica u području strome benignih promjena dojke. Sva očitana IH bojenja imunosnih stanica bila su citoplazmatska i/ili membranska, izuzev jezgrinog FOXP3 bojenja. Sva su bojenja očitali istraživači uz superviziju mentora specijalista patologa, bez uvida u kliničke podatke pacijenata i histološke karakteristike tumora.

Tablica 2 . Imunohistokemijska bojenja i protokoli

Monoklonalno protutijelo	Proizvođač	Klon	Razrjeđenj e	Otapalo	Inkubacija (minute)
CD4 104R-16	Cell Marque, Rocklin, CA, USA	SP35	1:75	DAKO S0809	60
CD8 IR623	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	C8 /144B	factory diluted	DAKO S0809	30
FOXP3 ab450	Abcam, Cambridge, UK	mAbcam450	1:200	DAKO S0809	60
CD11c NCL-L-CD11c-563	Novocastra, Newcastle, UK	5D11	1:75	DAKO S0809	30
PD-L1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany	SP-142	RTU*, Ventana		
CTLA4 sc-376016	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	F-8	1: 100	DAKO S0809	60
HSP70 ab2787	Abcam, Cambridge, UK	5A5	1: 200	DAKO S0809	30

*RTU - *ready to use*

3.3.5. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu korišteni su standardni statistički testovi u programima Statistica 14, za Windows 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK®), MedCalc Version 20.013 (Medcalc © 2024 MedCalc Software Ltd.) i X-tile analysis version 3.6.1. (X-Tile © Yale University 2003-05). Normalnosti distribucije svih podataka izračunati su Kolmogorov-Smirnovljevim testom (K-S test), a rezultati su prikazani kao vrijednosti aritmetičke sredine za varijable s pravilnom raspodjelom ili kao medijane vrijednosti dobivenih rezultata za varijable s nepravilnom raspodjelom podataka.

Razlike rezultata između dva ili više nezavisnih uzoraka određene su Studentovim T-testom za nezavisne uzorke i ANOVA testom kod pravilne raspodjele podataka, odnosno Mann-Whitney U testom i Kruskal-

Wallis testom kod nepravilne raspodjele podataka. U post hoc analizi rezultata dobivenih ANOVA i Kruskal-Wallis testom korišteni su Fisherov LSD i Conoverov test. Razlike između dva zavisna uzorka određeni su Studentovim T-testom za zavisne uzorke kod pravilne raspodjele podataka i Wilcoxonovim testom kod nepravilne raspodjele podataka. Razlike frekvencija određene su Hi-kvadrat testom.

Za imunosne varijable za koje je dokazana statistički značajna povezanost s pN statusom u adjuvantnoj skupini, odnosno odgovorom tumora na NAKT (RCB) u neoadjuvantnoj LB skupini, ROC analizom (od engl. *Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis*) je određena kriterijska vrijednost varijable pri kojoj bi dijagnostički test utemeljen na toj varijabli imao najveću točnost, odnosno najmanje lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata.

Korelacije među imunosnim varijablama određene su Spearmanovom korelacijom rangova. Koeficijent korelacije (ρ) interpretiran je kao zanemariv (manji od 0,30), slabo pozitivan (0,30 – 0,50), umjereno pozitivan (0,50 – 0,70), snažno pozitivan (0,70 – 0,90) i izrazito snažno pozitivan ($> 0,90$).

Za potrebe analize preživljenja, cut-off vrijednosti očitanih rezultata određene su X-tile analizom (X-tile analysis version 3.6.1). Krivulje preživljenja izračunate su Kaplan-Meierovom metodom, a razlike u krivuljama preživljenja log-rank testom. Za varijable za koje je dokazana statistički značajna povezanost s OS, DFS i RCB učinjena je univarijatna i multivarijatna logistička regresija, odnosno određen je utjecaj svake pojedine varijable na OS, DFS i RCB.

Sve dobivene razlike smatrane su statistički značajne za $P < 0,05$.

3.3.6. Etički aspekti istraživanja

Protokol istraživanja odobren je u okviru UNIRI projekta (pod šifrom uniri-biomed-18-259) izv. prof. dr. sc. Manuele Avirović, od Etičkog povjerenstva KBC-a Rijeka na sjednici održanoj 24. rujna 2019. i od Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci na sjednici održanoj 27. – 30. rujna 2019. godine. Izrada doktorskog rada na temelju rezultata provedenog istraživanja odobrena je na sjednici Etičkog povjerenstva KBC-a Rijeka održanoj 18. prosinca 2023. i na sjednici Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci održanoj 19. ožujka 2024. godine.

Istraživanje je provedeno u skladu sa svim primjenjivim smjernicama dobre kliničke prakse kako bi se osiguralo pravilno provođenje istraživanja i sigurnost sudionika. Osigurano je poštivanje temeljnih bioetičkih principa; osobnog integriteta (autonomnosti), pravednosti, dobročinstva i neškodljivosti, u skladu s Nürnberškim kodeksom, najnovijom revizijom Helsinške deklaracije i ostalim mjerodavnim dokumentima. Uobičajeni medicinski podaci o ispitanicima prikupljeni su retrospektivno, a dodatna istraživanja provedena su u skladu s bioetičkim standardima kako bi se osigurala privatnost ispitanika i

zaštita tajnosti podataka. S obzirom na to da je istraživanje retrospektivnog karaktera, tekst informiranog pristanka i suglasnost bolesnika za sudjelovanje u istraživanju nisu predviđeni protokolom istraživanja.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati prve (adjuvantne) studijske kohorte

4.1.1. Kliničko-patološke karakteristike prve studijske kohorte

Anonimizirani podaci dobiveni retrospektivnom analizom relevantnih kliničkih i tradicionalnih patoloških parametara ispitanica adjuvantne studijske kohorte prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Kliničko-patološke karakteristike prve studijske kohorte

Kliničko-patološke karakteristike (N=68)		Medijan (raspon)
Dob (godine)		61 (25-87)
		N (%)
Patološki status primarnog tumora (pT)	1	22 (32)
	2	35 (51)
	3	5 (9)
	4	6 (8)
Histološki gradus primarnog tumora	1	2 (2)
	2	33 (49)
	3	33(49)
Anatomske stadij bolesti	I	19 (28)
	II	31 (46)
	III	18 (26)
Status regionalnih	0	45 (66)
	1	10 (15)

limfnih čvorova (pN)	2	6 (4,5)
	3	6 (4,5)
Patološki prognostički stadij**	I	20 (30)
	II	27 (40)
	III	21 (30)
Recidiv/ progresija bolesti	Ne	47 (70)
	Lokoregionalni recidiv	9 (11)
	Distalni recidiv	13 (19)
		Medijan (raspon)
Broj mjeseci do recidiva		39 (2-64)
Vrijeme praćenja (mjeseci)		64 (2-124)
		N (%)
Smrt zbog TN[#] raka dojke		28(41)
*NST: ne specijalni tip; **AJCC Cancer Staging Manual, [#] TN: trostruko negativni		

4.1.2. Rezultati kvantitativne i kvalitativne analize TIL-a u adjuvantnoj TN skupini

Kvantitativna i kvalitativna analiza TIL-a prema odabranim IH markerima napravljena je za svaki slučaj prve studijske kohorte u području strome invazivne tumorske fronte (ITF) i strome centralnog dijela primarnog tumora (TC) dojke te u tkivu metastaze u regionalnom limfnom čvoru kod pN(+) slučajeva. Jednaka je analiza imunosnog infiltrata učinjena i u stromi benignih promjena tkiva dojke kontrolne skupine. Dobivene su vrijednosti prikazane u Tablici 4.

Distribucija podataka je testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Osim vrijednosti udjela CD8+ T limfocita u stromi ITF-a, čije su očitane vrijednosti IH bojenja imala pravilnu raspodjelu podataka, sve ostale varijable su imale nepravilnu raspodjelu. Stoga su srednje vrijednosti za CD8+ T limfocite u ITF prikazane kao vrijednosti aritmetičke sredine, a srednje vrijednosti svih ostalih varijabli adjuvantne skupine kao medijane vrijednosti dobivenih rezultata.

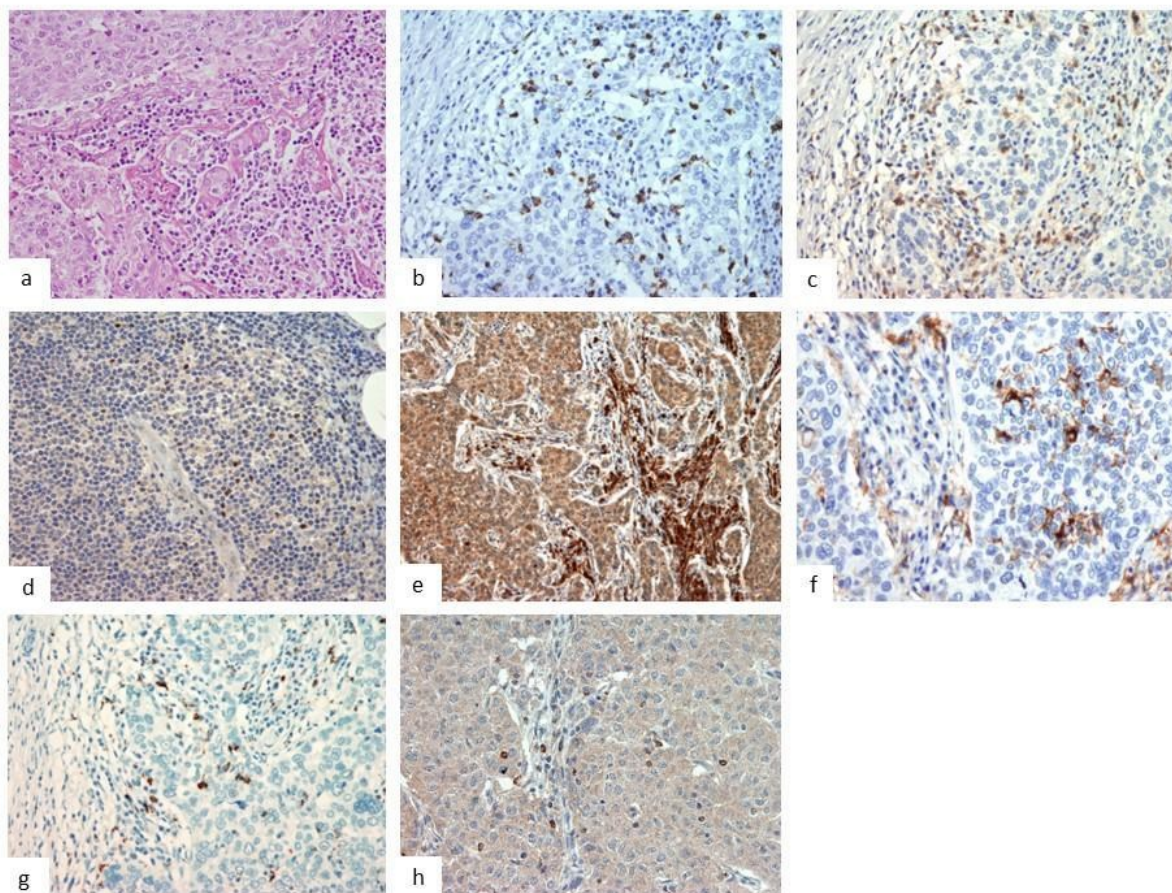
Tablica 4 . Imunohistokemijska ekspresija komponenti TIL-a u primarnom trostruko negativnom karcinomu dojke, regionalnoj metastazi i benignom tkivu kontrolne skupine

Varijabla	Benigne promjene (kontrola)	P	Primarni tumor	P	Regionalna metastaza	Primarni tumor		
						ITF	P	TC
TIL (%)[#]	-	/	17.500	/	-	20.000	< 0,001 [~]	10.000
CD8 (%)[~]	0.647	< 0,001 ^{**}	21.705	0,916 ¹	21.313	25.833	< 0,001 ¹	17.000
CD4 (%)[#]	1.000	< 0,001 [*]	17.500	0,074 [~]	21.000	25.000	< 0,001 [~]	10.000
PD-L1 (%)[#]	0.000	< 0,001 [*]	0.40	1,000 [~]	1.000	0.300	< 0,001 [~]	0.100
CTLA4 (N)[#]	0.000	< 0,001 [*]	22.250	0,180 [~]	80.500	23.500	0,237 [~]	14.500
FOXP3 (N)[#]	0.000	< 0,001 [*]	0.750	0,724 [~]	0.000	1.000	0,164 [~]	0.000
CD11c (%)[#]	0.000	< 0,001 [*]	5.500	0,773 [~]	5.500	4.500	0,962 [~]	5.000
HSP70 (N)[#]	2.000	< 0,001 [*]	15.000	0,114 [~]	70.000	15.500	0,057 [~]	10.000

ITF: invazivna tumorska fronta; TC: centralni dio tumora; ~ srednje vrijednosti varijable s pravilnom raspodjelom podataka izražene su kao aritmetička sredina; [#] srednje vrijednosti varijabla s nepravilnom raspodjelom podataka izražene su u medijanima; *Mann-Whitney U test; **Studentov T test za nezavisne uzorke; ¹Studentov T test za zavisne uzorke; [~]Wilcoxonov test

U odnosu na benigno tkivo dojke sve su vrijednosti ispitivanih varijabli bile značajno veće u tumorskom tkivu. Između tkiva primarnog tumora i metastaze u regionalnom limfnom čvoru nije pronađeno statistički značajnog odstupanja u kvantiteti ili kvaliteti imunosnog infiltrata. Veći udjeli TIL-a, CD4+, CD8+ i PDL1+ imunosnih stanica pronađeni su ITF u odnosu na TC primarnog tumora ($p < 0.001$). Udio CD11c+ imunosnih stanica i broj CTLA4+, FOXP3+ i HSP70+ imunosnih stanica nije statistički značajno varirao između ova dva područja.

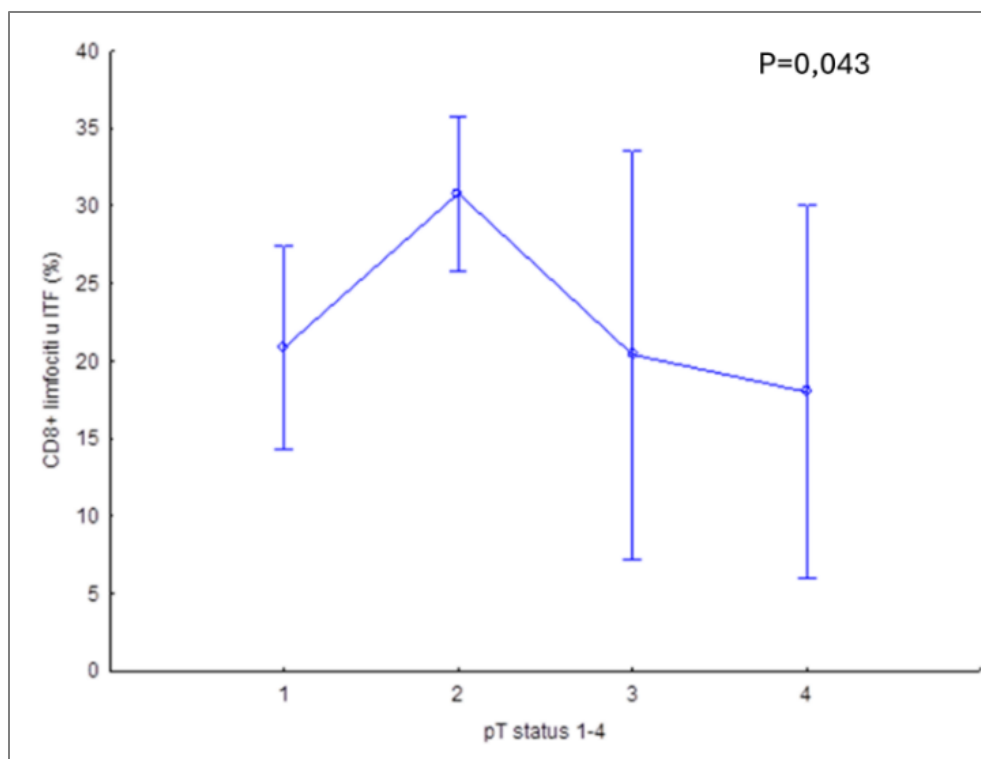
Reprezentativne fotografije HE i IH bojenja u adjuvantnoj kohorti prikazane su na Slici 10/a-h.



Slika 10. a) TIL prikazan bojenjem hematoksilin-eozinom (HE) i imunohistokemijska bojenja imunskih varijabli: b) CD8, c) CD4, d) FOXP3, e) HSP70, f) CD11c, g) PDL1 i h) CTLA4 u adjuvantnoj studijskoj kohorti. Povećanje 200 x

4.1.3. Odnos kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a i tradicionalnih kliničko-patoloških prognostičkih parametara u TN raku dojke

Primijećeno je nekoliko statistički značajnih povezanosti između kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a u tumorskom tkivu TN raka dojke i standardnih kliničko-patoloških prognostičkih čimbenika. Udio TIL-a i CD8+T limfocita raste u ITF porastom veličine primarnog tumora do pT2, a daljnjim porastom pT statusa udio TIL-a i CD8+T limfocita pada (Hi-kvadrat test, $P = 0,017$, $P = 0,021$). Asocijacija udjela CD8+ limfocita s pT statusom primarnog tumora potvrđena je ANOVA testom i grafički prikazana na Slici 11. Post hoc analizom utvrđeno je da se pT2 skupina statistički značajno razlikuje od svih ostalih skupina (Fisher LSD test, $P = 0,019$), odnosno da je u pT2 skupini udio CD8+ limfocita značajno veći u odnosu na pT1, pT3 i pT4 skupinu.



Slika 11. Udio CD8+ limfocita po površini tkivne areje invazivne tumorske fronte trostruko negativnog tumora u odnosu na patološki status primarnog tumora (pT)

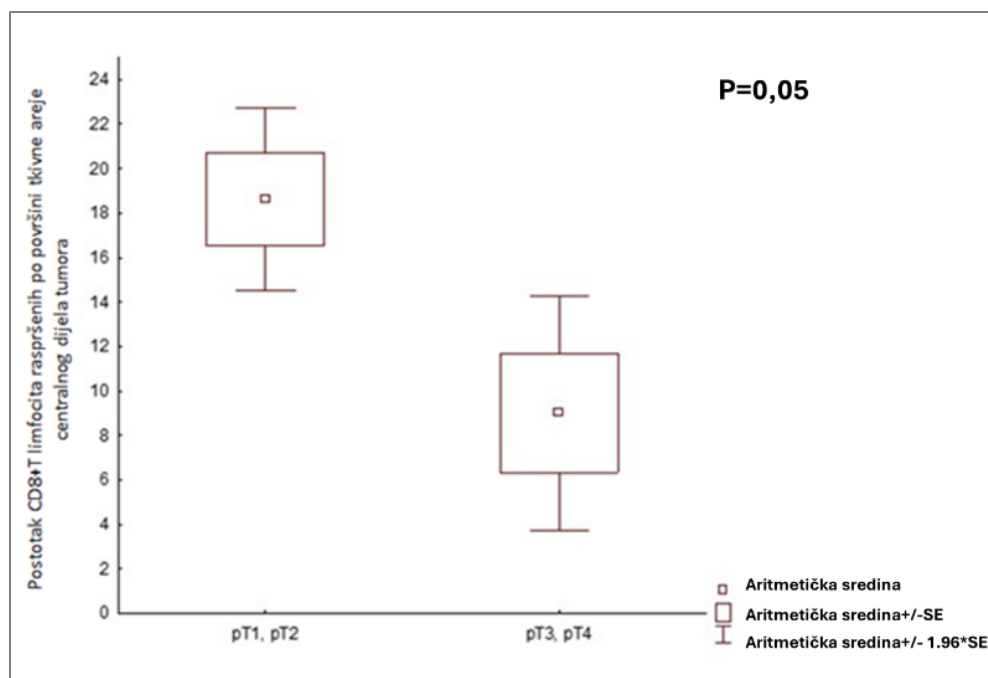
Prikazan je udio CD8+T limfocita raspršenih po površini tkivne areje invazivne tumorske fronte (ITF) u statistički značajnoj asocijaciji prema pT statusu primarnog tumora (ANOVA, $P = 0,043$), s porastom udjela od pT1 prema pT2 statusu i padu prema pT3 i pT4 statusu.

Pokrate: pT = patološki status primarnog tumora

Ista je dinamika za obje varijable primijećena u odnosu na anatomske (Hi-kvadrat test, $P = 0,057$, $P = 0,050$) i patološki prognostički (Hi-kvadrat test, $P = 0,059$, $P = 0,048$) stadij bolesti, međutim samo je posljednja asocijacija dosegla razinu statističkog značaja.

Posljednja statistički značajna povezanost u ITF-u pronađena je za udio CD11c+ dendritičkih stanica i broj CTLA-4+ imunskih stanica u odnosu prema statusu regionalnih limfnih čvorova (pN). Pritom je viša ekspresija obje varijable statistički značajno povezana s pN(+) statusom (Hi-kvadrat test, $P = 0,043$, $P = 0,048$).

Osim statističkog trenda pada udjela CD8+T limfocita u odnosu na porast patološkog statusa primarnog tumora nakon pT2 (Studentov T-test za nezavisne uzorke, $P = 0,050$; grafički prikazano na Slici 12), u TC-u nismo detektirali statistički značajne povezanosti između varijacija TIL-a i standardnih kliničko-patoloških prognostičkih čimbenika.



Slika 12. Udio CD8+ T limfocita po površini tkivne areje centralnog dijela trostruko negativnog tumora u odnosu prema patološkom statusu primarnog tumora (pT).

Prikazan je udio CD8+ T limfocita raspršenih po površini tkivne areje centralnog dijela tumora u statistički negativnom trendu povezanosti sa pT3-pT4 statusom primarnog tumora (Studentov T test za nezavisne uzorke, $P = 0,050$).

Pokrate: SE = standardna pogreška (od engl. *standard error*)

4.1.4. Međusobne korelacije TIL-a i IH ekspresije imunskih markera u TIL-u ITF i TC u TN raku dojke

Nekoliko je pozitivnih korelacija izračunato Spearmanovom korelacijom rangova između komponenti TIL-a u adjuvantnoj TN skupini u području strome ITF i TC. Sve su statistički značajne interkorelacije s pridruženom vrijednosti koeficijenta korelacije (ρ) prikazane u Tablici 5.

Udio TIL-a u području ITF statistički značajno pozitivno korelira s udjelom CD8+ (Spearmanova korelacija rangova, $N = 65$, $\rho = 0,56$, $P < 0,001$) i CD4+ (Spearmanova korelacija rangova, $N = 65$, $\rho = 0,50$, $P < 0,001$) T limfocita. Međutim, viši udio CD8+T stanica korelira i s povišenom ekspresijom imunosupresivnih markera PD-L1 i CTLA-4 (Spearmanova korelacija rangova, $N = 65$, $\rho = 0,31$, $P = 0,011$; $N=65$, $\rho = 0,40$, $P < 0,001$) i s višim brojem regulacijskih FOXP3+T limfocita (Spearmanova korelacija rangova, $N=61$, $\rho = 0,32$, $P = 0,012$).

U centralnom dijelu tumora (TC) udio TIL-a pozitivno korelira isključivo s infiltracijom CD4+T limfocita (Spearmanova korelacija rangova, $N = 65$, $\rho = 0,50$, $P < 0,001$) i s ekspresijom imunosupresivnih markera

PD-L1, CTLA-4 i HSP70 u imunskim stanicama (Spermanova korelacija rangova, N = 66, rho 0,39, P = 0,001; N = 65, rho 0,46, P < 0,001; N = 64, rho 0,38, P = 0,002). Viši udio CD8+T limfocita u TC također značajno korelira s višom ekspresijom PD-L1 (Spermanova korelacija rangova, N = 62, rho 0,62, P < 0,001).

Tablica 5. Korelacije među komponentama TIL-a u stromi invazivne tumorske fronte (ITF) i centralnog dijela tumora (TC) trostruko negativnog raka dojke

ITF (N=61)	TIL	CD8	CD4	FOXP3	CD11c	PD-L1	CTLA-4	HSP70+IC
TIL		++	+			+	+	
CD8	++		+	+	+	+	+	
CD4	+	+		+		+	+	
FOXP3		+	+				+	
CD11c		+						
PD-L1	+	+	+				++	
CTLA-4	+	+	+	+		++		
HSP70+IC								

TC (N=62)	TIL	CD8	CD4	FOXP3	CD11c	PD-L1	CTLA-4	HSP70+IC
TIL			+			+	+	+
CD8			+			++	+	
CD4	+	+					+	
FOXP3								
CD11c								
PD-L1	+	++						
CTLA-4	+	+	+	+				+
HSP70+IC	+						+	

Koeficijent korelacije (rho) interpretiran je kao zanemariv (manji od 0,30), (+) slabo pozitivan (0,30 – 0,50), (++) umjereno pozitivan (0,50 – 0,70), (+++) snažno pozitivan (0,70 – 0,90) i (+++++) izrazito snažno pozitivan (> 0,90). Sve dobivene razlike smatrane su statistički značajne za P vrijednosti manje od 0,05.

Pokrate: HSP70+IC = HSP70+ imunosne stanice

4.1.5. Odnos ekspresije HSP70 proteina u imunosnom infiltratu centralnog dijela tumora i tradicionalnih kliničko-patoloških prognostičkih parametara u TN raku dojke

Statistički najznačajnije asocijacije s tradicionalnim kliničko-patološkim prognostičkim faktorima u centralnom dijelu tumora pronađene su u odnosu na ekspresiju HSP70 u imunosnim stanicama. Veći broj HSP70(+) imunosnih stanica u TC povezan je s višim anatomskim (Hi-kvadrat test, $P = 0,027$) i patološkim prognostičkim (Hi-kvadrat test, $P = 0,013$) stadijem bolesti, višim histološkim gradusom (Hi-kvadrat test, $P = 0,013$) i višim patološkim statusom regionalnih limfnih čvorova (pN) (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$). ROC analizom testirana je prognostička vrijednost broja HSP70+ imunosnih stanica u TC TN raka dojke u procjeni pN statusa. U Tablici 6. prikazane su vrijednosti dobivene ROC analizom, a na Slici 13. grafički je prikazana ROC krivulja s 95-postotnim intervalom pouzdanosti za broj HSP70+ imunosnih stanica u TC TN raka dojke u odnosu prema pN statusu.

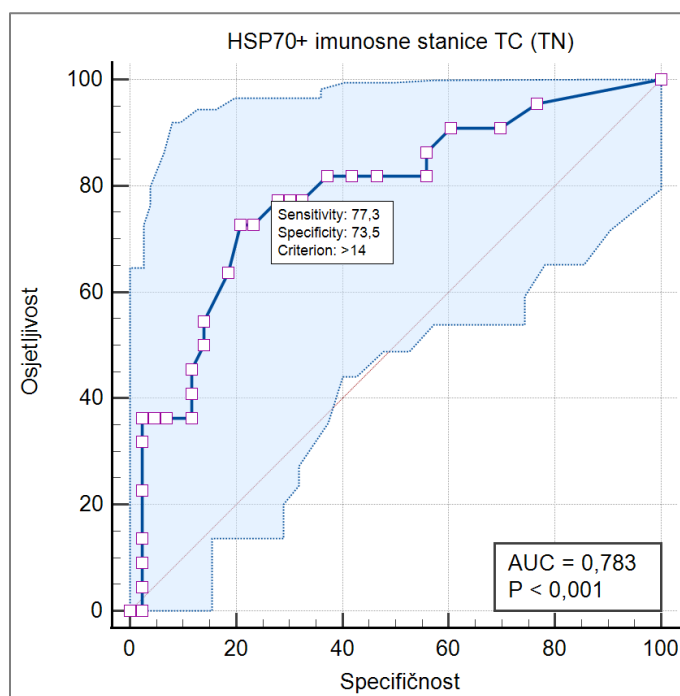
Iako je i veličina primarnog tumora statistički značajno povezana s rizikom metastatske bolesti u regionalnom limfnom čvoru ($AUC = 0,597$, $P = 0,015$) u ovoj analizi je ekspresija HSP70 u imunosnim stanicama TC bolji prognostički pokazatelj pN(+) statusa (razlika između AUC, $P = 0,0132$, Tablica 7, Slika 14) i jedini prognostički pokazatelj statistički povezan s metastatskim probojem kapsule limfnog čvora ($AUC = 0,78$, $P < 0,001$, Tablica 10, Slika 15).

U Tablici 8. prikazane su vrijednosti dobivene ROC analizom, a na Slici 15. grafički je prikazana ROC krivulja s 95-postotnim intervalom pouzdanosti za broj HSP70+ imunosnih stanica u TC TN raka dojke u odnosu prema metastatskom proboju kapsule limfnog čvora u slučajevima s pN(+) statusom.

Pronađene su i statistički značajne pozitivne korelacije između broja HSP70(+) imunosnih stanica u centralnom dijelu tumora i IH ekspresije CTLA-4 u TC (Spearmanova korelacija rangova, $N = 64$, $\rho = 0,34$, $P = 0,006$), broja FOXP3+ imunosnih stanica u ITF (Spearmanova korelacija rangova, $N = 61$, $\rho = 0,42$, $p < 0,001$) i broja FOXP3+ imunosnih stanica u metastatskom tkivu regionalnog limfnog čvora (Spearmanova korelacija rangova, $N = 13$, $\rho = 0,61$, $P = 0,026$).

Tablica 6. Vrijednosti dobivene ROC analizom za broj HSP70+ imunskih stanica u centralnom dijelu trostruko negativnog tumora u odnosu prema prisustvu ili odsustvu metastaze u regionalnom limfnom čvoru.

Površina ispod ROC krivulje (AUC, od engl. <i>Area Under ROC Curve</i>)	0,783
Standardna pogreška	0,0631
95 % interval pouzdanosti	0,664 – 0,876
Razina značajnosti P	< 0,0001



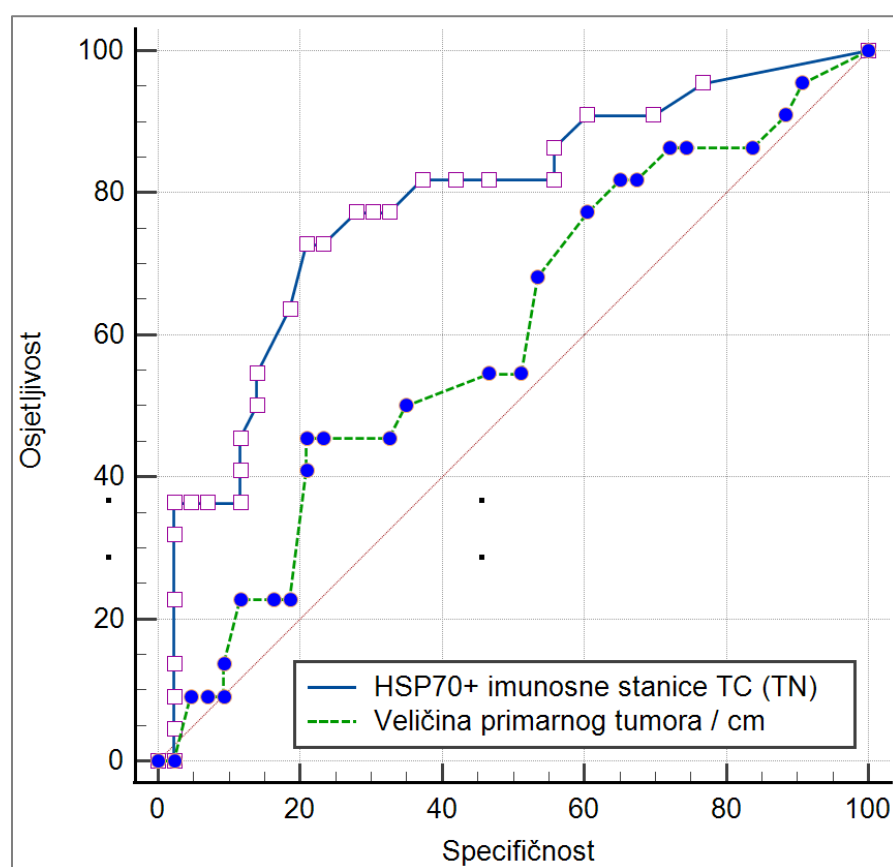
Slika 13. Grafički prikaz ROC krivulje za broj HSP70+ imunskih stanica u TIL-u centralnog dijela (TC) trostruko negativnog (TN) tumora u odnosu prema prisustvu ili odsustvu metastaze u regionalnom limfnom čvoru s pripadnim 95-postotnim intervalom pouzdanosti

Puna linija je dobivena na temelju izmjerenih vrijednosti, a dvije nepravilne isprekidane linije predstavljaju 95 % interval pouzdanosti. Broj HSP70+ imunskih stanica prognostički je čimbenik u TN raku dojke (AUC 0,783, $P < 0,001$) na osnovu kojeg se može razlučiti između prisustva ili odsustva metastaze u regionalnom limfnom čvoru. Kriterijska vrijednost broja HSP70+ imunskih stanica ≥ 14 povezana je s osjetljivosti testa od 77,3 %. (77,3 % nasumično odabranih pacijenata s TN rakom dojke s vrijednostima HSP70+ imunskih stanica ≥ 14 imat će metastazu u aksilarnom limfnom čvoru) i specifičnosti testa od 73,5 % (73,5 % nasumično odabranih pacijenata s TN rakom dojke s vrijednostima HSP70+ imunskih stanica < 14 neće imati metastazu u aksilarnom LČ). Za ovu kriterijsku vrijednost test će imati najveću točnost u predikciji metastatske bolesti u aksili (pN+ statusa), odnosno najmanji broj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata.

Tablica 7. Vrijednosti dobivene komparacijom para ROC krivulja broj HSP70+ imunskih stanica u TC i veličine primarnog tumora u TN raku dojke u odnosu prema pN statusu (pN(-) vs. pN(+))

Varijabla	AUC	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti	P
HSP70+ imunosne stanice (TC)	0,783	0,0631	0,664 – 0,876	0,0132
Veličina primarnog tumora (cm)	0,597	0,0756	0,468 – 0,717	

Pokrate: AUC = površina ispod ROC krivulje (od engl. Area Under ROC Curve), TC = centralni dio tumora

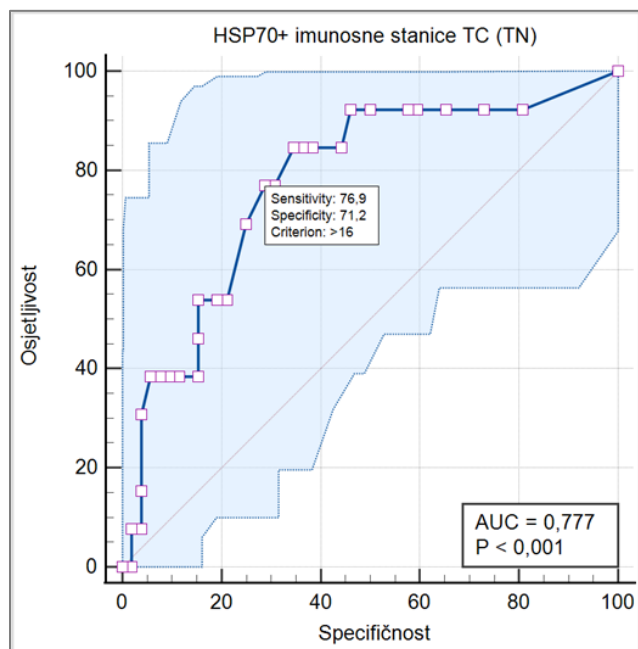


Slika 14. Grafički prikaz komparacije para ROC krivulja za broj HSP70+ imunskih stanica u centralnom dijelu tumora (TC) i veličine primarnog tumora u trostruko negativnom (TN) raku dojke odnosu prema pN statusu (pN(-) vs. pN(+))

Ekspresija HSP70 proteina u imunskim stanicama centralnog dijela TN raka dojke bolji je prognostički pokazatelj metastatske bolesti od veličine primarnog tumora ($P = 0,0132$).

Tablica 8. Vrijednosti dobivene ROC analizom za broj HSP70+ imunskih stanica u centralnom dijelu trostruko negativnog tumora u slučajevima s pN(+) statusom u odnosu prema metastatskom proboju kapsule limfnog čvora

Površina ispod ROC krivulje (AUC, od engl. <i>Area Under ROC Curve</i>)	0,777
Standardna pogreška	0,0756
95 % interval pouzdanosti	0,656 – 0,871
Statistički značaj P (Površina = 0,5)	0,0003



Slika 15. Grafički prikaz ROC krivulje za broj HSP70+ imunskih stanica u TIL-u centralnog dijela (TC) trostruko negativnog (TN) tumora u odnosu prema metastatskom proboju kapsule limfnog čvora kod pacijenata s pN(+) statusom s pripadnim 95-postotnim intervalom pouzdanosti.

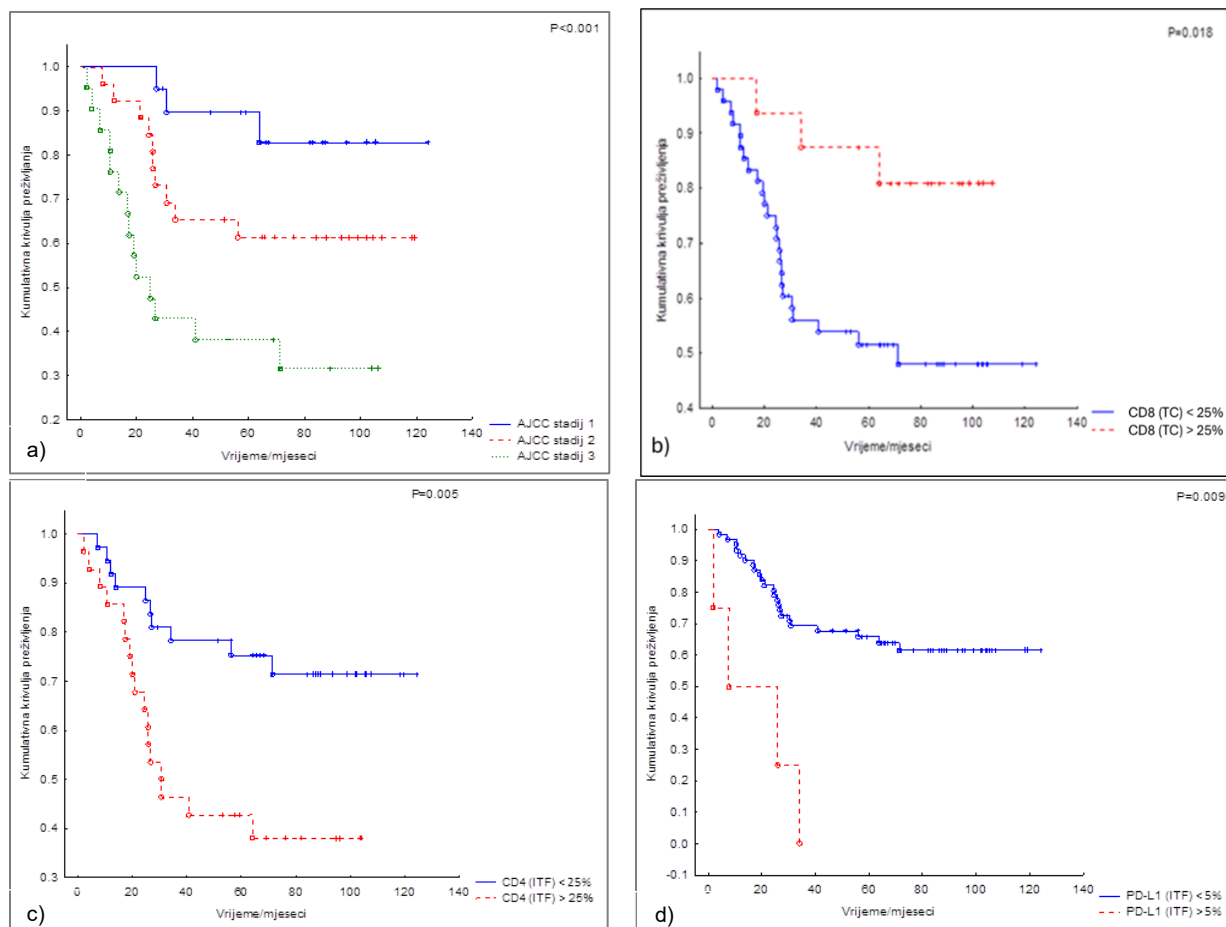
Puna linija je dobivena na temelju izmjerenih vrijednosti, a dvije nepravilne isprekidane linije predstavljaju 95 % interval pouzdanosti. Broj HSP70+ imunskih stanica u TC TN raka dojke prognostički je čimbenik u slučajevima s pN(+) statusom (AUC 0,777, $P < 0,001$) na osnovu kojega se može predvidjeti proboj kapsule limfnog čvora.

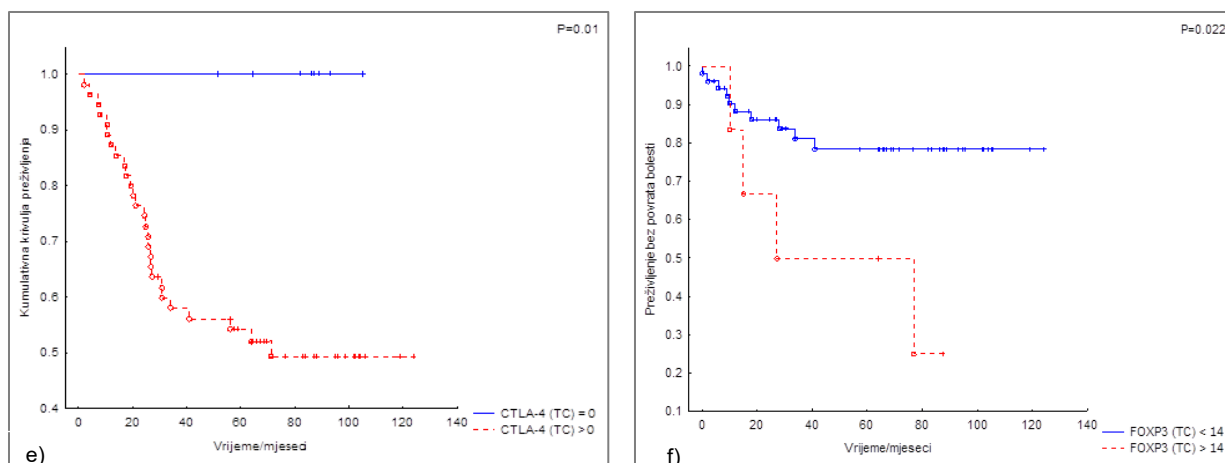
Kriterijska vrijednost broja HSP70+ imunskih stanica ≥ 16 povezana je s osjetljivosti testa od 76,9 %. (76,9 % nasumično odabranih pacijenata s pN(+) TN rakom dojke i brojem HSP70+ imunskih stanica ≥ 16 imat će proboj kapsule limfnog čvora) i specifičnosti testa od 71,2 %. (71,2 % nasumično odabranih pacijenata s pN(+) TN rakom dojke i brojem HSP70+ imunskih stanica < 16 neće imati proboj kapsule limfnog čvora). Za ovu kriterijsku vrijednost test će imati najveću točnost u predikciji proboja kapsule limfnog čvora, odnosno najmanji broj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata.

Pokrate: AUC = površina ispod ROC krivulje (od engl. *Area Under ROC Curve*), pN = patološki status regionalnih limfnih čvorova, TN =trostruko negativni

4.1.6. Prognostički značaj kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a u TN raku dojke

X-tile analizom određene su granične (*cut-off*) vrijednosti istraživanih varijabli, neophodne za analizu njihovog odnosa s onkološkim ishodima liječenja. Krivulje kumulativnog preživljenja i preživljenja bez povrata bolesti izračunate su Kaplan-Meierovom metodom za sve istraživane varijable. Statistički značajne razlike u ukupnom preživljenju (OS) dobivene su za varijacije CD8+ i CTLA-4+ imunskih stanica u TC (log-rank test, $P = 0,018$, $P = 0,01$), odnosno za varijacije CD4+ i PD-L1+ imunskih stanica u ITF (log-rank test, $P = 0,005$, $P = 0,009$). Za razlike u broju FOXP3+ T limfocita u TC dobivene su statistički značajne razlike u preživljenju bez povrata bolesti (DFS) (log-rank test, $P = 0,022$). Na Slici 16. grafički su prikazani svi statistički značajni rezultati dobiveni ovom analizom.





o Potpuno praćenje (događaj od interesa dogodio se u periodu praćenja)

+ Cenzurirani (nepotpuno praćenje; događaj od interesa nije se dogodio u periodu praćenja)

Slika 16. Grafički prikaz Kaplan–Meier kumulativne analize ukupnog preživljenja (OS) za a) Patološki prognostički stadij bolesti, b) CD8 ekspresiju u TC, c) CD4 ekspresiju u ITF, d) PD-L1 ekspresiju u ITF i e) CTLA-4 ekspresiju u TC. f) Analiza preživljenja bez povrata bolesti (DFS) za broj FOXP3+ stanica u TC.

Log-rank test pokazuje značajno kraće ukupno preživljenje kod skupine pacijenata s višim AJCC patološkim prognostičkim stadijem bolesti, $P = 0,001$ (a), ekspresijom CD8 nižom od 25 % u TC, $P = 0,018$ (b), ekspresijom CD4 iznad 25 % u ITF, $P = 0,005$ (c), ekspresijom PDL1 iznad 5 % u ITF, $P = 0,009$ (d) i bilo kojom ekspresijom CTLA-4 iznad 0 u TC, $P = 0,01$ (e). Log-rank test pokazuje značajno kraće vrijeme preživljenja bez povrata bolesti kod bolesnika s ekspresijom FOXP3 iznad 14 u TC, $P = 0,022$ (f).

Pokrate: AJCC = American Joint Committee of Cancer (11, 12), TC = centralni dio tumora, ITF = invazivna tumorska fronta.

Nakon multivarijantne Cox regresijske analize, neovisan prognostički značaj potvrđen je za pT status primarnog tumora ($P = 0,003$, $RR = 2,87$, $HR_{95\%} = 1,42 - 5,78$), patološki prognostički stadij bolesti ($P = 0,04$, $RR = 4,98$, $HR_{95\%} = 1,11 - 22,33$), udio CD4+T limfocita (cut-off 25 %, $P = 0,001$, $RR = 5,19$, $HR_{95\%} = 1,98 - 13,56$) i udio PD-L1+ imunskih stanica (cut-off 5 %, $P = 0,002$, $RR = 6,20$, $HR_{95\%} = 1,96 - 19,60$) u ITF, a povezanost između udjela CD8+limfocita u TC i ukupnog preživljenja ispitanica nije dosegla razinu statističkog značaja (cut-off 25 %, $P = 0,067$, $RR = 0,38$, $HR_{95\%} = 0,14 - 1,07$). Rezultati multivarijantne Cox regresijske analize prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati multivarijatne analize prognostičkog značaja za pT status, patološki prognostički stadij bolesti, udio CD4+ i PD-L1+ limfocita u ITF te udio CD8+ limfocita i broj CTLA-4+ limfocita u TC

N=68	β	SE	Omjer rizika	95-postotni interval pouzdanosti	P
pT	1,053	0,358	2,866	1,421 – 5,780	0,003
Anatomski stadij	-1,119	0,836	0,327	0,064 – 1,680	0,181
Patološki prognostički stadij	1,606	0,766	4,981	1,111 – 22,332	0,036
CD4+ (ITF)	1,646	0,490	5,186	1,983 – 13,560	0,001
CD8+ (TC)	-0,962	0,526	0,382	0,136 – 1,071	0,067
PD-L1+ (ITF)	1,824	0,587	6,198	1,961 – 19,590	0,002

pT = patološki status primarnog tumora, TC = centralni dio tumora, ITF = invazivna tumorska fronta, SE = standardna pogreška.

4.2. Rezultati druge (neoadjuvantne) studijske kohorte

4.2.1. Kliničko-patološke karakteristike druge studijske kohorte

Anonimizirani podaci dobiveni retrospektivnom analizom relevantnih kliničkih i patoloških parametara bolesnica neoadjuvantne studijske kohorte prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10 . Kliničko-patološke karakteristike druge studijske kohorte

Kliničko patološke karakteristike		TN N = 36 (%)	LB N = 53 (%)	Ukupno N = 89(%)
Dob	≤ 50	14 (38,9 %)	21 (39,6 %)	35 (39,3 %)
	> 50	22 (61,1 %)	32 (60,4 %)	54 (60,7 %)
Klinički status	1	0	0	0
primarnog tumora	2	35 (97,2 %)	53 (100 %)	88 (98,9 %)
cT	3	0	0	0
	4	1 (2,8 %)	0	1 (1,1 %)
Klinički status	0	26 (72,2 %)	22 (41,5 %)	48 (53,9 %)
regionalnih limfnih	1	6 (16,7 %)	25 (47,2 %)	31 (34,8 %)
čvorova cN	2	3 (8,3 %)	6 (11,3 %)	9 (10,1 %)
	3	1 (2,8 %)	0	1 (1,1 %)
RCB grupa	0 (pCR)	13 (36,1 %)	6 (11,3 %)	19 (21,3 %)
	1	1 (2,8 %)	5 (9,4 %)	6 (6,7 %)
	2	19 (52,8 %)	20 (37,7 %)	39 (43,8 %)
	3	3 (8,3 %)	21 (39,6 %)	24 (27 %)
Histološki tip tumora	Duktalni NST	32 (88,9 %)	50 (94,3 %)	82 (92,1 %)
	Lobularni	0	2 (3,8 %)	2 (2,2 %)
	Mucinozni	1 (2,8 %)	1 (1,9 %)	2 (2,2 %)
	Metaplastični	3 (8,3 %)	0	3 (3,4 %)
Nuklearni gradus	1	0	0	0
	2	9 (25 %)	33 (62,3 %)	42 (47,2 %)
	3	27 (75 %)	20 (37,7 %)	47 (52,8 %)

IH ekspresija PR'	≥ 1 % (+)	0	44 (83 %)	44(49,4 %)
	< 1 % (-)	36 (100 %)	9 (17 %)	45 (50,6 %)
IH ekspresija Ki67	< 30 %	1 (2,8 %)	15 (28,3 %)	16 (18,0 %)
	≥ 30 %	35 (97,2 %)	38 (71,7 %)	73 (82,0 %)
Anatomski stadij bolesti	IIA	26 (72,2 %)	23 (43,4 %)	49 (55,1 %)
	IIB	6 (16,7 %)	25 (47,2 %)	31 (34,8 %)
	IIIA	2 (5,6 %)	5 (9,4 %)	7 (7,9 %)
	IIIB	1 (2,8 %)	0	1 (1,1 %)
	IIIC	1 (2,8 %)	0	1 (1,1 %)
Klinički prognostički stadij bolesti*	IB	0	11 (20,8 %)	11 (12,4 %)
	IIA	2 (5,6 %)	25 (47,2 %)	27 (30,3 %)
	IIB	24 (66,7 %)	12 (22,6 %)	36 (40,4 %)
	IIIA	1 (2,8 %)	4 (7,5 %)	5 (5,6 %)
	IIIB	6 (16,7 %)	1 (1,9 %)	7 (7,9 %)
	IIIC	3 (8,3 %)	0	3 (3,4 %)
Recidiv/ progresija	Ne	26 (72,2 %)	40 (75,5 %)	66 (74,2 %)
	Da	10 (27,8 %)	13 (24,5 %)	23 (25,8 %)
	Lokoregionalni	3 (8,3 %)	5 (9,4 %)	8 (9 %)
	Udaljene metastaze	9 (25 %)	10 (18,9 %)	19 (21,3 %)
Broj mjeseci do povrata bolesti/ medijan (raspon)		18,5 (8 – 45)	38 (12 – 72)	30 (8 – 72)
Ukupno vrijeme praćenja/ medijan (raspon)		37,5 (11 – 87)	49 (11 – 89)	44 (11 – 89)

' svi tumori bili su HER2-, svi TN tumori bili su ER-, svi LB tumori bili su ER+

* za određivanje stadija uzet je u obzir nuklearni gradus tumora umjesto histološkog gradusa diferencijacije

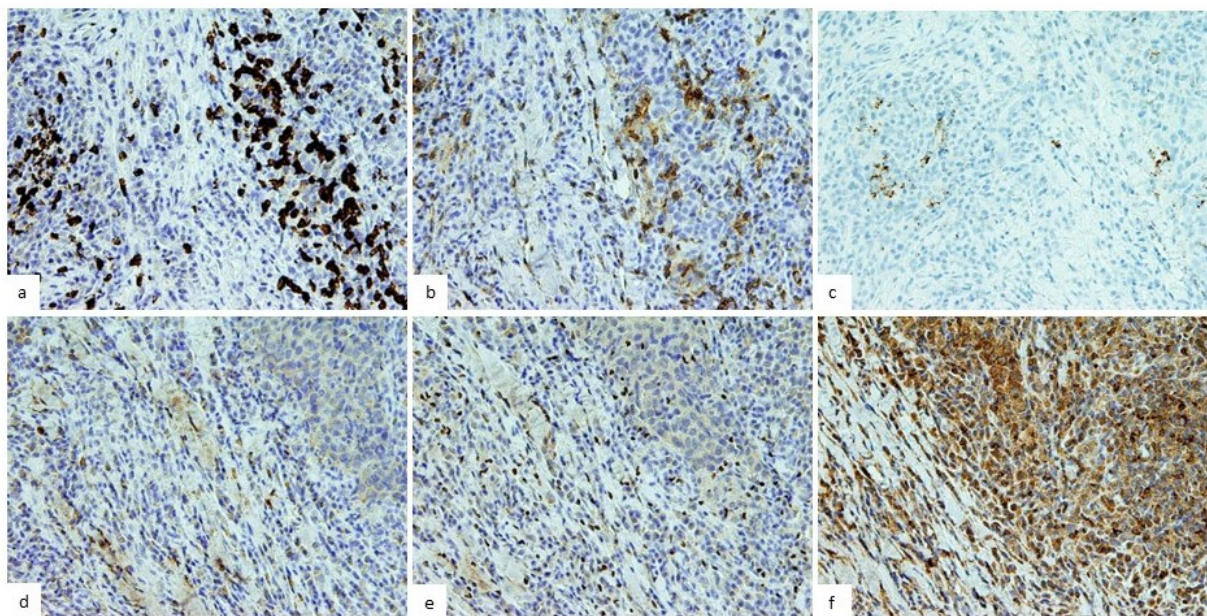
Pokrate: RCB = rezidualno opterećenje tumorom, pCR = kompletan patološki odgovor, IH = imunohistokemijska, PR = progesteronski receptori, Ki67 = indeks proliferacije, NST = nespecijalni tip, TN = trostruko negativni, LB = luminalni B

4.2.2. Rezultati kvantitativne i kvalitativne analize TIL-a u neoadjuvantnoj LB i TN skupini

Distribucija podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovljevom testom. Budući da su sve ispitivane varijable imale nepravilnu raspodjelu podataka, srednje su vrijednosti svih IH očitavanja neoadjuvantne skupine prikazane kao medijane vrijednosti dobivenih rezultata.

Udio stromalnog TIL-a određen je za sve slučajeve druge (neoadjuvantne) studijske kohorte. Medijana vrijednost u TN podskupini (N = 36) je bila 12 %, (raspon 3 – 70 %), a u LB podskupini (N = 53) 13 % (raspon 0,5 – 65 %). Statistički nije pronađena značajna razlika u udjelu TIL-a između TN i LB podskupine (Mann Whitney U test, P = 0,344). Kako bi te dvije podskupine bile bolje balansirane po stadiju bolesti, odabrali smo 36 slučajeva LB podskupine koji po anatomskom stadiju bolesti najbolje odgovaraju slučajevima TN skupine i ponovili statističku analizu. Ni na ovaj način nismo uspjeli detektirati statistički značajnu razliku u udjelu TIL-a između TN i LB skupine (Mann Whitney U test, P = 0,509), prikazano u Tablici 11.

Za svaki slučaj studijske kohorte učinjena je kvalitativna analiza TIL-a, prema protokolom definiranim IH markerima, na TMA formiranim od cilindara tkiva dobivenih širokoiglenom biopsijom. Reprezentativne fotografije IH bojenja u neoadjuvantnoj kohorti prikazane su na Slici 17/a-f.



Slika 17. Imunohistokemijska bojenja tkivnih mikroareja formiranih od cilindara tkiva dobivenih širokoiglenom biopsijom za: a) CD8, b) CD4, c) PD-L1, d) CTLA-4, e) FOXP3, f) HSP70; povećanje 200x

Dobiveni rezultati kvalitativne (IH) analize TIL-a statistički su komparirani između neoadjuvantne i kontrolne skupine, te između TN skupine i odabranih 36 slučajeva LB skupine koji po anatomskom

stadiju bolesti najbolje odgovaraju slučajevima TN skupine. Na ovaj način osigurali smo da jedino razlike u biologiji tumora mogu utjecati na razlike u TIL-u između TN i LB tumora. Dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 11.

Tablica 11. Rezultati kvantitativne i kvalitativne analize TIL-a u kontrolnoj skupini i cjelokupnoj studijskoj kohorti, trostruko negativnoj skupini i selektiranim slučajevima luminalne B skupine

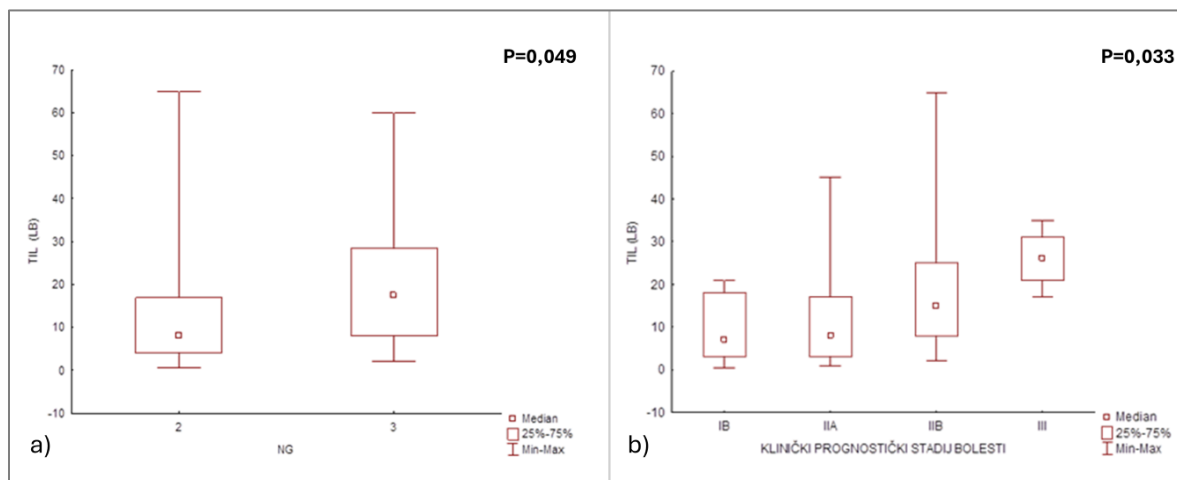
Varijabla	Kontrolna skupina** (N=36) (medijan)	Mann Whitney U test P	1° tumor			
			cijela kohorta ^u (N=89) (medijan)	TN [#] (N=36) (medijan)	Mann Whitney U test P	LB ^s (N=36) (medijan)
TIL (%)			13.000	12.000	0,509	14.500
CD4/CD8			1.000	1.000	0,001	0.795
CD8 (%)	0.647	< 0,001	12.500	12.250	0,848	11.500
CD4 (%)	1.000	< 0,001	13.000	15.000	0,140	7.7500
FOXP3 (N)	0.000	< 0,001	37.500	41.500	0,340	31.500
PDL1 (%)	0.000	< 0,001	0.0000	0.1500	0,190	0.0000
CTLA4 (N)	0.000	< 0,001	27.000	31.500	0,346	30.250
HSP70* (N)	2.000	< 0,001	11.250	20.000	0,206	10.500

*HSP70 (+) imunosne stanice, **tkivo dojke s benignim promjenama, [#]Trostruko negativna skupina, ^sSelektirana Luminalna B skupina ujednačena je po anatomskom stadiju bolesti s trostruko negativnom skupinom, ^uu cijelu kohortu su uključeni svi TN i svi LB tumori

Sva očitavanja IH bojenja bila su značajno viših vrijednosti u tumorskom tkivu u komparaciji s tkivom dobroćudnih promjena dojke kontrolne skupine (Mann Whitney U test, $P < 0,001$). Statistički nije bilo značajne razlike u udjelu CD8+, CD4+ i PD-L1+ imunosnih stanica, niti u broju FOXP3+, CTLA-4+ i HSP70+ imunosnih stanica između TN i LB kohorte balansirane po stadiju bolesti (Mann Whitney U test, sve P vrijednosti su prikazane u Tablici 11.). Međutim, statistički je značajno viši omjer CD4/CD8 povezan s TN skupinom (Mann Whitney U test, $P = 0,001$).

4.2.3. Odnos kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a i tradicionalnih kliničko-patoloških prognostičkih parametara u LB raku dojke

Unutar cijele LB skupine (N = 53) više su vrijednosti udjela stromalnog TIL-a povezane s višim nuklearnim gradusom (NG) tumora (Mann-Whitney U test, $P = 0,049$) i s višim kliničkim prognostičkim stadijem bolesti (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks, $P = 0,033$). Statistički značajna povezanost udjela TIL-a s NG tumora i kliničkim prognostičkim stadijem bolesti u LB kohorti prikazana je grafički na Slici 18/a-b. Conoverovim testom je u post-hoc analizi utvrđeno da se udio TIL-a u kliničkim prognostičkim stadijima IB i IIA statistički značajno razlikuje od udjela TIL-a u III. stadiju bolesti.



Slika 18. Povezanost TIL-a s nuklearnim gradusom tumora i kliničkim prognostičkim stadijem bolesti u luminalnoj B skupini

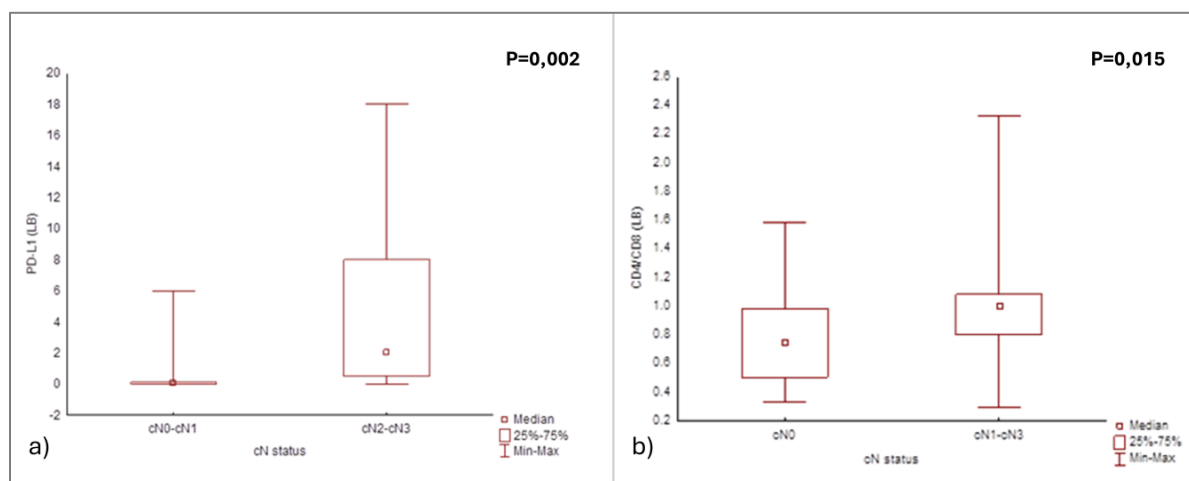
Prikazan je udio TIL-a u LB tumorima u odnosu prema nuklearnom gradusu tumora (a) i kliničkom prognostičkom stadiju bolesti (b)

Pokrate: TIL = tumorski infiltrat limfocita, NG = nuklearni gradus, LB = luminalni B

Kvantitativne varijacije TIL-a nisu bile statistički značajno povezane s kliničkim statusom primarnog tumora (cT), kliničkim statusom regionalnih limfnih čvorova (cN) i anatomskim stadijem bolesti u LB podskupini, ni na razini cijele neoadjuvantne kohorte.

Unutar cjelokupne LB kohorte (N = 53) viši je omjer CD4/CD8, viši udio PD-L1+ i veći broj HSP70+ imunskih stanica statistički povezan s višim proliferacijskim indeksom tumorskih stanica ($Ki67 > 30\%$) (Mann Whitney U test, $P = 0,045$, $P = 0,018$, $P = 0,040$) te s metastatskom bolesti u regionalnim limfnim čvorovima. Pritom je tumorska progresija u regionalne limfne čvorove (bilo koji cN(+) status) bila povezana s višim omjerom CD4/CD8 (Mann-Whitney U test, $P = 0,015$), a klinički palpabilni konglomerati limfnih čvorova (cN2-3 status) s višim vrijednostima PD-L1+ i HSP70+ imunskih stanica

u TIL-u (Mann-Whitney U test, $P = 0,002$, $P = 0,026$). Povezanosti udjela PD-L1+ imunskih stanica i omjera CD4/CD8 u upalnom infiltratu LB tumora s cN statusom prikazane su grafički na Slici 19/a-b.



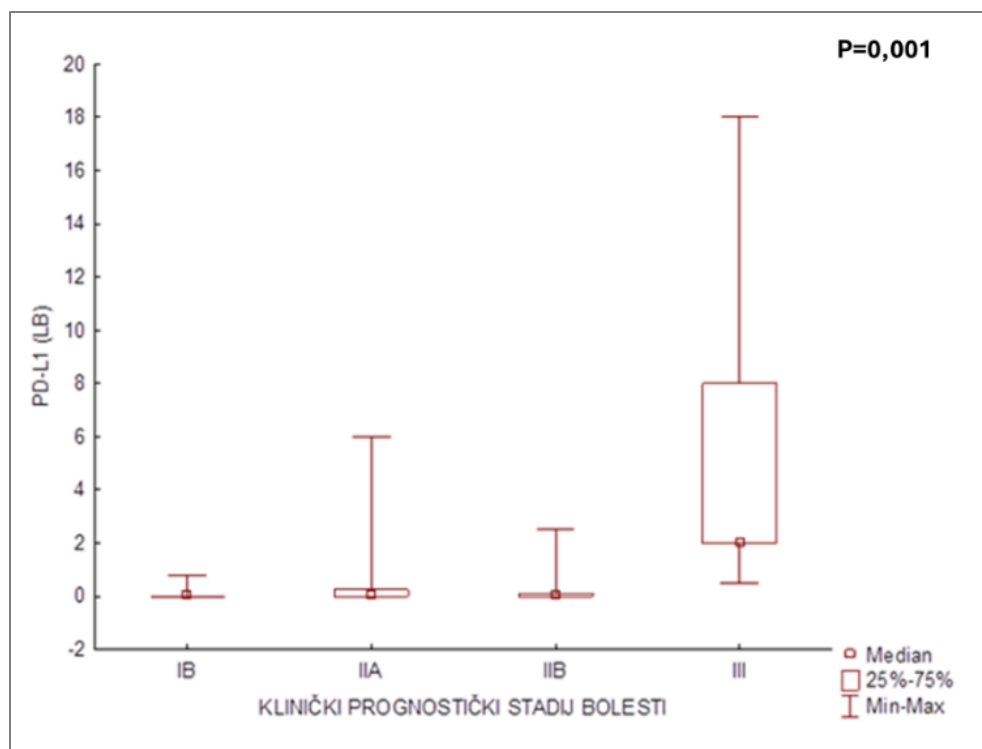
Slika 19. Povezanost cN statusa s udjelom PD-L1+ imunskih stanica i omjerom CD4/CD8 u upalnom infiltratu luminalnog B tumora

U luminalnoj B skupini viši je udio PDL-1+ imunskih stanica statistički značajno povezan s cN2-3 statusom, $P = 0,002$ (a), a viši omjer CD4/CD8 s cN(+) statusom, $P = 0,015$ (b)

Pokrate: LB = luminalni B, cN = patološki status regionalnih limfnih čvorova

Nastavno na povezanost s višim udjelom stromalnog TIL-a, viši je NG LB tumora u statistički značajnoj asocijaciji i s višim brojem FOXP3+ i CTLA-4+ imunskih stanica (Mann Whitney U test, $P = 0,023$, $P = 0,024$), a viši klinički prognostički stadij bolesti s višim udjelom PD-L1+ i višim brojem FOXP3 + i HSP70+ imunskih stanica u TIL-u (Kruskal-Wallis, $P = 0,001$, $P = 0,007$, $P = 0,020$). Za sve varijable statistički je značajna razlika između nižih i viših stadija bolesti potvrđena i Conoverovom post hoc analizom. Broj FOXP3+ T limfocita statistički se značajno razlikuje između IB-IIA i IIB-III (odnosno značajan je porast zabilježen u IIB stadiju), a ekspresija PD-L1 i HSP70 u imunskim stanicama između IB-IIB i III stadija bolesti (odnosno značajan je porast zabilježen u IIIA stadiju).

Statistički značajne povezanosti kliničkog prognostičkog stadija bolesti i proporcije PD-L1+ imunskih stanica u LB skupini (Kruskal-Wallis, $P=0,001$) prikazane su grafički na Slici 20. Statistički značajan porast udjela PD-L1+ imunskih stanica u upalnom infiltratu pridruženom luminalnim B tumorima u III. stadiju bolesti, u odnosu na ranije stadije, potvrđen je i Conoverovom post hoc analizom.



Slika 20. Povezanost kliničkog prognostičkog stadija bolesti i proporcije PD-L1+ imunskih stanica u LB skupini.

Prikazan je udio PD-L1+ imunskih stanica raspršenih po površini tkivne areje u odnosu prema kliničkom prognostičkom stadiju bolesti u luminalnoj B skupini.

Pokrate: LB = luminalni B

U neoadjuvantnoj TN podskupini nisu detektirane nikakve statistički značajne asocijacije između kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a i standardnih kliničkih i patoloških prognostičkih parametara. Kvalitativne i kvantitativne varijacije TIL-a i ekspresije HSP70 u imunskim stanicama nisu statistički značajno povezane sa razlikama u DFS pacijenata sa TN ili LB imunofenotipom raka dojke neoadjuvantne studijske kohorte.

4.2.4. Međusobne korelacije TIL-a i IH imunskih markera u TIL-u LB i TN raka dojke neoadjuvantne kohorte

Nekoliko je pozitivnih korelacija izračunato Spearmanovom korelacijom rangova između komponenti TIL-a unutar LB i TN kohorte. Sve su statistički značajne korelacije između imunskih varijabli u LB i TN neoadjuvantnoj skupini, s pridruženom vrijednosti koeficijenta korelacije (ρ), prikazane u Tablici 12.

Tablica 12. Korelacije imunskih varijabli u luminalnom B i trostruko negativnom raku dojke

LB (N=40)	TIL	CD8	CD4	FOXP3	PDL-1	CTLA-4	HSP70+IC
TIL		+++	+++	+	+	++	++
CD8	+++		+++	+	T	++	++
CD4	+++	+++		+	+	++	+
FOXP3	+	+	+		+++	+	++
PDL-1	+	T	+	+++			++
CTLA-4	++	++	++	+			+
HSP70+IC	++	++	+	++	++	+	

TN (N=16)	TIL	CD8	CD4	FOXP3	PDL-1	CTLA-4	HSP70+IC
TIL		+++	++		T		
CD8	+++		+++		++		
CD4	++	+++		++	++		
FOXP3			++				
PDL-1	T	++	++				
CTLA-4							
HSP70+IC							

Koeficijent korelacije (rho) interpretiran je kao zanemariv (manji od 0,30), (+) slabo pozitivan (0,30 – 0,50), (++) umjereno pozitivan (0,50 – 0,70), (+++) snažno pozitivan (0,70 – 0,90) i (+++++) izrazito snažno pozitivan (> 0,90). Sve dobivene razlike smatrane su statistički značajne za P vrijednosti manje od 0,05.

Pokrate: HSP70 + IC = HSP70+ imunološke stanice, T = trend pozitivne korelacije za P = 0,06

Udio stromalnog TIL-a u TN i LB skupini statistički značajno pozitivno koreliraju s proporcijom CD8+ (Spearmanova korelacija rangova, N = 16, rho = 0,744, P = 0,01; N = 40, rho = 0,842, P = 0,0001) i CD4+ T limfocita (Spearmanova korelacija rangova, N = 16, rho = 0,653, P = 0,006; N = 40, rho = 0,842, P = 0,0001). Međutim, različite su korelacije TIL-a s regulatornim molekulama primijećene u odnosu na imunofenotip raka dojke. U TN kohorti pozitivna korelacija između TIL-a i PD-L1+ imunskih stanica nije dosegla statistički značajnu razinu. Međutim za obje je populacije T limfocita, CD8+ i CD4+, zabilježena statistički značajna pozitivna korelacija s udjelom PD-L1+ stanica (Spearmanova korelacija rangova, N = 16, rho = 0,56, P = 0,023; N = 16, rho = 0,57, P = 0,020), a za udio CD4+ još i korelacija s brojem FOXP3+ Tregs (Spearmanova korelacija rangova, N = 16, rho = 0,53, P = 0,035). Za razliku od

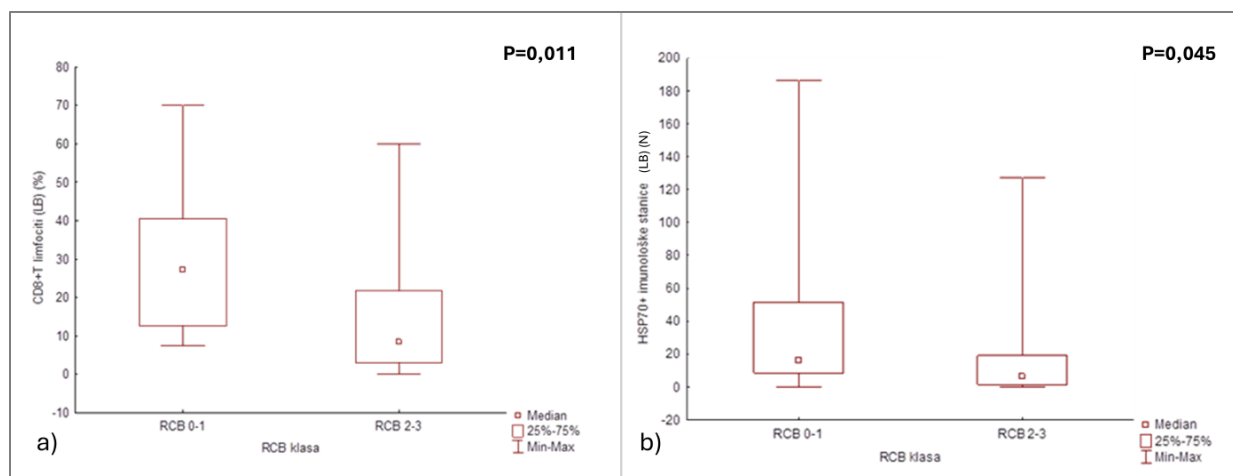
TN kohorte, u LB skupini proporcija CD4+ i CD8+ stanica najjače korelira s brojem CTLA-4+ imunskih stanica (Spearmanova korelacija rangova, $N = 40$, $\rho = 0,69$, $P = 0,0001$; $N = 40$, $\rho = 0,57$, $P = 0,0001$), a viši udio CD8+ stanica još i s većim brojem HSP70+ imunskih stanica (Spearmanova korelacija rangova, $N = 40$, $\rho = 0,51$, $P = 0,01$).

Viša ekspresija CTLA-4+ i HSP70+ imunskih stanica u LB podskupini također je i u statistički pozitivnoj korelaciji s ukupnim udjelom stromalnog TIL-a (Spearmanova korelacija rangova, $N = 40$, $\rho = 0,53$, $P = 0,0001$; $N = 40$, $\rho = 0,67$, $P = 0,0001$), a viši broj FOXP3+ T limfocita s višom proporcijom PD-L1+ imunskih stanica, većim brojem HSP70+ i CTLA-4+ imunskih stanica (Spearmanova korelacija rangova, $N = 40$, $\rho = 0,72$, $P = 0,0001$; $N = 40$, $\rho = 0,59$, $P = 0,0001$; $N = 40$, $\rho = 0,45$, $P = 0,003$).

4.2.5. Prediktivni značaj kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a u LB raku dojke

U odnosu na četiri standardne patološke RCB klase (pCR/RCB 0, RCB 1, RCB 2 i RCB 3) nisu pronađene statistički značajne asocijacije s kvalitativnim i kvantitativnim varijacijama TIL-a i ekspresijom HSP70 proteina u imunskom infiltratu na razini cijele kohorte niti u imunofenotipski specifičnim podskupinama luminalnog B i trostruko negativnog karcinoma (Kruskal-Wallis), vjerojatno posljedično nedostatnoj veličini uzorka za komparaciju između 4 kategorije (podskupine). Obzirom na navedeno oblikovane su dvije klinički i prognostički značajne kategorije za statističku analizu, od koji jedna predstavlja dobar odgovor na NAKT, a druga slabiji odgovor ili izostanak odgovora na NAKT. Za potrebe statističke analize TN podskupine prva kategorija predstavljena je kompletnim patološkim odgovorom na NAKT (pCR/RCB 0), a druga prisustvom rezidualnog tumora nakon NAKT (RCB 1-3). U TN podskupini primjećena je povezanost između gušćeg infiltrata CD8+ limfocita i kompletnog patološkog odgovora, međutim asocijacija nije dosegla razinu statističkog značaja (Mann-Whitney U test, $P = 0,0733$).

Za analizu LB podskupine prva kategorija oblikovana je fuzijom RCB 0 i RCB 1 skupina, a druga fuzijom RCB 2 i RCB 3 skupina. U odnosu prema dvije klinički značajne prognostičke kategorije u LB skupini (RCB 0+RCB 1 vs. RCB 2+RCB 3) pronađena je statistički značajna povezanost s infiltracijom CD8+ limfocita i s ekspresijom HSP70 proteina u imunskom infiltratu (Mann-Whitney U test, $P = 0,0107$, $P = 0,0446$), a povezanost s kvantitativnim varijacijama TIL-a nije dosegla razinu statističkog značaja (Mann-Whitney U test, $P = 0,0603$). Povezanost udjela CD8+ limfocita i broja HSP70+ imunskih stanica u TIL-u LB raka dojke s odgovorom tumora na NAKT prikazani su grafički na Slici 21/a-b.



Slika 21. Povezanost udjela CD8+ limfocita i broja HSP70+ imunskih stanica u luminalnom B tumoru s odgovorom tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

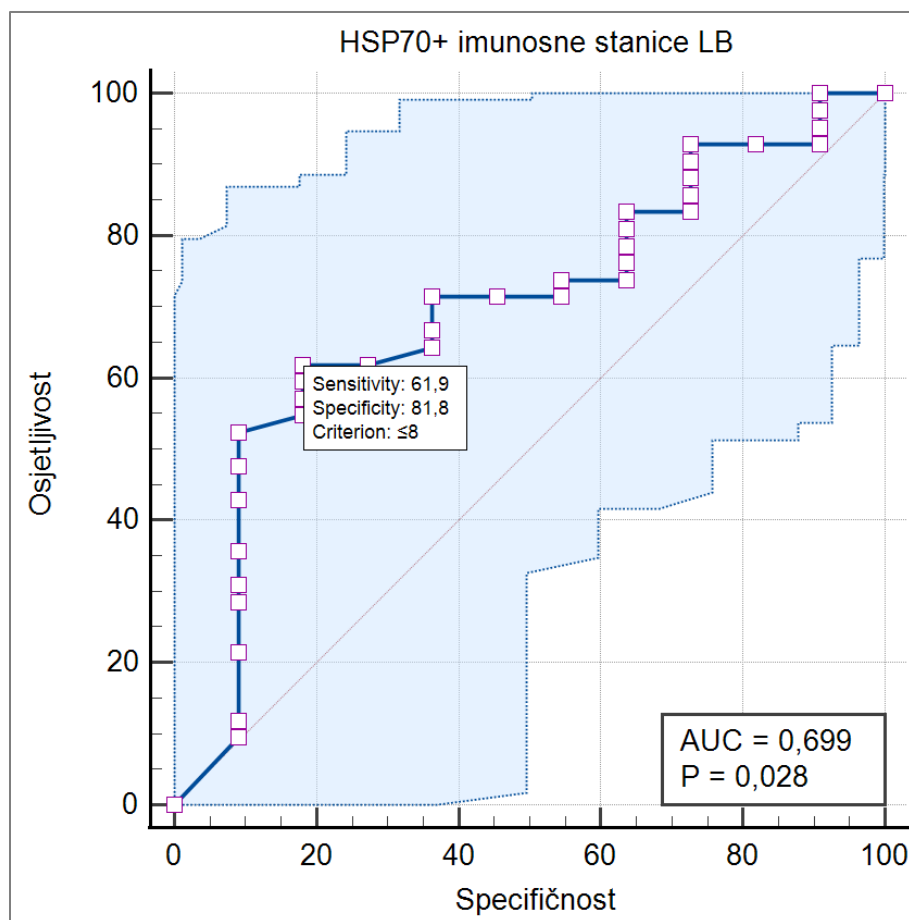
Prikazan je odnos između odgovora tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju i udjela CD8+T limfocita (a), odnosno broja HSP70+ imunskih stanica (b) raspršenih po površini tkivne areje luminalnih B tumora.

Pokrate: LB = luminalni B, RCB = rezidualno opterećenje tumorom (od engl. *residual cancer burden*)

ROC analizom je testirana vrijednost markera CD8 i HSP70 u predikciji dobrog odgovora na NAKT (RCB 0-1) u LB skupini te su određene kriterijske vrijednosti za svaku varijablu pri kojoj će specifičnost i osjetljivost testa biti optimalni. U tablicama 13. i 14. prikazane su vrijednosti dobivene ROC analizom, a na slikama 22. i 23. grafički su prikazane ROC krivulje s 95-postotnim intervalom pouzdanosti za broj HSP70+ imunskih stanica i udio CD8+ limfocita u LB raku dojke u odnosu prema odgovoru tumora na NAKT.

Tablica 13. Vrijednosti dobivene ROC analizom za broj HSP70+ imunskih stanica u luminalnom B raku dojke u odnosu prema odgovoru tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

Površina ispod ROC krivulje (AUC, od engl. <i>Area Under ROC Curve</i>)	0,699
Standardna pogreška	0,0905
95 % interval pouzdanosti	0,558-0,817
Statistički značaj P (Površina = 0,5)	0,0277



Slika 22. Grafički prikaz ROC krivulje za broj HSP70+ imunskih stanica u upalnom infiltratu luminalnog B raka dojke u materijalu iglene biopsije u odnosu na odgovor tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju s pripadnim 95-postotnim intervalom pouzdanosti

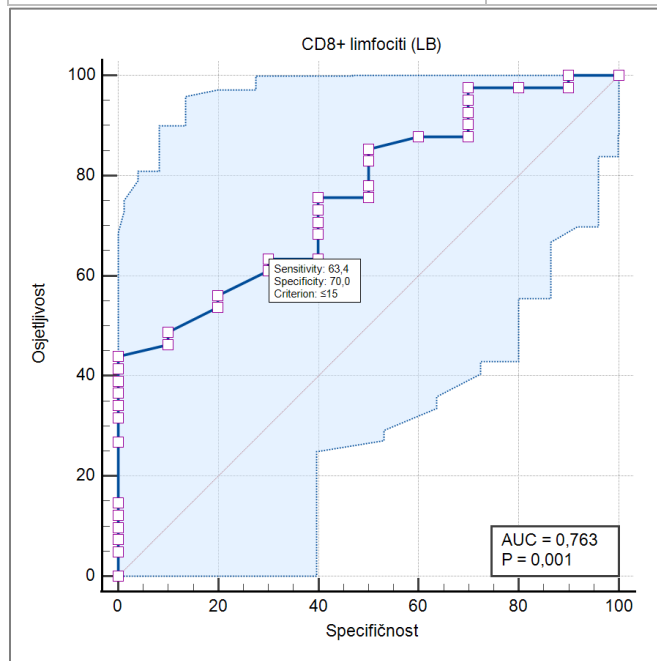
Puna linija je dobivena na temelju izmjerenih vrijednosti, a dvije nepravilne isprekidane linije predstavljaju 95-postotni interval pouzdanosti. Broj HSP70+ imunskih stanica prediktivni je čimbenik u luminalnom B (LB) raku dojke (AUC 0,669, $P = 0,028$) na osnovu kojeg se može unaprijed razlučiti između dobrog (RCB 0-1) ili lošeg (RCB 2-3) odgovora LB tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju (NAKT).

Kriterijska vrijednost broja HSP70+ imunskih stanica ≤ 8 povezana je s osjetljivosti testa od 61,9 % (61,9 % nasumično odabranih pacijenata s LB rakom dojke i preterapijskim vrijednostima broja HSP70+ imunskih stanica ≤ 8 imat će loš odgovor na NAKT) i specifičnosti testa od 81,8% (81,8 % nasumično odabranih pacijenata s LB rakom dojke i preterapijskim vrijednostima HSP70+ imunskih stanica > 8 imat će dobar odgovor na NAKT). Za ovu kriterijsku vrijednost test će imati najveću točnost u predikciji dobrog ili lošeg odgovora tumora na NAKT, odnosno najmanji broj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata.

Pokrate: AUC = površina ispod ROC krivulje (od engl. *Area Under ROC Curve*), RCB = rezidualno opterećenje tumorom (od engl. *residual cancer burden*)

Tablica 14. Vrijednosti dobivene ROC analizom udio CD8+ limfocita u luminalnom B raku dojke u odnosu prema odgovoru tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

Površina ispod ROC krivulje (AUC, od engl. <i>Area Under ROC Curve</i>)	0,763
Standardna pogreška	0,0773
95% interval pouzdanosti	0,624-0,871
Statistički značaj P (Površina=0.5)	0,0007



Slika 23. Grafički prikaz ROC krivulje za udio CD8+ limfocita u upalnom infiltratu luminalnog B raka dojke u materijalu iglene biopsije u odnosu na odgovor tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju s pripadnim 95-postotnim intervalom pouzdanosti.

Puna linija je dobivena temeljem izmjerenih vrijednosti, a dvije nepravilne isprekidane linije predstavljaju 95 % interval pouzdanosti. Udio CD8+ limfocita prediktivni je čimbenik u luminalnom B (LB) raku dojke (AUC 0,763, $P = 0,001$) na osnovu kojeg se može unaprijed razlučiti između dobrog (pRCB 0-1) ili lošeg (pRCB 2-3) odgovora tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju (NAKT).

Kriterijska vrijednost udjela CD8+ limfocita ≤ 15 % povezana je s osjetljivosti testa od 63,4 % (63,4 % nasumično odabranih pacijenata s LB rakom dojke s preterapijskim vrijednostima CD8+ imunskih stanica ≤ 15 % imat će loš odgovor na NAKT) i specifičnosti testa od 70 % (70 % pacijenata s LB rakom dojke s preterapijskim vrijednostima udjela CD8+ imunskih stanica > 15 % imat će dobar odgovor na NAKT). Za ovu kriterijsku vrijednost test će imati najmanji broj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata.

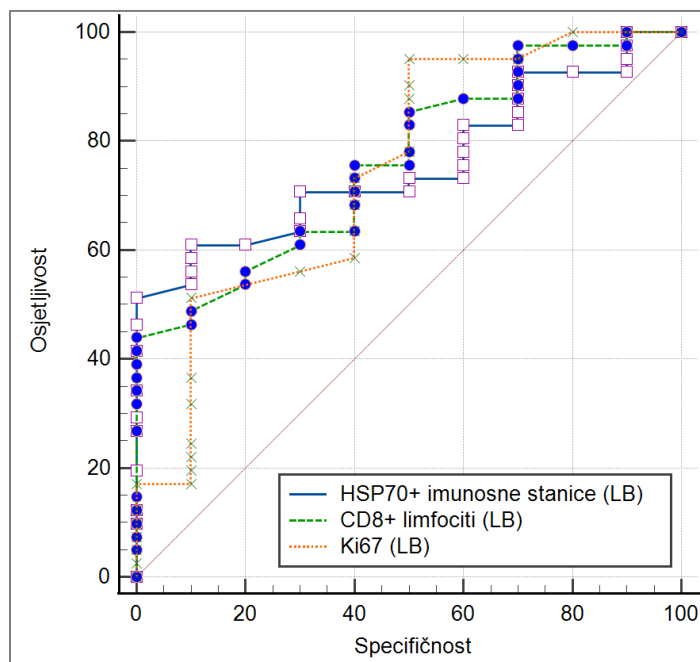
Pokrate: AUC = površina ispod ROC krivulje (od engl. *Area Under ROC Curve*), RCB = rezidualno opterećenje tumorom (od engl. *residual cancer burden*)

Komparacijom površina ispod ROC krivulja za broj HSP70+ imunskih stanica, udio CD8+ limfocita i Ki67 u LB raku dojke statistički je utvrđeno da su sve tri varijable jednako pouzdani čimbenici za predikciju odgovora LB tumora na NAKT. Rezultati dobiveni komparacijom ROC krivulja prikazani su u Tablici 15. i grafički na Slici 24.

Tablica 15. Rezultati komparacije parova ROC krivulja za broj HSP70+ imunskih stanica, udio CD8+ limfocita i indeks proliferacije Ki67 u luminalnom B (LB) raku dojke u odnosu prema odgovoru tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

Varijabla	AUC	Standardna pogreška	95 % interval pouzdanosti	P
HSP70+ imunostne stanice (LB)	0,759	0,0702	0,618 – 0,867	0,9336 (vs. CD8)
CD8+ T limfociti (LB)	0,763	0,0773	0,624 – 0,871	0,8843 (vs. Ki67)
Ki67 (LB)	0,745	0,0954	0,604 – 0,857	0,8945 (vs.HSP70)

LB = luminalni B, AUC = površina ispod ROC krivulje (od engl. *Area Under ROC Curve*)



Slika 24. Grafički prikaz komparacije parova ROC krivulja za broj HSP70(+) imunskih stanica, udio CD8+ T limfocita i indeks proliferacije Ki67 u luminalnom B (LB) raku dojke u predikciji dobrog (RCB 0-1) ili lošeg (RCB 2-3) odgovora na neoadjuvantnu kemoterapiju (NAKT)

Udio CD8+ limfocita, broj HSP70+ imunskih stanica i Ki67 jednako su vrijedni čimbenici za predikciju odgovora LB tumora na NAKT; $P = 0,9336$ (HSP70 vs. CD8), $P = 0,8945$ (HSP70 vs. Ki67), $P = 0,8843$ (CD8 vs. Ki67).

Pokrate: RCB = rezidualno opterećenje tumorom (od engl. *residual cancer burden*)

U multivarijantnoj analizi niti jedan od imunosnih markera nije dosegao statistički značaj. Iako je za udio CD8+ T limfocita primijećena povezanost s odgovorom na NAKT, ista nije dosegla razinu statističkog značaja ($P = 0,065$). Indeks proliferacije Ki67 potvrđen je kao neovisan čimbenik za predikciju odgovora LB tumora na NAKT ($P = 0,042$). Rezultati multivarijantne analize prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16. Rezultati dobiveni multivarijantnom analizom za broj HSP70+ imunosnih stanica, udio CD8+ limfocita i indeks proliferacije Ki67 u luminalnom B raku dojke u predikciji odgovora tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

Varijabla	β	Standardna pogreška	Omjer izgleda	95-postitni interval pouzdanosti	P
HSP70+ imunosne stanice	0,005	0,009	0,995	0,977 – 1,014	0,583
CD8+ limfociti	0,047	0,025	0,954	0,908 – 1,003	0,065
Ki67	0,067	0,033	0,935	0,877 – 0,998	0,042

5. RASPRAVA

Tumorski infiltrat limfocita (TIL) predstavlja specifični lokalni imunosni odgovor organizma na tumor koji se tijekom tumorogeneze mijenja [95]. U prethodnim istraživanjima pronađen je upalni infiltrat i u stromi dobroćudnih proliferativnih lezija dojke, a porast udjela stromalnog TIL-a zabilježen je tijekom razvoja invazivnog raka dojke iz prekursorskih proliferativnih lezija [96]. Imunohistokemijska (IH) ekspresija svih istraživanih imunosnih markera u TIL-u, kao i ekspresija HSP70 u imunosnim stanicama, statistički je značajno više zastupljena u tumorskom tkivu trostruko negativnog (TN) i luminalnog B (LB) raka dojke u odnosu na tkivo benignih promjena dojke kontrolne skupine, međutim odnos prema izravnim prekursorskim lezijama nije analiziran u ovom istraživanju.

U preinvazivnom stadiju raka dojke, duktalnom in situ karcinomu, viši je udio TIL-a povezan s lošijom prognozom pacijenata, kraćim periodom remisije i višom stopom lokalnog recidiva [97]. I u invazivnom raku dojke gušći TIL je povezan s višim histološkim gradusom, višim indeksom proliferacije te HER2+ i TN biologijom tumora [34]. Međutim, u velikom broju luminalnih tumora također je pronađen gust upalni infiltrat u tumorskoj stromi. Budući da na prirodu imunosnog odgovora, odnosno inflamatorni profil TIL-a utječu specifičnosti mutacija u tumoru, različiti podtipovi raka dojke mogu imati kvalitativno ili/i funkcionalno različit TIL pa prognostički značaj TIL-a može varirati unutar ove biološki heterogene skupine tumora [95, 98].

Visoke stope kromosomske nestabilnosti i aneuploidije u ranom stadiju TN raka dojke povezane su s disfunkcijom proliferativne aktivnosti tumorskih stanica i proinflamatornim (antitumorskim) profilom TIL-a [99, 100]. Ovo objašnjava naizgled paradoksalnu asocijaciju gušćeg imunosnog infiltrata s boljom prognozom pacijenata koja je do sada višestruko potvrđena u istraživanjima ranog stadija TN raka dojke [101, 102]. Prognostički značaj stromalnog TIL-a prihvaćen je za znanstveni dokaz 1b stupnja i suvremene smjernice [103, 104] preporučuju rutinsko određivanje ovog markera u TN raku dojke. Međutim, uočena povezanost TIL-a s boljim onkološkim ishodima pacijenata (OS i DFS) odnosi se prvenstveno na visoki udio TIL-a u ranom stadiju TN raka dojke [105, 106], dok za više stadije bolesti ova asocijacija nije jasno definirana [98, 106, 107]. Zbog fenomena imunosnog preslagivanja u tumoru tijekom tumorogeneze dolazi do kvantitativnih, ali i kvalitativnih i/ili funkcionalnih promjena TIL-a, pa čak i unutar istog podtipa raka dojke prognostički značaj TIL-a može varirati [98, 106].

Literaturni podaci o varijacijama TIL-a tijekom rasta TN tumora nisu konkluzivni. U odnosu na rast primarnog tumora zabilježeni su i porast [98] i pad [100] TIL-a, ili pak nije pronađena nikakva asocijacija

između te dvije varijable [108]. Vihervuori i suradnici ukazali su na pad TIL-a i CD8+ T limfocita u TIL-u TN raku dojke s primarnim tumorom većim od 2 cm i povezali pad obje varijable s većim rizikom mortaliteta [100]. U našoj adjuvantnoj TN kohorti udio TIL-a i CD8+ T limfocita raste do pT2 statusa, nakon čega obje varijable opadaju daljnjim porastom pT statusa primarnog tumora. Ipak, treba naglasiti da je srednja vrijednost veličine pT2 tumora bila 2,8 cm i da je 66 % pT2 tumora bilo promjera manjeg od 3 cm. I u odnosu na anatomske i patološko-prognostički stadij bolesti primijećen je sličan statistički trend povezanosti s obje spomenute varijable. Udio TIL-a i CD8+ T limfocita raste progresijom bolesti iz I. u II. stadij, a zatim opadaju prema III. stadiju bolesti. Porast udjela stromalnog TIL-a do II. stadija bolesti korelira s ranije objavljenim rezultatima Glajcara i suradnika [98], međutim u spomenutoj analizi nije istražen odnos prema višim stadijima bolesti.

S obzirom na fenomen imunosnog preslagivanja u tumoru, porast TIL-a i CD8+ T limfocita u TIL-u primarnog tumora pT2 statusa, odnosno u II. stadiju bolesti, koji smo primijetili u adjuvantnoj TN kohorti, ne moraju nužno biti povezani s boljom prognozom pacijenata. U našoj analizi viši udio TIL-a u invazivnoj tumorskoj fronti (ITF) statistički značajno korelira ne samo s višim udjelom CD8+ T limfocita, već i s porastom udjela CD4+ stanica te s višom ekspresijom regulatornih molekula PD-L1 i CTLA-4, a viši udio TIL-a u centralnom dijelu tumora (TC) korelira isključivo s višim udjelom CD4+ limfocita i s višom ekspresijom PD-L1, CTLA-4 i HSP70 u TIL-u. Udio CD8+ T limfocita i u ITF i u TC također je u pozitivnoj korelaciji s imunosupresivnim stanicama i regulatornim molekulama u TIL-u. Naši rezultati sugeriraju da bi se pT2 status primarnog tumora i II. stadij TN raka dojke mogli preklapati s fazom ekvilibrija imunosnog preslagivanja u tumoru u kojoj se, uz antitumorski imunosni odgovor, aktiviraju i brojni regulatorni mehanizmi. Zbog aktivacije fizioloških mehanizama negativne povratne sprege tijekom dugotrajnog podražaja imunosnog sustava i tumorom posredovane negativne regulacije imunosnog odgovora postepeno dolazi do konverzije inflamatornog profila TIL-a iz proupalnog i antitumorskog u imunosupresivni i protumorski. U posljednjoj fazi, tzv. fazi bijega, prevladana je imunosna obrana organizma od tumora. TIL je tipično imunosupresivnog profila i promovira rast tumora, ili je udio TIL-a niži budući da slabije imunogenični klonovi tumorskih stanica, koji su izbjegli imunosni napad u fazi eliminacije, ne potiču novi antitumorski imunosni odgovor. U analizi adjuvantne TN skupine i pad TIL-a i pad CD8+ T limfocita zabilježeni su u području ITF i TC pT3-4 statusa primarnog tumora, odnosno u III. stadiju bolesti.

Ogiya i suradnici povezali su bijeg tumora imunosnom sustavu s progresijom i metastatskim širenjem odbjeglog tumorskog kлона budući da su u tkivu udaljene metastaze primijetili niži udio TIL-a u komparaciji s udjelom TIL-a u primarnom tumoru [106]. U drugim istraživanjima nije pronađena razlika u TIL-u između primarnog tumora i metastaze, niti je razjašnjen značaj kvantitativnih varijacija TIL-a u

primarnom tumoru za limfogeno i hematogeno širenje tumora [98, 107, 108]. U ovoj analizi nismo uspjeli povezati razlike u gustoći TIL-a u primarnom tumoru i progresije tumora u regionalne limfne čvorove. Također, nismo detektirali kvantitativne ni kvalitativne razlike između TIL-a primarnog tumora i TIL-a regionalne metastaze TN raka dojke. Ipak, primijetili smo nekoliko asocijacija između kvalitativnih varijacija u TIL-u primarnog TN tumora i progresije tumora u regionalne limfne čvorove. Pritom su viši udio CD11c+ dendritičkih stanica i viši broj CTLA-4+ imunskih stanica u ITF primarnog tumora, te viši broj HSP70+ imunskih stanica u TC povezani s pN(+) statusom, odnosno s progresijom tumora u drenažne limfne čvorove.

Većina je tumorskih DC tolerogenog fenotipa s niskom ekspresijom kostimulacijskih i MHC molekula, što može biti posljedica inhibiranog sazrijevanja ovih stanica, posredovano učinkom egzogenog HSP70. Alternativno, zrele tumorske DC mogu biti funkcionalno inaktivirane CTLA-4 molekulom, koja se visokim afinitetom veže za kostimulacijske receptore DC i onemogućava kostimulacijski signal.

Tolerogene tumorske DC nisu učinkovite u aktivaciji naivnih T limfocita, ali mogu potaknuti diferencijaciju Treg [46, 48, 109, 110]. Zanimljivo je da su sve tri imunске varijable, povišena ekspresije CTLA-4 i HSP70 u TIL-u te viši udio DC, u ovoj analizi statistički značajno povezane s progresijom tumora u regionalne limfne čvorove. Iako temeljem metodologije ovog istraživanja ne možemo zaključiti direktnu povezanost (uzročno-posljedičnu vezu) između ovih imunskih varijabli i progresije tumora u regionalne limfne čvorove, dobiveni su rezultati u skladu s dosadašnjim spoznajama i našom hipotezom o ulozi tumorskih DC, CTLA-4+ i HSP70+ imunskih stanica u formiranju imunosupresivnog profila TIL-a s dominacijom populacije Treg, koji podržavaju limfogeno i hematogeno progresiju tumora [111, 112]. HSP70 izražava 80 % karcinoma dojke [113, 114]. Visoka ekspresija HSP70 u tumorskim stanicama raka dojke povezana je s visokim histološkim gradusom diferencijacije, pN(+) statusom, invazivnošću i diseminacijom tumora u životinjskim i in vitro modelima te s lošijim ukupnim preživljenjem pacijenata [51, 114-117]. Povišena ekspresija ovog molekularnog *chaperona* u tumorskim stanicama suprimira apoptozu, omogućuje diobu oštećenih tumorskih stanica i doprinosi progresiji tumora [118-120]. Iako smo tijekom istraživanja primijetili snažnu ekspresiju HSP70 u tumorskim stanicama TN i LB raka dojke, ostali smo fokusirani na značaj povišene ekspresije HSP70 u TIL-u, odnosno na uloge ovog proteina u kontekstu imunskog odgovora u tumoru.

Nastavno na ulogu ove molekule u homeostazi staničnih proteina i inhibiciji apoptoze, HSP70 ostvaruje multiple učinke u modulaciji imunskog odgovora [67, 75]. Uz već spomenutu inhibiciju sazrijevanja DC, opisani su i alternativni mehanizmi kojima HSP70 regulira imunski odgovor [67, 75]. Uz indukciju ekspresije HSP70, povišena aktivnost HSF1 transkripcijskog faktora suprimira izražaj pro-upalnih gena u imunskoj stanici, a egzogeni HSP70 ostvaruje učinke signalnog glasnika u oblikovanju imunskog odgovora, koji po prirodi može biti proupalni i antiupalni [68]. Antiinflamatorne učinke ostvaruje

vezivanjem za specifične receptore regulacijskih T limfocita, supresivnih stanica mijeloidne loze [75-77], ali i drugih stanica mijeloidnog porijekla poput tumorskih DC. Povišena koncentracija imunosupresivnih citokina i niska ekspresija kostimulacijskih molekula u membrani DC, oboje posredovani učinkom HSP70, povećavaju odjeljak regulacijskih T limfocita na periferiji [75], koji su povezani s bijegom tumora imunosnom sustavu i limfogenom progresijom tumora u regionalne limfne čvorove [111, 112]. Iako ekspresija HSP70 u TIL-u TN raka dojke nije statistički značajno varirala između područja ITF i TC, u ovom su istraživanju sve statistički značajne asocijacije i korelacije s povišenom ekspresijom HSP70 primijećene isključivo u odnosu na varijacije broja HSP70+ imunosnih stanica u TC. Ovo upućuje na aktivnu ulogu TIL-a TC u regulaciji imunosnog odgovora na tumor. Pozitivne korelacije HSP70+ imunosnih stanica u TC s ekspresijom CTLA-4 u TIL-u TC, brojem FOXP3+ regulacijskih T limfocita u TIL-u ITF i metastatskom tkivu regionalnog limfnog čvora, te snažna povezanost s cN(+) statusom sugeriraju da HSP70+ imunosne stanice u TIL-u imaju ulogu u negativnoj regulaciji imunosnog odgovora u tumoru. Iako svi naši rezultati ukazuju da su indukcija imunosupresivnog profila TIL-a, bijeg tumora imunosnom sustavu i progresija u regionalne limfne čvorove povezani s povišenom ekspresijom HSP70 u TIL-u, temeljem dizajna ovog istraživanja nismo u mogućnosti zaključiti je li imunosupresija posredovana negativnom regulacijom ekspresije pro-upalnih gena (HSF1 transkripcijski faktor) u imunosnim stanicama ili chaperokinskim (citokinskim) efektom koji egzogeni HSP70 ostvaruje vezanjem za receptore regulacijskih T limfocita i stanica mijeloidne loze u TIL-u. Također, nije moguće odrediti točan mehanizam u podlozi ovdje primijećene snažne asocijacije između povišene ekspresije HSP70 u imunosnim stanicama u TC i tumorske progresije u regionalne limfne čvorove.

Uz pN(+) status i metastatski proboj kapsule limfnog čvora, viši broj HSP70+ imunosnih stanica u TC povezali smo s još nekoliko negativnih prognostičkih čimbenika; višim anatomskim i prognostičkim stadijem bolesti i višim histološkim gradusom diferencijacije tumora. Stoga možemo zaključiti da povišena ekspresija HSP70 u TIL-u centralnog dijela TN raka dojke ima negativan prognostički značaj. Vrijednost dijagnostičkog testa za predikciju pN statusa, utemeljenog na IH ekspresiji HSP70 u imunosnim stanicama TC, potvrđena je i ROC analizom. Budući da se pri kriterijskoj vrijednosti od 14 HSP70+ imunosnih stanica u TIL-u može s visokom senzitivnosti i specifičnosti razlučiti između pN(+) i pN(-) statusa, a da vrijednosti ≥ 16 mogu ukazati na metastatski proboj kapsule limfnog čvora, rutinska IH evaluacija broja HSP70+ imunosnih stanica u TC može pridonijeti optimizaciji planiranja kirurškog zahvata u pazušnoj jami kod pacijenata s TN rakom dojke.

Za razliku od rezultata ranijih istraživanja TIL-a u ranom stadiju TN raka dojke [101, 102, 105], ovdje nije pronađena direktna povezanost između udjela stromalnog TIL-a i dugoročne prognoze pacijenata (OS i DFS). Koncept imunosnog uređivanja [121, 122] i naši rezultati sugeriraju kvalitativno i funkcionalno različit profil TIL-a u odnosu na patološki status primarnog tumora. Moguće je da upravo zbog različitog

prognostičkog značaja TIL-a u odnosu na pT status nismo pronašli asocijaciju s dugoročnim ishodima, s obzirom na to da smo u kohortu uključili pacijentice pT1-pT4 statusa.

Doprinos pojedinih subpopulacija imunskih stanica u TIL-u za dugoročnu prognozu pacijenata s TN rakom dojke nejasan je iz dosadašnjih literaturnih podataka. Rezultati koji ukazuju na prognostički značaj CD8+ [107, 123, 124], CD4+ [125], FOXP3+ [107, 119, 120, 126] i PD-L1+ imunskih stanica [108, 125, 127, 128] u TIL-u TN raka dojke su različiti, pa čak i oprečni. Naši rezultati upućuju na bolje ishode pacijenata s višim udjelom CD8+ stanica, odnosno nižim udjelom CD4+, FOXP3+, PD-L1+ i CTLA4+ stanica u TIL-u. Nezavisan negativni prognostički značaj za ukupno preživljenje pacijenata potvrđen je multivarijatnom analizom za varijacije CD4+ T limfocita i PD-L1+ imunskih stanica u TIL-u ITF, dok je za varijacije CD8+ limfocita u TC potvrđen tek statistički trend povezanosti. Viši udio PD-L1+ stanica korelira sa višim udjelom TIL-a i s biološki agresivnijim tumorima [129]. Ova je molekula marker kroničnog podražaja upalnih stanica i inhibicije anti-tumorskog imunskog odgovora pa ne iznenađuje ovdje potvrđena snažna negativna asocijacija s preživljenjem pacijenata. Ranijim je istraživanjima utvrđeno da udio CD4+ limfocita raste s porastom TIL-a [129] te da su CD4+ stanice dominantna limfocitna populacija u TIL-u TC, za razliku od TIL-a ITF, gdje u ranom stadiju bolesti prevladavaju CD8+ limfociti [130, 131]. U ovoj analizi porast udjela TIL-a u ITF korelira s porastom udjela obje limfocitne populacije, iako je jača korelacija primijećena za CD8+ limfocite. Nasuprot tome, porast TIL-a u TC u korelaciji je isključivo s porastom CD4+ limfocita. Budući da prirodu imunološkog odgovora u TIL-u određuje funkcionalno heterogena skupina CD4+ T limfocita, posljednja je opservacija također u prilog već spomenutoj hipotezi o aktivnoj ulozi TC u formiranju inflamatornog profila TIL-a. Rani je stadij TN raka dojke u prethodnim istraživanjima povezan s proupalnim TIL-om i dominacijom Th1 limfocita u CD4+ populaciji, a TIL imunosupresivnih karakteristika u kasnijim stadijima TN tumora i u tumorima s ekspresijom luminalnih gena povezan je s Th2 profilom CD4+ T limfocita i s visokim udjelom FOXP3+ CD4+ stanica [95, 98, 132, 133]. Viši je udio CD4+ limfocita u TIL-u već i ranije povezan s lošijim OS (98, 130), što je podudarno s rezultatom ovog istraživanja. Dobiveni rezultat negativnog prognostičkog značaja indirektno sugerira dominaciju Th2 profila u CD4+ populaciji T limfocita naše TN kohorte.

Za razliku od varijacija u TIL-u ITF, u stromi centralnog dijela tumora nismo uspjeli potvrditi neovisan prognostički značaj kvalitativnih varijacija TIL-a. Za povezanosti udjela CD8+ T limfocita u TC s preživljenjem pacijenata, odnosno broja FOXP3+ T stanica u TC s preživljenjem bez povrata bolesti, statistički se je značaj izgubio nakon multivarijatne analize, moguće zbog općenito nižeg udjela TIL-a u TC. Iako su i u ranijim istraživanjima ovih imunskih varijabli pronađeni slični odnosi s prognozom pacijenata [134], većina literaturnih podataka sugerira da se molekularne interakcije između tumorskih

stanica, komponenti ekstracelularnog matriksa i imunosnih stanica u stromi pretežno odražavaju u promjenama ITF [135, 136]. Naši rezultati podržavaju utjecaj spacijalne distribucije TIL-a na prognozu, s jačim prognostičkim značajem varijacija TIL-a invazivne tumorske fronte. Međutim, asocijacije i korelacije s brojem HSP70+ imunosnih stanica, koje smo primijetili isključivo u centralnom dijelu tumora, dominacija CD4+ populacije u TIL-u TC i pozitivne korelacije TIL-a TC s ekspresijom regulatornih molekula, upućuju na aktivnu ulogu TIL-a TC u negativnoj regulaciji imunosnog odgovora u TN raku dojke.

Zaključno, prilikom procjene prognostičkog značaja TIL-a u TN raku dojke, uz udio TIL-a treba uzeti u obzir i prirodu imunosnog odgovora, koja se mijenja tijekom rasta i progresije primarnog tumora. Rezultati IH analize tumorskog upalnog infiltrata površinskog i centralnog dijela primarnog TN raka dojke sugeriraju da su *priming* i aktivacija specifičnog CD8+T klona učinkoviti do pT2 statusa primarnog tumora, ali je njihova izvršna funkcija u imunosupresivnom tumorskom mikrokolišu djelomično kompromitirana. Pad TIL-a i CD8+ limfocita s daljnjim porastom pT statusa primarnog tumora ukazuje da je i aktivacija citotoksičnih T limfocita inhibirana u višim stadijima bolesti. Dinamika i sastav TIL-a u ITF i TC TN raka dojke, u odnosu na veličinu primarnog tumora, upućuju da bi imunoterapija inhibitorima kontrolnih točaka mogla biti najučinkovitija u pacijenata s pT2 statusom primarnog tumora. Spacijalna distribucija imunosnih markera u tumoru značajna je za regulaciju imunosnog odgovora u tumoru, tumorsku progresiju u regionalne limfne čvorove i prognozu pacijenata. Obzirom na neovisan prognostički značaj CD4+ T limfocita i PD-L1+ imunosnih stanica u području invazivne tumorske fronte, rutinsko određivanje ovih varijabli može doprinijeti u stratifikaciji rizika pacijenata s TN rakom dojke i unaprijediti odluku o eskalaciji i de-eskalaciji sistemskog liječenja. Rutinska IH evaluacija broja HSP70+ imunosnih stanica u TIL-u centralnog dijela tumora može pridonijeti optimizaciji regionalnog tretmana pacijenata s TN rakom dojke.

Kvantitativna je evaluacija TIL-a i kvalitativna IH analiza imunosnih markera ponovljena u drugoj, neoadjuvantnoj kohorti u koju smo uz pacijentice s TN rakom dojke uključili i one s LB imunofenotipom. Uz evaluaciju imunogeničnosti LB tumora u odnosu na imunogeničnost TN raka dojke, istražena je i priroda imunosnog odgovora u TIL-u LB tumora, te značaj kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a za stratifikaciju rizika i predikciju odgovora LB tumora na NAKT.

Iako se ER+ luminalni tumori dojke smatraju slabije imunogeničnim tumorima, malo je vjerojatno da se ova tvrdnja odnosi na cijelu ER+HER2- kohortu, s obzirom na to da je riječ o heterogenoj skupini tumora s različitim molekularnim putevima razvoja [10], ekspresijom gena, kliničkim karakteristikama i mutacijskim opterećenjem [8, 29]. Na molekularnoj razini LB tumori imaju nižu ekspresiju gena povezanih s ER, višu ekspresiju bazalnih i proliferacijskih gena i više mutacijsko opterećenje u odnosu na

LA tumore, i zbog toga je veća vjerojatnost da će potaknuti imunosni odgovor na tumor. Rezultati prijašnjih studija impliciraju da ovaj agresivni podtip luminalnog raka dojke ima višu ekspresiju gena povezanih s imunosnim odgovorom i viši udio stromalnog TIL-a, koji unutar ovog podtipa ER+ raka dojke može imati prognostički i prediktivni značaj [34, 83, 84, 86]. U stanicama TN i LB tumora, ali ne i u LA tumora, pronađena je povišena ekspresija HSP70, koju paradoksalno inducira TNF α i koji štiti stanice raka dojke od imunosnog napada [71].

Budući da je u dosadašnjim istraživanjima TIL-a skupina LB tumora rijetko proučavana izolirano od ostatka ER+ skupine, literaturni podaci, koji se odnose na prognostički i prediktivni značaj upalnog infiltrata u ovom podtipu raka dojke, raznoliki su i nisu konkluzivni. U našoj neoadjuvantnoj skupini usporedili smo rezultate kvantitativne i kvalitativne (IH) analize TIL-a između TN i LB tumora, koje smo ujednačili po anatomskom stadiju bolesti. Na ovaj smo način osigurali da isključivo biologija bolesti može utjecati na eventualne razlike u TIL-u. S obzirom na to da nismo pronašli statistički značajnu razliku ni u udjelu TIL-a, ni u ekspresiji istraživanih IH markera u TIL-u između TN i LB skupine, zaključili smo da su LB tumori jednako imunogenični kao i TN rak dojke, odnosno da su LB tumori imunogenična podskupina ER+ raka dojke. U daljnjoj smo analizi nastavili s evaluacijom potencijalnih implikacija ove opservacije na postojeću kliničku praksu.

U sustavima zdravstvene zaštite u kojima nisu dostupni genski testovi za procjenu rizika, klinička procjena rizika, utemeljena na validiranim prognostičkim čimbenicima, koristi se za selekciju pacijenata kod kojih se očekuje benefit od dodatnih terapijskih protokola uz standardnu endokrinu terapiju [137-143]. Stoga je u rutinskoj kliničkoj praksi važan i značajan svaki marker koji može sugerirati visokorizičnu biologiju unutar skupine LB tumora. U ovom smo istraživanju testirali može li kvantitativna i kvalitativna evaluacija TIL-a doprinijeti stratifikaciji rizika u LB imunofenotipu raka dojke, odnosno može li optimizirati postojeću prognostičku klasifikaciju i terapijske preporuke koje su utemeljene na kliničkoj procjeni rizika. Iako nismo uspjeli direktno povezati preživljenje bez povrata bolesti (DFS) s kvantitativnim i kvalitativnim varijacijama TIL-a u LB skupini, vjerojatno posljedično u kratkom periodu praćenja, nekoliko je varijacija TIL-a povezano s agresivnijom biologijom luminalnih tumora, višim kliničkim prognostičkim stadijima bolesti i tumorskom progresijom u regionalne limfne čvorove. Budući da smo u analizi adjuvantne TN kohorte primijetili značajno viši udio TIL-a u tumorima pT2 statusa u odnosu na tumore pT1 i pT3-4 statusa, u neoadjuvantnu smo skupinu uključili dominantno ispitanice s cT2 statusom primarnog tumora pa varijacije TIL-a u odnosu prema T statusu nije bilo moguće istražiti u ovoj skupini. U odnosu prema veličini primarnog tumora (mm) unutar LB skupine nismo detektirali statistički značajne kvantitativne i kvalitativne razlike u TIL-u.

Viši udio stromalnog TIL-a i veći broj FOXP3+ T limfocita u LB raku dojke povezani su s višim NG tumora i višim stadijima bolesti, odnosno upućuju na agresivniju biologiju tumora ili/i viši klinički rizik. Ovo je u skladu s rezultatima ranijih istraživanja, u kojima je signal estrogenskog receptora povezan s diferencijacijom regulacijskih T limfocita u TMO i u kojima je viši udio TIL-a u ER+ raku dojke povezan s lošijim ishodima pacijenata [71, 81-83]. U luminalnim tumorima u kojima proliferacija ne ovisi o signalu ER, diferencijacija FOXP3+ T reg u TIL-u, tercijarnim limfoidnim strukturama (TLS) i regionalnim limfnim čvorovima raste zbog fenomena imunosnog preslagivanja tijekom tumorogeneze. U ranijim je istraživanjima u imunologiji povišena diferencijacija ove populacije T limfocita na periferiji povezana s povišenom ekspresijom CTLA-4 i funkcionalnom inaktivacijom DC, povišenom koncentracijom imunosupresivnih citokina i egzogenog HSP70 koji inhibiraju sazrijevanje DC te signalom koji posreduje vezivanje PD-L1 za PD-1 receptor [40, 41, 43, 44, 46, 48, 109, 110]. Regulacijski T limfociti negativno reguliraju imunوسي odgovor na nekoliko različitih nivoa [41] i značajno doprinose u formiranju imunosupresivnog profila TIL-a, koji omogućuje bijeg stanica raka imunosnom sustavu domaćina i progresiju bolesti [111, 112].

U našoj je LB kohorti ekspresija svih evaluiranih imunosupresivnih markera, PD-L1, HSP70 i CTLA-4, u imunosnim stanicama pridruženim tumoru u pozitivnoj korelaciji s brojem FOXP3+ T limfocita u TIL-u. Ipak, najsnažnija je pozitivna korelacija zamijećena u odnosu prema ekspresiji PD-L1. Nastavno na navedeno viša je ekspresija PD-L1 i HSP70 u TIL-u primarnog LB tumora povezana s biološki agresivnijim tipovima tumora, s tumorima u višim stadijima bolesti i tumorima s pridruženim cN2-3 statusom, odnosno konglomeratima metastatskih limfnih čvorova u pazušnoj jami. Dobiveni rezultati sugeriraju da bi povišena diferencijacija Treg i posljedično tome povišena ekspresija CTLA-4 u TIL-u LB raka dojke mogli biti posredovani povišenom ekspresijom PD-L1 i HSP70 u imunosnom infiltratu, koja raste tijekom tumorogeneze biološki agresivnijih formi LB raka dojke, neovisnih o signalu ER. Ovaj je zaključak u skladu s ranije opisanim regulatornim ulogama PD-L1 i HSP70 u kontekstu imunosnog odgovora [35, 41, 43, 44, 59, 66, 67, 68, 75]. Opisane korelacije i asocijacije nismo detektirali u neoadjuvantnoj TN kohorti, moguće zbog premalog uzorka. Međutim, u analizi adjuvantne TN skupine primijećeni su slični odnosi s ekspresijom HSP70 u TIL-u, iako su se dominantno odnosili na TIL centralnog (dubokog) dijela tumora. Nasuprot tome, varijacije u ekspresiji PD-L1 ni u adjuvantnoj TN skupini nismo uspjeli direktno povezati s varijacijama u broju regulacijskih T limfocita, ni s progresijom tumora u regionalne limfne čvorove. Značajan porast udjela PD-L1+ imunosnih stanica u LB tumorima zabilježen je u III A prognostičkom stadiju bolesti. S obzirom na to da PD-L1, uz poticaj diferencijacije Treg, posreduje i inhibiciju intracelularnog signala antigen-specifičnog T staničnog receptora, ova molekula inhibira i aktivaciju i izvršnu funkciju CD8+ limfocita. Zato je porast ekspresije ovog markera u TIL-u viših stadija LB tumora funkcionalno jednak padu udjela stromalnog TIL-a i udjela CD8+T

limfocita u pT3-4 statusu primarnog tumora i III. stadiju bolesti adjuvantne TN skupine. Drugim riječima, obje opservacije impliciraju fazu bijega tumora imunom sustavu u III. stadiju bolesti.

Slom citotoksične funkcije limfocita, koji prethodi bijegu tumora imunom sustavu, predstavljen je u ranijoj literaturi višim omjerom CD4/CD8 u TIL-u [98, 129]. I naši su rezultati u prilog imunosupresivne uloge CD4⁺ stanica u TIL-u. Na temelju rezultata analize adjuvantne kohorte zaključili smo da je CD4⁺ populacija limfocita u TN tumorima dominantno Th2 profila. I pozitivne korelacije koje smo zabilježili između udjela CD4⁺ limfocita i broja Treg, odnosno udjela CD4⁺ limfocita i ekspresije imunosupresivnih markera u TIL-u obje TN kohorte, ali i unutar LB skupine ukazuju na regulatornu ulogu CD4⁺ stanica u TIL-u. U neoadjuvantnoj kohorti je viša stopa CD4/CD8 povezana s TN biologijom tumora, a unutar LB skupine sa slučajevima višeg kliničkog rizika; tumorima s proliferacijskim indeksom Ki67 > 30 % i/ili višim stadijima bolesti i/ili s progresijom LB tumora u regionalne limfne čvorove (cN⁺ status).

U zaključku viši udio stromalnog TIL-a s višim brojem FOXP3⁺ T limfocita i/ili višim udjelom PD-L1⁺ i/ili HSP70⁺ imunskih stanica i/ili višom stopom CD4/CD8 unutar LB kohorte markeri su koji sugeriraju agresivniju biologiju tumora i/ili viši prognostički stadij bolesti, odnosno podskupinu višeg kliničkog rizika, kod koje je poželjna eskalacijska strategija liječenja. Asocijaciju agresivne ER⁺ bolesti s visokim udjelom PD-L1⁺ imunskih stanica podržavaju i dosadašnji literaturni podaci koji su već ranije u raku dojke povezali višu ekspresiju PD-L1 s višom ekspresijom imunskih gena i nižom ekspresijom gena povezanih s ER [36]. Rezistencija na tamoksifen, koja je povezana s visokim udjelom FOXP3⁺ Treg u TIL-u luminalnih tumora [142], također je u prilog predloženoj eskalacijskoj strategiji liječenja LB tumora s visokim udjelom FOXP3⁺ limfocita u TIL-u. Određeni citotoksični lijekovi doprinose u regulaciji imunskog odgovora u tumoru [95]. Lijekovi na bazi platine i ciklofosfamid, koji reduciraju frakciju Treg u TIL-u te antraciklini i paklitaksel, koji reaktiviraju Th1 odgovor, mogu biti od koristi u tumorima s visokim udjelom TIL-a i frakcije Treg u TIL-u, i/ili tumorima s visokom stopom CD4/CD8. U tumorima s niskim udjelom TIL-a i CD8⁺ limfocita u TIL-u i/ili visokim udjelom PD-L1⁺ stanica, doksorubicin može inducirati aktivaciju novog imunskog odgovora u tumoru.

S obzirom na imunogeničnost LB tumora, koju smo potvrdili u analizi neoadjuvantne skupine, u odabranim slučajevima s višim kliničkim rizikom koji nemaju dobar odgovor na konvencionalno liječenje, imunoterapija inhibitorima kontrolnih točaka može biti jedna od terapijskih opcija. Ovome su u prilog i recentno objavljeni rezultati randomiziranih kliničkih studija KEYNOTE-756 i CheckMATE 7FL [143, 144]. U spomenutim istraživanjima je skupina ER⁺ tumora, koja je uz NAKT primala i imunoterapiju (pembrolizumab, nivolumab), ostvarila značajno višu stopu kompletnog patološkog odgovora u odnosu na skupinu koja je liječena isključivo kemoterapijom. Osobito dobar odgovor primjećen je kod pacijenata s visokim udjelom TIL-a u stromi ER⁺ tumora i s pojačanom ekspresijom

PD-L1 molekule (144). Ipak, u ovom trenutku prerano je zaključiti hoće li se ova prednost odraziti i na bolje onkološke ishode pacijenata. Specifična distribucija regulatornih molekula u TIL-u, koja može doprinijeti stratifikaciji rizika unutar LB skupine, primijećena je u ovoj analizi. Pritom je viša ekspresija CTLA-4 nespecifično povezana s višim udjelom TIL-a i svih limfocitnih subpopulacija u TIL-u, a ekspresija HSP70 i PDL-1 u imunosnim stanicama s podskupinom višeg rizika; s tumorima visokog proliferacijskog indeksa, pridruženim konglomeratima metastatskih limfnih čvorova i višim prognostičkim stadijima bolesti. S obzirom na različitu ekspresiju regulatornih molekula u TIL-u, moguće je da će za optimalnu aktivaciju imunosnog odgovora u LB tumorima višeg i nižeg kliničkog rizika biti potrebno razmotriti različite strategije liječenja. Dodatna su istraživanja potrebna kako bi potvrdili ove opservacije.

Budući da su svi ispitanici neoadjuvantne skupine preoperativno primili kemoterapiju, analizirali smo može li se odgovor tumora na NAKT predvidjeti na temelju kvantitativnih i kvalitativnih varijacija u TIL-u u uzorcima tkiva dobivenim širokoiglenom biopsijom dojke prije početka terapije. U TN skupini primijećen je tek statistički trend povezanosti između višeg udjela CD8⁺ T limfocita i više stope pCR. Budući da su udio TIL-a i CD8⁺ T limfocita u brojnim ranijim istraživanjima nedvosmisleno povezani s višom stopom pCR u TN raku dojke [81, 82], naši su rezultati vjerojatno posljedica nedostatnog uzorka za analizu. Literaturni podaci za kemosenzitivnost ER⁺ tumora s visokim udjelom TIL-a variraju između rezultata koji nisu dokazali asocijaciju i rezultata koji ukazuju na bolji odgovor tumora na NAKT [81, 82]. U našoj LB skupini bolji je odgovor tumora na NAKT u statističkom trendu povezanosti s višom proporcijom TIL-a u tumoru. Međutim, veći broj HSP70⁺ imunosnih stanica (> 8) i viša proporcija CD8⁺ limfocita (> 15 %) u tumorskom tkivu prije NAKT mogu ukazati na dobar odgovor LB tumora na predstojeći NAKT. Genski testovi za određivanje rizika povrata bolesti i benefiti kemoterapije u LB tumorima u našoj se ustanovi ne koriste u rutinskoj praksi budući da još uvijek nisu odobreni na državnoj razini, odnosno troškove testiranja ne refinancira zdravstveno osiguranje. Također, njihova je vrijednost za predikciju odgovora tumora na NAKT ograničena. Svi ispitanici u našoj LB kohorti klasificirani su u skupinu visokog kliničkog rizika na sastanku institucionalnog MDT za dojku i na temelju toga odabrani za preoperativno liječenje kemoterapijom. Međutim, tek je 20,7 % slučajeva postiglo pRCB 0 ili 1 po provedenom liječenju. Budući da IH određivanje udjela CD8⁺ limfocita i broja HSP70⁺ imunosnih stanica ima prediktivnu vrijednost u LB skupini za odgovor tumora na NAKT, rutinsko određivanje ovih markera u kliničkoj praksi može doprinijeti optimizaciji selekcije pacijenata s LB tumorima za NAKT.

Najveći nedostatak ove studije je retrospektivni dizajn. Međutim, za evaluaciju imunosnih varijabli sva su IH bojenja napravljena i očitana isključivo za potrebe ovog istraživanja, odnosno u vrijeme provođenja samog istraživanja i u skladu s predviđenim protokolom istraživanja. Također, svi klinički i patološki

podaci predviđeni protokolom istraživanja bili su dostupni za sve ispitanike adjuvantne i neoadjuvantne kohorte, uključujući i podatke o onkološkim ishodima liječenja (OS, DFS). Pritom treba spomenuti da je prosječno vrijeme praćenja u adjuvantnoj kohorti bilo 64 mjeseca, što je dovoljno dug period za adekvatnu analizu preživljenja ispitanica s TN imunofenotipom raka dojke. Međutim, u neoadjuvantnoj kohorti nismo bili u mogućnosti detektirati razlike u preživljenju bez povrata bolesti koje su povezane s kvantitativnim i kvalitativnim varijacijama TIL-a, najvjerojatnije zbog relativno kratkog perioda praćenja. Također nije bilo moguće istražiti je li i rani stadij LB raka dojke povezan s visokim udjelom TIL-a, koja je u tom slučaju priroda imunosnog odgovora i na koji je način TIL povezan s kliničkim ishodima ovih pacijenata, budući da populacija pacijenata s LB rakom dojke nižeg kliničkog rizika s cT1 statusom primarnog tumora nije uključena u ovu analizu. Premali uzorak TN podskupine u neoadjuvantnoj kohorti onemogućio je planiranu analizu prediktivne vrijednosti kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a u ovom imunofenotipu raka dojke.

6. ZAKLJUČCI

Provedenim istraživanjem smo potvrdili hipotezu. Utvrdili smo da je viši udio CD8+ T limfocita u TIL-u povezan s duljim ukupnim preživljenjem (OS) pacijenata s TN imunofenotipom raka dojke i s boljim odgovorom tumora LB imunofenotipa na neoadjuvantnu kemoterapiju (NAKT). Bolji je odgovor tumora na NAKT također povezan s većim brojem HSP70+ imunosnih stanica u terapijsko-naivnom primarnom tumoru LB imunofenotipa. S negativnim prognostičkim parametrima u adjuvantnoj TN skupini povezali smo viši udio CD4+ limfocita, PD-L1+ imunosnih stanica i CD11c+ dendritičkih stanica te viši broj FOXP3+, CTLA-4+ i HSP70+ imunosnih stanica, a u neoadjuvantnoj LB skupini viši udio TIL-a i PD-L1+ stanica, viši broj FOXP3+ i HSP70+ imunosnih stanica te viši omjer CD4/CD8 u TIL-u primarnog tumora.

1. U adjuvantnoj TN skupini udio TIL-a i IH ekspresija istraživanih imunosnih markera CD8, CD4, FOXP3, CD11c, PD-L1, CTLA-4 i HSP70 nije statistički značajno varirala između primarnog tumora i metastaze u regionalnom limfnom čvoru. U tumorskom tkivu pronađena je statistički značajno veća IH ekspresija svih imunosnih varijabli u odnosu prema tkivu s benignim promjenama dojke kontrolne skupine.
2. U području ITF utvrđen je viši udio TIL-a, CD8+, CD4+ i PD-L1+ stanica u odnosu na TC, dok udio CD11c+ dendritičkih stanica (DC) i broj CTLA-4+, FOXP3+ i HSP70+ imunosnih stanica nije statistički značajno varirao između ova dva područja.
3. Viši je udio TIL-a i CD8+ limfocita u ITF povezan s pT2 statusom primarnog tumora, a viši udio CD11c+ DC i veći broj CTLA-4+ stanica s pN+ statusom. Veći broj HSP70+ imunosnih stanica u području TC povezan je s višim anatomskim i patološkim prognostičkim stadijem bolesti, višim histološkim gradusom tumora i višim pN statusom. Ostale imunosne varijable nismo uspjeli povezati s tradicionalnim prognostičkim parametrima ni u ITF, ni u TC. Varijacije u udjelu CD4+ i PD-L1+ stanica u ITF te varijacije u udjelu CD8+ limfocita i broju CTLA-4+ stanica u TC povezane su s razlikama u ukupnom preživljenju (OS), a varijacije u broju FOXP3+ stanica u TC s razlikama u preživljenju bez povrata bolesti (DFS). Neovisan negativni prognostički značaj potvrđen je za varijacije CD4+ i PD-L1+ stanica u ITF multivarijantnom analizom.
4. U području ITF udio TIL-a pozitivno korelira s udjelom CD8+, ali također i s udjelom CD4+, PD-L1+ stanica i s brojem CTLA-4+ stanica. Nasuprot tome udio TIL-a u TC pozitivno korelira isključivo s udjelom CD4+ i PD-L1+ stanica te s brojem CTLA-4+ i HSP70+ imunosnih stanica. Broj HSP70+

imunskih stanica u TC je u pozitivnoj korelaciji s brojem CTLA-4+ stanica u TC te s brojem FOXP3+ stanica u ITF i u metastatskom tkivu regionalnog limfnog čvora.

5. IH ekspresija svih imunskih markera bila je statistički značajno veća u tumorskom tkivu prije početka NAKT u komparaciji s tkivom dobroćudnih promjena u dojci.

6. U neoadjuvantnoj skupini udio TIL-a i IH ekspresija imunskih markera nisu statistički značajno varirali s obzirom na imunofenotip primarnog tumora. Kvalitativnom i kvantitativnom analizom TIL-a u neoadjuvantnoj TN i LB skupini utvrđeno je da su udio TIL-a, CD8+, CD4+ i PD-L1+ stanica te broj FOXP3+, CTLA-4+ i HSP70+ imunskih stanica jednaki u tumorima TN i LB imunofenotipa na razini cjelokupne neoadjuvantne kohorte, kao i u tumorima TN i LB imunofenotipa, ujednačenih po anatomskom stadiju bolesti.

7. Analizom prognostičkog značaja kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a u LB skupini utvrđeno je da su viši udio TIL-a i veći broj FOXP3+ limfocita statistički značajno povezani s višim nuklearnim gradusom tumora i s višim kliničkim prognostičkim stadijima bolesti te da su viši udio PD-L1+ i veći broj HSP70+ imunskih stanica povezani s višim proliferacijskim indeksom tumorskih stanica, cN2-3 statusom i višim kliničkim prognostičkim stadijem bolesti. Viši omjer CD4/CD8 povezan je s TN biologijom tumora, a unutar LB skupine s višim proliferacijskim indeksom te s cN+ statusom. Kvantitativne i kvalitativne varijacije TIL-a u neoadjuvantnoj skupini nismo uspjeli povezati s razlikama u preživljenju bez povrata bolesti, vjerojatno posljedično nedovoljno dugom periodu praćenja.

8. U LB tumorima udio TIL-a pozitivno korelira s udjelom CD8+, CD4+ i PD-L1+ stanica, te s brojem FOXP3+, CTLA-4+ i HSP70+ imunskih stanica. Snažna je korelacija primijećena između udjela PD-L1+ stanica i broja FOXP3+ stanica.

9. Analizom prediktivnog značaja kvantitativnih i kvalitativnih varijacija TIL-a utvrđeno je da su viši udio CD8+ stanica i veći broj HSP70+ imunskih stanica u LB skupini povezani s boljim odgovorom tumora na NAKT. U skupini tumora TN imunofenotipa u provedenom istraživanju nismo uspjeli identificirati imunskie varijable koje su povezane s boljim odgovorom tumora na NAKT, najvjerojatnije zbog nedostatne veličine uzorka neoadjuvantne TN skupine.

Kvantitativnom i kvalitativnom analizom TIL-a u karcinomu dojke TN i LB imunofenotipa utvrđeno je da nema razlike u imunogeničnosti ovih tumora. Stoga za odabrane pacijente s rakom dojke TN ili LB imunofenotipa imunoterapija može biti jedna od terapijskih opcija, a evaluacija tumorskog imunskog mikrokoliša u rutinskoj kliničkoj praksi može pridonijeti u stratifikaciji rizika i optimizaciji postojećih preporuka za liječenje te unaprijediti kvalitetu i ishode liječenja oboljelih.

U istraživanju su identificirani imunosni markeri koji ukazuju na pacijente s povišenim rizikom kod kojih je poželjna eskalacijska strategija sistemskog liječenja. Također su pronađeni imunosni markeri na osnovu kojih se može unaprijed procijeniti odgovor LB tumora na specifični kemoterapijski protokol i temeljem kojih je moguće optimizirati regionalni tretman za pacijente s TN rakom dojke. S obzirom na neovisan negativni prognostički značaj CD4+ T limfocita i PD-L1+ imunosnih stanica u području invazivne tumorske fronte TN raka dojke, rutinsko IH određivanje ovih markera u kliničkoj praksi može optimizirati stratifikaciju rizika pacijenata s TN rakom dojke i unaprijediti proces donošenja odluke o eskalaciji i deeskalaciji sistemskog liječenja. U optimizaciji regionalnog tretmana i odluci o opsegu kirurškog zahvata u pazušnoj jami kod pacijenata s TN rakom dojke može doprinijeti rutinsko IH određivanje broja HSP70+ imunosnih stanica u TIL-u centralnog dijela tumora, budući da je pronađena snažna povezanost između ovog markera i pN statusa. U tumorima LB imunofenotipa viši udio TIL-a i/ili viša IH ekspresija FOXP3, HSP70, PD-L1 i/ili viši omjer CD4/CD8 u TIL-u markeri su višeg kliničkog rizika, odnosno ukazuju na pacijente kod kojih postoji potreba za dodatnim opcijama sistemskog liječenja. Na temelju IH evaluacije udjela CD8+ T limfocita i broja HSP70+ imunosnih stanica u TIL-u LB tumora moguće je unaprijed procijeniti odgovor tumora na NAKT i optimizirati selekciju pacijenata za ovakav protokol liječenja.

7. LITERATURA

1. Worldwide cancer data | World Cancer Research Fund International [Internet]. Dostupno na: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/> pristupljeno 20.8.2022.
2. Allemani C, Minicozzi P, Berrino F i sur. Predictions of survival up to 10 years after diagnosis for European women with breast cancer in 2000-2002. *International Journal of Cancer*. 2012;132(10):2404–12.
3. Biganzoli L, Cardoso F, Beishon M i sur. The requirements of a specialist breast centre. *Breast*. 2020;51:65-84.
4. Singletary SE. Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg*. 2003;237(4):474-82.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
6. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46.
7. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*. 2016;7(10):1281-94.
8. Feng Y, Spezia M, Huang S i sur. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*. 2018;5(2):77-106.
9. Molyneux G, Geyer FC, Magnay FA i sur. BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):403-17.
10. Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol*. 2011;223(2):307-17.
11. Amin MB, Edge SB, Greene FL i sur, ur. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York: Springer; 2017
12. Breast Cancer Staging System: AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition. [Internet]. Dostupno na: <http://www.breastsurgeonsweb.com/wp-content/uploads/downloads/2020/10/AJCC-Breast-Cancer-Staging-System.pdf>. pristupljeno 21.1.2024.
13. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®), Breast Cancer version 5/2023. [Internet]. Dostupno na: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf, pristupljeno 21.1.2024.
14. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S i sur. ESMO Guidelines Committee. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26 Suppl 5:v8-30.

15. Yau C, Osdoit M, van der Noordaa M i sur. Residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy and long-term survival outcomes in breast cancer: a multicentre pooled analysis of 5161 patients. *Lancet Oncol.* 2022;23(1):149-160.
16. Residual Cancer Burden Calculator [Internet]. Dostupno na: <https://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert3>, pristupljeno 30.1.2024.
17. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-10.
18. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1992;20(6):479-89.
19. Ellis P, Schnitt SJ, Sastre-Garau X i sur. Invasive breast carcinoma. U: Tavassoli, F.A., Devilee, P. ur, WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: Lyon Press; 2003.
20. Tan PH, Ellis I, Allison K i sur; WHO Classification of Tumours Editorial Board. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology.* 2020;77(2):181-185.
21. Rakha EA, Tse GM, Quinn CM. An update on the pathological classification of breast cancer. *Histopathology.* 2023;82(1):5-16.
22. Schipper K, Seinstra D, Paulien Drenth A i sur. Rebalancing of actomyosin contractility enables mammary tumor formation upon loss of E-cadherin. *Nat Commun.* 2019;10(1):3800.
23. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol.* 2010;4(3):192-208.
24. Coates A, Winer E, Goldhirsch A i sur. Tailoring therapies—Improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Annals of Oncology,* 2015;26(8):1533-1546.
25. Perou CM, Sørli T, Eisen MB i sur. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
26. Haan JC, Bhaskaran R, Ellappalayam A i sur. MammaPrint and Blueprint comprehensively capture the cancer hallmarks in early-stage breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 2022;61(3):148-160.
27. Syed YY. Oncotype DX Breast Recurrence Score®: A Review of its Use in Early-Stage Breast Cancer. *Mol Diagn Ther.* 2020;24(5):621-632.

28. Ohnstad HO, Borgen E, Falk RS i sur. Prognostic value of PAM50 and risk of recurrence score in patients with early-stage breast cancer with long-term follow-up. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):120.
29. Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics.* 2012;6:289-97.
30. Santarpia L, Bottai G, Kelly CM, Györfy B, Székely B, Pusztai L. Deciphering and Targeting Oncogenic Mutations and Pathways in Breast Cancer. *Oncologist.* 2016;21(9):1063-78.
31. Cornen S, Guille A, Adélaïde J i sur. Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. *PLoS One.* 2014;9(1):e81843.
32. Du XW, Li G, Liu J i sur. Comprehensive analysis of the cancer driver genes in breast cancer demonstrates their roles in cancer prognosis and tumor microenvironment. *World J Surg Oncol.* 2021;19(1):273.
33. El Bairi K, Haynes HR, Blackley E i sur; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *NPJ Breast Cancer.* 2021;7(1):150.
34. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol.* 2016;2(10):1354-1360.
35. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M i sur. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget.* 2017;8(31):51936-51945.
36. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E i sur. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(7):5449-64.
37. Homet Moreno B, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *Br J Cancer.* 2015;112:1421-7.
38. Hartkopf AD, Taran FA, Wallwiener M i sur. PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Blockade to Treat Breast Cancer. *Breast Care (Basel).* 2016;11:385-390.
39. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016;39:98-106.
40. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775-87.
41. Cai J, Wang D, Zhang G, Guo X. The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy. *Onco Targets Ther.* 2019;12:8437-8445.
42. Oshi M, Asaoka M, Tokumaru Y i sur. Abundance of Regulatory T Cell (Treg) as a Predictive Biomarker for Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(10):3038.

43. Walker LS. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun.* 2013;45(100):49-57.
44. Walker LS, Sansom DM. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol.* 2015;36(2):63-70.
45. Rudd CE. CTLA-4 co-receptor impacts on the function of Treg and CD8+ T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 2009;39(3):687-90.
46. Veglia F, Gabrilovich DI. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr Opin Immunol.* 2017;45:43-51.
47. Ara A, Ahmed KA, Xiang J. Multiple effects of CD40-CD40L axis in immunity against infection and cancer. *Immunotargets Ther.* 2018;7:55-61.
48. Nunes-Hasler P. Oxidized lipids keep heat shock chaperones busy: new insights on the deficiencies of tumour-associated dendritic cells. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):60.
49. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M i sur. A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer.* 1995;61(2):272-9.
50. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones.* 2016;21(3):379-404.
51. Sherman MY, Gabai VL. Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene.* 2015 Aug;34(32):4153-61.
52. Goloudina AR, Demidov ON, Garrido C. Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett.* 2012;325(2):117-24.
53. Heck TG, Scomazzon SP, Nunes PR i sur. Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. *Cell Stress Chaperones.* 2017;22(2):271-291.
54. Henderson B, Pockley AG. Molecular chaperones and protein-folding catalysts as intercellular signaling regulators in immunity and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2010;88(3):445-62.
55. Alberti G, Vergilio G, Paladino L i sur. The Chaperone System in Breast Cancer: Roles and Therapeutic Prospects of the Molecular Chaperones Hsp27, Hsp60, Hsp70, and Hsp90. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7792.
56. Kabakov AE, Gabai VL. HSP70s in Breast Cancer: Promoters of Tumorigenesis and Potential Targets/Tools for Therapy. *Cells.* 2021;10(12):3446.
57. Lee E, Ouzounova M, Piranlioglu R i sur. The pleiotropic effects of TNF α in breast cancer subtypes is regulated by TNFAIP3/A20. *Oncogene.* 2019;38(4):469-482.

58. Korkaya H, Lee E, Piranioglu R i sur. Improving the effectiveness of immunotherapy in breast cancer by targeting the tumor microenvironment [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019; 2019 Mar 29-Apr 3; Atlanta, GA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2019;79(13 Suppl):Abstract nr 2245.
59. Ferris DK, Harel-Bellan A, Morimoto RI, Welch WJ, Farrar WL. Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(11):3850-4.
60. Albakova Z, Mangasarova Y, Sapozhnikov A. Impaired Heat Shock Protein Expression in Activated T Cells in B-Cell Lymphoma. *Biomedicines*. 2022;10(11):2747.
61. Taha EA, Ono K, Eguchi T. Roles of Extracellular HSPs as Biomarkers in Immune Surveillance and Immune Evasion. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4588.
62. Oehler R, Pusch E, Zellner M i sur. Cell type-specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by feverlike whole body hyperthermia. *Cell Stress Chaperones*. 2001;6(4):306-15.
63. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA i sur. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*. 2000;6(4):435-42.
64. Multhoff G, Hightower LE. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones*. 1996;1(3):167-76.
65. Binder RJ. Functions of heat shock proteins in pathways of the innate and adaptive immune system. *J Immunol*. 2014;193(12):5765-71.
66. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulators. *Molecules*. 2018;23(11):2846.
67. Linder M, Pogge von Strandmann E. The Role of Extracellular HSP70 in the Function of Tumor-Associated Immune Cells. *Cancers (Basel)*. 2021;13(18):4721.
68. Albakova Z, Mangasarova Y. The HSP Immune Network in Cancer. *Front Immunol*. 2021;12:796493.
69. Multhoff G, Mizzen L, Winchester CC i sur. Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol*. 1999;27(11):1627-36.
70. Todryk S, Melcher AA, Hardwick N i sur. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol*. 1999;163(3):1398-408.

71. Ogbodo E, Michelangeli F, Williams JHH. Exogenous heat shock proteins HSPA1A and HSPB1 regulate TNF- α , IL-1 β and IL-10 secretion from monocytic cells. *FEBS Open Bio*. 2023;13(10):1922-1940.
72. Asea A, Rehli M, Kabingu E i sur. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*. 2002;277(17):15028-34.
73. Multhoff G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods*. 2007;43(3):229-37.
74. Arnold-Schild D, Hanau D, Spohner D i sur. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol*. 1999;162(7):3757-60
75. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ i sur. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol*. 2012;3:95.
76. Stocki P, Wang XN, Dickinson AM. Inducible heat shock protein 70 reduces T cell responses and stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells. *J Biol Chem*. 2012;287(15):12387-94.
77. Wachstein J, Tischer S, Figueiredo C i sur. HSP70 enhances immunosuppressive function of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T regulatory cells and cytotoxicity in CD4(+)CD25(-) T cells. *PLoS One*. 2012;7(12):e51747.
78. Fong JJ, Sreedhara K, Deng L i sur. Immunomodulatory activity of extracellular Hsp70 mediated via paired receptors Siglec-5 and Siglec-14. *EMBO J*. 2015;34(22):2775-88.
79. Kos Z, Roblin E, Kim RS i sur; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2020;6:17.
80. Khoury T, Nagrle V, Opyrchal M, Peng X, Wang D, Yao S. Prognostic Significance of Stromal Versus Intratumoral Infiltrating Lymphocytes in Different Subtypes of Breast Cancer Treated With Cytotoxic Neoadjuvant Chemotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(8):523-532.
81. He L, Wang Y, Wu Q i sur. Association between levels of tumor-infiltrating lymphocytes in different subtypes of primary breast tumors and prognostic outcomes: a meta-analysis. *BMC Womens Health*. 2020;20(1):194.
82. Gao ZH, Li CX, Liu M, Jiang JY. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020;20(1):1150.
83. Criscitiello C, Vingiani A, Maisonneuve P, Viale G, Viale G, Curigliano G. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2- breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2020;183(2):347-354.

84. Oner G, Altintas S, Canturk Z i sur. The immunologic aspects in hormone receptor positive breast cancer. *Cancer Treat Res Commun*. 2020;25:100207.
85. Erber R, Hartmann A. Understanding PD-L1 Testing in Breast Cancer: A Practical Approach. *Breast Care (Basel)*. 2020;15(5):481-490.
86. Valenza C, Taurelli Salimbeni B, Santoro C, Trapani D, Antonarelli G, Curigliano G. Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment. *Cancers (Basel)*. 2023;15(3):767.
87. Catacchio I, Silvestris N, Scarpi E, Schirosi L, Scattone A, Mangia A. Intratumoral, rather than stromal, CD8⁺ T cells could be a potential negative prognostic marker in invasive breast cancer patients. *Transl Oncol*. 2019;12(3):585-595.
88. Wang K, Shen T, Siegal GP, Wei S. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2017;69:110-117.
89. Aebi S, Davidson T, Gruber G, Cardoso F, ESMO Guidelines Working Group. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 2011;22 Suppl 6:vi12-24.
90. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M i sur. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2020;38(12):1346-1366.
91. Untch M, Gerber B, Harbeck N i sur. 13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (zurich 2013). *Breast Care (Basel)*. 2013;8(3):221-9.
92. Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, Abeler VM, Sudbø J, Nesland JM et al. The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res*. 1998;18:4757-64.
93. Salgado R, Denkert C, Demaria S i sur.; International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26:259-71.
94. Ahn SG, Kim SK, Shepherd JH i sur. Clinical and genomic assessment of PD-L1 SP142 expression in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2021;188(1):165-178
95. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2016;4:59.
96. Hussein MR, Hassan HI. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *J Clin Pathol*. 2006;59(9):972-7.

97. Caparica R, Bruzzone M, Agostinetti E i sur. Tumour-infiltrating lymphocytes in non-invasive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Breast*. 2021;59:183-192.
98. Glajcar A, Szpor J, Hodorowicz-Zaniewska D, Tyrak KE, Okoń K. The composition of T cell infiltrates varies in primary invasive breast cancer of different molecular subtypes as well as according to tumor size and nodal status. *Virchows Arch*. 2019;475(1):13-23.
99. Santaguida S, Richardson A, Iyer DR i sur. Chromosome Mis-segregation Generates Cell-Cycle-Arrested Cells with Complex Karyotypes that Are Eliminated by the Immune System. *Dev Cell*. 2017;41(6):638-651.e5.
100. Vihervuori H, Autere TA, Repo H i sur. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8⁺ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(12):3105-3114.
101. Karn T, Jiang T, Hatzis C i sur. Association Between Genomic Metrics and Immune Infiltration in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(12):1707-1711.
102. Loi S, Michiels S, Salgado R i sur. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1544-50.
103. Morigi C. Highlights of the 16th St Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna, Austria, 20-23 March 2019: personalised treatments for patients with early breast cancer. *Ecanermedicalscience*. 2019;13:924.
104. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S i sur; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194-1220.
105. de Jong VMT, Wang Y, Ter Hoeve ND i sur. Prognostic Value of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Young, Node-Negative, Triple-Negative Breast Cancer Patients Who Did Not Receive (neo)Adjuvant Systemic Therapy. *J Clin Oncol*. 2022;40(21):2361-2374.
106. Ogiya R, Niikura N, Kumaki N i sur. Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. *Cancer Sci*. 2016;107:1730-1735.
107. Althobiti M, Aleskandarany MA, Joseph C i sur. Heterogeneity of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer and its prognostic significance. *Histopathology*. 2018;73(6):887-896.
108. Lotfinejad P, Asghari Jafarabadi M, Abdoli Shadbad M i sur. Prognostic Role and Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL) and Programmed Death Ligand 1

- (PD-L1) Expression in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): A Systematic Review and Meta-Analysis Study. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(9):704.
109. Fricke I, Gabrilovich DI. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunol Invest*. 2006;35:459-83.
 110. Lee H, Lee HJ, Song IH i sur. CD11c-Positive Dendritic Cells in Triple-negative Breast Cancer. *In Vivo*. 2018;32(6):1561-1569.
 111. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumour microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4345-54.
 112. Zahran AM, El-Badawy O, Kamel LM, Rayan A, Rezk K, Abdel-Rahim MH. Accumulation of Regulatory T Cells in Triple Negative Breast Cancer Can Boost Immune Disruption. *Cancer Manag Res*. 2021;13:6019-6029.
 113. Jagadish N, Agarwal S, Gupta N i sur. Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) overexpression in breast cancer. *J Exp cancer Cancer Res*. 2016;35:150.
 114. Dimas DT, Perlepe CD, Sergentanis TN i sur. The Prognostic Significance of Hsp70/Hsp90 Expression in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Res*. 2018;38:1551-1562.
 115. Gong J, Weng D, Eguchi T i sur. Targeting the hsp70 gene delays mammary tumor initiation and inhibits tumor cell metastasis. *Oncogene*. 2015;34:5460-71.
 116. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jäättelä M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev*. 2005;19:570-82.
 117. Car Peterko A, Rajković-Molek K, Veljković Vujaklija D i sur. PD-L1 and HSP-70 molecules are part of immunosuppressive environment in the deep layer of the lymphocyte-predominant breast cancer (LPBC). *European journal of cancer*. 2020;138;S1:22-23.
 118. Maureen EM. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 2013;34(6):1181-8.
 119. Rérole AL, Jegou G, Garrido C. Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. *Methods Mol Biol*. 2011;787:205-30.
 120. Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM. HSP70 Multi-Functionality in Cancer. *Cells*. 2020;9:587.
 121. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.

122. Poschke I, De Boniface J, Mao Y, Kiessling R. Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2012;131(7):1611-20.
123. Wakabayashi O, Yamazaki K, Oizumi S i sur. CD4⁺ T cells in cancer stroma, not CD8⁺ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci*. 2003;94(11):1003-9.
124. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ i sur. Association between CD8⁺ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol*. 2014:1536-43.
125. Huang W, Ran R, Shao B, Li H. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;178:17-33.
126. Yeong J, Thike AA, Lim JC i sur. Higher densities of Foxp3⁺ regulatory T cells are associated with better prognosis in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;163(1):21-35.
127. Bae SB, Cho HD, Oh MH i sur. Expression of Programmed Death Receptor Ligand 1 with High Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Associated with Better Prognosis in Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2016;19(3):242-251.
128. Wang X, Liu Y. PD-L1 expression in tumor infiltrated lymphocytes predicts survival in triple-negative breast cancer. *Pathol Res Pract*. 2020;216:152802.
129. Buisseret L, Garaud S, de Wind A i sur. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology*. 2016;6(1):e1257452
130. Huang Y, Ma C, Zhang Q, Ye J i sur. CD4⁺ and CD8⁺ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015;6:17462-78.
131. Gruosso T, Gigoux M, Manem VS i sur. Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. *The Journal of clinical investigation*. 2019 Apr 5;129(4):1785-800.
132. Liu F, Lang R, Zhao J i sur. CD8⁺ cytotoxic T cell and FOXP3⁺ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130(2):645-55.
133. Ghirelli C, Reyat F, Jeanmougin M i sur. Breast Cancer Cell-Derived GM-CSF Licenses Regulatory Th2 Induction by Plasmacytoid Predendritic Cells in Aggressive Disease Subtypes. *Cancer Res*. 2015;75(14):2775-87.

134. Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020;20(1):179.
135. Bryne M, Boysen M, Alfsen CG i sur. The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res*. 1998;18:4757-64.
136. König L, Mairinger FD, Hoffmann O i sur. Dissimilar patterns of tumor-infiltrating immune cells at the invasive tumor front and tumor center are associated with response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *BMC Cancer*. 2019;19:120.
137. Schmid P, Cortes J, Dent R i sur. Neoadjuvant pembrolizumab or placebo plus chemotherapy followed by adjuvant pembrolizumab or placebo for early-stage triple-negative breast cancer: Updated event-free survival results from the phase 3 KEYNOTE-522 study. 2023 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract LBO1-01. Presented December 5, 2023.
138. Collet L, Péron J, Penault-Llorca F i sur. PARP Inhibitors: A Major Therapeutic Option in Endocrine-Receptor Positive Breast Cancers. *Cancers*. 2022; 14(3):599.
139. André F, Ciruelos EM, Juric D i sur. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: Final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol* 32:208-217, 2021.
140. Rugo HS, Lerebours F, Ciruelos E i sur. Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer after a CDK4/6 inhibitor (BYLieve): One cohort of a phase 2, multicentre, open-label, non-comparative study. *Lancet Oncol* 22:489-498, 2021.
141. Hortobagyi G, Stroyakovsky D, Yardley D i sur. Ribociclib + nonsteroidal aromatase inhibitor as adjuvant treatment in patients with HR+/HER2– early breast cancer: Final invasive disease–free survival analysis from the NATALEE trial. 2023 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract GS03-03. Presented December 8, 2023.
142. Dieci MV, Miglietta F, Guarneri V. Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells*. 2021;10(2):223.
143. Cardoso F, O'Shaughnessy J, McArthur H i sur. Phase 3 study of neoadjuvant pembrolizumab or placebo plus chemotherapy, followed by adjuvant pembrolizumab or placebo plus endocrine therapy for early-stage high-risk ER+/HER2– breast cancer: KEYNOTE-756. 2023 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract GS01-02. Presented December 6, 2023.
144. Loi, S., Salgado, R., Curigliano, G. i sur. Neoadjuvant nivolumab and chemotherapy in early estrogen receptor-positive breast cancer: a randomized phase 3 trial. *Nat Med* 31, 433–441 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03414-8>

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. MD Anderson RCB online kalkulator

Slika 2. Krivulje preživljenje bez povrata bolesti (EFS, od engl. event free survival) stratificirane prema RCB grupama za a) TN rak dojke, b) ER-HER2+ rak dojke, c) ER+HER2+ rak dojke i d) ER+HER2- rak dojke

Slika 3. Raspodjela pacijenata prema RCB skoru i rizik povrata bolesti kao funkcija RCB skora za a) TN rak dojke, b) ER-HER2+ rak dojke, c) ER+HER2+ rak dojke i d) ER+HER2- rak dojke

Slika 4. Krivulje preživljenja bez pojave udaljenih metastaza za sve molekularne podtipove raka dojke

Slika 5. Imunosna sinapsa između antigen prezentirajuće dendritičke stanice i T limfocita

Slika 6. Citokinima regulirana diferencijacija CD4+ T limfocita

Slika 7. PD1-ovisni inhibitorni mehanizmi u T limfocitu

Slika 8. Imunosupresivni mehanizmi posredovani interakcijom egzogenog HSP70 s receptorima stanica mijeloidne loze

Slika 9. Izrada tkivnih mikroareja

Slika 10. a) TIL prikazan bojenjem hematoksilin-eozinom (HE) i imunohistokemijska bojenja imunskih varijabli: b) CD8, c) CD4, d) FOXP3, e) HSP70, f) CD11c, g) PDL1 i h) CTLA4 u adjuvantnoj studijskoj kohorti

Slika 11. Udio CD8+ limfocita po površini tkivne areje invazivne tumorske fronte trostruko negativnog tumora u odnosu na patološki status primarnog tumora (pT)

Slika 12. Udio CD8+ T limfocita po površini tkivne areje centralnog dijela trostruko negativnog tumora u odnosu prema patološkom statusu primarnog tumora (pT)

Slika 13. Grafički prikaz ROC krivulje za broj HSP70+ imunskih stanica u TIL-u centralnog dijela (TC) trostruko negativnog (TN) tumora u odnosu prema prisustvu ili odsustvu metastaze u regionalnom limfnom čvoru s pripadnim 95-postotnim intervalom pouzdanosti

Slika 14. Grafički prikaz komparacije para ROC krivulja za broj HSP70+ imunskih stanica u centralnom dijelu tumora (TC) i veličine primarnog tumora u trostruko negativnom (TN) raku dojke odnosu prema pN statusu (pN(-) vs. pN(+))

Slika 15. Grafički prikaz ROC krivulje za broj HSP70+ imunskih stanica u TIL-u centralnog dijela (TC) trostruko negativnog (TN) tumora u odnosu prema metastatskom proboju kapsule limfnog čvora kod pacijenata s pN(+) statusom s pripadnim 95-postotnim intervalom pouzdanosti

Slika 16. Grafički prikaz Kaplan–Meier kumulativne analize ukupnog preživljenja (OS) za: a) Patološki prognostički stadij bolesti, b) CD8 ekspresiju u TC, c) CD4 ekspresiju u ITF, d) PD-L1 ekspresiju u ITF i e) CTLA-4 ekspresiju u TC. f) Grafički prikaz analize preživljenja bez povrata bolesti (DFS) za broj FOXP3+ stanica u TC

Slika 17. Imunohistokemijska bojenja tkivnih mikroareja formiranih od cilindara tkiva dobivenih širokoiglenom biopsijom za: a) CD8, b) CD4, c) PD-L1, d) CTLA-4, e) FOXP3, f) HSP70

Slika 18. Povezanost TIL-a s nuklearnim gradusom tumora i kliničkim prognostičkim stadijem bolesti u luminalnoj B skupini

Slika 19. Povezanost cN statusa s udjelom PD-L1+ imunosnih stanica i omjerom CD4/CD8 u upalnom infiltratu luminalnog B tumora

Slika 20. Povezanost kliničkog prognostičkog stadija bolesti i proporcije PD-L1+ imunosnih stanica u LB skupini

Slika 21. Povezanost udjela CD8+ limfocita i broja HSP70+ imunosnih stanica u luminalnom B tumoru s odgovorom tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

Slika 22. Grafički prikaz ROC krivulje za broj HSP70+ imunosnih stanica u upalnom infiltratu luminalnog B raka dojke u materijalu iglene biopsije u odnosu na odgovor tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju s pripadnim 95-postotnim intervalom pouzdanosti

Slika 23. Grafički prikaz ROC krivulje za udio CD8+ limfocita u upalnom infiltratu luminalnog B raka dojke u materijalu iglene biopsije u odnosu na odgovor tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju s pripadnim 95-postotnim intervalom pouzdanosti

Slika 24. Grafički prikaz komparacije parova ROC krivulja za broj HSP70(+) imunosnih stanica, udio CD8+ T limfocita i indeks proliferacije Ki67 u luminalnom B (LB) raku dojke u predikciji dobrog (RCB 0-1) ili lošeg (RCB 2-3) odgovora na neoadjuvantnu kemoterapiju (NAKT)

Popis tablica

Tablica 1. Imunohistokemijski surogati molekularnih podtipova karcinoma dojke

Tablica 2. Imunohistokemijska bojenja i protokoli

Tablica 3. Kliničko-patološke karakteristike prve studijske kohorte

Tablica 4 . Imunohistokemijska ekspresija komponenti TIL-a u primarnom trostruko negativnom karcinomu dojke, regionalnoj metastazi i benignom tkivu kontrolne skupine

Tablica 5. Korelacije među komponentama TIL-a u stromi invazivne tumorske fronte (ITF) i centralnog dijela tumora (TC) trostruko negativnog raka dojke

Tablica 6. Vrijednosti dobivene ROC analizom za broj HSP70+ imunosnih stanica u centralnom dijelu trostruko negativnog tumora u odnosu prema prisustvu ili odsustvu metastaze u regionalnom limfnom čvoru

Tablica 7. Vrijednosti dobivene komparacijom para ROC krivulja broj HSP70+ imunosnih stanica u TC i veličine primarnog tumora u TN raku dojke u odnosu prema pN statusu (pN(-) vs. pN(+))

Tablica 8. Vrijednosti dobivene ROC analizom za broj HSP70+ imunosnih stanica u centralnom dijelu trostruko negativnog tumora u slučajevima s pN(+) statusom u odnosu prema metastatskom proboju kapsule limfnog čvora

Tablica 9. Rezultati multivarijatne analize prognostičkog značaja za pT status, patološki prognostički stadij bolesti, udio CD4+ i PD-L1+ limfocita u ITF te udio CD8+ limfocita i broj CTLA-4+ limfocita u TC

Tablica 10 . Kliničko-patološke karakteristike druge studijske kohorte

Tablica 11. Rezultati kvantitativne i kvalitativne analize TIL-a u kontrolnoj skupini i cjelokupnoj studijskoj kohorti, trostruko negativnoj skupini i selektiranim slučajevima luminalne B skupine

Tablica 12. Korelacije imunosnih varijabli u luminalnom B i trostruko negativnom raku dojke

Tablica 13. Vrijednosti dobivene ROC analizom za broj HSP70+ imunosnih stanica u luminalnom B raku dojke u odnosu prema odgovoru tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

Tablica 14. Vrijednosti dobivene ROC analizom udio CD8+ limfocita u luminalnom B raku dojke u odnosu prema odgovoru tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

Tablica 15. Rezultati komparacije parova ROC krivulja za broj HSP70+ imunosnih stanica, udio CD8+ limfocita i indeks proliferacije Ki67 u luminalnom B (LB) raku dojke u odnosu prema odgovoru tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

Tablica 16. Rezultati dobiveni multivarijatnom analizom za broj HSP70+ imunosnih stanica, udio CD8+ limfocita i indeks proliferacije Ki67 u luminalnom B raku dojke u predikciji odgovora tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju

POPIS POKRATA

AJCC – American Joint Committee on Cancer

AUC – od engl. Area Under ROC Curve

CD4 – od engl. cluster of differentiation 4

CD8 – od engl. cluster of differentiation 8

CD11c – od engl. cluster of differentiation 11c

CD25 – receptor za interleukin 2, od engl. cluster of differentiation 25

CD28 – od engl. cluster of differentiation 28

CD80/CD86 (B7/B7-2) – od engl. cluster of differentiation 80/86

CDK4/6 – od engl. cyclin-dependent kinase 4/6

cN – klinički status regionalnih limfnih čvorova

cT – klinički status primarnog tumora

CTL – citotoksični T limfociti

CTLA-4 – od engl. cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4

DC – dendritičke stanice (od engl. dendritic cells)

DCIS – duktalni in situ karcinom

DDFS – preživljenje bez pojave udaljenih metastaza (od engl. distant disease free survival)

DFS – preživljenje bez povrata bolesti (od engl. disease free survival)

ER – estrogenski receptor

ERBB2 – od engl. erythroblastic oncogene B

ESMO – od engl. European Society for Medical Oncology

FOXP3 – od engl. forkhead box protein 3

G – gradus diferencijacije tumora

HE – hematoksilin-eozin

HER2 – od engl. human epidermal growth factor receptor 2

HSF1 – transkripcijski faktor za HSP 70 (od engl. Heat Shock Transcription Factor 1)

HSP70 – protein toplinskog šoka 70, od engl. heat shock protein 70

IH – imunohistokemija

IL – interleukin

INF γ - interferon γ

IT – imunoterapija

ITF – invazivna tumorska fronta

LA – luminalni A

LB – luminalni B

LRFS – preživljenje bez lokalnog povrata bolesti (od engl. local recurrence free survival)

mDC – dendritičke stanice mijeloidnog porijekla

MDSCs – od engl. myeloid-derived supressor cells

MHC I/II – od engl. major histocompatibility complex

NAKT – neoadjuvantna kemoterapija

NF κ B – nuklearni faktor κ B

NG – nuklearni gradus

NK stanice – prirodno ubilačke stanice (od engl. natural killer)

NST – nespecijalni tip

OS – ukupno preživljenje (od engl. overall survival)

PARP – od engl. poly ADP ribose polymerase

pCR – patološki kompletan odgovor (od engl. pathologic complete response)

PD1 – od engl. programmed cell death receptor 1

PD-L1 – od engl. programmed cell death receptor 1 ligand

PIK3CA – od engl. phosphoinositide 3-kinase

pN – patološki status regionalnih limfnih čvorova

PR – progesteronski receptor

pT – patološki status primarnog tumora

RCB – rezidualno opterećenje tumorom (od engl. residual cancer burden)

Rho – koeficijent korelacije

ROC – od engl. Receiver Operating Characteristic

RRFS – preživljenje bez regionalnog povrata bolesti (od engl. regional recurrence free survival)

TC – centralni dio tumora, od engl. tumour centre

TCR – T stanični receptor (od engl. T cell receptor)

Th1/2/17 – od engl. T helper cells type 1/2/17

TIL – tumorski infiltrat limfocita

TMA – tkivne mikroareje

TMO – tumorski mikrookoliš

TN – trostruko negativni

TNF α – od engl. tumour necrosis factor α

TNM – tumor nodus metastaza

Treg – od engl. regulatory T lymphocytes

ŽIVOTOPIS

Ana Car Peterko

Državljanstvo: hrvatsko

Datum rođenja: 02/11/1978 **Spol:** Žensko

Telefonski broj: (+385) 989798103 **E-adresa:** anacarpeterko@gmail.com; ana.car.peterko@uniri.hr

Kućna adresa: Ante Kovačića 24, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

RADNO ISKUSTVO

Liječnik, specijalist opće kirurgije s užom specijalizacijom iz kirurške onkologije, FEBS, CEBS

Klinički bolnički centar Rijeka [15/05/2017 –]

Naslovni asistent na Katedri za kirurgiju – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci [03/2018 –]

Liječnik sekundarac/specijalizant/specijalist opće kirurgije – Opća bolnica Virovitica [11/2006 – 05/2017]

Liječnik - Dom zdravlja Virovitičko-podravske županije [03/2005 – 11/2006]

Liječnik pripravnik – Dom zdravlja Senj i KBC Rijeka [2003 – 2004]

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Biomedicina; Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci [01/2019 –]

Primarijat: Ministarstvo zdravstva RH [06/09/2023]

Europski certifikat iz kirurške onkologije dojke (*European Certification in Breast Surgical Oncology*):

BRESO [26/01/2023]; internetska stranica: <https://breastsurgeoncercertification.com/>

F.E.B.S. (breast surgery); Europsko udruženje medicinskih specijalista (*UEMS, Section of Surgery, Division of Breast Surgery*) [28/11/2021]; internetska stranica: <https://uemssurg.org/divisions/breast-surgery/breast-surgery-fellows/>

Subspecijalizacija iz kirurške onkologije; Klinički bolnički centar Rijeka i Klinika za tumore Zagreb [02/01/2019 – 29/01/2021]

Specijalizacija opće kirurgije; OB Virovitica i KBC Sestre Milosrdnice [12/2008 – 06/2013]

Studij opće medicine; Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci [1997 – 2003]

Prirodoslovno-matematička gimnazija; Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci [1993 – 1997]

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik: hrvatski

Drugi jezici: engleski: Slušanje C1, Čitanje C1, Pisanje B2, Govorna produkcija B1, Govorna interakcija B2

DIGITALNE VJEŠTINE: Rad na računalu / Windows / MS Office (Word Excel PowerPoint) / Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer) /Internet

ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE

Osnivač i voditelj prospektivnog kliničkog Registra za bolesti dojke u KBC Rijeka (01/01/2021 –)

Aktivni sudionik u organizaciji i provedbi kontrole kvalitete multidisciplinarnog tima za bolesti dojke KBC-a Rijeka (EUSOMA/Italcert-BCCert) (08/2020 – 12/2022)

Sudjelovanje u multicentričnom randomiziranom kliničkom istraživanju TAXIS/ www.clinicaltrials.gov

NCT03513614; Glavni istraživač u KBC Rijeka (01/2023 –)

OSTALE VJEŠTINE

Stalni sudski vještak iz područja opće kirurgije i kirurške onkologije od 17. svibnja 2022.

Vozačka dozvola B kategorija

PUBLIKACIJE

- Car Peterko A, Kirac I, Gaurina A, Diklić D, Bekavac-Bešlin M. Diagnosis and management of acute and early complications of/after bariatric surgery. *Dig Dis*. 2012;30(2):178-81.
- Peterko AC, Mazul-Sunko B, Mirosević G, Bekavac-Beslin M. Combined sleeve gastrectomy and mini-gastric bypass in a new bariatric procedure of mini-gastric bypass and proximal sleeve gastrectomy. *Acta Clin Croat*. 2013 Sep;52(3):316-20.
- Car Peterko A, Kirac I, Čugura Filipović J, Bekavac-Bešlin M. Single Incision Laparoscopic Spigelian Hernia Repair-an approach with standard instrumentarium, *Acta Clinica Croatica* 2013;52(3):383-386
- Car Peterko A, Avirović M, Mance D, Valković Zujić P, Belac-Lovasić I, Lovasić F. Clinical impact of sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant systemic treatment in luminal B, HER-2 positive and triple-negative breast cancer patients with initially involved axillary lymph node(s); protocol for a prospective, non-randomised, observational clinical trial, *Libri Oncologici* 2019;47(1):29-35
- Car Peterko A, Avirović M, Valković Zujić P, Belac-Lovasić I, Lovasić F. Clinical impact of sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant treatment in breast cancer patients with initially involved axillary lymph nodes; single-centre experience preliminary analysis, *Libri Oncologici* 2020;48(1):1-7
- Car Peterko A, Avirović M, Skočilić I, Valković Zujić P, Belac-Lovasić I, Lovasić F. Overall survival and disease control rates for operable invasive breast cancer in the era of conservative surgery; retrospective institutional five-year follow-up data, *Libri Oncologici* 2020;48(2-3):61-67
- Car Peterko A. Axillary surgery for invasive breast cancer treatment; evolution, current guidelines and controversies, *Medicina Fluminensis* 2021;57(1):17-24 https://doi.org/10.21860/medflum2021_365335
- Car Peterko A, Avirović M, Valković Zujić P, Rajković-Molek K, Belac-Lovasić I, Lovasić F. Axillary lymph node dissection could be omitted in the breast cancer patients with a limited sentinel lymph node involvement following neoadjuvant systemic treatment, *Libri Oncologici* 2021;49(2-3):57-65
- Peterko A, Grebić D, Juranić D, Bila A, Trčak D, Brajan D, Žepina N, Golubovac Iskra M, Lovasić F. Conservation Rates of Breast and Axilla Indicate the Quality of Surgical Management of the Early-Stage Breast Cancer Patient: Quality in breast surgery. *Arch Breast Cancer* [Internet]. 2022 Mar. 31 [cited 2023 May 28];9(3):394-7. Available from: <https://www.archbreastcancer.com/index.php/abc/article/view/553>
- Peterko AC, Rajković-Molek K, Gulić T, Vujaklija DV, Lovasić IB, Lovasić F, Mustać E, Avirović M. HSP70 In triple negative breast cancer: Prognostic value and clinical significance. *Pathol Res Pract*. 2022 Sep 15;238:154127.

- Car Peterko A. Oncoplastic breast conservation; a standard of care in modern breast cancer surgical management, poglavlje knjige Breast Cancer Updates, Published: November 29th, 2022.108944 Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/85038> DOI:10.5772/intechopen.108944
- Peterko A, Avirović M, Valković Zujić P, Grebić D, Juranić D, Lovasić F. The Type of Surgical Axillary Staging Following Neoadjuvant Systemic Treatment Has No Impact on Breast Cancer Patients' Oncological Outcomes : SLNB; safe staging post-NA setting. Arch Breast Cancer [Internet]. 2023 Oct. 31 [cited 2024 Mar. 10];10(4):377-8. Available from: <https://www.archbreastcancer.com/index.php/abc/article/view/809>
- Valković Zujić, P., Rnjak, J., Tkalčić, L., Miletić, D., Lovasić, F., Avirović, M., Car Peterko, A. Indikacije za intervencijske zahvate na dojčkama i pazušnim jamama. Medicina Fluminensis, 2024; 60(1):78-93.
- Nina Bartolović, Ana Car Peterko, Manuela Avirović, Doris Šegota Ritoša, Emina Grgurević Dujmić, Petra Valković Zujić. Validation of Contrast-enhanced mammography as a breast imaging modality compared to standard mammography and digital breast tomosynthesis, Diagnostics 2024;14:1575.
- Car Peterko A, Rajković Molek K, Savić Vuković A, Gulić T, Valković Zujić P, Cini Tešar E, Juranić D, Pirjavec Mahić A, Lovasić F, Đorđević G, Avirović M. Quantitative and qualitative variations of TILs in risk stratification and patient selection for neoadjuvant chemotherapy of luminal B and triple-negative breast cancer immunophenotype. Sci 2025, 7, 69. <https://doi.org/10.3390/sci7020069>

KONGRESNA PRIOPĆENJA

- Sažeci i poster prezentacije: Clinical impact of sentinel node biopsy after preoperative systemic treatment in luminal B, HER-2 positive and triple negative breast cancer patients with initially involved axillary lymph node(s) i Clinical impact of sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant treatment in breast cancer patients with initially involved axilla-single center experience prikazane na 39. kongresu Europskog društva za kiruršku onkologiju (ESSO), Rotterdam, 9. – 11. listopada 2019. i sažeci objavljeni u časopisu European Journal of Surgical Oncology 2020;46(2):PE38-E39
- Sažetak i usmeno priopćenje Groin hernia repair as day-surgery procedure in Clinical Hospital Center Rijeka na 1. Hrvatskom kongresu jednodnevne kirurgije, Zagreb, 6. prosinca 2019.
- Sažetak i poster prezentacija: Institutional data on survival and disease control for early and locally advanced breast cancer patients in the era of conservative surgical and adjuvant oncological pproaches, sažetak objavljen u časopisu Libri Oncologici 2020;48(suppl.1):142-143, poster prikazan na 13. Hrvatskom onkološkom kongresu 2020. i nagrađen za 3. najbolji poster kongresa
- Sažetak i poster prezentacija: PD-L1 and HSP-70 molecules are part of immunosupressive environment in the deep layer of the lymphocyte predominant breast cancer (LPBC), sažetak objavljen u časopisu European Journal of Cancer 2020;138(suppl 1):S22-S23, poster prikazan na 12. EBCC (virtual), 2. – 3. listopada 2020.
- Sažetak i poster prezentacija: ALND can be omitted in at least 72 % of breast cancer patients following neoadjuvant systemic treatment, 14. HOK (virtual, 22. – 25. travnja 2021.), sažetak objavljen u časopisu Libri Oncologici 2021;49(suppl 1):83-84

- Sažetak i poster prezentacija: Multidisciplinary breast cancer management in Clinical Hospital Centre Rijeka; compliance with EUSOMA benchmark quality indicators, 14. HOK (virtual, 22. – 25. travnja 2021.), nagrada za 3. najbolju poster prezentaciju kongresa, sažetak objavljen u časopisu *Libri Oncologici* 2021;49(suppl 1):110-111
- Sažetak i poster prezentacija: Is ALND an optimal treatment option in all sentinel node positive breast cancer patients following primary systemic treatment? 40. ESSO (European Society of Surgical Oncology) kongres (Lisabon, Portugal, 8. – 10. studenoga 2021.), sažetak objavljen u časopisu *European Journal of Surgical Oncology* 2022;48:e57-e187
- Sažetak i poster prezentacija: Mastectomy should not be offered to the early-stage breast cancer patients, 15. Hrvatski onkološki kongres (HOK), Opatija 31. ožujka – 3. travnja 2022., sažetak objavljen u časopisu *Lib Oncol.* 2022;50(Suppl 1):85–156
- Sažetak i poster prezentacija: Setting up the first quality-assured specialized Breast Centre in Croatia, 15. Hrvatski onkološki kongres (HOK), Opatija 31. ožujka – 3. travnja 2022., sažetak objavljen u časopisu *Lib Oncol.* 2022;50(Suppl 1):85–156
- Sažetak i poster prezentacija: Breast cancer surgery in first certified specialized Breast Centre in Croatia; quality evaluation by EUSOMA indicators, 41st Congress of European Society of Surgical Oncology (ESSO 41), Bordeaux (FR) 18. – 20. listopada 2022., sažetak objavljen u časopisu *European Journal of Surgical Oncology* 49 (2023) e62ee216
- Sažetak i poster prezentacija: A higher number of HSP70 positive immune cells in a deep layer of TNBC is associated with a higher FOXP3 expression and a higher risk of axillary lymph node involvement, European Breast Cancer Conference (EBCC 13), Barcelona, 16. – 18. studenoga 2022., sažetak objavljen u časopisu *European Journal of Cancer* 175, Suppl. 1 (2022) S80
- Sažetak i poster prezentacija: Clinical significance of TIL components in triple negative breast carcinoma, St. Gallen-18. Internacionalna konferencija karcinoma dojke, Beč, 15. – 18. ožujka 2023., sažetak objavljen u časopisu *The Breast* 6251(2023)S15-S136
- Autor sažetka za usmeno priopćenje: The type of axillary procedure following neoadjuvant systemic treatment has no impact on breast cancer patients' oncological outcomes, 21st SIS world congress on breast cancer and breast healthcare, Rhodes Island (GR) 3-6/5/2023
- Član Organizacijskog odbora 1. Kongresa suvremenog oslikavanja dojki BeHere, Rijeka, Hrvatska, 9. – 11. svibnja 2024.
- Sažetak i oralna prezentacija: Važnost dijaloga između grudnog kirurga i grudnog radiologa u suvremenoj dijagnostici i liječenju raka dojke, 1. Kongres suvremenog oslikavanja dojki BeHere, Rijeka, Hrvatska, 9. – 11. svibnja 2024.
- Sudionik u panel diskusiji: Prikaz slučajeva kroz MDT i voditelj radionice: Prikazi slučajeva – preoperativna obrada i planiranje kirurškog zahvata, 1. Kongres suvremenog oslikavanja dojki BeHere, Rijeka, Hrvatska, 9. – 11. svibnja 2024.
- Sažetak i oralna prezentacija (koautor): Upotreba hiperbarične terapije kisikom za liječenje avulzijske rane na šaci: prikaz slučaja, 3. Međunarodni Kongres Udruge za Rane-Hrvatska Inicijativa, Zagreb 4-5/10/2024.

PROJEKTI

- Suradnik na projektu odobrenom i financiranom od Sveučilišta u Rijeci, *Prediktivna i prognostička uloga stanica imunološkog sustava, PD-1, PD-L1 i heat shock proteina u bolesnika s trostruko negativnim, HER-2 pozitivnim i neoadjuvantno liječenim karcinomom dojke* (2018. – 2024.)
- Suradnik na projektu odobrenom i financiranom od Sveučilišta u Rijeci (UNIRI-INOVA), *Validacija kontrastne mamografije kao metode oslikavanja dojki u odnosu na standardnu mamografiju i tomosintezu* (2024. –)
- Suradnik na projektu odobrenom i financiranom od Sveučilišta u Rijeci, *Prediktivna uloga ekspresije Galectina 3 u neoadjuvantnom liječenju luminalnog B i trostruko negativnog karcinoma dojke* (2024. –)

CERTIFICIRANA EDUKACIJA

- Osnovni tečaj laparoskopske kirurgije, Aesculap akademija Zagreb, 9. – 11. studenoga 2011.
- ESSO *Course on Localisation Techniques for Guided Breast Cancer Surgery*, Madrid, 12. lipnja 2019.
- ESSO *Advanced Course on Oncoplastic Breast Surgery*, Madrid, 13. – 15. lipnja 2019.
- ICH-GCP online training, 21. prosinca 2019.
- *Publons Academy Practical Peer Review Online Course*, 8. lipnja 2020.
- TARGIT *Academy training on INTERBEAM 600*, online 28. siječnja 2021.
- EYSAC *Research Academy Webinar Series-Focus on Clinical Research Methodology*, online 4. – 11. listopada 2021.
- ESSO *Online Advanced Course on Breast Cancer Surgery*, online 24. studenoga 2021.
- ESSER *Masterclass in Oncoplastic Breast Reconstruction*, Rotterdam, 2. – 3. lipnja 2022.
- ESSO *Advanced Course on Breast Cancer Surgery*, Atena, 29. rujna – 1. listopada 2022.

EDUKACIJA U DRUGIM USTANOVAMA

- Studijski boravak u Sveučilišnom medicinskom centru (VUMC), Amsterdam, 18. studenoga – 4. prosinca 2019.
- Studijski boravak u Klinici za tumore (KZT), Zagreb, 6. siječnja – 20. ožujka 2020. i 31. kolovoza – 6. studenoga 2020.
- Studijski boravak u Nacionalnom onkološkom institutu, Budimpešta, 4. – 29. studenoga 2021.

MREŽE I ČLANSTVA

- Hrvatska liječnička komora (HLK)
- Hrvatski liječnički zbor (HLZ)
- Hrvatsko onkološko društvo (HOD)
- Hrvatsko društvo za jednodnevnu kirurgiju (HDJK)
- European Society of Surgical Oncology (ESSO) i ESSO Young Surgeons and Alumni Club (EYSAC); Nacionalni predstavnik EYSAC za RH, od 2021. do 2024.
- European Organisation for Research and Treatment of Cancer EORTC
- Oncoplastic Breast Consortium (OPBC)