

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Danijel Lopac

POVEZANOST PIK3CA MUTACIJA, PD-L1 EKSPRESIJE I KLINIČKO-
PATOLOŠKIH PARAMETRA U KARCINOMU DOJKE

Doktorski rad

Rijeka, 2026

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Danijel Lopac

POVEZANOST PIK3CA MUTACIJA, PD-L1 EKSPRESIJE I KLINIČKO-
PATOLOŠKIH PARAMETRA U KARCINOMU DOJKE

Doktorski rad

Mentor: izv. prof. dr. Ita Hadžisejdić

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Danijel Lopac

ASSOCIATION OF PIK3CA MUTATION, PD-L1 EXPRESSION AND
CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN BREAST CANCER

Doctoral thesis

Mentor: Assoc. prof. Ita Hadžisejdić, MD, PhD

Mentor rada: Izv. prof. dr. Ita Hadžisejdić, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu
Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

Rad ima 118 listova

UDK: _____

PREDGOVOR

“...The electric light was not discovered as a result of the development of candles...”

(nepoznati autor).

Doktorski rad je izrađen na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Velika zahvala Izv. prof. dr. Iti Hadžisejdić, mojoj dragoj mentorici i kolegici bez čije velike pomoći ne bi bilo moguće napraviti ovo opsežno istraživanje. Tijekom našeg zajedničkog rada u dijagnostici i kirurškom liječenju onkoloških pacijenata došla je ideja o nastavku suradnje i istraživanja u jednom za mene novom smjeru na razini molekule, puno složenijem od kirurškog noža.

Puno hvala na pomoći i savjetima dragoj Izv. prof. dr. Emini Babarović, čija je pomoć u ovom radu bila od velike koristi. Zahvala od srca i laboranticama Zavoda koje su pripremale uzorke tumorskog tkiva i odrađivale onaj “nevidljivi“ ali vrijedni i teški posao.

Rad posvećujem svim onkološkim pacijentima i osoblju koje svakodnevno brine o njima.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Mutacijski status *PIK3CA* gena je važan u liječenju pacijentica s metastatskim hormon receptor pozitivnim/humani epidermalni čimbenik rasta-2 negativnim (HR+/HER2-) karcinomom dojke, a novije studije ukazuju da može poslužiti i kao biobiljeg odgovora na imunološku terapiju. Cilj ovoga istraživanja je evaluirati i pronaći povezanost promjena stanica tumorskog mikrookoliša CD4, CD8, CD68 i CD163 s PD-L1 izražajem te njihovu povezanost s kliničko-patološkim karakteristikama i prognostički značaj u HR+/HER2- karcinomima dojke sa i bez mutacije *PIK3CA* gena.

Ispitanici i metode: U ovom retrospektivnom istraživanju bila su uključena 123 uzorka pacijentica oboljelih od HR+/HER2- karcinoma dojke dobivena iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Iz uzoraka tumorskog tkiva učinjena je analiza mutacije *PIK3CA* gena pomoću Cobas *PIK3CA* mutacijskog testa, a imunohistokemijski su se odredili PD-L1 izražaj, kvantifikacija i procjena tumorskog mikrookoliša CD4, CD8, CD68 i CD163. Rezultati navedenih analiza su potom uspoređivani sa kliničko-patološkim parametrima te stopom preživljenja specifičnom za bolest (DSS) i periodom preživljenja bez povratka bolesti (DFS).

Rezultati: Analizom podataka pronađena je statistički značajna povezanost između PD-L1 izražaja i prisutnosti *PIK3CA* mutacije u eksonu 20 ($p=0.044$). Tumori pozitivni na PD-L1 imali su i viši udio *PIK3CA* mutacija u eksonu 20. Tumori s *PIK3CA* mutacijom imali su umjerenu do snažnu statistički značajnu pozitivnu korelaciju između PD-L1 izražaja i infiltracije tumora CD8 imunološkim stanicama ($r_s=0.462$, $p=0.0027$), CD68 stanicama ($r_s=0.398$, $p=0.0134$) i CD163 ($r_s=0.617$, $p<0.0001$). Kod pacijentica sa *PIK3CA* mutacijom ($p=0.026$) i *PIK3CA* mutacijom u eksonu 20 ($p=0.041$) našlo se statistički značajno duže preživljenja bez recidiva karcinoma.

Zaključak: Određivanje mutacijskog statusa *PIK3CA* gena, PD-L1 izražaja i vrste imunoloških stanica u HR+/HER2- podtipu karcinoma dojke moglo bi biti od značaja u određivanju adekvatne imunološke terapije, budući da promjene u *PIK3CA* mutacijskom statusu gena utječu na preživljenje od karcinoma dojke.

Ključne riječi: karcinom dojke, *PIK3CA* gen, PD-L1, tumor-infiltrirajući limfociti

ABSTRACT

Research objective: The mutational status of the *PIK3CA* gene is important in the treatment of patients with metastatic hormone receptor positive/human epidermal growth factor receptor-2 negative (HR+/HER2-) breast cancer, and recent studies indicate that it can also serve as a biomarker of response to immunotherapy. The aim of this research is to evaluate the association of changes in CD4, CD8, CD68, and CD163 cells within tumor microenvironment with PD-L1 expression, and to assess their association with clinical and pathological characteristics as well as their prognostic significance in HR+/HER2- breast cancers with and without *PIK3CA* gene mutation.

Subjects and methods: This retrospective study included 123 biopsy samples from patients with HR+/HER2- breast cancer obtained from the archives of the Clinical Department of Pathology and Cytology, Clinical Hospital Center, Rijeka. The tumor tissue samples were analyzed for *PIK3CA* gene mutation using the Cobas *PIK3CA* mutation test while PD-L1 expression and tumor microenvironment composition with CD4, CD8, CD68, and CD163 expression were determined immunohistochemically. The results of the analyses were compared with clinicopathological parameters, disease-specific survival (DSS), and disease-free survival (DFS).

Results: Data analysis revealed a statistically significant association between PD-L1 expression and the presence of *PIK3CA* mutation in exon 20 ($p=0.044$). Tumors positive for PD-L1 had a higher proportion of *PIK3CA* mutations in exon 20. Tumors with *PIK3CA* mutation showed a moderate to strong, statistically significant positive correlation between PD-L1 expression and tumor infiltration by CD8 ($r_s=0.462$, $p=0.0027$), CD68 ($r_s=0.398$, $p=0.0134$), and CD163 immune cells ($r_s=0.617$, $p<0.0001$). Patients with *PIK3CA* mutation ($p=0.026$) and *PIK3CA* mutation in exon 20 ($p=0.041$) had statistically significant longer survival.

Conclusion: Determining the mutational status of the *PIK3CA* gene, PD-L1 expression, and immune cell types in the HR+/HER2- subtype of breast cancer could be important for selecting appropriate immunotherapy, since *PIK3CA* mutational status affects breast cancer survival.

Keywords: breast cancer, *PIK3CA*, PD-L1, tumor-infiltrating lymphocytes.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Epidemiologija karcinoma dojke i dijagnostički postupci.....	1
1.2. Etiologija i dijagnoza karcinoma dojke.....	5
1.3. Prognostički biobiljezi i genetska obilježja karcinoma dojke.....	9
1.4. PI3K signalni put i <i>PIK3CA</i> gen.....	12
1.5. PD-1/PD-L1 signalni put.....	18
1.6. Obilježja tumorskog mikrokoliša.....	23
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	28
2.1 Glavni cilj.....	28
2.2. Specifični ciljevi.....	28
3. MATERIJALI I METODE	29
3.1. Materijal i ispitanice.....	29
3.2. Izolacija tumorske DNA i analiza statusa <i>PIK3CA</i> gena.....	31
3.3. Priprema tkivnih mikročipova (TMA).....	33
3.4. Imunohistokemijske analize.....	43
3.5. Ocjena tumorskog mikrokoliša.....	41
3.6. Etički aspekti istraživanja.....	42
3.7. Statistička analiza podataka.....	42
4. REZULTATI	44
4.1. Kliničko-patološki parametri karcinoma dojke.....	44
4.2. Povezanost kliničko-patoloških parametara i <i>PIK3CA</i> mutacijskog statusa karcinoma dojke.....	47
4.3. Procjena tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL).....	49
4.4. Usporedba CD4, CD8, CD68 i CD163 stanica unutar mikrokoliša i PD-L1 izražaja u HR+/HER2- karcinoma dojke sa i bez <i>PIK3CA</i> mutacije gena.....	50

4.5. Korelacija PD-L1 izražaja ovisno o <i>PIK3CA</i> mutacijskom statusu u HR+/HER2- karcinomu dojke.....	53
4.6. Analiza preživljenja.....	58
5. RASPRAVA.....	70
6. ZAKLJUČCI.....	80
7. LITERATURA.....	82
POPIS TABLICA.....	101
POPIS SLIKA.....	102
POPIS POKRATA.....	104
ŽIVOTOPIS.....	106

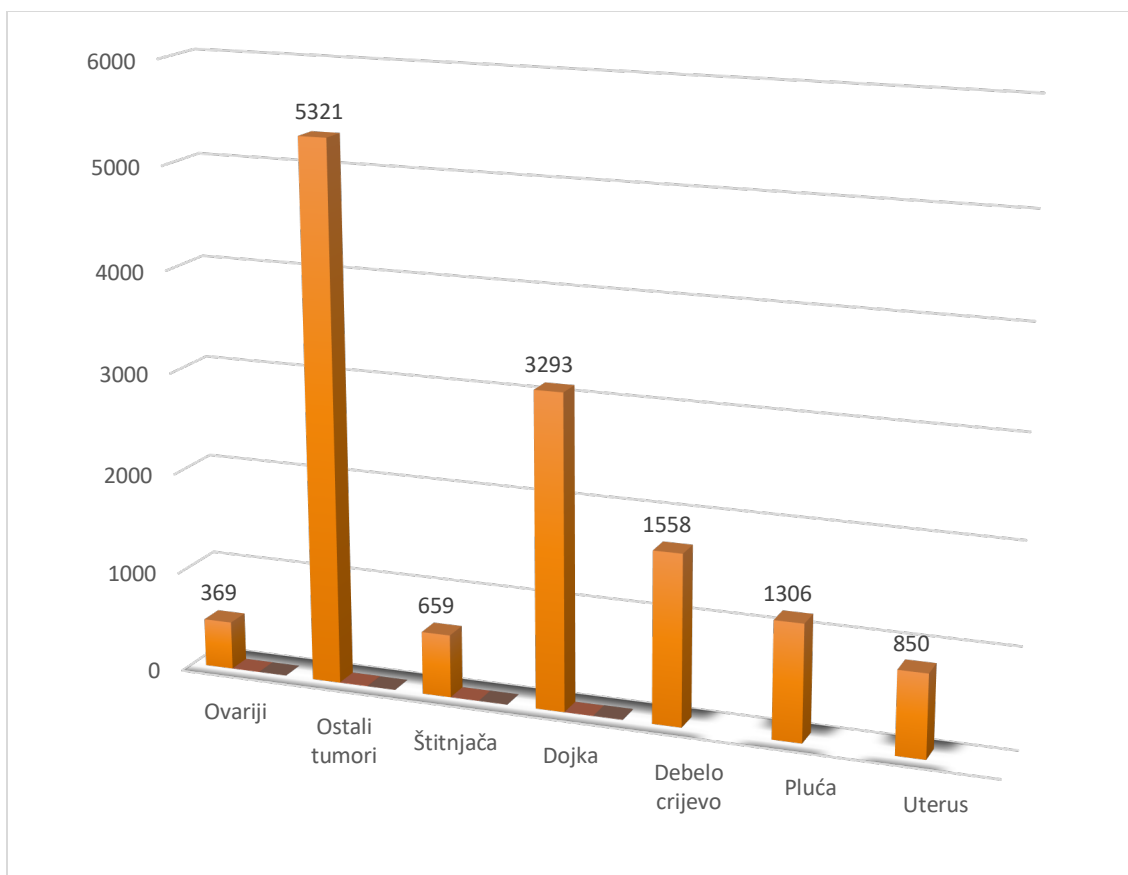
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Epidemiologija karcinoma dojke i dijagnostički postupci

Karcinom dojke je danas najčešći primarni zloćudni tumor kod žena i vodeći uzrok smrtnosti diljem svijeta [1]. Zbog navedenog predstavlja veliki javno-zdravstveni problem svakog suvremenog društva. Određeni postotak karcinoma dojke, unatoč provedenoj suvremenoj terapiji, razvije rezistenciju na terapiju. Tada dolazi do recidiva, proširenja bolesti i smrtnog ishoda. Općenito svi karcinomi, nastoje različitim mehanizmima prilagodbe izbjeći djelovanje imunološkog sustava i tako nastaviti autonomni rast. Stoga bolje razumijevanje molekularnih mehanizma putem genetskih i epigenetskih analiza može pomoći u otkrivanju dodatnih terapijskih modaliteta u liječenju karcinoma, osobito nakon razvoja rezistencije na standardnu terapiju.

Usprkos prevenciji, mjerama ranog otkrivanja i suvremenim metodama liječenja, broj smrtnih slučajeva od karcinoma dojke u svijetu je i dalje u porastu. Obzirom na dugotrajno liječenje, potpuni oporavak od ove bolesti je često vrlo neizvjestan te znatno utječe na psihičko zdravlje oboljelih kao i na život njihovih obitelji.

Podatci na razini Europske Unije, odnosno *EUROCORE-6* baze podataka, sadrže informacije o incidenciji tumora svih zemalja Europske Unije, te su na temelju toga učinjene projekcije o pojavnosti raznih tumora u narednom desetljeću [2,3]. U Republici Hrvatskoj, prema najnovijim podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, najčešće sijelo tumora kod žena je upravo karcinom dojke (Slika 1).

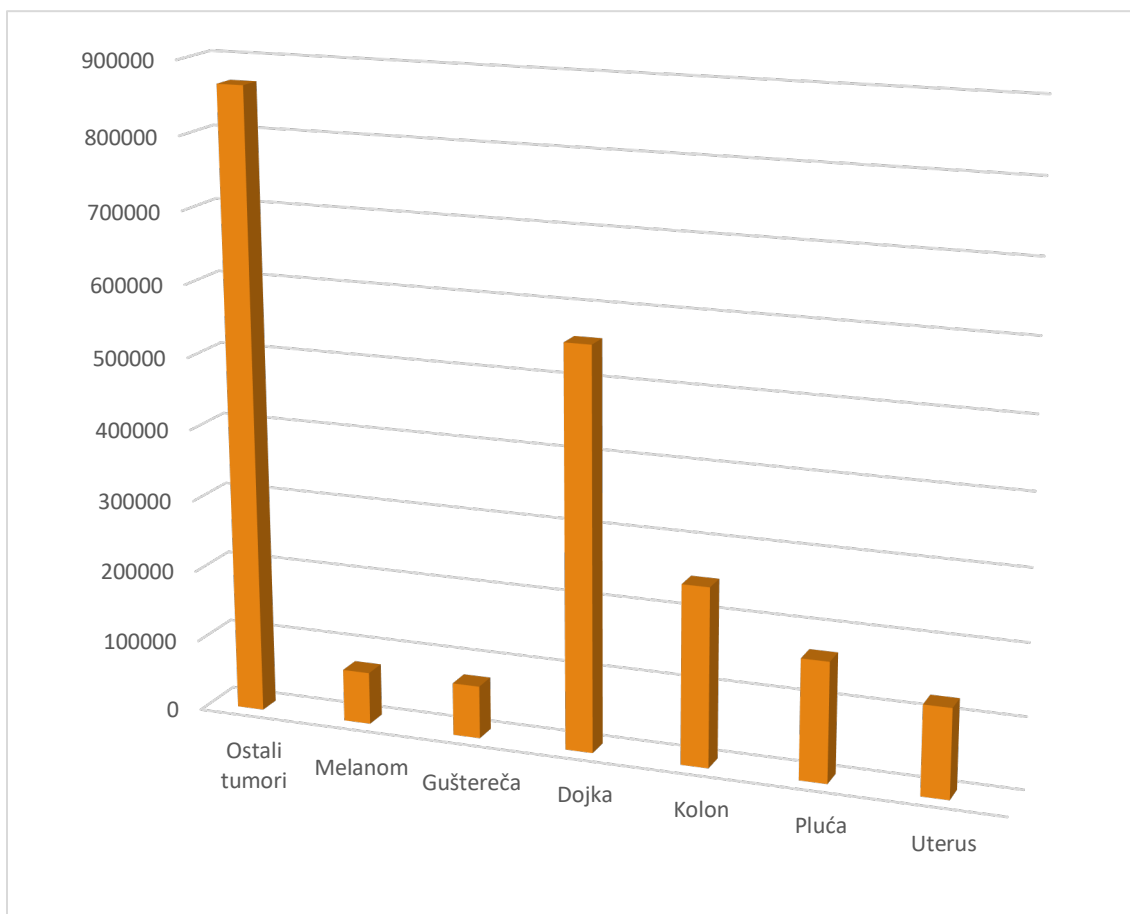


Slika 1. Apsolutni broj oboljelih žena od tumora u Republici Hrvatskoj u 2023.

Karcinom dojke je sa 329308 slučajeva u 2022. godini na vodećem mjestu obolijevanja od svih karcinoma ukupno (autorski crtež prema EURO CARE-6 bazi podataka i podacima Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske, Rak u Hrvatskoj 2023./2024. Zagreb 2026)

Obzirom na porast novooboljelih od karcinoma dojke, na području Republike Hrvatske u 2022. i 2023. godini prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, karcinom dojke ostaje peti uzrok smrti (bez obzira na spol) nakon tumora pluća, debelog crijeva, prostate i gušterače. Kada se gleda samo populacija žena, kao uzrok smrti od zloćudnih tumora, karcinom dojke u Republici Hrvatskoj je na trećem mjestu, nakon tumora pluća i debelog crijeva. Slična incidencija i distribucija tumora kod žena je i diljem zemalja Europske Unije. Karcinom dojke je kod žena prema studiji *Global Cancer Observatory*, GLOBOCAN, na prvom mjestu po broju oboljelih od svih zloćudnih tumora u Europskoj Uniji (Slika 2).

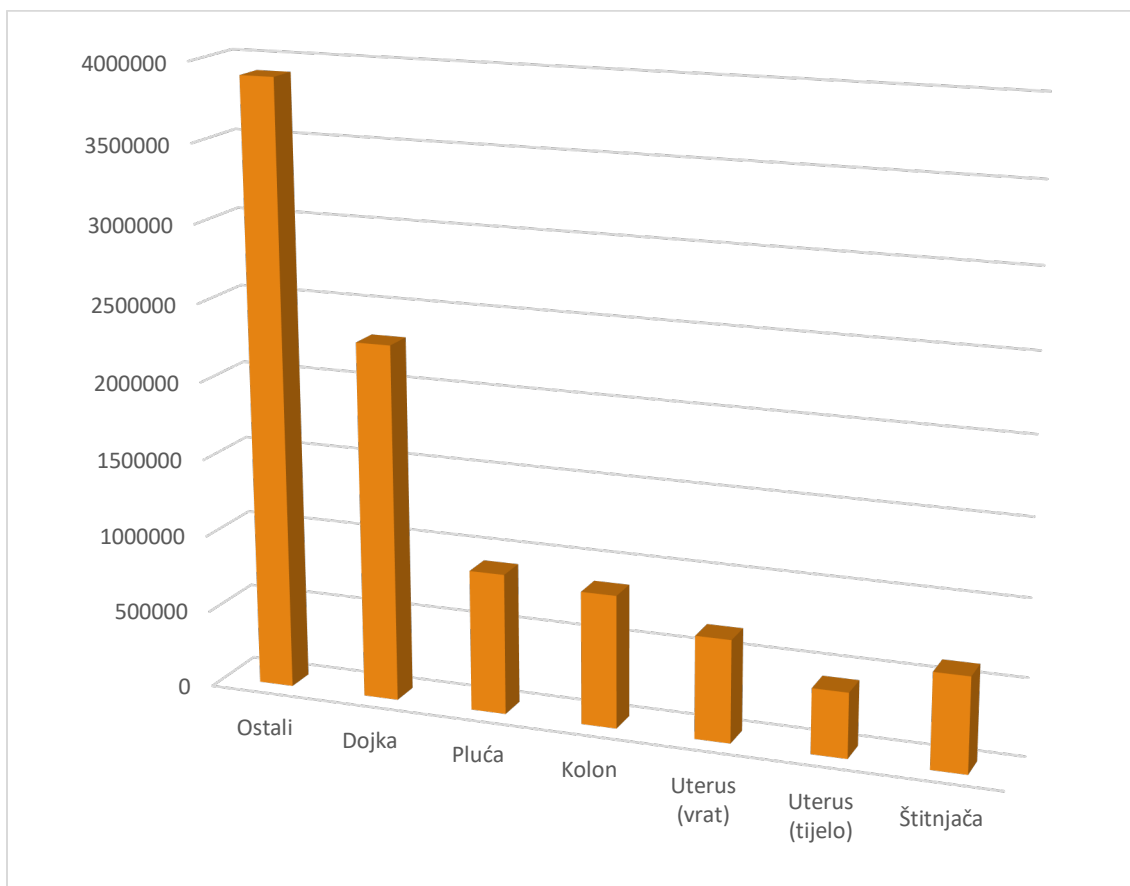
Prema tim podacima, za razliku od Republike Hrvatske i Europske Unije, karcinom dojke u cijelom svijetu ostaje vodeći uzrok smrtnosti od svih zloćudnih tumora kod žena (Slika 3). Svake godine se otkrije oko 9.64 milijuna svih karcinoma kod žena diljem svijeta, a to uzrokuje oko 4.31 milijuna smrtnih slučajeva godišnje. Od toga je 2.26 milijuna je novo dijagnosticiranih slučajeva karcinoma dojke kod žena (23.8% od ukupnog broja svih tumora).



Slika 2. Incidencija zloćudnih tumora u Europskoj Uniji u 2022. kod žena (autorski crtež prema EURO CARE-6 bazi podataka)

U Republici Hrvatskoj je prema podacima Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo 2023. godine otkriveno 3293 slučajeva karcinoma dojke kod žena, a stopa mortaliteta je bila 35.5/100.000 [4]. Analize i procjene temeljene na podacima *GLOBOCAN* studije, pokazuju da incidencija karcinoma dojke u Republici Hrvatskoj i regiji raste za otprilike 1-4 % godišnje. To bi značilo povećanje incidencije novooboljelih pacijentica u 2025. i 2026. godini [5,6]. Stope smrtnosti

prema dostupnim podacima u Republici Hrvatskoj su i dalje više u odnosu na ukupni prosjek ostatka Europske Unije [7]. Apsolutne brojke novooboljelih žena ovise i o broju stanovnika u Republici Hrvatskoj, koji je u padu, ali je incidencija pojavljivanja karcinoma dojke kroz godine u konstantnom porastu.



Slika 3. Incidencija zloćudnih tumora kod žena u svijetu u 2022. godini (autorski crtež prema EURO CARE-6 bazi podataka)

Incidencija i broj smrti zbog karcinoma dojke u svijetu se povećavao posebice u periodu između 1990-2016. godine. U tom vremenskom periodu, incidencija se u 60 od 102 zemlje diljem svijeta udvostručila, a apsolutni broj smrti uzrokovan karcinomom dojke u 43 zemlje također podvostručio [8]. Prema projekcijama pretpostavlja se da će se broj oboljelih i dalje povećavati. Očekuje se da će do 2030. godine biti oko 2.7 milijuna novootkrivenih slučajeva karcinoma dojke na godinu, za razliku od sadašnje razine koja je na oko 2.3 milijuna novootkrivenih slučajeva

diljem svijeta [9]. Prema određenim radovima, uzrok povećanja incidencije u ekonomski razvijenim zemljama je „zapadnjački“ stil života, gdje žene u sve kasnijoj dobi ostaju trudne, kasnije ulaze u menopauzu te sjedilački način života, bez redovite tjelesne aktivnosti. Povećanju incidencije obolijevanja još doprinosi pušenje, izloženost klimatskim utjecajima i štetnim tvarima iz okoliša te konzumiranje alkohola [10].

1.2. Etiologija i dijagnoza karcinoma dojke

Rano otkrivanje karcinoma dojke i pravodobno liječenje je od iznimne važnosti u postizanju boljih rezultata i boljoj kontroli bolesti, a pravodobnim otkrivanjem se povećava i šansa za izlječenjem. Stope smrtnosti su stoga u padu u pojedinim visoko razvijenijim zemljama, dok u drugim, manje razvijenijim zemljama, diljem svijeta se uočava porast smrtnosti od karcinoma dojke. Rizični čimbenici za nastanak karcinoma dojke se mogu podijeliti na konstitutivne, tj. one koji su nepromjenjivi i na one na koje se može utjecati tj. promjenjivi čimbenici.

U nepromjenjive čimbenike, rizika za nastanak karcinoma dojke spadaju spol, dob, genetske mutacije, rasa, trudnoća, period ulaska u menopauzu, gustoća tkiva dojke, radijacijska terapija i prethodne druge zloćudne bolesti. Zbog specifične hormonske stimulacije, estrogenima i progesteronom, žene imaju povećani rizik od razvoja karcinoma dojke za razliku od muškarca. Promjene razine tih hormona u postmenopauzalnih žena dovode do povišenog rizika za razvoj karcinoma dojke [11]. S porastom dobi također se povećava rizik od nastanka karcinoma dojke kod žena. Vrlo rijetko se karcinomom dojke manifestira i kod muškarca te čini manje od 1% svih tumorskih oboljenja. Obično se radi o težoj kliničkoj prezentaciji i lošijoj prognozi nego kod žena. Povezanost pozitivne obiteljske anamneze i pojavnosti karcinoma dojke je također vrlo dobro poznata i opisana. Kod 13-15% pacijentica kod kojih je dijagnosticiran karcinom dojke postoji netko u obitelji tko je bolovao od karcinoma dojke.

Genetske mutacije koje su povezane s povećanim rizikom od razvoja karcinoma dojke su dobro poznate. Radi se o tumor-supresorskim genima, *BRCA1* i *BRCA2* (engl. *BReast CAncer gene*), koji su smješteni na 17. kromosomu i odgovorni su za povećani rizik od nastanka ovog karcinoma. Navedeni geni imaju važnu ulogu u održavanju genske stabilnosti poglavito putem popravaka oštećenja DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) pomoću homologne rekombinacije te se nasljeđuju autonomno-dominantno [12]. Danas se preporučuje testiranje *BRCA1* i *BRCA2* gena radi

utvrđivanja mutacija osobito kod trostruko negativnog (TNBC) karcinoma dojke (engl. *Triple-Negative Breast Cancer*), kod obostrane prezentacije karcinoma dojke i kod pozitivne obiteljske anamneze prema preporukama Američkog društva za kirurgiju dojke (*American Society of Breast Surgeons*) [13]. Od ostalih gena koji su važni za nastanak karcinoma dojke najčešće su istraživani *PALB2*, *TP53*, *CDH1*, *SKT11* i *PTEN*, *TP53*, *ATM*, *CHEK2*, *BARD1*, *NF1*, *RAD51C* i *RAD51D*. Geni koji su udruženi sa osobito višom stopom razvoja karcinoma dojke su *PALB2*, *TP53*, *PTEN*, *SKT11* i *CDH1* [14]. Ovi geni su odgovorni i za pojavnost tumora ostalih sijela npr. gušterače, prostate ovarija, tumora probavnog sustava i drugih solidnih zloćudnih tumora.

Osim mutacija određenih gena, povećanju incidencije karcinoma dojke može doprinijeti i kasnija trudnoća, tako da je rizik dva puta veći kod žena koje su prvi puta zatrudnjele iznad tridesete godine nego u dvadesetima. Gustoća tkiva dojke i njegova kvaliteta također imaju ulogu u razvoju oboljenja na način da solidnije tkivo dojke može biti jedan od predisponirajućih čimbenika u nastanku bolesti. Također, prethodna zračenja mogu se dovesti u vezu sa nastankom karcinoma dojke na način, da što je bila mlađa životna dob kod izloženosti zračenju, to je veća vjerojatnost pojave karcinoma [15]. U ostale čimbenike koji su promjenjivi i koji se mogu dovesti u vezu sa povećanim rizikom od nastanka karcinoma dojke spadaju starenje tkiva, određeni lijekovi, povećana tjelesna masa, fizička neaktivnost, konzumacija alkohola, pušenje, neadekvatne dijete, nedostatak mikronutritijenata i vitamina važnih za normalno funkcioniranje imunološkog sustava. Različiti su mehanizmi kojim ovi čimbenici mogu biti odgovorni za razvoj tumorske bolesti. Primjerice, jako je dobro istražena karcinogena sposobnost etanola putem njegovog metabolita acetaldehida, u oštećenju DNA, povećanju razine estrogena i poticanju upalnih promjena u organizmu. Za žene koje posjeduju mutacije gena *BRCA1/2* nema podataka da alkohol još više povećava rizik od razvoja karcinoma dojke. [16]. Konzumiranje alkohola može biti rizični čimbenik za razvoj osobito HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke (engl. *Hormone Receptor-positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 negative*). Uzimanje nadomjesne hormonske terapije, posebno kombiniranih estrogen-progesteronskih preparata, također može biti udruženo sa povišenim rizikom od razvoja karcinoma dojke, a u kombinaciji sa uzimanjem alkohola rizik se dodatno povećava [17].

Postavljanje dijagnoze karcinoma dojke počinje kao i obično s pažljivo uzetom anamnezom te inspekcijom i palpacijom tkiva dojke. Ponekad su izvana vidljivi znakovi koji upućuju na tumorsku bolest poput promjena na koži u smislu ulceracija, crvenila, promjene u konzistenciji

kože, uvučena bradavica i iscjedak iz bradavice. Diferencijalno-dijagnostički na prvom mjestu uvijek treba isključiti zloćudnu bolest.

Od ostalih oboljenja koji mogu imati sličnu kliničku sliku, kao karcinom dojke, su razne cistične promjene, fibroadenomi dojke, intraduktalni papilom i druge slične tvorbe. Prvi korak kada se uoče takve promjene je mamografski pregled i ultrazvuk (UZV) dojke. Magnetska rezonanca (MR) je dodatna pretraga u specifičnim situacijama, u većim dojkama i kod gušćeg tkiva, radi bolje vizualizacije. MR može poslužiti kod planiranja točne kirurške resekcije kojom bi se postiglo dovoljno radikalno uklanjanje tumorske mase po principima onkološke kirurgije.

Na mamografskom pregledu, koji je ključan u dijagnozi karcinoma dojke, mogu se otkriti razne promjene tkiva dojke u vidu kalcifikacija, tumorske infiltracije, povećanja limfnih čvorova i promjene kvalitete tkiva dojke. Danas se za kategorizaciju promjena tkiva dojke, u rutinskom radu, prilikom postavljanja dijagnoze, koristi BI-RADS sustav (engl. *Breast Imaging and Reporting Data System*). Ovaj sustav je uveden od strane Američkog udruženja radiologa (*The American College of Radiology*) [18]. Promjene na mamografiji, UZV ili na MR se mogu svrstati u 6 kategorija i olakšavaju komunikaciju radiologa, patologa, onkologa i kirurga te pomažu u pravilnom odabiru načina liječenja. Tablica 1 prikazuje navedenu klasifikaciju, odnosno kategorije BI-RADS od 0-6. Za svaku kategoriju postoje smjernice o daljnjem postupanju te jednom kada se na temelju mamografskog nalaza, UZV, MR dojki odredi kategorija lakše je daljnje kliničko vođenje pacijenta kao i komunikacija između kliničara. Sustav je široko prihvaćen na međunarodnoj razini i sastavni je dio programa za probir kod karcinoma dojke.

Tablica 1 . BI-RADS kategorije prilikom dijagnostike promjena u dojci

Kategorija	Postupak
BI-RADS 0 (nekompletna dijagnostika)	potrebna dodatna slikovna obrada
BI-RADS 1 (negativan)	potreban MR ako je kumulativni rizik $\geq 20\%$
BI-RADS 2 (dobročudna promjena)	potreban MR ako je kumulativni rizik $\geq 20\%$
BI-RADS 3 (moguće dobroćudna promjena)	kliničko praćenje svakih 6 mjeseci
BI-RADS 4 (suspektna zloćudna promjena)	biopsija tumora
BI-RADS 5 (vjerojatno zloćudan tumor)	biopsija tumora
BI-RADS 6 (biopsijom dokazan tumor)	kirurško odstranjenje tumora

Skraćenice: MR-magnetska rezonanca. BI-RADS-(engl. *Breast Imaging Reporting and Data System*), standardizirani sustav za opis slikovne dijagnostike promjena u dojci. Izvor: autor, prema smjernicama Američkog udruženja radiologa (engl. *The American College of Radiology*)

Definitivna dijagnoza karcinoma dojke se potvrđuje patohistološkom analizom bioptičkog uzorka tkiva tumora. Uzorci tkiva se mogu uzeti biopsijom dojke iglom pod kontrolom UZV-a ili otvorenom kirurškom biopsijom. Nakon patohistološke obrade tumorskog tkiva i određivanja histološkog tipa i stupnja tumora, imunohistokemijskih obilježja tumora kao što su hormonski receptori, izražaja HER2 (humani epidermalni receptor čimbenika rasta 2), Ki-67 proliferacijskog čimbenika, određuje se i stadij bolesti (engl. *staging*) prema TNM (engl. *tumor, node, metastasis*) klasifikacijskom sustavu za karcinom dojke. Ovaj klasifikacijski sustav karcinoma dojke međunarodno je prihvaćen za procjenu proširenosti bolesti i usvojen je od Američkog odbora za rak (*AJCC*) te je temeljen na tri komponente. Prva komponenta opisuje veličinu tumora, druga procjenjuje zahvaćenost limfnih čvorova, a treća govori o prisutnosti ili odsutnosti udaljenih metastaza. Naknadno su u navedeni klasifikacijski sustav (uz gore navedeno), dodana i genska obilježja tumora [19]. Klasifikacijom i određivanjem podtipa karcinoma dojke moguće je donijeti određene zaključke o prognozi i očekivanom preživljenju bolesti (Tablica 2). Također za svaki podtip karcinoma postoji i specifična terapija kao i način onkološkog liječenja. Zato je vrlo važno poznavati suvremene klasifikacijske sustave i sve parametre prilikom analize karcinoma dojke te ih uzeti u obzir.

Tablica 2. Podtipovi karcinoma dojke

	Luminal A	Luminal B	HER2	TNBC
Učestalost (%)	50	15	20	15
ER	Da	Da	Rijetko	ne
PR	Da	Rijetko	Rijetko	ne
HER2 izražaj	Ne	Ne	Da	ne
Ki67	Rijetko	Rijetko	Visoki	visoki
Mutacije	Nema	BRCA2	P53	P53 i BRCA1
Prognoza	Dobra	Umjerena	umjerena/loša	loša
Terapija	hormonska	hormonska/kemoterapija	hormonska/kemoterapija/herceptin	kemoterapija/eksperimentalna terapija

Skraćenice: ER-estrogen receptor, PR-progesteron receptor, HER2-humani epidermalni receptor čimbenika rasta 2, Ki67- nuklearni protein stanične proliferacije (prognostički indeks). TNBC- (engl. *Triple Negative Breast Cancer*), trostruko negativan karcinom dojke

Izvor: autor, prema smjernicama Američkog odbora za rak (*AJCC*)

Koristeći klasifikaciju tumora prema *UICC* (engl. *International Union for Cancer Control*), te *AJCC* i TNM klasifikacijski sustav, karcinom dojke se dijeli u 4 stadija ovisno o veličini tumora, prisutnosti regionalnih metastaza u limfne čvorove i prisutnosti jedne ili više metastaza karcinoma dojke u udaljene organe:

- **Stadij 0:** karcinom in situ (stanice tumora se razvijaju unutar kanalića ili acinusa tkiva dojke)
- **Stadij I:** IA -negativan limfni čvor, tumor manji od 20 mm.
IB -prisutnost mikrometastaze tumora u limfni čvor vel.0.2-2 mm
- **Stadij II:** IIA -metastaze u razini I i II limfnog čvora, te veličina tumora manja od 20 mm
IIB -metastaze u razini I i II limfnog čvora, veličina tumora 20-50mm, ili tumor veći od 50 mm bez znakova lokalnog širenja u limfne čvorove.
- **Stadij III:** lokalno uznapredovali tumor, sa metastazama u limfne čvorove i ostala susjedna tkiva
- **Stadij IV:** uznapredovala tumorska bolest sa metastazama u ostale organe i sustave.

1.3. Prognostički biobiljezi i genetska obilježja karcinoma dojke

Estrogenski receptori (ER) u karcinomu dojke su vrlo važan prognostički čimbenik, a pacijentice s tom podgrupom karcinoma su kandidati za liječenje selektivnim estrogenskim modulatorima i aromataznim inhibitorima te imaju znatno bolju prognozu od ostalih podtipova. Ukoliko imaju pozitivan HER2 protein unatoč pozitivitetu na ER receptor, tada je prognoza bolesti znatno lošija. [20]. Prema literaturi, nađeno je da su karcinomi dojke u oko 58-68% slučajeva pozitivni na oba receptora, ER i progesteronski receptor (PR), dok je samo ER pozitivan u oko 85%, a samo PR u oko 75% slučajeva [21]. PR regulira i utječe na djelovanje estrogenih hormona te je također važan prognostički čimbenik [22].

Veća ekspresija PR može se dovesti u korelaciju s boljom prognozom bolesti i manjom vjerojatnosti za lokalni recidiv. Izražaj HER2 se pojavljuje u otprilike 15-20% svih karcinoma dojke [23]. Ovaj receptor pripada obitelji tirozin-kinaznih proteina čija aktivacija regulira važne unutarstanične signalne puteve. Povećan izražaj HER2 proteina na membrani stanice, nastaje kao posljedica amplifikacija istoimenog gena koji kodira ovaj receptor i povezan je s većom pojavnosti lokalnog recidiva, lošijom prognozom i većom mogućnosti razvoja rezistencije na standardnu endokrinu terapiju. Danas u terapiji, kod ovog podtipa karcinoma dojke, dobre rezultate daju anti-HER2 lijekovi poput trastuzumaba [24]. Stoga je jako važno točno odrediti izražaj HER2 glikoproteina odnosno status *HER2* gena kod karcinoma dojke radi uvođenja ciljane terapije. Analiza izražaja HER2 proteina određuje se imunohistokemijski, a status *HER2* gena nekom od in-situ hibridizacijskih metoda [25]. Ki-67 je marker stanične proliferacije i široko se koristi u dijagnostici i klasifikaciji karcinomima pa tako i kod karcinoma dojke, a određuje se imunohistokemijski [26]. Povećan Ki-67 izražaj je povezan s agresivnijim ponašanjem karcinoma što doprinosi lošijoj prognozi, odnosno lošijem preživljenju i ranijoj pojavnosti metastatske bolesti. Također koristi se i za razlikovanje luminal A i luminal B podtipa karcinoma dojke gdje je granična vrijednost postavljena na 20%. Navedena granična vrijednost je korištena i za potrebe ovog istraživanja, mada je optimalna granična vrijednost još uvijek predmet rasprave stručnih društava. Također, granična vrijednost od 20% je danas postavljena i kao prag za uvođenje terapije kod visokorizičnog HR+/HER2- karcinoma dojke [27].

Od ostalih prognostičkih čimbenika valja spomenuti razinu izražaja slijedećih proteina kao i promjene u genima, npr. androgen receptor, E-kadherin, ciklin D1protein cirkulirajuće RNA, mikro RNA, P53 supresijski protein, tumor-infiltrirajuće limfocite, TIL (engl. *Tumor-infiltrating lymphocytes*), urokinaza, pazminogen aktivator i ostali markeri. Svi su oni odgovorni za autonomni razvoj tumora te kasniji razvoj rezistencije na odgovor imunološkog sustava što u konačnici utječe na prognozu i preživljenje. Današnje tehnike detekcije poput sekvenciranja gena novom generacijom NGS (engl. *next-generation sequencing*) ili PCR-a (engl. *polymerase chain reaction*), mogu detektirati promjene u genima ili cijelom genomu, a ti podaci su važni u liječenju i prognozi karcinoma dojke. U dijagnostičke i terapijske svrhe se danas najčešće rade analize sljedećih gena: *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *GATA3*, *PTEN*, *TP53*, *RB1*, *CDH1*, *CDKN1B*, *MAP3K1*, *MLL3* [28].

Vrlo važne mutacije kod HR+/HER2- podgrupe karcinoma dojke su *MAP3K1* i *MAP3K4* mutacije gena unutar p38- JNK1 signalnog puta [29]. Veći je udio mutacija prisutan u *MAP3K1* genu, dok

su mutacije manje zastupljene u MAP3K4 genu, a njihova uloga još uvijek nije do kraja dovoljno istražena. U ostalim podtipovima karcinoma dojke ove su mutacije kao i mutacije *PIK3CA* gena nešto manje zastupljene [30, 31]. Uloga mutacija gore navedenih gena je ispitivana i kod ostalih solidnih tumora te se utvrdilo da mogu utjecati na biološko ponašanje i razvoj rezistencije na kemoterapiju kao primjerice kod karcinoma želuca [32].

Mutirani geni u HR+/HER2- podgrupi dovode do poremećaja enzimskih kinaznih putova što uzrokuje poremećaje u apoptozi tumorskih stanica te boljem preživljenju i rezistenciji na hormonsku terapiju. Mutacije gena *TP53* gena mogu se naći u određenom postotku i u HR+/HER2- podtipu karcinoma dojke. Prema radovima, učestalost mutacije *TP53* gena, kod karcinoma dojke je oko 28% uzevši u obzir sve podvrste, a prisutnost navedene mutacije je također usko povezana s lošijom prognozom i preživljenjem [33].

Tumori razvijaju razne mehanizme kako bi izbjegli djelovanje imunološkog sustava domaćina i pod utjecajem kemoterapije mijenjaju svoja osnovna obilježja. Kako kemoterapija uništava tumorske stanice, tako može i uzrokovati da se tumor vremenom prilagodi na lijekove koji ga uništavaju i razvije kompenzacijske mehanizme. Tumori nakon nekog perioda mijenjaju i mutacijski status određenih gena pa je određivanje genskih promjena *TP53*, *PIK3CA*, *ESR1*, *GATA3* i *KMT2C* vrlo važan korak u pronalaženju adekvatne terapije kod svakog podtipa karcinoma dojke. Kako je u HR+/HER2- podtipu karcinoma u najvećem postupku prisutna mutacija *PIK3CA* gena, tako je kod TNBC karcinoma mutacija *TP53* gena najviše zastupljena od svih ostalih podtipova karcinoma dojke [34]. Prilikom nastanka metastaza kod HR+/HER2- podtipa može doći i do promjena u genetskim obilježjima između metastatskog i primarnog tumora te se oni mogu razlikovati po učestalosti i prisutnosti pojedinih mutacija gena. Prisutnost *PIK3CA* mutacije gena u HR+/HER2- podtipu može se razlikovati u metastatskom i primarnom karcinomu dojke [35].

TNBC karcinom dojke je podtip koji je ER, PR i HER2 negativan i nema izražaj ovih receptora na tumorskim stanicama. TNBC karcinomi imaju agresivnije biološko ponašanje i nepovoljniju prognozu. Također imaju veliku učestalost mutacija određenih gena, za razliku od HR+/HER2- podtipa. *PIK3CA* mutacije se u TNBC-u javljaju u nešto manjem postotku (15-25%) u odnosu na podtip HR+/HER2-. *PIK3CA* mutacijski status i utjecaj na biološko ponašanje kod TNBC karcinoma dojke nije u potpunosti jasan niti do kraja istražen [36,37].

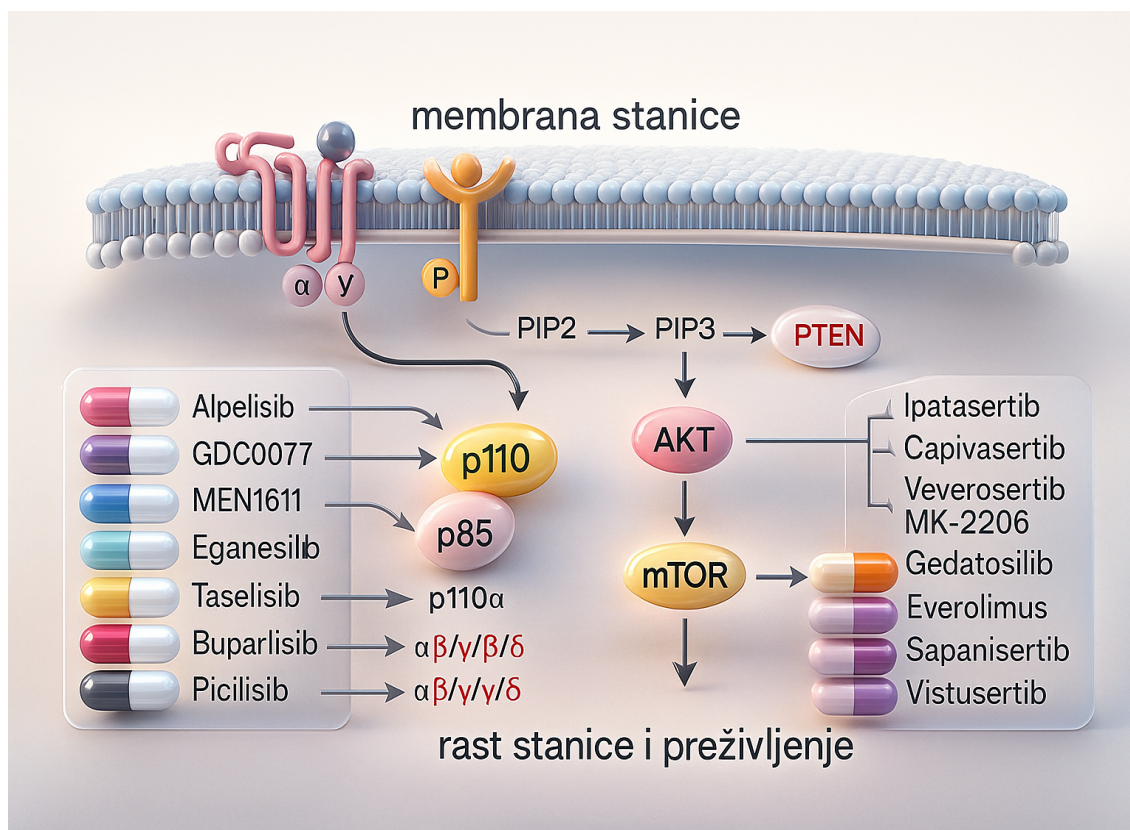
1.4. PI3K signalni put i *PIK3CA* gen

Fosfoinozimid-3-kinaza (PI3K) je enzim koji pripada grupi lipidnih kinaza. Oni djeluju na fosfatidilinozitol tako što fosforiliraju 3'-OH grupu i imaju važnu ulogu u metabolizmu tumorskih stanica te utječu na proliferaciju, autonomni rast i preživljenje.

Ovi enzimi se dijele u tri klase, a kod istraživanja tumorskih oboljenja, u fokusu je mehanizam djelovanja PI3K klase I. Produkti klase I PI3K puta, posebice PIP3 produkt, su veoma važan dio PI3K signalnog puta [38]. Ukoliko PIP3-klasa enzima, bude defosforilirana, putem tumorsupresijskih gena (*PTEN*) dolazi do inaktivacije PI3K signalnog puta, a danas je moguće ciljanim molekulama djelovati na različitim nivoima unutar ovog puta prijenosa signala (Slika 4). Za regulaciju staničnog ciklusa, razvoj i preživljenje raznih vrsta tumora odgovorne su četiri katalitičke jedinice klase I, signalnog PI3K puta: p110 α , p110 β , p110 γ i p110 δ i pet regulatornih jedinica (P85) [39].

Mnoge studije danas govore da su upravo promjene u signalnom putu PI3K/AKT/mTOR odgovorne za razvoj tumorske bolesti. *PIK3CA* je važan gen u PI3K signalnom putu i u najvišem postotku je mutiran upravo u HR+/HER2- podtipu karcinoma dojke [40].

On kodira p100 α podjedinicu PI3K signalnog puta, a mutacije se javljaju na nekoliko ključnih mjesta u *PIK3CA* genu, odnosno to su tzv. vruće točke (engl. *hot-spot*) na specifičnoj nukleotidnoj poziciji unutar gena. U odnosu na HR+/HER2- podtip karcinoma dojke, *PIK3CA* mutacije su manje zastupljene u ostalim podtipovima karcinoma i taj udio je na razini od 18-40% (Slika 5) [41-43]. Prema podacima iz literature, kod metastatskog HR+/HER2- karcinoma dojke u odnosu na primarni tumor, prisutnost *PIK3CA* mutacija je nešto manje zastupljena (oko 9,8% manje) no nije se značajno razlikovala obzirom na područje tijela u koje je karcinom dojke metastazirao [44]. Mutacije *PIK3CA* gena se najčešće nalaze u eksonu 9 (varijante E542, E545 i Q546) i u eksonu 20 (varijanta H1047) [45]. Po učestalosti, najmanje su zastupljene mutacije u eksonima 1, 4, 5 i 19 *PIK3CA* gena [46]. Ukoliko dođe do mutacije *PIK3CA* gena, to uzrokuje gubitak funkcije inhibitorne aktivnosti p85 signalne molekule i aktivacije p100 α jedinice što utječe na povećanu aktivnost lipidnih kinaza u staničnom ciklusu.



Slika 4. Mogućnosti blokade *PI3K/AKT/mTOR* na različitim mjestima uz pomoć različitih vrsta lijekova

Blokadom pojedinog puta, dolazi do promjena u metabolizmu i staničnom ciklusu što utječe na rast tumora i preživljenje tumorske stanice te dovodi do ubrzane stanične smrti (autorski crtež uz pomoć Adobe Illustrator programa)

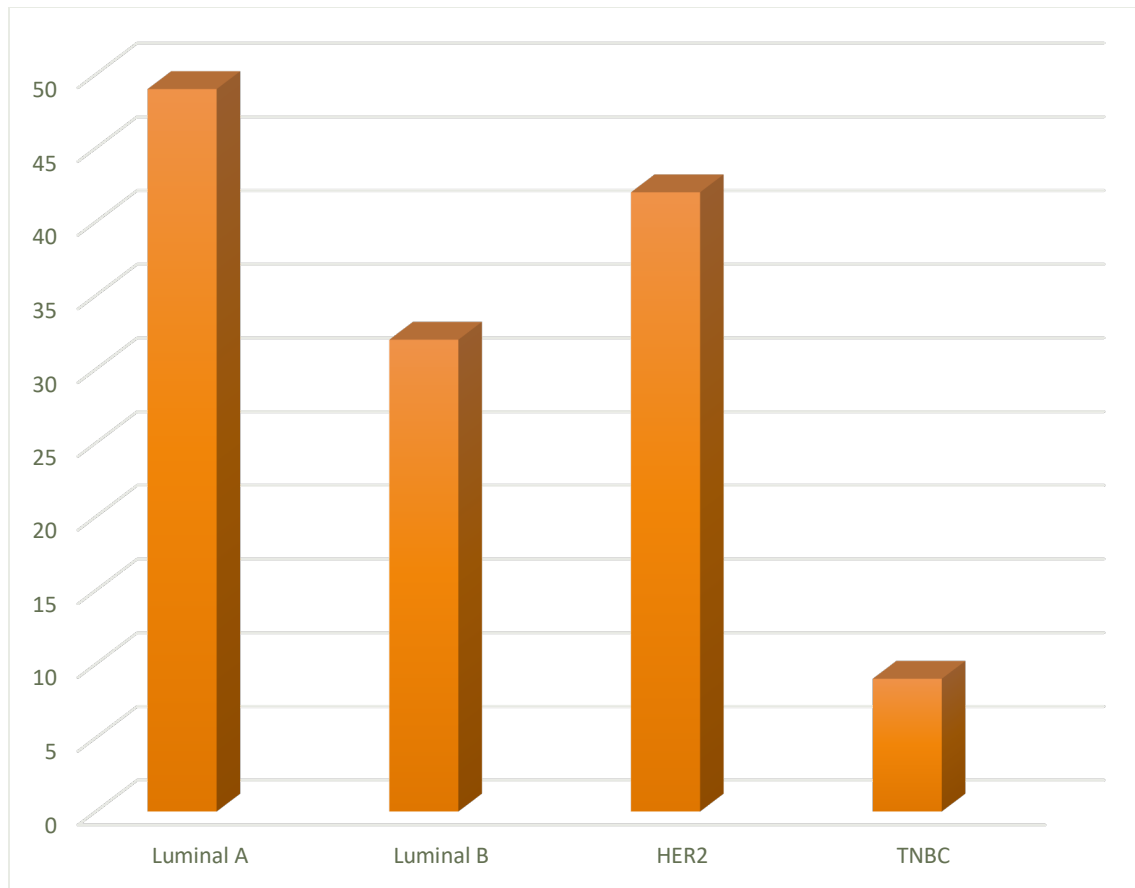
P110α podjedinica je građena od 5 domena i kada dođe do mutacije *PIK3CA* gena dolazi i do promjene u *PI3K/AKT/mTOR* signalnom putu što posljedično mijenja tumorski mikrookoliš i utječe na važne signalne puteve koji dovode do boljeg preživljavanja tumora i izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina [47].

Mutacija E545K, u eksonu 9 prekida nSH2-helikalnu interakciju, dok mutacija H104R, u eksonu 20 djeluje na karakteristike stanične membrane u vezanju za specifične kinaze [48].

Time dolazi do pojačane onkogene aktivnosti i aktivacije gena *BRAF*, *RAS* i *EGFR*, a kao rezultat navedenog dolazi do razvoja tumorske rezistencije, povećane sklonosti invaziji u okolna tkiva, raste otpornosti na mehanizme apoptoze, raste autonomna tumorska proliferacija kao i tumorska

angiogeneza. Iako je poznat mehanizam unutarstaničnog djelovanja, utjecaj mutacije *PK3CA* gena na preživljenje pacijentica oboljelih od karcinoma dojke nije u potpunosti jasan. Rezultati raznih studija su oprečni, ali se čini da je ukupno preživljenje, OS (engl. *overall survival*) ipak nešto lošije kod oboljelih čiji su tumori imali *PIK3CA* mutaciju [139]. Određeni radovi govore da su mutacije *PIK3CA* gena bile povezane sa boljom prognozom kod ranog karcinoma dojke, osobito u onih sa pozitivnom estrogenskom ekspresijom u HR+/HER2- podgrupi i manjom inicijalnom veličinom samog karcinoma [49]. Nakon određenog vremena, na primjenu standardnog onkološkog liječenja, dolazi do razvoja rezistencije i kod ovog podtipa karcinoma dojke [43]. Različiti su mehanizmi nastanka rezistencije na terapiju u HR+/HER2- podtipu karcinoma dojke, a jedan od važnijih načina je promjena u regulaciji PI3K signalnog puta. Danas je korištenjem PI3K inhibitora moguće modulirati ovaj važan signalni put koji može biti promijenjen kao posljedica mutacije *PIK3CA* gena. Tim djelovanjem lijeka može doći do boljeg preživljenja odnosno do kasnije pojave recidiva usprkos mutaciji gena [50].

Danas su u kliničkoj upotrebi različiti *PI3K* inhibitori kao što su buparlisib koji je pan PI3K inhibitor, zatim pictilisib te alpelisib kao specifični PI3K inhibitor koji djeluje na jedinicu p110 α . Provedena SOLAR-1 klinička studija te njeni rezultati utjecali su na korištenje PI3K inhibitora alpelisiba, u pacijentica s metastatskim HR+/HER2- podtipom karcinoma dojke [51,52]. Američko udruženje kliničkih onkologa, preporuča terapiju alpelisibom u postmenopausalnih žena sa HR+/HER2- podtipom karcinoma, s dokazanom *PIK3CA* mutacijom, u uznapredovaloj fazi bolesti sa metastatskom prezentacijom, a pacijentice čiji tumori nemaju *PIK3CA* mutaciju gena dokazano nemaju koristi od ove vrste terapije.



Slika 5. *PIK3CA* mutacije u pojedinom podtipu karcinoma dojke prema atlasu TCGA (engl. *The Cancer Genome Atlas*)

TCGA je sadrži veliku bazu podataka uključujući i rak dojke koji sadrži podatke o pojedinim podtipovima karcinoma dojke uključujući i promjena na genima (autorski crtež prema TCGA atlasu)

Mutacije u eksonu 20 *PIK3CA* gena su povezane s većom razinom p-ERK1/2 u signalnom putu mitogen-aktiviranih proteinskih kinaza (MAP). Također, karcinomi koji imaju *PIK3CA* mutaciju u eksonu 9 su udruženi s većom razinom p-AKT i p-ERK1/2 proteina, ali ne i sa p-p70S6K [53,54]. Utjecaj mutacija na te molekule određuje i biološko ponašanje tumora. Različiti utjecaj na prognozu mogu imati mutacije *PIK3CA* gena u eksonu 9 ili 20 i upravo zbog toga studije uspoređuju prognozu i utjecaj položaja mutacije na *PIK3CA* genu i kod karcinoma dojke.

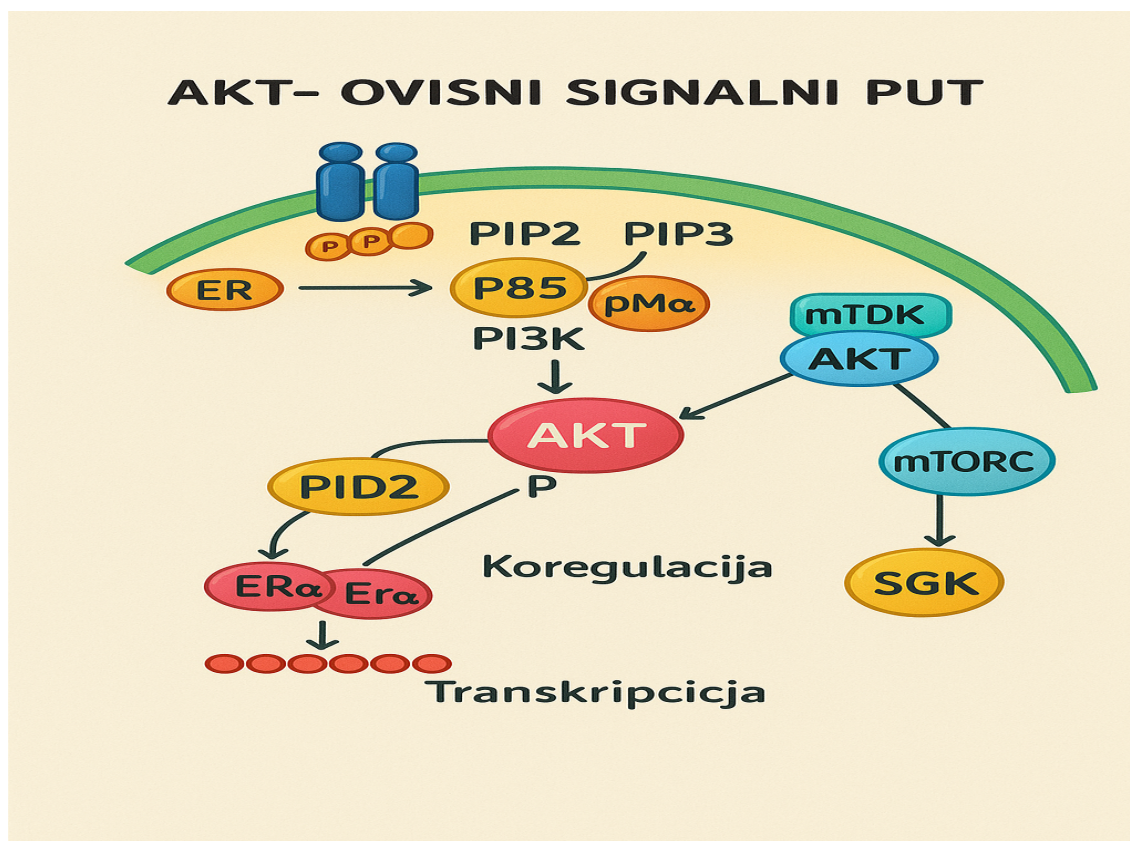
Neka od istraživanja ukazuju na to da je mutacija u eksonu 9 *PIK3CA* gena udružena sa nešto boljom prognozom, za razliku od mutacije u eksonu 20, kod HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke [55,56]. Mutacije u eksonu 20 *PIK3CA* gena su bile povezane sa kraćim ukupnim preživljenjem i

bolesnice su bile sklonije razvoju rezistencije na kemoterapiju [57]. Određene studije iznose i oprečne rezultate i ovo tumačenje i utjecaj pozicije mutacije u *PIK3CA* genu nije jednostavno.

Potrebna su dodatna istraživanja, osobito kod HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke da se razjasni povezanost položaja mutacije unutar *PIK3CA* gena i biološkog ponašanja karcinoma.

Također PI3K signalni put primjerice kod ER pozitivnih karcinoma ima utjecaj na estrogen-receptor signalni mehanizam te mijenja utjecaj blokatora estrogenskih receptora. Kod HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke ER regulacijski put služi u kontroli stanične proliferacije i rasta stanice. Vežući se na svoj ER na stanici, estrogen potiče aktivaciju važnih regulacijskih mehanizama. Blokatori i antagonisti estrogenskih receptora koji se koriste u terapiji karcinoma dojke, poput letrozola (nesteroidni aromataza inhibitor III generacije) ili eksemestana (ireverzibilni steroidni aromataza inhibitor) blokiraju ovaj signalni put. Obzirom da je većina *PIK3CA* mutacija zastupljena upravo u ovom podtipu karcinoma dojke, čini se da PI3K signalni put i ER nakon vezanja estrogena djeluju u vrlo uskoj interakciji (Slika 6). Djelotvornost blokade samo jednog pojedinačnog puta nije adekvatna kao kada se blokiraju oba signalna puta te se time može utjecati na bolju kontrolu bolesti. Pokazalo se da kombinacija blokade PI3K puta, uz pomoć alpelisiba, a u kombinaciji sa lijekom fulvestrantom (estrogen-receptor antagonist) kod postmenopausalnih žena, oboljelih od HR+/HER2- karcinoma dojke, može poboljšati PFS [58].

Višestruke mutacije na različitim eksonima *PIK3CA* gena utječu na promjene u *PI3K* signalnom vrlo složenim mehanizmom i kod ostalih solidnih tumora i mogu promijeniti biološko ponašanje što se može vidjeti na primjeru karcinoma endometrija materice [56]. Prema nekim radovima uočen je međusobni odnos izmijenjenog PI3K signalnog puta i MAPK puta (engl. *mitogen activated protein kinase*) [59-63]. Otkriće MAPK signalnog puta početkom 90-ih godina prošlog stoljeća započinje na stanicama kvasca koje tako razvijaju adaptivne mehanizme na stres prilikom razmnožavanja. Kasnije je uočeno da je MAP kinaza važan enzim MAPK signalnog puta i djeluje i u eukariotskim stanicama u ključnim staničnim putevima signaliziranja. MAPK signalni put ovisi uglavnom o međudjelovanju tri proteinske kinaze MAPK, MAPK2 i MAPK3. U višestaničnih organizama postoji nekoliko glavnih MAPK putova koji su građeni od komponenti ERK1/2, JNK1/2/3 i p38 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), ostale manje komponente ovog puta služe za pokretanje i regulaciju signalizacije [64-66].



Slika 6. Mehanizmi interakcije estrogenskog i PI3K signalnog puta

Djelovanjem na estrogenski receptor dolazi do promjena i u signalizaciji p85 regulatorne podjedinice tumora; Skraćenice: AKT-gen odgovoran za rast metabolizam i stanično preživljenje, PIP2 fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, PIP3-fosfatidilinozitol-2,4,5-trifosfat, ER-estrogen receptor (autorski crtež uz pomoć Adobe Ilustrator programa)

Mutacija gena odgovornih za regulaciju MAPK signalnog puta je u najvišem postotku otkrivena u estrogen-negativnim podtipovima karcinoma dojke [67]. Osobito je ovo svojstvo karakteristično za karcinome koji pokazuju povećanu ekspresiju epidermalnog čimbenika rasta ili HER2 receptora [68,69]. Inhibitorna aktivnost na PI3K/AKT/mTOR put može dovesti do pojačane aktivnosti *MAPK* signalnog puta i obrnuto što ukazuje na njihovu važnu sinergističku ulogu. Postoji nekoliko studija koje ispituju ovu sinergističku aktivnost blokirajući istovremeni PI3K i MAPK signalni put kod karcinoma dojke i malignog melanoma dokazujući učinkovitost istovremene blokade oba puta signalizacije [70].

Svaki tumor stvara vlastite mutacije kojima modulira signalne puteve i njihovo razumijevanje i racionalno tumačenje može dovesti do poboljšanja i unapređenja standardne terapije.

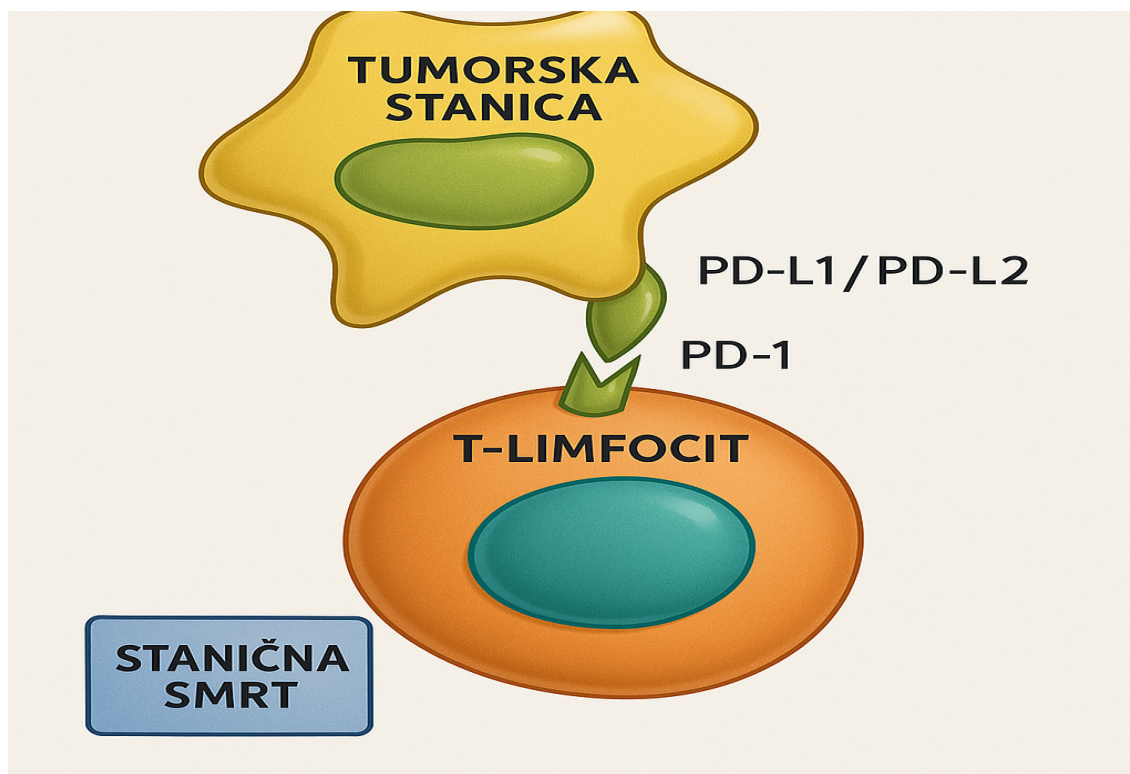
Osim što *PIK3CA* mutacije mijenjaju signalne puteve i povećavaju otpornost tumora na djelovanje imunoloških stanica domaćina, utječu i na sastav mikrookoliša tumora. Tako kod određenih tumora, primjerice karcinoma debelog crijeva, radovi ukazuju da su *PIK3CA* mutacije udružene sa povećanjem limfocitne infiltracije i povećanim izražajem liganda programirane stanične smrti, PD-L1 (engl. *programmed death-ligand 1*), odnosno promjenama u tumorskom mikrookolišu [71,72]. Prognoza oboljenja i biološko ponašanje solidnih tumora je ovisna o tipu imunoloških stanica koje zauzimaju sam prostor tumora i razini izražaja PD-L1 na stanicama tumora [73].

1.5. PD-1/PD-L1 signalni put

Otkrićem PD-1/PD-L1 imunološkog puta dolazi do značajnih pomaka u liječenju tumora imunološkom terapijom. Modulacijom imunološkog sustava na ključnim nivoima može se utjecati na bolji imunološki odgovor domaćina na tumorske stanice. 2018 godine istraživači James P Allison i Tasuku H dobivaju Nobelovu nagradu za ovo važno otkriće. Protein programirane stanične smrti, PD-1 (engl. *programmed cell death protein*), nekad označavan kao CD279 je 55 kDa transmembranski protein koji se sastoji od 288 aminokiselina. PD-1 protein se nalazi na površini mnogih stanica imunološkog sustava, primjerice na T i B limfocitima, monocitima, dendritičkim i NK stanicama. Pokazuje visoku ekspresiju osobito na tumorskim T- limfocitima kod određenih vrsta malignih tumora [74].

Pojedini transkripcijski čimbenici kao NFAT, Foxo1, IRF9 mogu dovesti do pojačane transkripcije i izražaja PD-L1 molekule na površini stanica. PD-L1 ligand, ranije poznat kao CD274 ili B7-H1 je 40 kDa, tip 1 transmembranski glikoprotein. Građen je od 290 aminokiselina i sadrži Ig i IgC domenu. PD-L1 ligand se kao i PD-1 protein nalazi na aktiviranim T i B limfocita, makrofazima i ostalim stanicama imunološkog sustava te tumorskim stanicama [75]. Povećanim izražajem PD-L1 molekule, tumorske stanice su razvile adaptacijski mehanizam kako izbjeći imunološkom sustavu domaćina (Slika 7). Dokazano je kako u nekim tumorima lučenje γ -interferona uzrokuje povišenu razinu PD-L1 izražaja na tumorskim stanicama što može biti razlog povećane tumorske otpornosti na djelovanje imunološkog sustava domaćina [76].

Osim spomenutog mehanizma i drugi signalni putevi utječu na regulaciju PD-1/PD-L1 osovine kao dobro poznati PI3K i MAPK put. Njihovo isprepletano i komplicirano djelovanje nije u potpunosti do danas istraženo. Pojedina istraživanja govore kako aktivacijom PI3K signalnog puta može doći do povećanog izražaja PD-L1 čime se mijenja energetski protok u stanici što se može vidjeti na primjeru brojnih tumora [77].



Slika 7. Osovina PD-1/PD-L1 i način regulacije

Tumorska stanica se veže na PD-1 ligand na T limfocitima uzrokujući smanjenje stanične proliferacije, aktivacije i smanjenog lučenja važnih citokina u homeostazi stanice, dolazi do ubrzane stanične smrti tj. apoptoze; Skraćenice: PD-1- (engl. *Programmed cell death-1*), protein programirane stanične smrti PD-L1- (engl. *Programmed cell death ligand-1*), ligand programirane stanične smrti (autorski crtež uz pomoć Adobe Illustrator programa)

Razina PD-L1 izražaja u pojedinim podtipovima karcinoma dojke nije jednaka i općenito je razina PD-L1 izražaja u karcinomu dojke niže nego kod ostalih solidnih tumora te iznosi oko 10-30% [78-80]. Najveći postotak PD-L1 izražaja je nađen kod TNBC podtipa karcinoma dojke. TNBC podtip karcinoma u 45-55% slučajeva ima povećan PD-L1 izražaj, a zatim slijede HER2+ pozitivni karcinoma (oko 30%), dok je PD-L1 rijetko pozitivan u HR+/HER2- podtipu sa otprilike 0-10% slučajeva [81-83]. Značaj PD-L1 izražaja u karcinomu dojke te njegova prognostička uloga nisu još uvijek u potpunosti jasni između ostalog i zbog različitih klonova protutijela korištenih u imunohistokemijskim analizama i različito postavljenih pragova pozitivnosti (engl. *cut-off*) kao i samog načina očitavanja.

Vežanjem PD-1 proteina na PD-L1 ligand dolazi do njegove aktivacije, a posljedično dolazi do inaktivacije stanica imunološkog sustava, odumiranja stanica, smanjenog lučenja različitih citokina te povećane tolerancije imunološkog sustava na antigene. PD-1 (CD279) kao član CD28/CTLA4 obitelji svojim receptorom za PD-L1 (CD274) i PD-L2 (CD273) čini važan imuni regulatorni (inhibitorni) mehanizam (engl. *checkponit*). Povećana razina izražaja PD-L1 na tumorskim stanicama je značajan mehanizam kojim stanice tumorskog tkiva izbjegavaju imunološki odgovor domaćina. PD-L1 na tumorskim stanicama djeluje ponajprije na citotoksične T limfocite izravnim mehanizmom inhibicije vežući se na PD-1 receptor na limfocitima. Tako dolazi do oslabljenja staničnog odgovora posredovanog limfocitima uzrokujući njihovu ubranu staničnu smrt tj. apoptozu. Mehanizam kojim se prekida interakcija između PD-L1 i PD-1 može dovesti do boljeg antitumorskog odgovora. Tijekom godina razvili su se različiti inhibitori ovog signalnog puta, a 2014. godine počinje se upotrebljavati lijek pembrolizumab (monoklonalno IgG4-k antitijelo) koji je PD-1 inhibitor, a nakon njega i inhibitorno antitijelo na PD-L1, atezolizumab. Danas je u upotrebi sve više novih imunomodulatornih lijekova koji su odobreni u Americi od strane Agencije za hranu i lijekove, FDA (engl. *Food and Drug Administration*) i koriste se širom svijeta (Tablica 3).

Tumorski mikrookoliš kod karcinoma dojke je jako varijabilan i građen je od različitih stanica imunološkog sustava koje infiltriraju tumor. Mnoge studije pokazuju da TNBC karcinomi dojke uz viši PD-L1 izražaj imaju i veću količinu infiltrirajućih limfocita nego ostali podtipovi karcinoma dojke [84,85]. Veći izražaj PD-L1 je povezan sa negativnim prognostičkim čimbenicima karcinoma dojke poput višeg histološkog gradusa, veličine tumora, odsutnošću ER, PR, HER2 receptora i visokim indeksom proliferacije [86]. Kroz promjenu PI3K signalnog puta,

putem povećane aktivnosti PI3K dolazi i do povećanog izražaja PD-L1. Zanimljivo je da je kod HR+/HER2 podtipa karcinoma dojke razina PD-L1 izražaja niža nego kod ostalih podtipova. Povezanost *PIK3CA* mutacija kod HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke sa razinom PD-L1 izražaja nije u potpunosti jasna, za razliku od drugih vrsta solidnih tumora gdje je ta povezanost više istražena. Obzirom da je imunogenost karcinoma dojke na nešto nižoj razini od ostalih tumora, imunoterapija je najviše bila usmjerena na imunogeničan podtip karcinoma dojke a to je TNBC.

Tablica 3. Odobreni lijekovi od strane FDA te njihova primjena i mehanizam djelovanja na ključnim nivoima i vrste tumora kod kojih se može očekivati učinkovitost terapije

Ciljna molekula	Lijek	Proizvođač	Klasa antitijela	Tip tumora
PD-1	Pembrolizumab	Keytruda (Merck)	IgG4K	melanom, dojka, pluća, jednjak, debelo crijevo, Hodgkin limfom
	Nivolumab	Squibbi Opdivo (Bristol-Meyers)	IgG4	melanom, Hodgkin limfom, tumor glave i vrata, pluća
	Cemiplimab	Libtayo (Sanofi)	Kombinacija antitijela i lijekova	kutani skvamozni tumor
PD-L1	Azetolizumab	Tecentriq (Genentech/Roche)	IgG1K	pluća, dojka, mokraćni sustav
	Alvelumab	Bavenico (Pfeizer)	IgG1	Merkell cell tumor, mokraćni sustav
	Durvalumab	Imfinzi (A. Zeneca)	IgG1K	mokraćni sustav, pluća

Skraćenice : PD-1-(engl. *Programmed cell death-1*), protein programirane stanične smrti

PD-L1- (engl. *Programmed cell death ligand-1*), ligand programirane stanične smrti. IgG- imunoglobulin G

Unatoč pozitivnom efektu na liječenje tumora primjenom imunološke terapije, njena upotreba može uzrokovati i znatne nuspojave i štetne učinke, te bi davanje iste trebalo biti dobro procijenjeno. Treba pažljivo razmotriti sve čimbenike prije započinjanja imunoterapije solidnih tumora kako bi se umanjio šteni učinak kao i nuspojave kemoterapijskih režima (Tablica 4).

Tablica 4. Prediktivni čimbenici za anti-PD-L1 terapiju

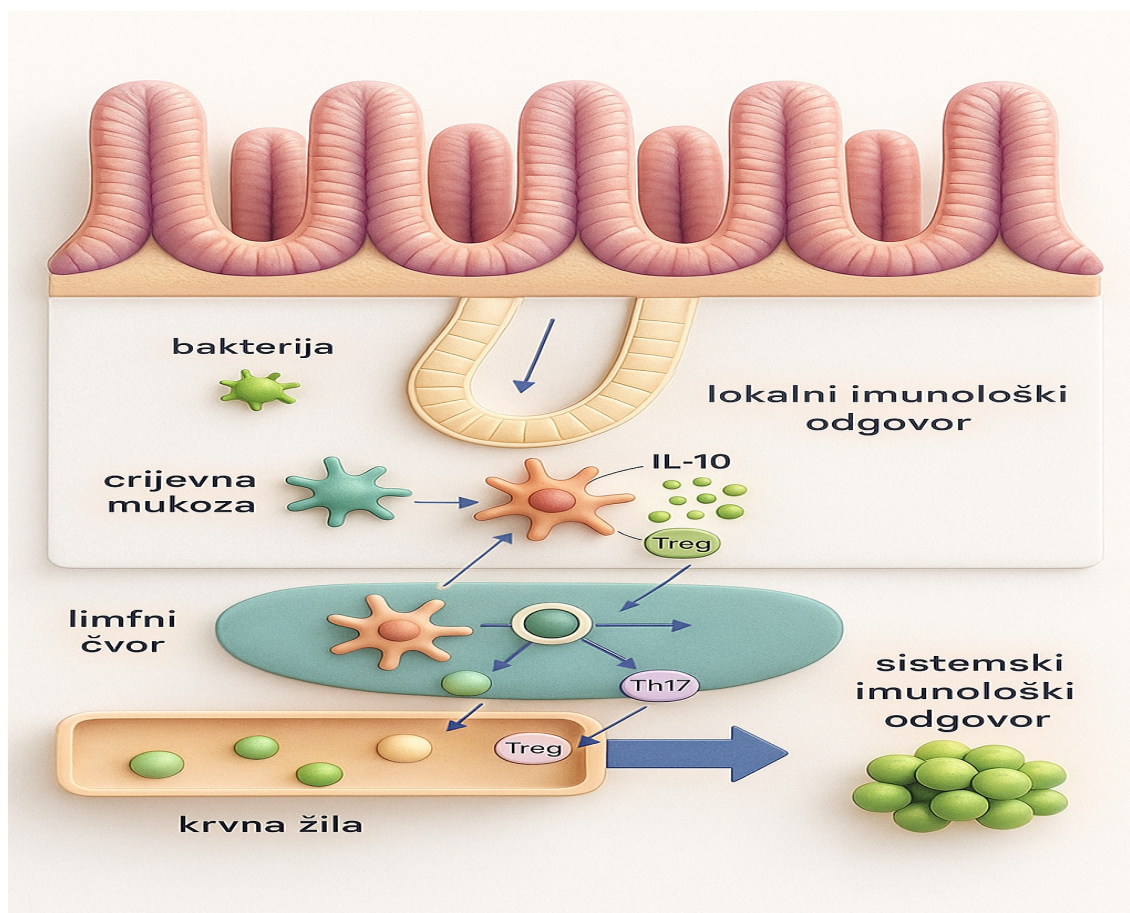
Određivanjem ovih čimbenika se može dati ciljana anti-tumorska terapija kod određenih solidnih tumora

Tip karcinoma	Lijek	Predikatni čimbenik
pluća	Atezolizumab	PD-L1
debelo crijevo	Nivolumab	MMR/MSI
urogenitalni sustav	Azetolizumab	TMB
melanom	Anti PD-L1 terapija	crijevna mikrobiota

Skraćenice: MMR- (engl. *missmatch repair*) popravak neusklađenih baza nukleotida, MSI-(engl. *Microsatelite instabilitet*), mikrosatelitska nestabilnost tj. brisanje ili umetanje mutacija unutar kratkih ponavljajući DNA sekvenci, TMB-(engl. *mutation burden*) ukupan broj somatskih mutacija tumora. PD-L1- (engl. *Programmed cell death ligand-1*), ligand programirane stanične smrti

Određeni radovi dovode u vezu međusobnu povezanost crijevne mikrobiote i djelovanja imunološke modulacije putem PD-1/PD-L1 blokade. Transplantacijom cijevne mikrobiote, može se utjecati na djelotvornost same imunološke terapije, odnosno može se utjecati na smanjenje rezistencije na PD-1/PD-L1 imunološke modulatore [87, 88].

Identificiran je rod bakterija koje mogu biti odgovorne za bolju prognozu oboljelih koji se liječe imunoterapijom, tj. blokatorima PD-1/PD-L1 osovine (Slika 8). Bakterije iz roda Clostridiales, Ruminococcaceae i Faecalibacterium u nekim tumorima su se pokazale u povećanim koncentracijama kod pacijenata koji su imali dobar odgovor na terapiju. Stoga crijevna mikrobiota također može biti jedan od prediktivnih čimbenika koji bi mogli odrediti uspjeh imunološke terapije u budućnosti [89,90].



Slika 8. Odnos tumorskih stanica, imunološkog odgovora domaćina i crijevne mikrobiote. Bakterije u crijevima putem svojih medijatora izazivaju niz imunoloških odgovora u sluznici crijeva, a time dolazi do mijenjanja sistemskog imunološkog odgovora organizma što utječe na djelovanje kemoterapije i učinkovitost u otklanjanju tumorskih stanica iz organizma (autorski crtež uz pomoć Adobe Illustrator programa)

1.6. Obilježja tumorskog mikrookoliša

Određeni signalni putevi i geni su odgovorni za povećani PD-L1 izražaj te promjene u tumorskom mikrookolišu. TIL u karcinomima dojke uglavnom sadržavaju CD8 i CD4 pozitivne T limfocite ali i ostale vrste stanica imunološkog sustava. Visoka razina TIL-a u solidnim tumorima je često

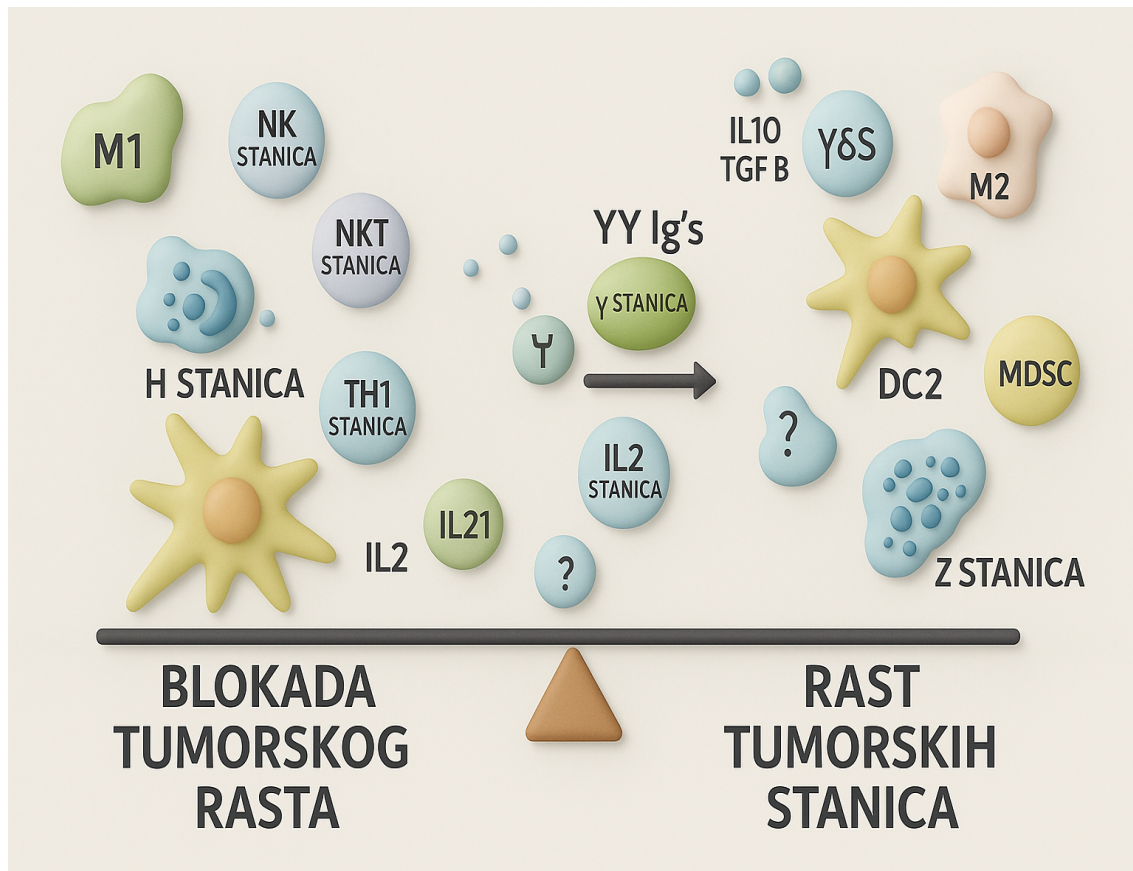
udružena sa boljim odgovorom na liječenje imunoterapijom, te boljom prognozom ali ovisi i o vrsti stanica imunološkog sustava koje infiltriraju tumorsko tkivo [91-93].

Što se tiče ocjene TIL-a, kao prognostičkog čimbenika u podtipu karcinoma dojke HR+/HER2-, nalazi studija su oprečni. U nekim radovima pronađena je povezanost sa lošijom prognozom karcinoma koji su imali visok stupanj TIL-a, dok drugi autori nisu uspjeli pronaći povezanost razine TIL-a i prognostičkog značaja [94]. Mikrookoliš je složena i dinamička struktura čiji sastav reguliraju razni čimbenici i njegov sastav može dati važne prognostičke informacije o biološkom ponašanju tumora. Stanice imunološkog sustava infiltriraju tumor nastojeći ukloniti tumorske stanice iz organizma. Potpuno drugačija građa i struktura imunoloških stanica odnosno tumorskog mikrookoliša karakteristična je za svaki pojedini tip tumora. Odnos razine infiltracije, vrste stanice i podtipa karcinoma dojke je vrlo složen, nije dovoljno istražen i postoje mnogi radovi koji imaju oprečne rezultate.

Primjerice, odnos CD4 i CD8 limfocitne infiltracije kao i prognoze, nije u potpunosti jasan i postoje oprečne studije kod karcinoma dojke i pojedinih vrsta solidnih tumora, kao npr. mokraćnog mjehura [95-99]. Promatrajući samo HR+/HER2- podtip karcinoma dojke, viša razina infiltracije tumora CD4 stanicama imunološkog sustava i njihova količina može biti udružena sa lošijom prognozom, a viša razina CD8 može utjecati na povoljniji DFS. Ovo opažanje ide u prilog složenosti mehanizma na koji način vrsta stanične infiltracije utječe na prognozu bolesti. Može se zaključiti da je kod različitih podtipova karcinoma dojke, uloga CD4 i CD8 stanične infiltracije različita na prognozu bolesti [100].

Stanice imunološkog sustava oblikuju tumorski mikrookoliš na način da njihov međudodnos ima učinak na supresiju tumora ili je učinak nedovoljan i dolazi do nesmetanog autonomnog rasta tumora (Slika 9). Stanice imunološkog sustava mogu infiltrirati, odnosno zauzimati prostor unutar strome samog tumora ili se vezati na mrežu tumorskih stanica. Time su u bliskom kontaktu sa tumorskim stanicama. Mnoge studije, do danas, više su uzimale u obzir stromalne limfocite, za razliku od limfocita koji su vezani na mrežu tumorskih stanica i koje čine bliski kontakt s njima. Limfociti u kontaktu sa tumorskim stanicama su češće zastupljeni u manjem broju i teže ih je procijeniti na standardnim preparatima zbog svoje heterogenosti. U novije vrijeme su se i oni pokazali uz stromalne limfocite važnim prediktivnim čimbenikom u procjeni prognoze tumora. Današnje imunohistokemijske metode olakšavaju detekciju te klasifikaciju limfocita obzirom na

smještaj unutar tumora. Stromalni limfociti se procjenjuju kao postotak stromalnog područja koje je infiltrirano samim limfocitima dok je manji postotak ipak vezan na same tumorske stanice.



Slika 9. Međusobni odnos raznih vrsta imunoloških stanica i tumora

Ukoliko dođe do inaktivacije imunoloških stanica mehanizmima blokade imunološkog sustava, tumor nastavlja nesmetani rast, a u obrnutom slučaju, ukoliko imunološki sustav nadvlada mehanizme tumorskog rasta dolazi do zaustavljanja tumorskog rasta i eliminacije tumorskih stanica iz organizma (autorski crtež uz pomoć Adobe Illustrator programa)

Studije pokazuju, da se u HR+/HER2- podtipu karcinoma sa *PIK3CA* mutacijom, može naći u većem postotku infiltracija CD8 stanicama, za razliku od karcinoma dojke iste podgrupe bez *PIK3CA* mutacije, gdje je stanična infiltracija sa CD8 manja [101]. Također, prema spomenutim

radovima je uočeno kako povećana infiltracija tumora CD8 stanicama utječe i na prognozu bolesti [101]. Također na sastav tumorskog mikrookoliša utječe i PD-1/PD-L1 signalni put. Povećani PD-L1 izražaj znači promjenu u gustoći i sastavu tumorskog mikrookoliša kod karcinoma dojke kao i drugih solidnih tumora [102-103].

Kemoterapija inducira cijeli niz promjena u tumorskom mikrookolišu i uzrokuje promjene u sastavu TIL-a te obično dovodi do smanjenja razine stromalnih limfocita što utječe na prognozu bolesti. Npr. ukoliko nakon kemoterapije ne dođe do smanjenja infiltracije, osobito stromalnih limfocita, to može biti nepovoljan prognostički znak kod TNBC podtipa karcinoma dojke [104]. Infiltracija imunološkim stanicama je obilježje primarnog ali i metastatskog tumora. Razine limfocitne infiltracije mogu biti niže u metastatskom tumoru, nego u primarnoj prezentaciji tumora [105].

Luminalni A karcinom, HR+/HER2- podtipa, ima nižu razinu infiltracije TIL-a od luminalnog B, HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke [106]. Luminalni B karcinomi su udruženi sa lošijom prognozom i imaju niže ukupno preživljenje od luminalnog tipa A. Osim limfocita u tumorskom mikrookolišu se mogu pronaći i druge stanice koje nisu limfocitne linije, a utječu na preživljenje i prognozu. To su makrofazi linije M1 i M2 koji čine vrlo važnu sastavnicu tumorskog mikrookoliša.

Pregledom dostupne literature ne nalazi se jasna povezanost i utjecaj *PIK3CA* mutacija na izražaj CD68 i CD163 makrofaga u tumorskom mikrookolišu. Nije objašnjena povezanost PD-L1 izražaja i promjena u tumorskom mikrookolišu kod tumora koji su imali mutaciju *PIK3CA* gena i onih koji nisu imali tu mutaciju. Za značaj i razinu izražaja CD4, CD8, CD68 i CD168 te utjecaj na biološko ponašanje ovisno o mutacijskom statusu *PIK3CA* gena nema jednoznačnih objašnjenja. Osobito se to odnosi na HR+/HER2- podgrupu karcinoma dojke koji je od svih podtipova karcinoma dojke najmanje imunogeničan tumor.

Procjena TIL-a je vrlo važan prognostički čimbenik kod raznih vrsta tumora, a tijekom zadnjih godina je bilo potrebno standardizirati postupke za evaluaciju i interpretaciju TIL-a. Radna grupa patologa, usko specijaliziranih za patologiju karcinoma dojke (engl. *International Immunology Biomarker Working Group on Breast Cancer*) je standardizirala kriterije za procjenu imunoloških biobiljega [107]. Općenite smjernice za procjenu TIL-a su slijedeće:

1. 200-400 puta uvećanje svjetlosnog mikroskopa (okular x10, te objektiv mikroskopa 20-40x uvećanja)
2. Standardna debljina rezova tkiva je 4-5 μ m, tkivo tumora je prethodno fiksirano u formalinu i uklopljeno u parafinsku kocku za fino narezivanje i izradu preparata
3. Važno je analizirati tkiva prije i nakon primijenjene kemoterapije, procjenjuje se odgovor tumora na djelovanje kemoterapije i stupanj nekroze
4. Promatraju se sve mononuklearne stanice uključujući limfocite i plazma stanice (isključeni su granulociti iz analize)
5. Rutinska upotreba i analiza drugih podtipova limfocita (CD45, CD8 i CD3 i drugih limfocita) nisu za sada od većeg kliničkog značaja
6. Računalni, odnosno digitalni rezultati (engl. *machine scoring*) još nisu publicirani u većim serijama, za njihovo očitavanje je potrebno uvesti posebnu standardizaciju.
7. Klasifikacija TIL-a putem ocjene RNA ili drugih specifičnih proteina nije još uvijek dovoljno istražena, tehnike novije generacije poput CyTOF (engl. *cytometry by time-of-flight*) mogu imati određeni potencijal u pronalaženju specifičnih upalnih proteina.

Radna grupa patologa specijalizirana za tumore dojke redovito revidira smjernice i daje nove preporuke za poboljšanje standardizacije i olakšavanja interpretacije rezultata, jednog tako važnog prognostičkog čimbenika kao što je sastav tumorskog mikrookoliša.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Glavni cilj:

Utvrđiti izražaj PD-L1 na tumorskim stanicama i na T limfocitima kod *PIK3CA* mutiranih tumora i tumora bez mutacije te procijeniti broj i vrstu stanica upalnog infiltrata (CD4, CD8, CD68 i CD163) u mikrookolišu tumora te njihovu povezanost s kliničko patološkim karakteristikama tumora kao i prognostički značaj.

2.2. Specifični ciljevi:

1. Utvrđiti sastav stanica mikrookoliša tj. CD4, CD8, CD68 i CD163 u skupini HR+/HER- invazivnih karcinoma dojke (luminal A i luminal B HER2 negativnih) sa i bez *PIK3CA* mutacije
2. Ispitati izražaj PD-L1 na tumorskim i upalnim stanicama mikrookoliša u skupini HR+/HER- invazivnih karcinoma dojke sa i bez *PIK3CA* mutacije
3. Utvrđiti položaj i prisutnost (ekson 9, ekson 20) *PIK3CA* mutacija u tumorskom tkivu.
4. Odrediti tip i usporediti gustoću upalnog infiltrata (CD4, CD8, CD68 i CD163) mikrookoliša tumora te PD-L1 izražaj u tumorima sa i bez mutacije *PIK3CA* gena
5. Usporediti odnos kliničko-patoloških parametara sa statusom *PIK3CA* mutacije i PD-L1 izražajem
6. Analizirati prognostički značaj PD-L1 izražaja i sastava upalnih stanica mikrookoliša (CD4, CD8, CD68 i CD163) u tumorima sa i bez mutacije *PIK3CA* gena

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijal i ispitanice

Provedeno istraživanje je retrospektivno, a analizirani su uzorci karcinoma dojke 123 pacijentice koje su liječene u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Rijeka. Korišten je bioptički materijal, dobiven biopsijom ili operativnim zahvatom iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, KBC-a Rijeka iz razdoblja 2010-2015 godine. Analizirani su samo oni uzorci tkiva karcinoma dojke koji su bili klasificirani kao HR+/HER2- podtip i za koje je bilo dovoljno tumorskog tkiva za analize. Svi uzorci su selektirani na način da bolesnice nisu prethodno primale adjuvantnu terapiju zračenjem ili kemoterapiju. Za kategorizaciju estrogenskih, progesteronskih receptora i HER2 statusa korištene su smjernice ASCO i društva Američkih patologa [98,99]. Po zadanim smjernicama i za točno određeni podtip karcinoma dojke odabrani su uzorci odgovarajuće kvalitete za analizu tumorskog tkiva. Uzorci arhivskog bioptičkog tkiva su prošli postupak fiksacije u formalinu te su uklopljeni u parafin i potom pohranjeni. Nakon pronalaska i selekcije odgovarajućih uzoraka, najprije se pristupilo analizi kliničko-patoloških parametara pacijentica čija su tumorska tkiva prikupljena u navedenom periodu.

Klinički podaci su prikupljeni iz informatičke baze podataka KBC Rijeka (WinBIS baza podataka), a patohistološki nalazi su dobiveni iz baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Rijeka. Pomnom analizom su iščitavani medicinski kartoni, zatim su u proračunske tablice uneseni kliničko-patološki parametri za svaku pojedinu pacijenticu.

Navedeni podaci su uključivali točno određene parametre. Dob pacijentica je podijeljena na dob prije 50-te godine (premenopauzalne) i nakon 50-te godine života (postmenopauzane) pacijentice. Medijan dobi prilikom analize je iznosio 61 godinu, sa rasponom od 37-93 godine. Zatim je analiziran histološki stupanj karcinoma koji je označen arapskim brojevima od 1-3 (ovisno o karakteristikama tumora). Za histološki stupanj je korišten Bloom-Richardson bodovni sustav. [100].

Analizirano je potom: veličina tumora (manji ili veći od 2 cm u promjeru), prisutna multifokalnost karcinoma, egzulceracija, strana tijela na kojoj se pojavljuje karcinom (lijeva/desna dojka) i prisutnost upalne reakcije u karcinomu, tj. inflamatorni tip.

U kliničko-patološke parametre nadalje uključen je histološki tip karcinoma dojke koji može prema karakteristikama biti:

- ne specijalni tip karcinoma dojke: NST (engl. *no special type breast cancer*)
- specijalni tip karcinoma dojke: lobularni
- drugi specijalni tipovi (papilarni, kribriiformni i mucinozni)
- miješani NST tip + mucinozni tip karcinoma dojke
- miješani NST tip + lobularni tip karcinoma dojke

Prema molekularnoj analizi, u ovisnosti u ekspresiji hormonski receptora i izražaju Ki-67 proliferacijskog indeksa, HR+/HER2- karcinomi dojke analizirani u ovom istraživanju su klasificirani u dvije skupine: luminal A i luminal B. Uzevši u obzir kliničko-patološke parametre nadalje su analizirani podaci za potrebe rada o kliničkom stadiju bolesti. Za stadij bolesti su uzeti TNM kriteriji definirani prema AJCC te prema UICC [101]. Također analizirani su i unošeni u tablice podatci :

- prisutnost limfovaskularne invazije
- prisutnost perineuralne invazije
- nekroze i kalcifikacije unutar dijelova karcinoma
- Ki-67 proliferacijski indeks,
- status aksilarnih limfnih čvorova, odnosno zahvaćenost limfnih čvorova
- širenje karcinoma izvan limfnog čvora,
- prisutnosti metastatskog oboljenja prilikom primarne prezentacije oboljenja
- pojavnosti recidiva i metastaza te broj mjeseci do pojavnosti recidiva i metastaza
- ukupni period praćenja oboljelih pacijentica
- broj umrlih pacijentica u navedenom periodu.

Uzorci tkiva dojke koja su standardno obojena hemalaun-eozin bojom (HE) s pripadajućim parafinskim blokom, koji su obrađeni i pripremljeni po standardom protokolu na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC Rijeka su izdvojeni iz arhive i obilježavani kako bi se od tih uzoraka mogle napraviti TMA kocke.

Uzorci tkiva su prethodno pripremani na slijedeći način: najprije su fiksirani u 10%-tnom puferiranom formaldehidu (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i kao takvi transportirani s raznih radilišta u kojima se obavljaju biopsije ili definitivne operacije primarnog karcinoma dojke. Poslani su potom na Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Rijeka. Formaldehid je glavno sredstvo koje služi kao standardni reagens za fiksaciju tumorskog tkiva da se očuva morfologija i stabilizira arhitektura koja se mora analizirati. Tim mehanizmom je moguće i dugoročno očuvati uzorke tkiva. Nakon prvotnih analiza tumora, tkiva se mogu se koristiti i kasnije za buduća istraživanja što je primjer u ovom radu. Formaldehid može svojim djelovanjem na stabilizaciju strukture narušiti integritet DNA, što može ponekad otežati molekularne analize tumora ali i dalje ostaje tzv. zlatni standard u rutinskoj primjeni i pohrani tumorskog tkiva za dugoročne analize. Za pohranu tkiva vrlo je važan postupak uklapanja tumorskog tkiva u parafin, odnosno izrada tzv. parafinskih kocki. Nakon fiksacije u formaldehidu, tkivo se pažljivo priprema za buduću pohranu metodama dehidracije i pročišćavanja te uklapa u parafinski blok. Parafinski blokovi su vrlo su pogodni za narezivanja na tanke slojeve, obično od 4-5 μ m debljine. Ovakva priprema tkiva, omogućuje pohranu i dugoročno čuvanje morfoloških i molekularnih osobitosti tkiva. U svakom trenutku su dostupna za dodatne daljnje analize i provjere. Nakon uklapanja u parafin tkiva su bojana HE bojom koja spada u osnovnu metodu za pripremu i procjenu tkiva u svakodnevnom radu patologa. Ono različito boji dijelove stanice, tako se jezgrića tumorskih stanica oboji plavo do ljubičasto, a citoplazma se oboji više u ružičasto. Time se patologu omogućuje da lakše ocjeni vrstu tumorskog tkiva [102]. Određene molekule, kod određenih tumora i tkiva, ipak neće moći biti dugoročno očuvane ovom metodom pohrane što može utjecati na rezultate imunohistokemijskih i molekularnih analize [103,104].

3.2. Izolacija tumorske DNA i analiza statusa *PIK3CA* gena

Nakon što su izabrani odgovarajući uzorci tkiva, uslijedila je izolacija tumorske DNA te analiza *PIK3CA* gena i određivanje mutacijskog statusa tkiva tumora. Parafinske kocke su najprije narezane na tanke rezove. Tijekom narezivanja uzorka strogo se vodilo računa da je nož mikrotoma dobro očišćen kako bi se izbjegla bilo kakva križna kontaminacija između pojedinih uzoraka tkiva. Pomoću mikrotoma, tkiva uklopljena u parafin se režu na točno određenu debljinu za potrebe izolacije tumorske DNA (4-10 rezova koji su debljine 5-6 μ m) te fiksiraju na predmetno staklo.

Potom se nebojani rezovi prosuše. Na odgovarajućim staklima obojenim sa HE područje s dovoljnom količinom tumorskog tkiva se označi flomasterom. Zatim se odabrano područje tkiva prenese na nebojane preparate za makrodisekciju i izolaciju DNK. Dijelovi odabranog tumorskog tkiva ostružu se s predmetnih stakala i stave u epruvetu od 2 mL. Ostrugani fragmenti tkiva se potom deparafiniziraju dodavanjem 1 mL ksilena i zagrijavaju na 55°C tijekom 30 minuta. Zatim slijedi centrifugiranje i naknadno uklanjanje supernatanta. Nakon deparafinizacije s tri ispiranja pomoću ksilena, dodaje se 1 mL 100%-tnog etanola da se ukloni zaostali ksilen. Tkiva se suše na 37°C tijekom 30 minuta, a postupak DNA izolacije se potom učini pomoću NucleoSpin Tissue kita (Macharey-Nagel, Duren, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Prinos i koncentracija izolirane DNA određeni su pomoću Qubit 3.0 (ThermoFisher, Waltham, MA, SAD) uređaja, a kako bi se procijenila kvaliteta izolirane DNK, učinjen ja PCR za kontrolni β -globinski gen (Takara Biomedicals, Japan).

Nakon izolacije, provjere kvalitete i određivanja koncentracije DNA, pomoću Cobas *PIK3CA* Mutation test kita (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, SAD), a na uređaju Cobas z480 analyzer (Roche, Diagnostics, Indianapolis, IN, SAD) se učini PCR analiza mutacijskog statusa *PIK3CA* gena prema uputi proizvođača. Radi se o alel-specifičnom PCR testu u realnom vremenu, (engl. *real-time PCR*) za kvalitativnu detekciju i identifikaciju mutacijskog statusa u određenim eksonima *PIK3CA* gena. Navedenom metodom u stvarnom vremenu mogu se otkriti mutacije u 5 eksona *PIK3CA* gena.

Ovim testom detektiraju se sljedeće mutacije *PIK3CA* gena:

- ekson 1: R88Q
- ekson 4: N345K
- ekson 7: C420R
- ekson 9: E542K, E545X (E545A, E545D, E545G, E545K), Q546X (Q546E, Q546K, Q546L, Q546R)
- ekson 20: M1043I, H1047X (H1047L, H1047R, H1047Y), G1049R.

Kod određenih uzoraka zbog loše kvalitete DNA, status *PIK3CA* gena nije se mogao analizirati. Takvih uzoraka u ovom istraživanju je bilo 11 i ti uzorci su označeni kao nevaljani (engl. *invalid*). Oni uzorci tumorskog tkiva koji nisu imali mutaciju su označeni s wt (engl. *wild type*).

COBAS *PIK3CA* mutacijski test je *in vivo*, (u neživom) IVD test (engl. *in vitro diagnostics*) validiran i danas je u kliničkoj upotrebi za određivanje *PIK3CA* mutacijskog statusa kod karcinoma dojke. Njegova visoka osjetljivost i podudarnost koja je oko 96% sa novijim metodama genske analize poput NGS, čini ga veoma pouzdanim i sigurnim testom u genskoj analizi karcinoma dojke.

3.3. Priprema tkivnih mikročipova (TMA)

Tehnikom izrade tkivnih mikročipova (TMA), iz prethodno pripremljenog tumorskog tkiva koje je uklopljeno u parafinske blokove, omogućava se istovremena analiza stotine uzoraka tumora [105,106]. Prvi puta ova metoda testiranja je opisana u radu autora *Kononen* i sur., 1988g. TMA je predložena tada kao jedinstvena i vrlo ekonomična metoda kojom se može analizirati veliki broj uzoraka tumorskog tkiva na jednom preparatu istovremeno [107].

Napredovanjem tehnika i usavršavanjem izrade, TMA dolaze u vrlo široku primjenu i bivaju prihvaćeni diljem svijeta. Iako je metoda nedvojbeno veliki napredak u brznoj interpretaciji velikog broja tumora, vremenom su uočeni i neki manji nedostaci. Ovdje su korišteni REMARK kriteriji (engl. *Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies*) za izradu tkivnih mikročipova [108,109]. Usporedba TMA tehnike sa standardnom analizom tkiva prikazana je u Tablici 5.

Nakon izrade preparata i narezivanja parafinskih kocki, flomasterom se označio najreprezentativniji dio tumorskog tkiva na hemalaun-eozin obojenim stakalcima (područja bez nekroze, upalnih stanica i krvarenja). Označeno mjesto se prenese, odnosno precrta na parafinske kocke. To je vrlo osjetljiv korak u izradi i o njemu može ovisiti ishod cijele analize. Nužne su česte provjere i validacije navedenog postupka prema smjernicama iz literature i stručnih društava što je i učinjeno prilikom istraživanja [110].

Pomoću aparata MTA Booster OI (Alphelys, Plasil, Francuska) i prema preporuci proizvođača, sa označenog mjesta na parafinskom bloku donora, uzeta su po 3-4 cilindra (engl. *core*) tkiva za svaki uzorak karcinoma dojke pomoću posebne igle čiji je promjer bio 1 mm. Uzorci su potom preneseni na nove parafinske blokove, tzv. blokove primatelje. Cilindri su zatim umetani po točno zadanom redosljedu u razmacima od 0.5mm, u smjeru x i y koordinatnih osi.

Kao orijentacija i početna točka za izradu TMA je upotrijebljeno tkivo jetre što je bilo označeno kao startna pozicija i brza orijentacijska točka za pregled pod mikroskopom. Novi TMA parafinski blok primatelj se potom ostavio preko noći u termostatu na 45°C da bi se cilindri sa bloka davatelja povezali i uklopili u blok primatelj. Nakon toga su se narezali za daljnje imunohistokemijske analize (Slika 10A i 10B).

Tablica 5. Usporedba TMA i standardne pripreme tkiva za analizu

Obilježje	Standardna analiza tkiva	Tkivni mikročipovi (TMA)
Broj uzoraka	Jedno tkivo po uzorku	Stotinjak uzoraka tumora
Uporaba reagensa	Visoka	Značajno manja
Vrijeme analize	Duže vrijeme	Puno brži rezultat
Eksperimentalna varijabilnost	Visoka	Niska (ako su svi uzorci tretirani identično)
Cijena	Vrlo skup postupak	Vrlo isplativ

Skraćenice: TMA- (engl. *Tissue micro array*), tkivni mikročip. Izvor: autor prema REMARK kriterijima izrade tkivnih mikročipova (TMA) u karcinomu dojke

Dobro pripremljeni i konstruirani na ovaj način TMA su ključni za buduće imunohistokemijske analize. Ponekad arhivski pospremljeno tumorsko tkivo može biti problematično u smislu njegove količine i pronalaska mjesta u parafinskim kockama koja su adekvatna za izradu tkivnih mikročipova.

Unutar iste ustanove i između laboratorija su moguće različite varijacije u pripremi i pohrani tumorskog tkiva. To može dovesti do određenih tehničkih nedostataka što može prouzročiti poteškoće u upotrebi standardnih TMA [111,112].



A

B

Slika 10. A) Uređaj za izradu mikročipova (MTA Booster OI, Alphelys, Plasir Francuska), Zavod za patologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci; **B)** Tkivni mikročipovi (TMA), tj. nove parafinske kocke u koje su preneseni uzorci odabranog tumorskog tkiva (autorska slika)

Zbog heterogenosti, uzorci tumorskog tkiva se uzimaju iz više područja što je u ovom istraživanju i primijenjeno. Broj uzoraka (cilindara tkiva) prema autoru Bharghava i sur. , gdje je uzeto između 2 i 4 cilindra ima visku razinu podudarnosti (99%) između tkivnih mikročipova i cijelih presjeka tkiva, odnosno punog reza. Prema navedenom radu 99 od 101 analiziranih slučajeva je bilo podudarno između cilindra tkiva i punog reza i slaganju između rezultata FISH (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*) analize dobivenih iz cijelih presjeka i TMA. Volumen tkiva prilikom analize je pokazao podudaran rezultat kada su uzeti cilindri tkiva i puni rez tumorskog tkiva, što govori u prilog da je tehnika izrade mikročipova i dobiveni rezultati očitavanja vrlo efikasna, odnosno da je volumen tkiva dovoljan za izradu analize [113]. Za potrebe ovog

istraživanja korištena su 3-4 uzorka tkiva (cilindra) po jednom tumorskom tkivu odnosno pacijentice, te su tako i označena prilikom izrade TMA i očitavanja rezultata.

3.4. Imunohistokemijske analize

Nakon pripreme TMA slijedilo je njihovo narezivanje na rezove debljine 3-4 μ m i priprema stakalaca za imunohistokemijske analize. Tijekom narezivanja i pripreme stakalca, određeni cilindri tkiva mogu biti lošije kvalitete, fragmentirani i s nedovoljnom količinom tumorskog tkiva što može dovesti da broj cilindara varira od uzorka do uzorka. Tako da se na pojedinom stakalcu određeni tumori mogli imati cilindre bez tumorskog tkiva.

Za potrebe imunohistokemijske analize korištena su antitijela navedena u tablici 6.

Tablica 6. Karakteristike korištenih protutijela, proizvođači, način pripreme i postupak otkrivanja epitopa

Protutijelo, klon, porijeklo, izotip	Proizvođač	Razrjeđenje Protutijela	Pre-tretman i otkrivanje epitopa
PD-L1, SP142, zečje monoklonalno (IgG)	Ventana, Tucson, SAD	Originalno razrjeđenje ^a	BenchMark Ultra (Ventana, SAD), otkrivanje epitopa pomoću topline u CC1 puferu ^b
CD4, SP35, zečje monoklonalno (IgG)	Cell Marque, Rocklin, SAD	1:75	PT Link (Agilent, SAD), Tris/EDTA, pH 9
CD8, C8/144B, mišje monoklonalno (IgG1)	DakoAgilent, Santa Clara, SAD	Originalno razrjeđenje ^a	PT Link (Agilent, SAD), Tris/EDTA, pH 9
CD68, PG-M1, mišje monoklonalno (IgG)	DakoAgilent, Santa Clara, SAD	1:100	PT Link (Agilent, SAD), Tris/EDTA, pH 9
CD163, MRQ-26, mišje monoklonalno (IgG1)	Cell Marque, Rocklin, SAD	1:25	PT Link (Agilent, SAD), Tris/EDTA, pH 9

^apripremljeno za upotrebu od strane proizvođača (engl. *ready to use*)

^bCC1 je pufer na bazi Tris-a, pH 8.0-8.5 (engl. *ready to use*)

Monoklono zečje (IgG) anti-PD-L1 antitijelo, klon SP142 razvijeno od Ventana Medical Systems proizvođača (Arizona, SAD) je specifično za ocjenu PD-L1 izražaja kod pacijenata koji boluju od karcinoma pluća (malih stanica), mokraćnog mjehura i TNBC karcinoma dojke. Povećani PD-L1 izražaj u tumorskom tkivu može služiti za selekciju pacijenata koji bi imali učinkovitosti u liječenju imunoterapijom, osobito lijekom atezolizumabom i drugim imunomodulatorima. [114].

SP142 klon antitijela veže se većinom za citoplazmatske epitope proteina PD-L1 za razliku od drugih antitijela koja mogu vezati ekstracelularne domene. Bojanje s SP142 klonom može pokazivati nešto niži PD-L1 izražaj za razliku od drugih antitijela koja su danas u upotrebi, kao primjerice antitijelo SP263. Pa npr. kada se kod karcinoma mokraćnog mjehura koristilo SP263 PD-L1 antitijelo umjesto SP 142 nađen je veći PD-L1 izražaj s SP263 klonom [115-117].

Postupak analize PD-L1 izražaja na tumorskom tkivu je slijedio prema uputama proizvođača.

Nakon narezivanja izrađenih TMA na debljinu od 3-4 μ m i pripreme stakalaca, slijedio je imunohistokemijski postupak po preporuci proizvođača uz upotrebu slijedećih platformi i kitova za analizu:

- BenchMark ULTRA platforma (Ventana, SAD)
- zečje monoklono, IgG antitijelom za negativnu kontrolu
- OptiView DAB IHC Detection Kit
- OptiView Amplification Kit
- pomoćni reagensi za detekciju

Koristeći ovaj imunohistokemijski test za detekciju PD-L1 na tumorskim i imunološkim stanicama postupak analize je bio slijedeći: nakon što se narezalo tkivo na mikrotomu i fiksiralo, stakalca su stavljena u instrument BenchMark ULTRA (Ventana, SAD) za imunohistokemijsku analizu. Automatski je uključena opcija deparafinizacije čiji je cilj ukloniti višak parafina te omogućiti demaskiranje epitopa. Nakon toga slijedila je priprema stanica uz reagens CC1 u trajanju od 48 minuta uz blokiranje endogene peroksidaze kako bi se spriječila moguća nespecifična reakcija vezivanja. Slijedio je postupak inkubacije sa primarnim antitijelom VENTANA PD-L1 i negativnom kontrolom na 36°C u trajanju od 16 minuta te postupak detekcije vezivanja antitijela koristeći OptiView sustav. Korišten je HQ Linker 8 minuta i Multilimer 8 minuta. Uređaj je potom automatski učinio amplifikaciju signala nakon čega je slijedilo završno kontrastno bojanje

(hematoksilin II) 4 minute i postkontrastno bojanje uz pomoć Bluing Reagent-a u trajanju 4 minute. Ovo je uobičajena histološka metoda za lakšu orijentaciju i razlikovanje obojenih stanica pod svjetlosnim mikroskopom. Učinjene su kontrole kvalitete procedure uz pomoć tkiva tonzile sa specifičnim zečjim monoklonalnim antitijelom prema preporuci proizvođača. Potom je slijedila analiza imunohistokemijskih stakala, tj. očitavanje PD-L1 izražaja koja je provedena od strane doktoranda i mentora, a odstupanja u rezultatima su riješena diskusijom i zajedničkim slaganjem. Ocjenjeni su postoci ekspresije prema radu Gua H i sur., tj. prema smjernicama na sljedeći način [118]:

1. Postotak PD-L1 izražaja u imunološkim stanicama (engl. *immune cells-IC*) koje infiltriraju tumor je ocjenjeno kao udio tumorskog tkiva koje je prožeto PD-L1 pozitivnim imunološkim stanicama (membransko ili citoplazmatsko bojanje tumorskih stanica).
2. PD-L1 izražaj u tumorskim stanicama (engl. *tumor cells-TC*) je procijenjen kao postotak tumorskih stanica koje su imale pozitivno parcijalno ili kompletno membransko bojanje PD-L1 bez obzira na intenzitet bojanja.
3. Kombinirana procjena (engl. *immune cells+tumor cells-TCIC*) PD-L1 izražaja na tumorskim i imunološkim stanicama se gledala kao udio pozitivnih tumorskih (membransko bojanje) i imunoloških stanica (membransko i citoplazmatsko bojanje) na ukupni broj tumorskih stanica.

Svaki rezultat koji je iznosio 1% ili više ($\geq 1\%$) je smatran pozitivnim, a postotak manji od 1% ($< 1\%$) smatran je negativnim rezultatom. Cilindri tkiva unutar TMA koji su imali manje od 100 morfološki održanih tumorskih stanica se nisu evaluirali.

Po očitavanju i unošenju PD-L1 izražaja na tumorskim i imunološkim stanicama, te unošenju rezultata u proračunske tablice, uslijedilo je očitavanje specifičnih imunohistokemijskih bojanja za tumor-infiltrirajuće limfocite CD4 i CD8 te tkivne makrofage CD68 i CD163 sa specifičnim antitijelima.

Mišje monoklonalno (IgG) anti-CD4 antitijelo (klon SP35, Cell Marque, Rocklin, CA, SAD) je korišteno za detekciju CD4 antigena, glikoproteina koji se nalazi na limfocitima, odnosno na T-pomagačkim limfocitima. Analiza je učinjena na TMA pripremljenim uzorcima tumorskog tkiva. Nakon postupka deparafinizacije i dehidracije, antigeni su bili izloženi u citratom puferu, te je

slijedila inkubacija sa antitijelom klona SP53 u specifičnom razrijeđenu od 1:75. Inkubacija je provedena na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta, a potom je slijedila detekcija i vizualizacija obojenih područja na imunološkim stanicama. U testiranje su također bile uključene i pozitivne i negativne kontrole prema preporuci proizvođača.

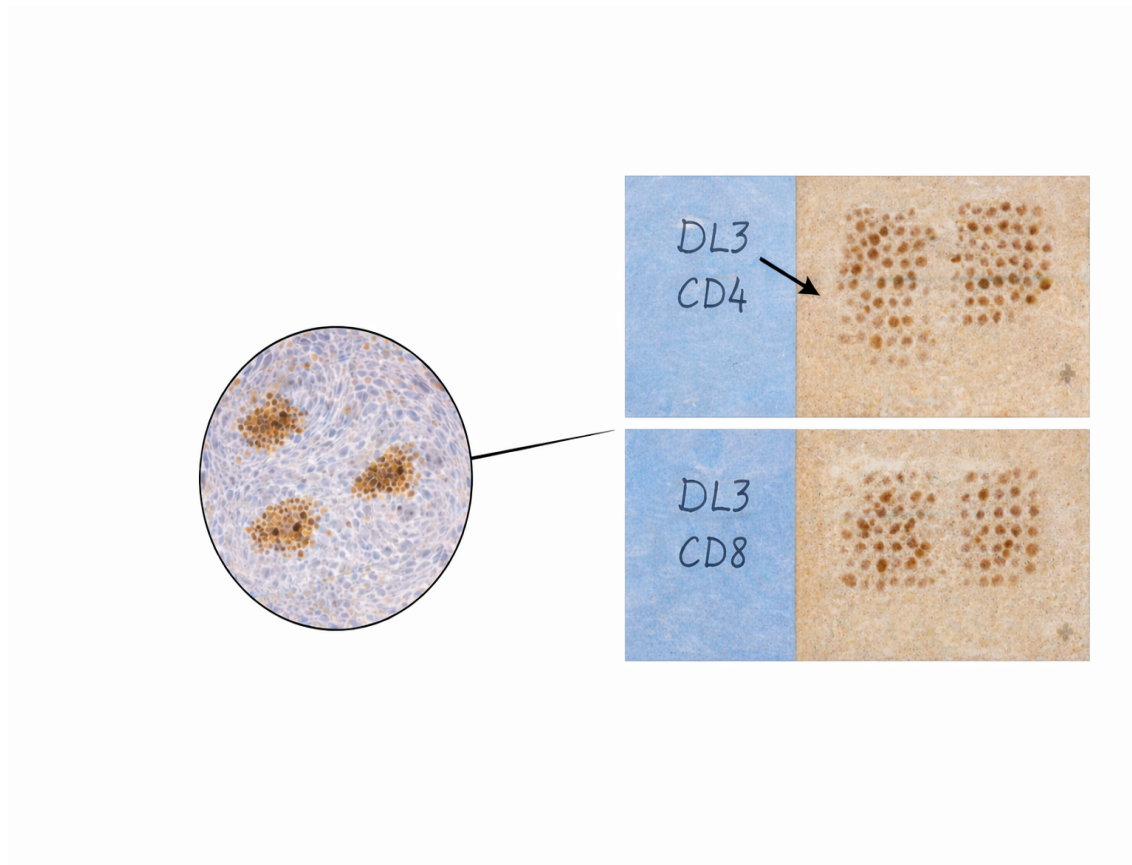
Za detekciju CD8 antigena je korišteno mišje monoklonalno (IgG1) anti-CD8 (klon C8/144B, DakoAgilent, Santa Clara, CA, SAD). CD8 je glikoprotein koji je smješten na T- limfocitima, tj. T-citotoksičnim limfocitima čija ekspresija može varirati, a ovisi o stupnju aktivacije same stanice. Također i ovdje je korišteno tumorsko tkivo koje je narezano nakon izdade TMA. Prvi korak je bio deparafinizacija tkiva i izlaganju epitopa pomoću specifičnih pufera: 10 mmol/L Tris pufer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Prema preporuci proizvođača, slijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi od 60 min. i izlaganje monoklonalnom mišjem antitijelu CD8, u originalnom razrijeđenu (tzv. „*ready to use*“ protutijelo) u automatskom analizatoru. Za negativnu kontrolu je korišteno mišje Dako IgG1 antitijelo koda X093, razrijeđen kao kod prethodnog testa. Za vizualizaciju je korišten Dako EnVision+/HRP kit, koda K4005 prema preporuci proizvođača.

Mišje monoklonalno (IgG) anti-CD68 (klon PG-M1, Dako Agilent, Santa Clara, CA, SAD) protutijelo je korišteno za detekciju CD68 antigena na imunološkim stanicama. CD68 je lizosomalni glikoprotein, koji se nalazi na površini imunoloških stanica: monocita/makrofaga, uključujući i dendritičke stanice i tkivne makrofage. Analiza je i ovdje učinjena kao u prethodnim testovima prema preporuci proizvođača, uz inkubaciju na sobnoj temperaturi od 60 min i razrijeđenje protutijela od 1:100, uz pozitivne i negativne kontrole. Reagens je bio u formi tekućine koja je specijalno pripremljena sa 0.05 mmol/L Tris-HCl puferom, pH:7.2 uz 15 mmol/L Na₃N. CD163 je transmembranski receptor koji se strogo specifičan za monocitno-makrofagnu liniju imunoloških stanica. Glavna uloga ovog receptora je u imunomodulaciji te u antiinflatornom odgovoru [119] Kao i kod CD68, CD163 se koristi u dijagnostičke svrhe kao visoko specifično obilježje monocitno-makrofagne linije imunoloških stanica koje invadiraju u tumorsko tkivo. Ipak CD163 pokazuju veću specifičnost nego CD68 za monocitno-makrofagnu liniju, osobito kod određenih vrsta tumora: dermatofibroma, histiocitoma, dermatofibrosarkoma i fibroznog histiocitoma [120]. Za analizu je korišteno mišje monoklonalno (IgG1) anti CD163 (klon MRQ-26, Cell Marque Rocklin, SAD) protutijelo. Postupak je i ovdje isti kao i za CD68 imunohistokemijsku analizu. Selekcionirani se preparati najprije deparafiniziraju i rehidriraju, potom se uz pufer oslobađaju antigeni za analizu te slijedi inkubaciju sa CD168 antitijelima.

Koristi se klon MRQ-26, u razrjeđenju 1:25 po preporuci proizvođača. Postupak inkubacije je trajao 60 minuta i na sobnoj temperaturi. Slijedila je detekcija uz pomoć specifičnog reagensa, supstrata koji ima kromogena svojstva te provjera dobivenog bojenja.

Pod svjetlosnim mikroskopom, nakon što su završena bojanja za imunološke stanice :CD4, CD8, CD68 i CD163 je slijedilo brojanje stanica. Brojanje imunoloških stanica je izvršeno pod povećanjem 200x (x20 objektiv) na tri odvojena mjesta u područjima sa najvećom gustoćom obojenih imunoloških stanica, a prostoru 0.4x0.4 mm (Slika 11).

Takva mjesta koja su pokazivala najgušća područja infiltracije imunoloških stanica u tumoru su bila označena za brojanje pozitivnih stanica [121].



Slika 11. Primjer imunohistokemijskog bojenja za CD4 i CD8. Pod svjetlosnim mikroskopom su izabrana područja gdje su imunološke stanice najgušće raspoređene i pod povećanjem 200X (x20 objektiv) su brojane imunološke stanice na tri odvojena mjesta (autorski crtež uz pomoć Adobe Photoshop programa)

Nakon što su izbrojane sve pozitivne stanice u tim odvojenim područjima unutar samog tumorskog tkiva, izračuna se srednja vrijednost. Za statističku analizu broja CD4, CD8, CD68 i CD163 pozitivnih stanica, očitavanja su podijeljena u manju i veću grupu uzimajući u obzir prag pozitivnosti izračunat ROC (engl. *Receiver operating characteristic*) metodom. Tako su dobivene dvije kategorije „niska“ i „visoka“ razina infiltracije za pojedine imunološke stanice, ovisno o graničnoj vrijednosti za pojedina očitavanja:

- CD4 granična vrijednost: 6 (CD4 niska ≤ 6 i CD4 visoka > 6).
- CD8 granična vrijednost: 8 (CD8 niska ≤ 8 i CD8 visoka > 8)
- CD68 granična vrijednost: 23 (CD68 niska ≤ 23 i CD68 visoka > 23)
- CD163 granična vrijednost: 12 (CD163 niska ≤ 12 i CD163 visoka > 12)

3.5. Ocjena tumorskog mikrookoliša

Tumorski mikrookoliš je dinamičan prostor koji je veoma varijabilan i promjenjiv u ovisnosti o fazama bolesti i utjecaja liječenja. Kada se analizira važno je odrediti područje koje infiltriraju imunološke stanice, odnosno određuje se količina tumor-infiltrirajućih limfocita, TIL-a. To se izražava kao numerička kontinuirana varijabla, a ocjenjuje se područje koje je infiltrirano imunološkim stanicama unutar samog tumora. Ocjenjuju se i procjenjuju intratumoralni limfociti koji su u direktnoj povezanosti sa tumorskim stanicama, a nalaze se u nakupinama unutar tumorskog tkiva. Za potrebe ovog istraživanja i ocjenu TIL-a korištene su preporuke radne skupine; *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group*, odnosno evaluacija TIL-a prema radnim preporukama za karcinom dojke 2014.

U području strome tumora koja se analizira, kvantificira se postotak stromalnog područja kojeg zauzimaju mononuklearne upalne stanice (limfociti i plazma stanice), te se označuje kao vrijednost u postocima od 0-100%.

Za procjenu infiltracija tumorske strome korištene su različite granične vrijednosti, prema literaturi i radnoj grupi za evaluaciju TIL-a [122].

- niski TIL (0-10%), srednje gustoće TIL (11-50%) i visoki TIL ($> 50\%$)
- niski TIL (0-10%) i visoki TIL (11-100%)
- niski TIL (0-30%) i visoki TIL (31-100%)

3.6. Etički aspekti istraživanja

Istraživanje je provedeno u skladu sa svim suvremenim bioetičkim standardima. Pritom su poštivana četiri temeljna bioetička principa (osobni integritet-autonomnost, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost) kao i oni iz njih izvedeni (npr. privatnost, povjerenje i sl.), a u skladu sa Nurberškim kodeksom, najnovijom revizijom Helsinške deklaracije te sa ostalim mjerodavnim instrumentima. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja, Medicinskog fakulteta u Rijeci; klasa: 003-8/21-01/75, URBROJ: 2170-24-04-3-21-8 od 28. prosinca 2021 i Etičkog povjerenstva KBC Rijeka, klasa: 003-05/21-1/105, URBROJ:2170-29-02/1-21-2 od 23. srpnja 2021.

3.7. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka je provedena koristeći MedCalc Windows, verzija 23.3.4 (MedCalc Statistical Software, Ostend Belgija). Razlika u frekvencijama između nominalnih varijabli je izračunata koristeći Fischer's egzaktni test i chi-square test. Spearman's analiza korelacije, je korištena za određivanje povezanosti između PD-L1 i imunoloških stanica. Test logističke regresije je korišten za analizu predviđanja nastanka recidiva tumora.

Kaplan-Meier metoda je korištena za izračunavanje kumulativne vjerojatnosti preživljenja od tumorske bolesti. Lonk-rank testom je ocijenjena i uspoređena nejednakost u stopi preživljenja. Multivarijatna analiza je korištena uz Cox multiple-hazard model i p-vrijednost od 0.05 u univarijatnoj analizi preživljenja koja je određena i usvojena kao limit uključenja u multivarijantnom modelu testiranja. Svi testovi su bili dvostrani i statistički značajan rezultat je označen ukoliko je $p < 0.05$.

ROC metoda je korištena za određivanje optimalne statistički značajne granične vrijednosti kako bi se procijenio statistički značajan broj stanica CD4, CD8, CD68 i CD163 kao biobiljeg za određivanje prognoze bolesti. ROC krivulja i Youden indeks su računati za optimizaciju osjetljivosti i specifičnosti kao individualno obilježje za parametre DSS i DFS u univarijatnom modelu. Područje unutar ROC krivulje AUC (engl. *area under the curve*) je izračunato za ocjenu prediktivnog modela kvalitete, sa 95%-tnim intervalom pouzdanosti CI (engl. *confidence interval*).

ROC analizom je pokazana statistički značajna granična vrijednost za CD4 stanice (niska razina infiltracije CD4 stanicama, nasuprot visoka razina infiltracije CD4 stanicama), granična vrijednost 6 ($p=0.001$, $AUC=0.711$) i CD8 stanice (niska razina infiltracije CD8 stanicama, nasuprot visoka razina infiltracije CD8 stanicama), granična vrijednost 8 ($p=0.014$, $AUC=0.646$).

Za razliku od CD4 i CD8, ROC metoda izračuna granične vrijednosti za CD68 stanice je bila 23 ($p=0.463$, $AUC=0.547$) te za CD163 stanice 12 ($p=0.842$, $AUC=0.513$), što nije bilo na razini statističke značajnosti.

Preživljenje specifično za bolest (engl. *Disease specific survival-DSS*) je definirano kao broj mjeseci koji je protekao od dijagnoze do smrtnog ishoda pacijentice oboljele od karcinoma dojke. Uzrok smrti u ovom slučaju je isključivo bio karcinom dojke.

Preživljenje bez bolesti (engl. *Disease free survival-DFS*) je definirano kao vremenski interval od trenutka postavljanja dijagnoze do evidentirane (slikovnom dijagnostikom i biopsijom karcinoma) prve pojavnosti recidiva ili metastaze bolesti u mjesecima. Ukoliko nije zabilježena pojavnost recidiva ili metastaze, broj mjeseci za DFS je izračunat u odnosu na kliničke podatke o posljednjoj kontroli pacijentice.

4. REZULTATI

4.1. Kliničko-patološki parametri karcinoma dojke

Retrospektivnom analizom je obuhvaćeno ukupno 123 uzoraka pacijentica oboljelih od karcinoma dojke, podtipa HR+/HER2-. S obzirom na dob koja je podijeljena na one mlađe od 50 godina (premenopauzalne) i one starije od 50 godina (postmenopauzalne), 27 pacijentica (22%) je bilo mlađe ili je imalo 50 godina, a njih 96 (78.0%) je bilo starije od 50 godina u trenutku dijagnoze karcinoma dojke (Tablica 7).

Od ukupno 123 uzorka karcinoma dojke, u 43% (53/123) pronađena je *PIK3CA* mutacija, sa većinom mutacija u eksonu 20 (26.8%) i eksonu 9 (16.3%). Promatrajući razinu PD-L1 izražaja na imunološkim stanicama (IC) nađeno je 9.8% (12/123) pozitivnih slučajeva dok na tumorskim stanicama (TC) ni u jednom uzorku nije bilo PD-L1 izražaja, a gledajući PD-L1 kao kombinirani izražaj (TCIC) bilo je 5.7% (7/123) slučajeva. Pretražujući literaturu nađeno je da je za korišteno PD-L1 protutijelo (SP142 Ventana) jedino klinički relevantno bojanje je ono na imunim stanicama stoga su sve daljnje analize rađene s PD-L1 izražajem utvrđenim na IC. U grupi uzoraka karcinoma koji su imali *PIK3CA* mutaciju gena, pronađeno je 19% (8/42 uzoraka) pozitivnih na PD-L1, dok tumori koji nisu imali *PIK3CA* mutaciju PD-L1 izražaj je nađen u samo 6.7% slučajeva (3/45). Prema položaju mutacije u eksonima, tumori sa *PIK3CA* mutacijama u eksonu 20 su u većoj mjeri pokazivali izražaj PD-L1 nego tumori s mutacijom u eksona 9. Karcinomi s mutacijom u eksonu 20 su bili u 25.9% (7/27) slučajeva pozitivni na PD-L1 za razliku od 6.7% (1/15) u uzorcima koji su imali mutaciju *PIK3CA* gena u eksonu 9.

Histološki gradus karcinoma u najvećem postotku bio je gradus II 49.4% (61/123). Multifokalna prezentacija je bila prisutna u samo 11.4% pacijentica (14/123). Karcinomi pokazuju određeni stupanj egzulceracija u samo 5.7% slučajeva (7/123). Podjednako su zahvaćanjem karcinoma bile zastupljene lijeva i desna dojka (63% desna, a 54% lijeva doka), dok su obje dojke bile zahvaćene tumorom u samo 5% slučajeva. Informatorni karcinom dojke je veoma rijedak, i u ovoj studiji je bio prisutan u samo 1.6% pacijentica (2/123). Predominantni histološki tip tumora je bio NST (ne specijalni tip) u 73.2% (90/123), dok je na drugom mjestu po učestalosti bio specijalni (lobularni) tip sa 16.3% slučajeva (20/123). Prema histološkom podtipu, na luminal A otpada 52.8% (65/123), dok na luminal B 46.3% (57/123)

Kod postavljanja dijagnoze karcinoma dojke, pacijentice su najčešće imale stadij bolesti 2 i to u 31.7% (39/123) slučajeva. Limfovaskularna invazija tumora je bila prisutna u 66.7% (82/123), dok je perineuralna nađena u 45.5% (55/123). Znaci nekroze su bili zabilježeni unutar tumorskog tkiva u 26.9% slučajeva (33/123), a kalcifikacije u 31.7% (39/123). Ki-67 proliferacijski indeks je u 58.5% (72/123) je iznosio manje od 20%. Pozitivitet limfnih čvorova, odnosno širenje tumora u limfne čvorove je bio 43.9% (54/123), a ektranodalno širenje je nađeno u 59.3% (32/123) slučaja. Samo 17.9 % (22/123) pacijentica je prilikom inicijalne dijagnoze tumora imalo prisutne znakove metastatske bolesti.

Naknadna pojavnost metastatske bolesti je zabilježena u 37.4% (46/123) i to su bile udaljene metastaze u druge organske sustave, a 6.5% su bile lokalne manifestacije osnovne bolesti (8/123). Srednji period do pojavnosti recidiva ili metastaze je iznosio 41.4 mjeseci, sa rasponom od (3-180). Ukupni period praćenja je bio 73 mjeseca (12-240). Do zaključenja studije 30.9% pacijentica je umrlo (38/123) (Tablica 7).

Tablica 7. Kliničko-patološka obilježja karcinoma dojke

Kliničko-patološka obilježja	Broj pacijentica N (%)
Dob (godine)	
≤50	27 (22.0)
>50	96 (78.0)
Histološki gradus	
1	50 (40.7)
2	61 (49.4)
3	4 (3.3)
N/A	8 (6.4)
Veličina tumora (cm)	
<2	39 (31.7)
≥2	79 (64.2)
N/A	5 (4.1)
Multifokalnost	
Odsutna	105 (85.4)
Prisutna	14 (11.4)
N/A	4 (3.2)
Dojka (strana)	
Desna	63 (51.6)
Lijeva	54 (44.3)
Obostrano	5 (4.1)
Inflamatorni tumor	
Odsutan	116 (94.3)
Prisutan	2 (1.6)
N/A	5 (4.1)
Egzulcerirani tumor	

Odsutan	112 (91.1)
Prisutan	7 (5.7)
N/A	4 (3.2)
Histološki tip	
NST	90 (73.2)
Specijalni tip (lobularni)	20 (16.3)
Ostali spec.tip (papilarni, mucinozni, kribriof.)	8 (6.5)
Miješani NST + mucinozni	4 (3.3)
Miješani NST + lobularni	1 (0.7)
	0
Histološki podtip	
Luminal A	65 (52.8)
Luminal B	57 (46.3)
Multifokalnost tumora	1 (0.9)
Klinički stadij	
1	32 (26.0)
2	39 (31.7)
3	28 (22.8)
4	21 (17.1)
N/A	3 (2.4)
Perineuralna invazija	
Odsutna	59 (48.8)
Prisutna	55 (45.5)
N/A	7 (5.7)
Limfovaskularna invazija	
Odsutna	36 (29.3)
Prisutna	82 (66.7)
N/A	5 (4.0)
Nekroza tumora	
Odsutna	88 (71.5)
Prisutna	33 (26.9)
N/A	2 (1.6)
Kalcifikacije	
Odsutne	82 (66.7)
Prisutne	39 (31.7)
N/A	2 (1.6)
Ki-67 indeks	
<20%	72 (58.5)
≥20 %	51 (41.5)
Status limfnih čvorova	
Negativni	51 (41.5)
Pozitivni	54 (43.9)
N/A	18 (14.6)
Ekstranodalno širenje tumora	
Odsutno	21 (38.9)
Prisutno	32 (59.3)
N/A	1 (1.8)
Metastaza kod postavljanja dijagnoze	
Odsutna	99 (80.5)
Prisutna	22 (17.9)
N/A	2 (1.6)
Metastaza i recidiv tumora	
Odsutan	63 (51.2)
Prisutna, lokalni recidiv	8 (6.5)
Prisutna, udaljena metastaza	46 (37.4)

N/A	6 (4.9)
Mjeseci do pojave recidiva ili metastaza tumora Median (raspon)	41.5 (3-180)
Period praćenja (mjeseci) Median (raspon)	73 (12-240)
Broj umrlih pacijentica N (%)	38 (30.9)
PIK3CA mutacije	
Divlji tip (Wt)	59 (48.0)
Mutacija	53 (43.1)
Nevaljan (engl. invalid)	11 (8.9)
PIK3CA mutacije (mjesto mutacije)	
Divlji tip (Wt)	59 (48.0)
Ekson 9	20 (16.3)
Ekson 20	33 (26.8)
Nevaljan (engl. invalid)	11 (8.9)
PD-L1 izražaj (IC)	
<1%	85 (69.1)
≥1%	12 (9.8)
N/A	26 (21.1)
PD-L1 izražaj (TC)	
<1%	97 (78.9)
≥1%	0 (0)
N/A	26 (21.1)
PD-L1 izražaj (TCIC)	
<1%	90 (73.2)
≥1%	7 (5.7)
N/A	26 (21.1)
CD 4 median (raspon)	8.0 (0.0-232.0)
CD 8 median (raspon)	10 (0.0.-142.0)
CD 68 median (raspon)	7 (1.0-75.0)
CD 163 median (raspon)	6 (0.0-68.0)

Skraćenice: NST-ne specijalni tip, N/A -nedostupno (*not available*), divlji tip (wt)-bez *PIK3CA* mutacije, IC- imunološke stanice, TC-tumorske stanice, TCIC-tumorske stanice i imunološke stanice

4.2. Povezanost kliničko-patoloških parametara i *PIK3CA* mutacijskog statusa karcinoma dojke

Uzevši u obzir povezanost kliničko-patoloških obilježja HR+/HER2- karcinoma dojke i *PIK3CA* mutacija, nađe se povezanost samo sa multifokalnom i bilateralnom prezentacijom karcinoma. Povezanost je bila na razini statističke značajnosti $p=0.089$ za multifokalnu prezentaciju tumora i $p=0.084$ za bilateralnu prezentaciju tumora i takvi tumori su češće imali *PIK3CA* mutaciju gena. (Tablica 8). Kada su se analizirale karakteristike karcinoma ovisno o poziciji *PIK3CA* mutacije u eksonima 9 i 20, uočena je statistički značajna povezanost sa Ki-67 proliferacijskim indeksom i to u slijedećem slučaju: mutacije u eksonu 20 su bile učestalije sa Ki-67 proliferacijskim indeksom

koji je bio niži od 20% ($p=0.041$). Nađena je i viša povezanost mutacija *PIK3CA* gena u eksonima 9 i 20 kod pacijentica koje su imale niži do srednji gradus tumora ali je to bilo na razini statističkog trenda ($p=0.055$). Također na razini statističkog trenda ($p=0.097$) je bila i povezanost između mutacije *PIK3CA* gena u eksonu 20 i statusa bolesti bez znakove recidiva ili metastatske bolesti tj više je bilo pacijentica bez recidiva/proširene maligne bolesti s *PIK3CA* mutacijom u eksonu 20 (Tablica 8).

Tablica 8. Usporedba karakteristika tumora HR+/HER2- podtipa tumora dojke i mutacijskog statusa *PIK3CA* gena

Obilježja (HR+/HER2-)	<i>PIK3CA</i> W/t N(%)	Mt N(%)	p-vrijednost	<i>PIK3CA</i> Wt N(%)	Ex9 N(%)	Ex20 N(%)	p-vrijednost
Dob							
≤50	14 (23.7)	12 (22.6)	1.0 ^φ	14 (23.7)	6 (30.0)	6 (18.2)	0.608 ^φ
>50	45 (76.3)	41 (77.4)		45 (76.3)	14 (70.0)	27 (81.8)	
Klinički stadij							
I	12 (20.3)	15 (30.0)	0.390*	12 (20.3)	4 (21.1)	11 (35.5)	0.319*
II	19 (32.2)	17 (34.0)		19 (32.2)	5 (26.3)	12 (38.7)	
III	17 (28.8)	8 (16.0)		17 (28.8)	4 (21.1)	4 (12.9)	
IV	11 (18.6)	10 (20.0)		11 (18.6)	6 (31.6)	4 (12.9)	
Veličina tumora							
<2cm	18 (30.5)	17 (35.4)	0.679 ^φ	18 (30.5)	5 (29.4)	12 (38.7)	0.697 ^φ
≥2cm	41 (69.5)	31 (64.6)		41 (69.5)	12 (70.6)	19 (61.3)	
Multifokalnost							
Prisutna	48 (82.8)	47 (94.0)	0.084 ^φ	10 (17.2)	1 (5.3)	2 (6.5)	0.199 ^φ
Odsutna	10 (17.2)	3 (6.0)		48 (82.8)	18 (94.7)	29 (93.5)	
Egzulceracija							
Prisutna	54 (93.1)	47 (94.0)	1.0 ^φ	4 (6.9)	1 (5.3)	2 (6.5)	0.969 ^φ
Odsutna	4	3 (6.0)		54 (93.1)	18 (94.6)	29 (93.5)	
Inflamatorni tumor							
Prisutan	55(96.5)	50 (100)	0.497 ^φ	5 (3.5)	0 (0)	0 (0)	0.409 ^φ
Odsutan	2 (3.5)	0 (0)		55 (96.5)	19 (100)	31 (100)	
Obostrani tumor							
Prisutan	54 (91.5)	52 (100)	0.059 ^φ	5 (8.5)	0 (0)	0 (0)	0.099 ^φ
Odsutan	5 (8.5)	0 (0)		54 (91.5)	20 (100)	32 (100)	
Histološki tip							
Duktalni NST	44 (74.6)	42 (79.2)	0.569*	44 (74.6)	14 (70.0)	28 (84.8)	0.370 ^φ
Lobularni	9 (15.3)	9 (17.0)		9 (15.3)	6 (30.0)	3 (9.1)	
Ost.specijalni tip	5 (8.5)	2 (3.8)		5 (8.5)	0 (0)	2 (6.1)	
Miješani	1 (1.7)	0 (0)		1 (1.7)	0 (0)	0 (0)	
Histološki podtip							
Luminal A	27 (45.89)	31 (58.5)	0.191 ^φ	27 (45.8)	10 (50.0)	21 (63.6)	0.254 ^φ
Luminal B	32 (54.2)	22 (41.5)		32 (54.2)	10 (50.)	12 (36.4)	
Histol. gradus							
1	21 (36.8)	24 (51.1)	0.131*	21 (36.8)	5 (29.4)	19 (63.3)	0.055*

2	33 (57.9)	23 (48.9)		33 (57.9)	12 (70.6)	11 (36.7)	
3	3 (5.3)	0 (0)		3 (5.3)	0 (0)	0 (0)	
L.č.²							
Negativan	22 (43.1)	23 (53.5)	0.408 ^φ	22 (43.1)	7 (43.7)	16 (59.3)	0.373 ^φ
Pozitivan	29 (56.9)	20 (46.5)		29 (56.9)	9 (56.2)	11 (40.7)	
Širenje van lč.							
Odsutno	11 (37.9)	7 (36.8)	1.0 ^φ	11 (37.9)	3 (33.3)	4 (40.0)	0.953 ^φ
Prisutno	18 (62.1)	12 (63.2)		18 (62.1)	6 (66.7)	6 (60.0)	
Meta³ kod dg.							
Odsutna	46 (79.3)	42 (80.8)	1.0 ^φ	46 (79.3)	14 (70.0)	28 (87.5)	0.302 ^φ
Prisutna	12 (20.7)	10 (19.2)		12 (20.7)	6 (30.0)	4 (12.5)	
Meta/recidiv							
Odsutna	26 (46.4)	31 (59.6)	0.183 ^φ	26 (46.4)	9 (45.0)	22 (68.7)	0.097 ^φ
Prisutna	30 (53.6)	21 (40.4)		30 (53.6)	11 (55.0)	10 (31.2)	
KI-67							
<20%	31 (52.5)	35 (66.0)	0.179 ^φ	31 (52.5)	10 (50.0)	25 (75.8)	0.041 ^φ
≥20%	28 (47.5)	18 (34.0)		28 (47.5)	10 (50.0)	8 (24.2)	

Skracenicice: N-broj, W/t- bez *PIK3CA* mutacije, Mt-sa *PIK3CA* mutacijom, Ex9-exon 9, Ex20-exon 20, NST-nije specijalni tip, ^φ-Fischer egzaktni test, * -X²-test, 2 -limfni čvor,3-metastaza

4.3. Procjena tumor infiltrirajućih limfocita (TIL)

Stromalni tumor infiltrirajući limfociti (sTIL) su prema postotku podijeljeni u niske TIL i visoke TIL koristeći različite granične vrijednosti kako bi se bolje mogle analizirati moguće povezanosti s kliničko-patološkim i prognostičkim parametrima (Tablica 9). Kroz daljnje analize nijedna granična vrijednost nije pokazala statistički značajne rezultate pa se odustalo od daljnjih analiza u izračuna. Koristeći klinički prihvaćenu graničnu vrijednost od 30%, prema preporukama *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group*, nađe se da je najveći broj slučajeva u ovom istraživanju imao nisku infiltraciju TIL-a, 73.2% što odgovara onim što je nađeno u ranijim studijama [123-125]

Tablica 9. Procjena tumor infiltrirajućih limfocita

Imunološki mikrokoliš (TIL)		Slučajevi N (%)
sTIL (%) medijan (raspon)		15 (0-95)
sTIL		
nizak (0-10%)		45 (36.6)
srednji (11-50%)		65 (51.2)
visok (>50%)		11 (8.9)
NA		4 (3.3)

sTIL	nizak (0-10%) visok (11-100%) NA	45 (36.6) 74 (60.1) 4 (3.3)
sTIL	nizak (0-30%) visok (31-100%) NA	90 (73.2) 29 (23.5) 4 (3.3)

Skraćenice: sTIL-stromalni tumor infiltrirajući limfociti, N/A- nedostupno (non available)

4.4. Usporedba CD4, CD8, CD68 i CD163 stanica unutar mikrookoliša i PD-L1 izražaja u HR+/HER2-karcinomima dojke sa i bez *PIK3CA* mutacije gena

Usporedbom građe i sastava stanica mikrookoliša tumora tj. infiltracije tumor-infiltrirajućim limfocitima i to CD4, CD8 te makrofazima CD68 i CD163 kod tumora koji su imali *PIK3CA* mutaciju i onih koji nisu pokazivali mutaciju, statistički nema značajne razlike u distribuciji stanica. Za statističku usporedbu su korištene metode ROC i mjere središnjice i raspršenja za evaluaciju populacije imunoloških stanica te nije pronađena statistički značajna razlika u infiltraciji CD4, CD8, CD68 i CD163 obzirom na *PIK3CA* mutacijski status karcinoma dojke (Tablica 10).

Nadalje usporedbom PD-L1 izražaja kod tumora sa i bez *PIK3CA* mutacije nije se pronašla statistički značajna razlika ($p=0.110$). No statistički značajna razlika je pronađena uspoređujući PD-L1 izražaj i položaja u kojem je eksonu *PIK3CA* gena prisutna mutacija. Primijećeno je da je prisutnost mutacije u eksonu 20 *PIK3CA* gena bila povezano sa višom razinom PD-L1 izražaja ($p=0.044$). To znači da su pacijentice sa povišenom PD-L1 ekspresijom, češće imale mutaciju u eksonu 20 *PIK3CA* gena (Tablica 10).

Kada se uspoređuje sastav tumor-infiltrirajućih limfocita i makrofaga u stanicama mikrookoliša u ovisnosti o kliničko-patološkim parametrima, tj. o prisutnosti metastatske bolesti ili pojavnosti recidiva tumorskog oboljenja primijećena je statistički značajna distribucija CD163 makrofaga. Većina tumora koji su pokazivali niski stupanj infiltracije stanicama CD163 pokazivali su znakove recidiva ili metastatske bolesti, na razini statističke značajnosti ($p=0.002$) (Tablica 11). Također je statistički značajno uočeno da postoji razlika u distribuciji CD4 i PDL-1 izražaja u ovisnosti o pojavnosti recidiva tumora ili metastaze. Karcinomi koji su imali pozitivan PD-L1 izražaj i višu

razinu infiltracije CD4 stanicama, imali su znatno manju tendenciju razvoja recidiva i pojavnost metastaza ($p=0.096$ i $p=0.065$, Tablica 11). Ovisno o *PIK3CA* mutacijskom statusu, karcinomi koji nisu pokazivali mutaciju i imali su višu infiltraciju CD4 stanicama, manje su bili skloni razvoju metastaza ($p=0.039$).

Tumori sa nižom infiltracijom CD163 stanicama i sa prisutnom mutacijom *PIK3CA* gena, u višoj učestalosti pojavljivanja su imali metastatsku bolest ($p=0.036$, Tablica 11). Ostale usporedbe i proračuni nisu bili statistički značajni, tj. nije pronađena povezanost između vrste tumor-infiltrirajućih limfocita/makrofaga i razvoja metastaza ili recidiva karcinoma u ovisnosti o mutacijskom statusu *PIK3CA* gena. Također, statističkom analizom i usporedbom stanica mikrookoliša između podtipova luminal A i luminal B karcinoma dojke, obzirom na mutacijski status *PIK3CA* gena, nije pronađena statistički značajna razlika (Tablica 12).

Tablica 10. Usporedba sastava tumorskog mikrookoliša i PD-L1 izražaja ovisno o mutacijskom statusu *PIK3CA* gena

Varijabla	<i>PIK3CA</i>		p-vrijednost
	Wt	Mutacija	
CD4 median (raspon) CD4	8.0 (0.0-94.0)	9.0 (0.0-232)	0.436
Visoki (≤ 6)	21 (41.2)	14 (34.1)	0.524
Niski (> 6)	30 (58.8)	27 (65.9)	
CD8 median (raspon) CD8	10.0 (0.0-100.0)	14.5 (1.0-142.0)	0.655
Visoki (≤ 8)	17 (34.7)	15 (35.7)	1.00
Niski (> 8)	32 (65.3)	27 (64.3)	
CD68 median (raspon) CD68	8.0 (1.0-30.0)	8.0 (1.0-75.0)	0.794
Visoki (≤ 23)	43 (84.3)	37 (92.5)	0.336
Niski (> 23)	8 (15.7)	3 (7.5)	
CD163 median (raspon) CD 163	8.0 (1.0-68.0)	6.0 (0.0-41.0)	0.143
Niski (≤ 12)	32 (72.7)	32 (82.1)	0.433
Visoki (> 12)	12 (27.3)	7 (17.9)	
PD-L1			
<1%	42 (93.3)	34 (81.0)	0.110
$\geq 1\%$	3 (6.7)	8 (19.0)	
PD-L1			
<1%	42 (93.3)	Ex9 14 (93.3)	0.044
$\geq 1\%$	3 (6.7)	Ex20 1 (6.7) 20 (74.1) 7 (25.9)	

Skraćenice : Wt- bez *PIK3CA* mutacije, ex9-ekson 9, ex20-ekson 20

Tablica 11. Usporedba sadržaja tumorskog mikrookoliša kod HR+/HER2- karcinoma s metastazom/recidivom ovisno o *PIK3CA* mutacijskom statusu i PD-L1 izražaju

Varijabla <i>PIK3CA</i> Wt	Metastaza/recidiv		p-vrijednost	
	Nema	Prisutna		
CD4	Nizak (≤ 6) Visok (> 6)	5 (23.8) 16 (76.2)	15 (55.6) 12 (44.4)	0.039
CD8	Nizak (≤ 8) Visok (> 8)	6 (27.3) 16 (72.7)	9 (37.5) 15 (62.5)	0.539
CD68	Nizak (≤ 23) Visok (> 23)	17 (81.0) 4 (19.0)	24 (88.9) 3 (11.1)	0.683
CD 163	Nizak (≤ 12) Visok (> 12)	12 (63.2) 7 (36.8)	19 (86.4) 3 (13.6)	0.144
PD-L1	$< 1\%$ $\geq 1\%$	17 (89.5) 2 (10.5)	22 (95.7) 1 (4.3)	0.581
PIK3CA mt				
CD4	Nizak (≤ 6) Visok (> 6)	7 (26.9) 19 (73.1)	6 (42.9) 8 (57.1)	0.480
CD8	Nizak (≤ 8) Visok (> 8)	8 (28.6) 20 (71.4)	6 (46.2) 7 (53.8)	0.307
CD68	Nizak (≤ 23) Visok (> 23)	25 (96.2) 1 (3.8)	11 (84.6) 2 (15.4)	0.253
CD163	Nizak (≤ 12) Visok (> 12)	18 (72.0) 7 (28.0)	14 (100) 0 (0)	0.036
PD-L1	$< 1\%$ $\geq 1\%$	21 (75.0) 7 (25.0)	12 (92.3) 1 (7.7)	0.398
SVI TUMORI				
CD4	Nizak (≤ 6) Visok (> 6)	17 (31.5) 37 (68.5)	22 (50.0) 22 (50.0)	0.096
CD8	Nizak (≤ 8) Visok (> 8)	17 (29.8) 40 (70.2)	17 (42.5) 23 (57.5)	0.279
CD68	Nizak (≤ 23) Visok (> 23)	46 (90.2) 5 (9.8)	38 (88.4) 5 (11.6)	1.00
CD163	Nizak (≤ 12) Visok (> 12)	32 (64.0) 18 (36.0)	36 (92.0) 3 (7.7)	0.002
PD-L1	$< 1\%$ $\geq 1\%$	43 (81.1) 10 (18.9)	37 (94.9) 2 (5.1)	0.096

Skraćenice: Wt-bez *PIK3CA* mutacije; Mt-sa *PIK3CA* mutacijom

Tablica 12. Usporedba sastava tumorskog mikrookoliša i PD-L1 izražaja kod luminal A i luminal B karcinoma dojke ovisno o *PIK3CA* mutacijskom statusu

Varijabala		PIK3CA		p-vrijednost
		luminal A wt	luminal A mt	
CD4	Nizak (≤ 6)	8 (30.8)	9 (34.6)	1.0
	Visok (< 6)	18 (69.2)	17 (65.4)	
CD8	Nizak (≤ 8)	9 (36.0)	8 (29.0)	0.667
	Visok (< 8)	16 (64.0)	19 (70.4)	
CD68	Nizak (≤ 23)	21 (84.0)	23 (92.0)	0.667
	Visok (< 23)	4 (16.0)	2 (8.0)	
CD163	Nizak (≤ 12)	17 (77.3)	19 (76.0)	1.00
	Visok (< 12)	5 (22.7)	6 (24.0)	
PD-L1	$< 1\%$	23 (95.8)	21 (77.8)	0.103
	$\geq 1\%$	1 (4.2)	6 (22.2)	
Varijabala		PIK3CA		p-vrijednost
		luminal B wt	luminal B mt	
CD4	Nizak (≤ 6)	13 (52.0)	5 (33.3)	0.332
	Visok (< 6)	12 (48.0)	10 (66.7)	
CD8	Nizak (≤ 8)	8 (33.3)	7 (46.7)	0.505
	Visok (< 8)	16 (66.7)	8 (53.3)	
CD 68	Nizak (≤ 23)	22 (84.6)	14 (93.3)	0.636
	Visok (< 23)	4 (15.4)	1 (6.7)	
CD163	Nizak (≤ 12)	15 (68.2)	13 (92.9)	0.115
	Visok (< 12)	7 (31.8)	1 (7.1)	
PD-L1	$< 1\%$	19 (90.5)	13 (86.7)	1.00
	$\geq 1\%$	2 (9.5)	2 (13.3)	

Skraćenice: Wt-bez *PIK3CA* mutacije; Mt-sa *PIK3CA* mutacijom

4.5. Korelacija PD-L1 izražaja ovisno o *PIK3CA* mutacijskom statusu u HR+/HER2- karcinomu dojke

Prema ukupnom broju analiziranih HR+/HER2- karcinoma, neovisno o mutacijskom statusu *PIK3CA* gena, PD-L1 izražaj je imao slabu statistički značajnu pozitivnu korelaciju s razinom infiltracije s CD4 limfocitima (Slika 12A) ($r_s=0.203$, $p=0.051$), zatim CD8 limfocitima (Slika 12B i ($r_s=0.312$, $p=0.0026$) i CD68 stanicama ($r_s=0.238$, $p=0.023$, slika 12C i tablica 13).

Kod karcinoma koji nisu imali mutacije u *PIK3CA* genu, PD-L1 izražaj negativno je korelirao sa razinom infiltracije s CD163 stanicama ($r_s = -0.317$, $p = 0.052$). Ostale korelacije u ovoj skupini nisu bile statističke značajne (Slika 12D)

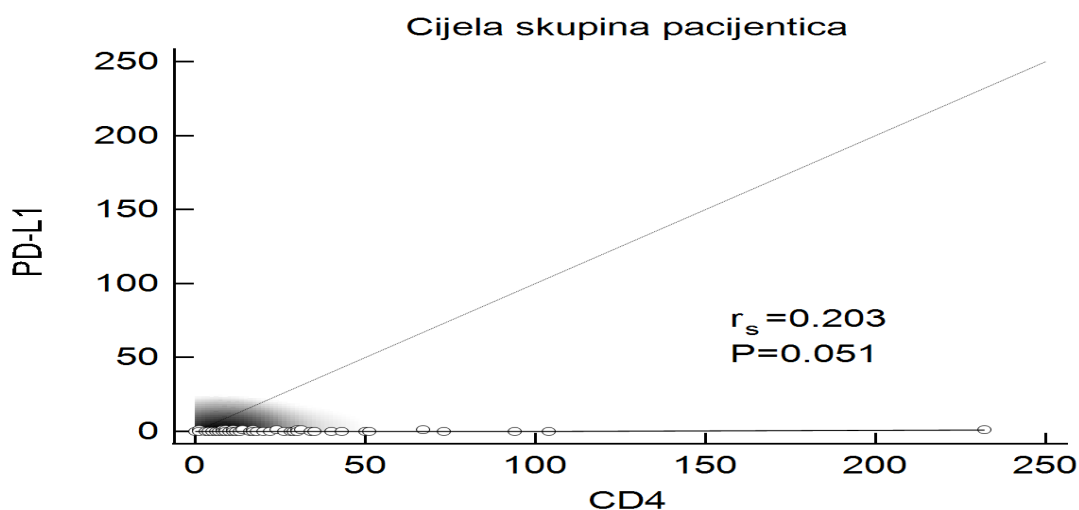
Kod karcinoma sa *PIK3CA* mutacijom, pronađena je srednje do jaka statistička značajna pozitivna korelacija između PD-L1 izražaja i infiltracije stanicama CD8 (Slika 12E) ($r_s = 0.46$, $p = 0.0027$), CD68 (slika 12F) ($r_s = 0.398$, $p = 0.0134$) i CD163 (slika 12G) ($r_s = 0.617$, $p < 0.0001$) (Tablica 13).

Tablica 13. Povezanost PD-L1 izražaja u svim tumorima te u tumorima bez i sa *PIK3CA* mutacijom

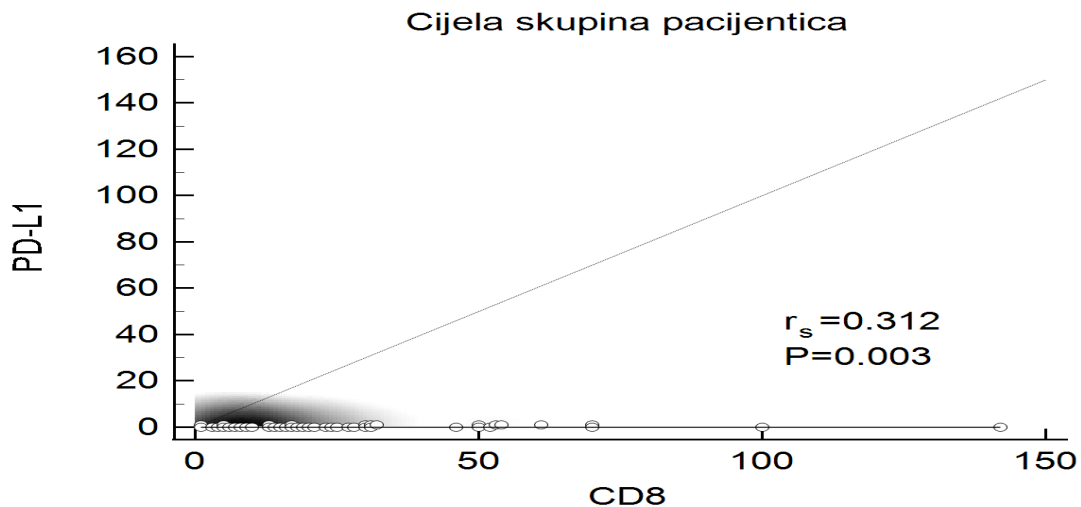
Varijabla		CD4	CD8	CD68	CD163
PD-L1 wt	r_s	0.025	0.063	0.053	-0.317
	p	0.0872	0.693	0.730	0.052
PD-L1 mt	r_s	0.285	0.462	0.398	0.617
	p	0.078	0.0027	0.0134	<0.0001
PD-L1 (svi tumori)	r_s	0.203	0.312	0.238	0.205
	p	0.051	0.0026	0.023	0.061

Skraćenice: Wt-bez *PIK3CA* mutacije; Mt-sa *PIK3CA* mutacijom

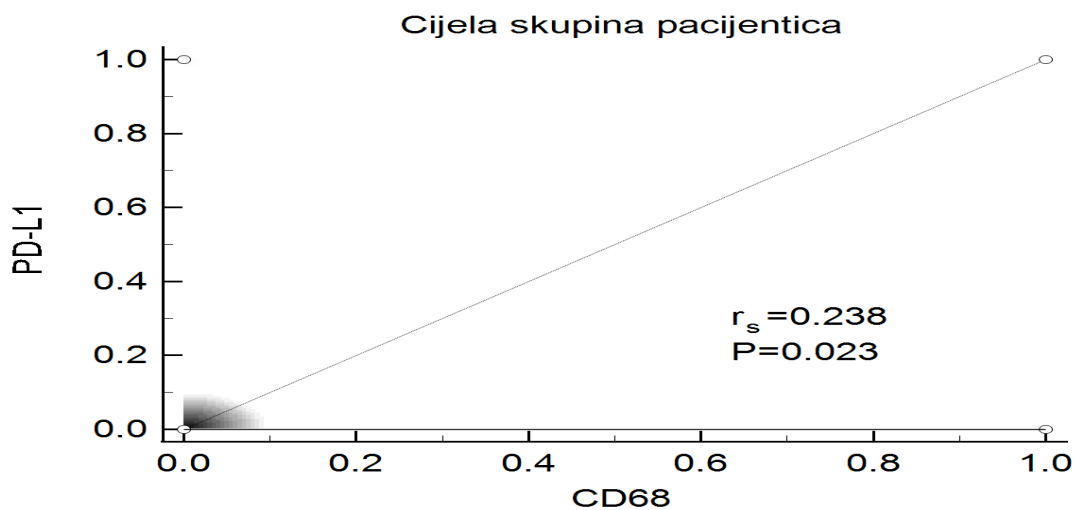
Usporedba je učinjena koristeći Spearman-rank korelacijski koeficijent



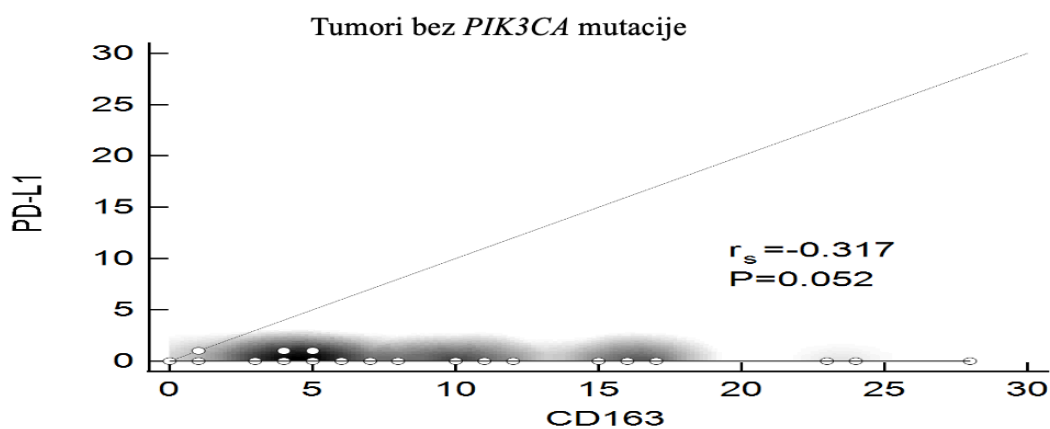
Slika 12A. Graf korelacije infiltracije CD4 stanicama i PD-L1 izražaja u cijeloj skupini pacijentica (korišten je Spearmanov koeficijent korelacije)



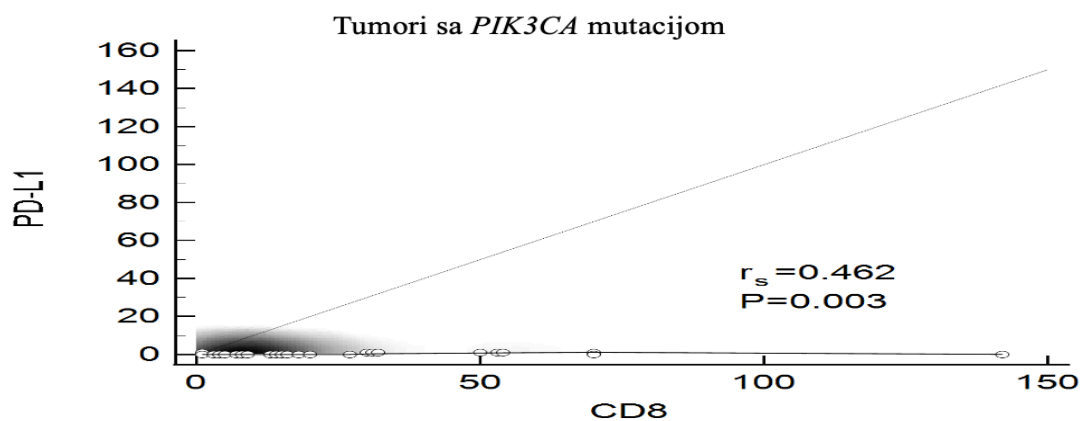
Slika 12B. Graf korelacije infiltracije CD8 stanicama i PD-L1 izražaja u cijeloj skupini pacijentica (korišten Spearmanov koeficijent korelacije)



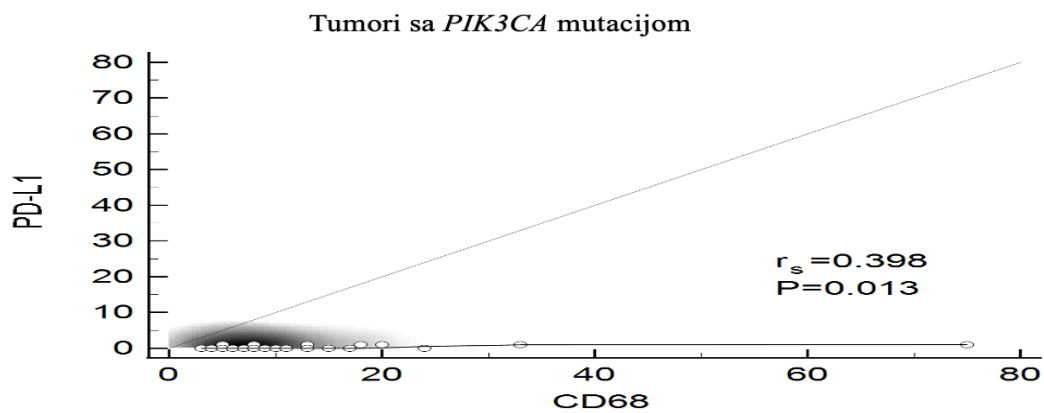
Slika 12C. Graf korelacije infiltracije tumora CD68 makrofazima i PD-L1 izražaja u cijeloj skupini pacijentica (korišten je Spearmanov koeficijent korelacije)



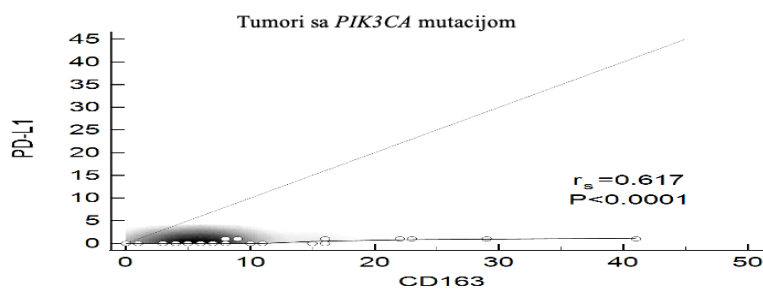
Slika 12D. Graf korelacije infiltracije CD163 stanicama i PD-L1 izražaj u skupini tumora bez mutacije *PIK3CA* gena (korišten Spearmanov koeficijent)



Slika 12E. Graf korelacije pokazuje odnos infiltracije CD8 stanicama i PD-L1 izražaja u skupini tumora sa mutacijom *PIK3CA* gena (korišten Spearmanov koeficijent korelacije)



Slika 12F. Graf korelacije pokazuje povezanost infiltracije tumora CD68 makrofazima i PD-L1 izražaja u *PIK3CA* mutiranih tumora (korišten Spearmanov koeficijent korelacije)

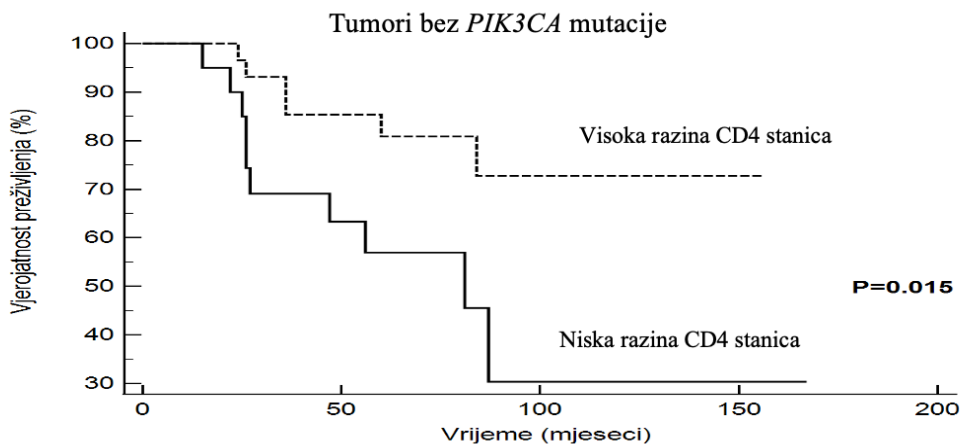


Slika 12G. Graf korelacije infiltracije CD163 stanicama i PD-L1 izražaj u skupini tumora sa *PIK3CA* mutacijom (korišten Spearmanovog koeficijent korelacije)

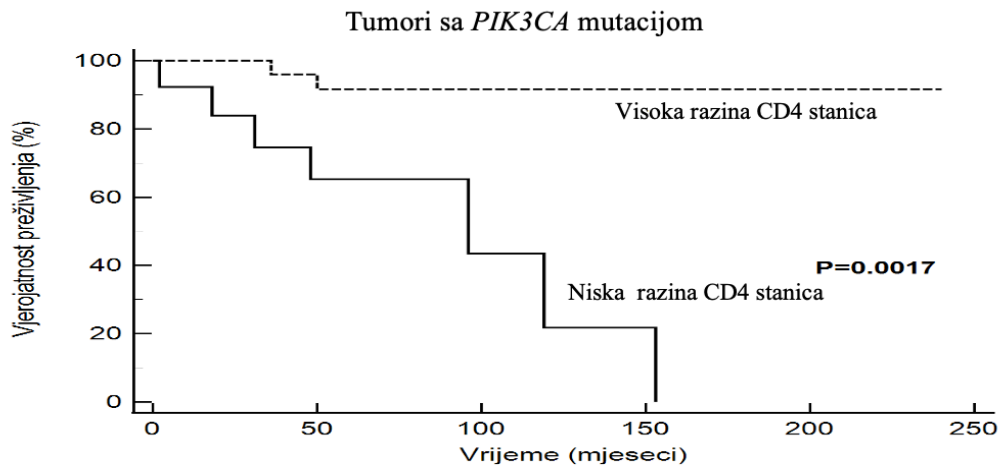
4.6. Analiza preživljenja

Analiza preživljenja, odnosno vjerojatnost specifičnog preživljenja za bolest (DSS) za pacijentice s HR+/HER2- karcinomima sa ili bez mutacije *PIK3CA* gena, u oba slučaja su pokazale statistički značajno bolje preživljenje ako su njihovi tumori imali veću infiltraciju CD4 limfocitima u usporedbi sa pacijenticama sa nižom CD4 infiltracijom unutar tumora ($p=0.015$ i $p=0.0017$) (Tablica 14, Slika 13A i 13B). Pacijentice sa višom razinom infiltracije CD4 limfocitima su imale 85% petogodišnje preživljenje, dok su one sa nižom infiltracijom imale 63% petogodišnje preživljenje, a rezultati su bili podjednaki i kod onih sa i bez *PIK3CA* mutacije (Tablica 14).

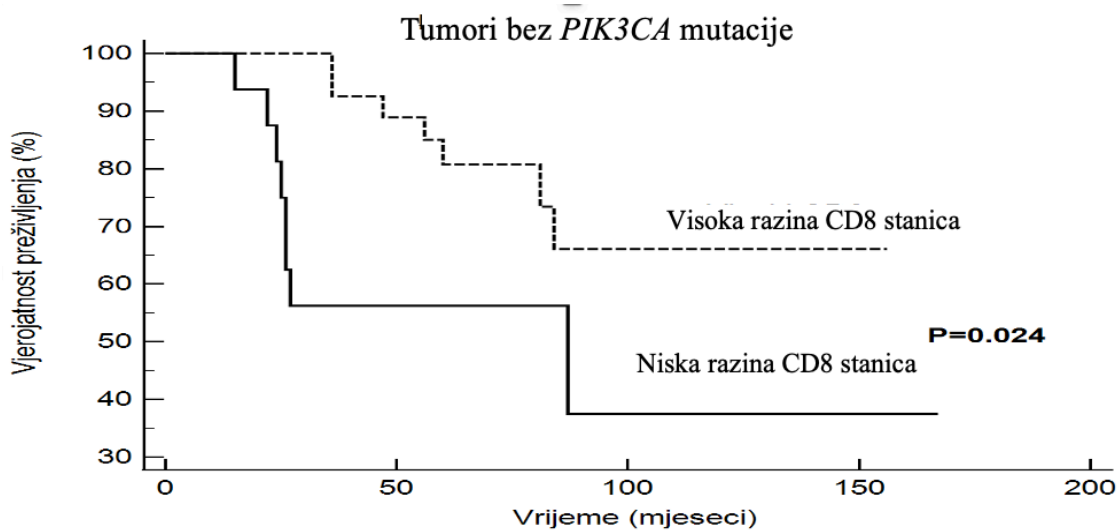
Pacijentice bez *PIK3CA* mutacije gena i sa višom infiltracijom CD8 stanicama unutra tumora imale su statistički značajno bolje preživljenje ($p=0.024$) (Slika 13C), no slična korelacija nije pronađena u pacijentica u kojih je *PIK3CA* mutacija bila prisutna, tj. karcinomi sa *PIK3CA* mutiranim genom su imali slični DSS neovisno o razini infiltracije CD8 stanicama u tumoru (Slika 13D).



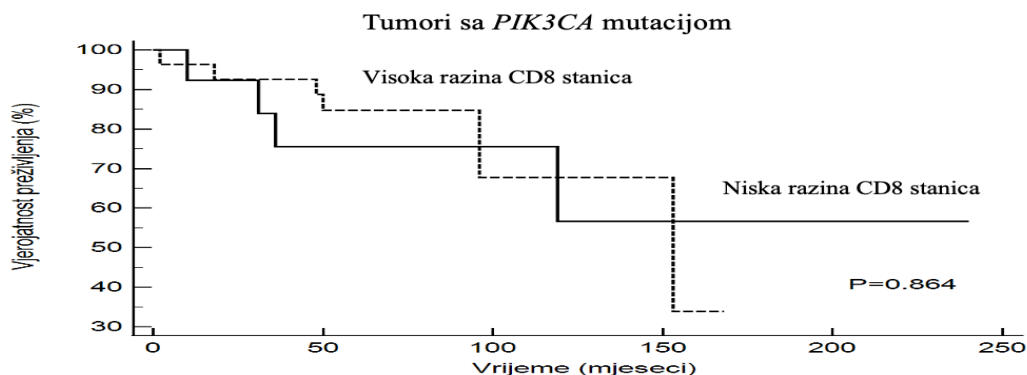
Slika 13A. Infiltracija CD4 stanicama kod tumora koji nisu imali *PIK3CA* mutaciju i utjecaj na DSS



Slika 13B. Infiltracija CD4 stanicama kod tumora koji su imali *PIK3CA* mutaciju i utjecaj na DSS

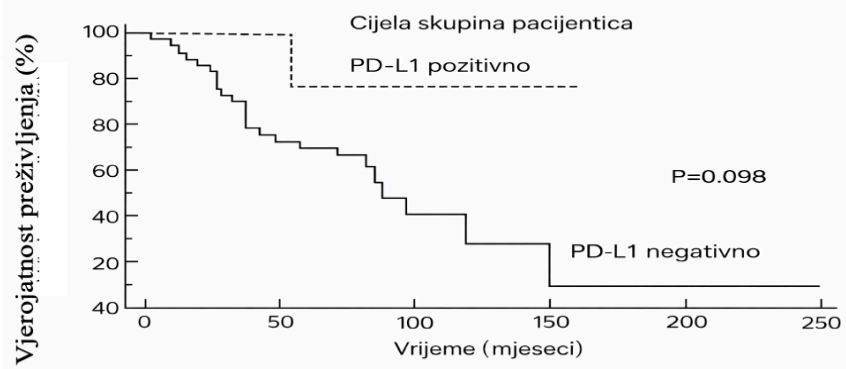


Slika 13C. Infiltracija CD8 stanicama u tumorima bez *PIK3CA* mutacije i utjecaj na DSS

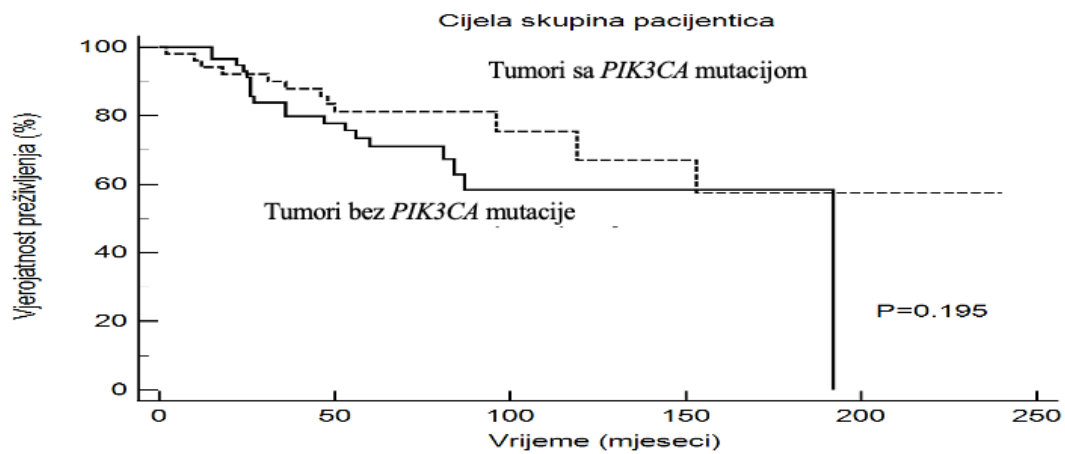


Slika 13D. Infiltracija CD8 stanicama u tumorima bez *PIK3CA* mutacije i utjecaj na DSS

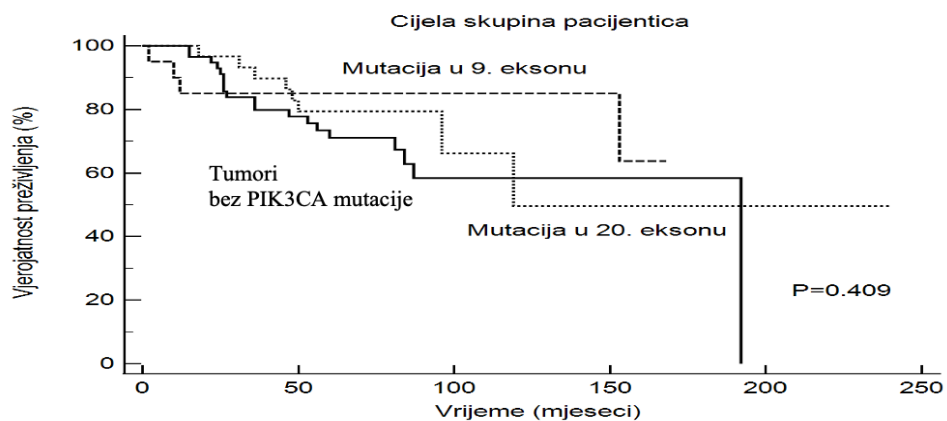
Analizirajući ostale stanice mikrokolišu uz PD-L1 izražaj i njihov utjecaj na DSS, nije se našao statistički značajan rezultat kada se gledaju skupine sa ili bez mutacije *PIK3CA* gena (Tablica 14). Usporedbom cijele ispitivane grupe pacijentica (svi karcinomi zajedno sa i bez *PIK3CA* mutacije gena), one sa višom razinom infiltracije tumora CD4 i CD8 stanicama su statistički značajno imale bolju prognozu, odnosno duži DSS interval ($p=0.0003$ i $p=0.041$) (Tablica 14). Također u cijeloj ispitivanoj skupini bolji DSS je nađen kod pacijentica koje su imale PD-L1 pozitivne karcinome ali je to nije bilo na razini statističkog trenda ($p=0.098$) (Slika 13E i Tablica 14). Uz to, gledajući cijelu ispitivanu skupinu, nije se našla statistički značajna razlika u DSS-u kada se analizirao utjecaj *PIK3CA* mutacije (Tablica 14, Slika 13F i 13G).



Slika 13E. DSS u ovisnosti o PD-L1 izražaju



Slika 13F. DSS unutar cijele ispitivane skupine pacijentica ovisno o *PIK3CA* mutacijskom statusu



Slika 13G. DSS u cijeloj skupini pacijentica sa mutacijom *PIK3CA* gena u eksonu 9 ili 20

Tablica 14. DSS u pacijentica sa i bez *PIK3CA* mutacije ovisno o stanicama tumorskog mikrookoliša

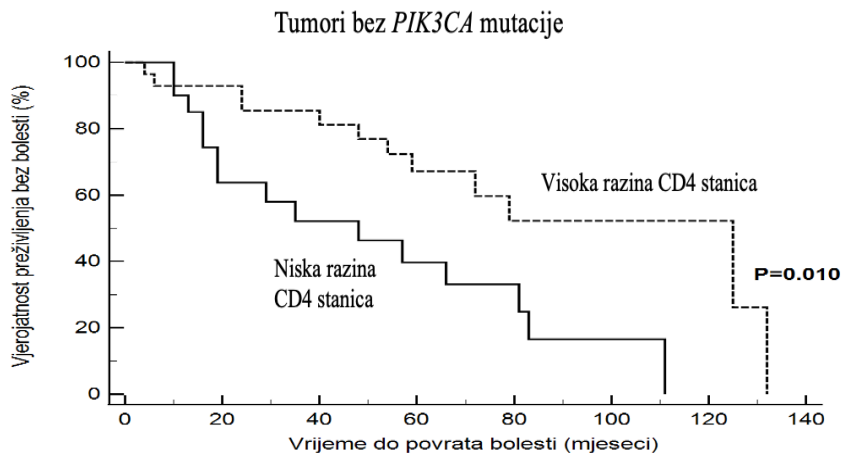
Varijabla	N	Umrle pacijentice (N)	5-godišnje preživljenje (%)	Srednja vrijednost +/- SD	95% CI	χ^2	Log-Rank Test (p-vrijednost)
Pacijentice bez <i>PIK3CA</i> mutacije							
CD4							
Nizak (<6)	20	10	63	86.7±16.2	54.9-118.6	5.92	0.015
Visok (≥6)	30	6	85	127±10.2	107.5-147.6		
CD8						5.09	0.024
Nizak (<8)	16	8	56	89.3±18.9	52.1-126.4		
Visok (≥8)	32	7	85	124.3±10.1	104.5-144.2		
CD68						1.256	0.263
Nizak (<23)	42	15	75	110.0±11.2	89.1-132.9		
Visok (≥23)	8	1	85	132.3±16.4	100.1-164.4		
CD163						0.722	0.395
Nizak (<12)	31	10	76	99.3±13.3	73.3-125.4		
Visok (≥12)	12	3	75	120.5±14.8	91.4-149.5		
PD-L1						0.553	0.457
<1%	41	13	77	119.2±10.7	98.1-140.2		
≥1%	3	0	100	55.0±0.0	55.0-55.0		
Pacijentice sa <i>PIK3CA</i> mutacijom tumora							
CD4						9.88	0.0017
Nizak (<6)	13	7	63	89.1±17.9	54.4-123.8		
Visok (≥6)	26	2	85	223.6±11.2	201.7-245.4		
CD8						0.029	0.864
Nizak (<8)	13	4	75	164.8±30.1	105.9-223.7		
Visok (≥8)	27	6	85	129.6±13.4	103.4-155.8		
CD68						1.219	0.269
Nizak (<23)	36	9	79	158.3±22.9	113.2-203.3		
Visok (≥23)	3	0	100	168.0±0.0	168.0-168.0		
CD163						0.045	0.831
Nizak (<12)	32	8	84	164.2±21.6	121.9-206.5		
Visok (≥12)	7	1	87	86.9±5.7	75.7-98.0		

PD-L1 <1%	32	9	80	148.8±23.0	103.7-193.9	0.859	0.354
≥1%	8	1	89	153.3±13.8	126.2-180.3		
Pacijentice bez obzira na mutacijski status <i>PIK3CA</i> gena (cijela skupina)							
CD4							
Nizak (<6)	39	20	62	85.8±10.5	65.3-106.4	13.29	0.0003
Visok (≥6)	61	11	85	196.6±12.1	172.9-220.2		
CD8							
Nizak (<8)	34	15	62	129.7±20.7	89.2-170.2	4.19	0.041
Visok (≥8)	65	16	85	128.5±8.3	112.2-144.7		
CD68							
Nizak (<23)	86	28	72	148.6±14.6	120.1-177.1	2.14	0.143
Visok (≥23)	11	1	90	153.8±13.5	127.4-180.2		
CD163							
Nizak (<12)	69	22	77	144.5±16.0	113.1-175.9	0.829	0.363
Visok (≥12)	23	5	87	124.7±9.9	105.2-144.2		
PD-L1 <1%	82	27	75	144.4±15.2	114.7-174.2	2.741	0.098
≥1%	12	1	90	156.2±11.2	134.3-178.1		
<i>PIK3CA</i> specifično							
Wt	58	19	72	132.6±11.7	109.7-155.6	1.788	0.409
Ekson 9	20	4	85	140.8±12.8	115.8-165.9		
Ekson 20	31	8	80	159.4±29.9	110.6-208.2		
<i>PIK3CA</i> Wt	58	19	72	132.6±11.7	109.7-155.6	1.697	0.195
Mutacija	51	12	81	173.5±16.7	140.7-206.3		

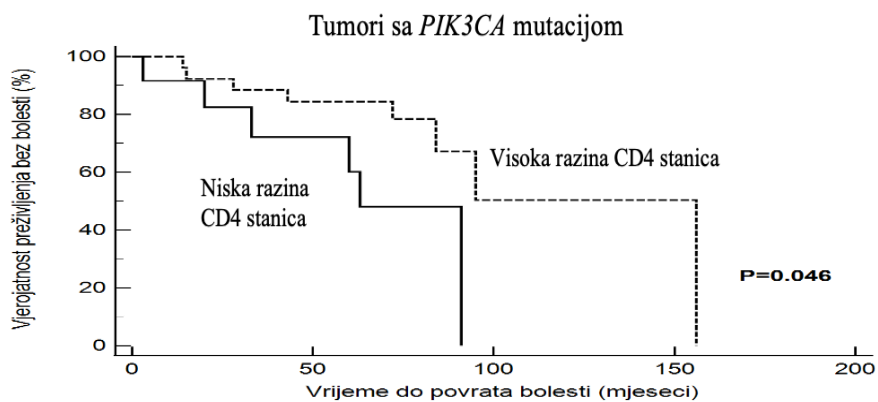
Skraćenice: Wt-bez *PIK3CA* mutacije; Mt-sa *PIK3CA* mutacijom

Kada se promatra varijablu koja označava period preživljenja bez povratka tumorske bolesti tj. DFS kod pacijentica koje nisu imale *PIK3CA* mutaciju gena, ali su njihovi tumori imali veću CD4 infiltraciju, našlo se statistički značajnije 5-godišnje preživljenje bez razvoja recidiva tumora u 78% slučajeva ($p=0.010$) (Slika 14A), dok su oni sa nižom CD4 infiltracijom i bez *PIK3CA* mutacije imali 5-godišnje preživljenje na razini od 45% (Tablica 15). U skupini karcinoma sa *PIK3CA* mutacijom koji su imali višu razinu CD4 infiltracije, 5-godišnji DFS interval je bio statistički duži, (5-godišnje preživljenje je bilo na razini 85% za tumore s CD4 visokom infiltracijom odnosno 72% za tumore s CD4 niskom infiltracijom) ($p=0.046$) (Slika 14B i Tablica 15). Kada se promatra utjecaj infiltracije sa stanicama CD8 trend boljeg DFS je u svim skupinama (karcinomi sa i bez mutacije, te cijela skupina) sa višom CD8 infiltracijom ali nije na razini statističke značajnosti (za w/t: $p=0.175$, grupa sa mutacijom *PIK3CA* gena $p=0.576$, te za ukupnu grupu 0.222). Kada se promatra razina infiltracije CD68 stanicama i utjecaj na DFS u svim skupinama, ne nalazi se razina statističke značajnosti te CD68, odnosno razina CD68 visoka ili niska nije utjecala na DFS bez obzira na status mutacija *PIK3CA* gena. Kod karcinoma koji nisu imali *PIK3CA* mutaciju te su imali visoku CD163 infiltraciju nije nađena statistički značajna

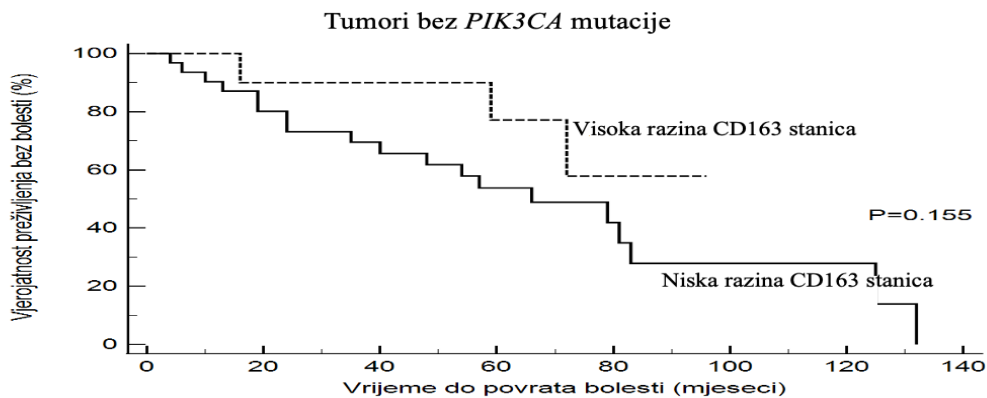
razlika prema dužem DFS ($p=0.155$) (Slika 14C). No u skupini karcinoma sa *PIK3CA* mutacijom i višom razinom CD163 infiltracije nađen je statistički trend ka dužem DFS ($p=0.077$) (Slika 14D).



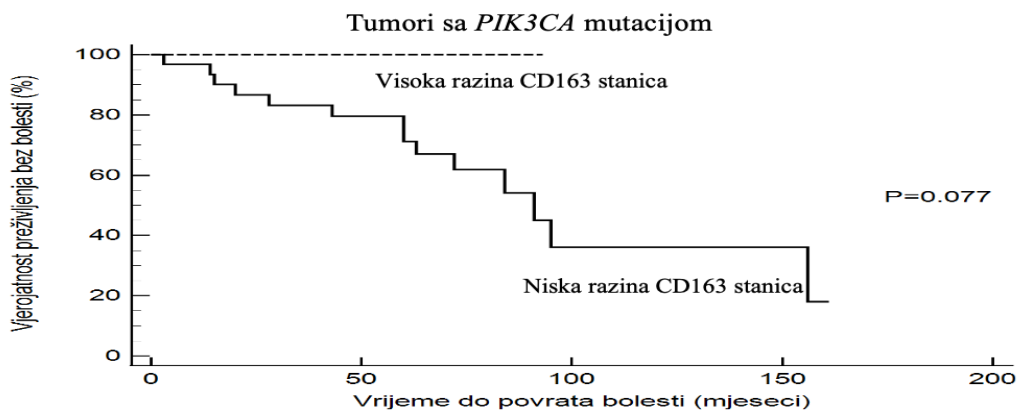
Slika 14A. DFS i infiltracija CD4 limfocitima kod karcinoma bez *PIK3CA* mutacije gena



Slika 14B. DFS i infiltracija CD4 limfocitima kod karcinoma sa *PIK3CA* mutacijom gena



Slika 14C. DFS i infiltracija CD163 stanicama u skupini pacijentica bez *PIK3CA* mutacije gena



Slika 14D. DFS i infiltracija CD163 stanicama u skupini pacijentica sa *PIK3CA* mutacijom gena

Analizirajući cijelu grupu karcinoma (sa i bez mutacije *PIK3CA* gena), DFS interval je bio statistički značajno duži u pacijentica sa karcinomima koji su imali veću infiltraciju s CD4 ($p=0.005$) i CD163 ($p=0.009$) stanicama. Kod pacijentica sa većom CD4 infiltracijom (promatrana cijela skupina) 5-godišnji DFS je bio 78%, za razliku od onih sa nižom CD4 infiltracijom gdje je

bio 43% (Tablica 15). Kod pacijentica koje su imale mutaciju *PIK3CA* gena ($p=0.026$) te također kod onih pacijentica koje su imale mutaciju *PIK3CA* gena u području eksona 20 ($p=0.041$), pronađeno je statistički značajno duže preživljenje bez povrata tumorske bolesti (Tablica 15). U ovom istraživanju položaj mutacije u eksonu 20 kod *PIK3CA* mutiranih tumora se pokazao kao povoljan prognostički znak (Slika 14E). Također u cijeloj ispitivanoj skupini nađen je statistički trend prema dužem DFS intervalu u PD-L1 pozitivnih karcinoma ($p=0.072$), gdje je 5-godišnji DFS iznosio 91%, za razliku od tumora bez PD-L1 izražaja, gdje je 5-godišnji DFS bio 73% (Tablica 15 i Slika 14F). Pacijentice se prisutnom mutacijom *PIK3CA* gena u cijeloj skupini imaju statistički značajno duži DFS, za razliku od od pacijentica cijele ispitivane skupine ali koje nisu imale *PIK3CA* mutaciju gena (slika 14G). Multivarijatnom analizom za sve statistički značajne varijable u univarijatnoj DSS i DFS analizi, statističku značajnost zadržala je jedino *PIK3CA* mutacija u DFS-u ($p=0.0488$) (Tablica 16).

Tablica 15. DFS kod svih pacijentica te u skupinama sa i bez *PIK3CA* mutacije gena

Varijabla	N	Recidiv tumora (N)	5-godišnji DFS (%)	Srednja vrijednost \pm SD	95% CI	χ^2	Log-Rank Test (p-vrijednost)
Pacijentice bez <i>PIK3CA</i> mutacije (wt)							
CD4							
Nizak (<6)	20	15	45	51.95 \pm 8.84	34.63-69.3	6.64	0.01
Visok (\geq 6)	28	12	78.5	89.82 \pm 7.25	70.35-109.3		
CD8							
Nizak (<8)	15	9	50	51.68 \pm 8.90	43.24-69.12	1.84	0.175
Visok (\geq 8)	31	15	65	84.37 \pm 8.78	67.16-101.5		
CD68							
Nizak (<23)	41	24	55	72.4 \pm 7.81	57.09-87.7	0.007	0.932
Visok (\geq 23)	7	3	41	66.21 \pm 12.34	42.02-90.4		
CD163							
Nizak (<12)	31	19	55	69.3 \pm 9.1	51.5-87.1	2.02	0.155
Visok (\geq 12)	10	3	78	78.61 \pm 8.56	61.8-95.4		
PD-L1							
<1%	39	22	59	72.45 \pm 7.38	57.99-86.91	0.07	0.786
\geq 1%	3	1	65	40.0 \pm 12.25	15.99-64.01		
Pacijentice sa <i>PIK3CA</i> mutacijom tumora							
CD4							
Nizak (<6)	13	6	72		43.7-84.4		

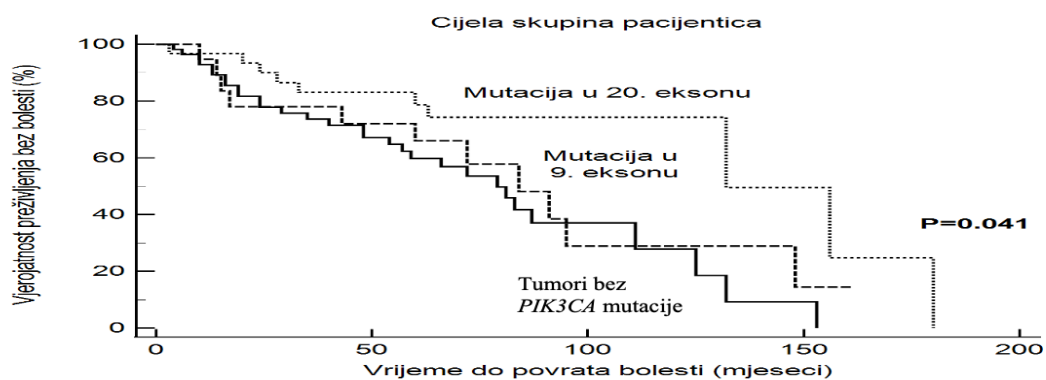
Visok (≥6)	26	8	85	64.1±10.4 112.3±14.4	84.1-140.4	3.98	0.0458
CD8							
Nizak (<8)	13	6	75	101.8±18.92	64.52-138.7	0.313	0.576
Visok (≥8)	27	7	88	129.6±13.4	74.32-92.45		
CD68							
Nizak (<23)	36	11	82	109.2±12.29	85.13-133.2	1.714	0.190
Visok (≥23)	3	2	66	64.67±8.99	47.03-82.30		
CD163							
Nizak (<12)	32	14	80	96.1±11.77	73.02-119.1	3.136	0.077
Visok (≥12)	7	0	100	93.0±0.0	93.0-93.0		
PD-L1							
<1%	32	12	80	97.75±12.8	72.58-122.9	1.943	0-163
≥1%	8	1	100	92.0±3.65	84.84-99.16		
Pacijentice bez obzira na <i>PIK3CA</i> mutacijski status (cijela skupina)							
CD4							
Nizak (<6)	39	22	43	61.9±6.6	49.1-74.8	8.09	0.005
Visok (≥6)	58	22	78	98.4±8.5	81.8-115.0		
CD8							
Nizak (<8)	33	17	60	85.1±12.2	60.8-109.2	1.493	0.222
Visok (≥8)	63	23	73	90.8±5.2	73.6-103.0		
CD68							
Nizak (<23)	84	38	68	86.9±7.2	72.9-101.0	0.367	0.545
Visok (≥23)	10	5	50	66.3±9.2	48.3-84.3		
CD163							
Nizak (<12)	68	36	60.5	80.3±7.5	65.7-94.9	6.874	0.009
Visok (≥12)	21	3	89	97.7±4.6	78.8-96.7		
PD-L1							
<1%	32	12	80	97.75±12.8	72.58-122.9	1.943	0.163
≥1%	8	1	100	92.0±3.65	84.84-99.16		
<i>PIK3CA</i> specifično							
Wt	56	30	65	77.9±7.7	62.9-93.0	6.375	0.041
Ekson 9	20	11	72	85.8±13.5	59.5-112.2		
Ekson 20	31	10	82	120.5±14.0	97.7-152.4		
<i>PIK3CA</i>							
Wt	56	30	62	77.9±7.7	62.9-93.0	4.971	0.026
Mutacija	51	21	79.5	107.4±10.9	85.9-128.8		

Skraćenice: DFS -vjerojatnost preživljenja bez bolesti, wt-bez mutacije *PIK3CA* gena; mt-sa *PIK3CA* mutacijom

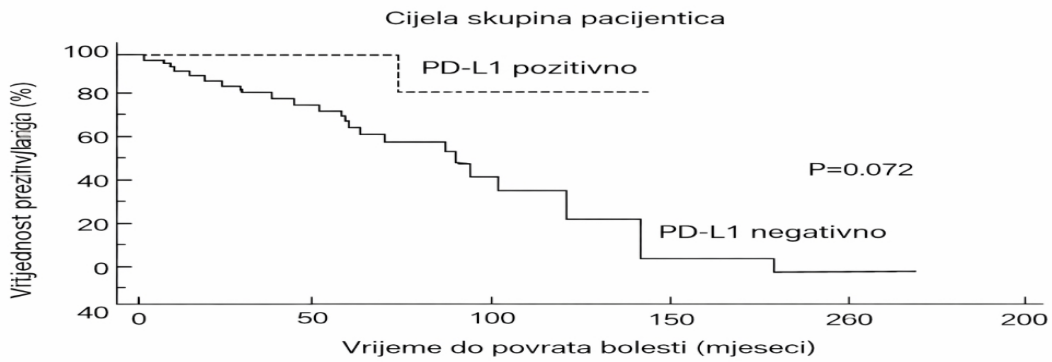
Tablica 16. Multivarijatna analiza preživljenja specifična za bolest i preživljenja bez povrata bolesti

DSS (preživljenje specifično za bolest)			
Varijabla (granične vrijednosti)	HR	95% CI	ρ-vrijednost
CD4 (≤6)	0.51	0.19-1.30	0.159
CD8 (<8)	0.61	0.23-1.59	0.313
PD-L1 142 IC	0.20	0.02-1.62	0.313
DFS (preživljenje bez povrata bolesti)			
CD4 (≤6)	0.54	0.24-1.21	0.134
CD163 (>12)	0.35	0.09-1.24	0.351
PD-L1 142 IC	0.83	0.18-3.76	0.835
PIK3CA mutacija	0.45	0.21-0.99	0.0488

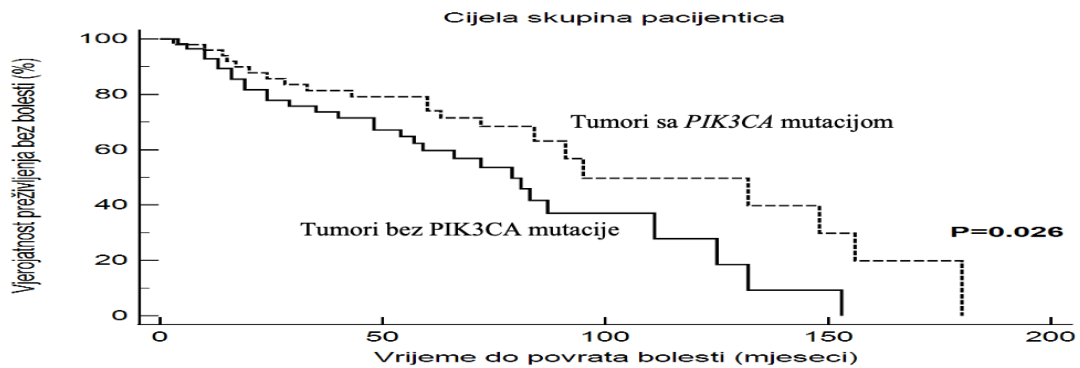
Skraćenice: HR-omjer rizika (engl. *hazards ratio*), CI-interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)



Slika 14E. DFS u ovisnosti o položaju mutacije *PIK3CA* gena u eksonu 9 i eksonu 20 u cijeloj ispitivanoj skupini



Slika 14F. DFS i utjecaj PD-L1 izražaja u cijeloj ispitivanoj skupini



Slika 14G. DFS u cijeloj ispitivanoj skupini ovisno o prisutnosti mutacije *PIK3CA* gena

5. RASPRAVA

Karcinomi dojke su heterogena i složena skupina oboljenja za čiju prognozu, preživljenje i uspjeh liječenja su odgovorni brojni čimbenici. Svojim međusobnim odnosom imunološki sustav i tumorsko tkivo nastoje stvoriti preduvjete za što duže preživljenje. Tijekom vremena tumor mutacijama različitih gena, nastoji izbjeći imunološkom odgovoru domaćina i nastaviti svoj autonomni rast. To je slučaj i sa *PIK3CA* mutacijom u karcinomu dojke. Kod HR+/HER2- podtipa je udio razine mutacija najviši u usporedbi sa ostalim podtipovima karcinoma dojke. Općenito prema literaturi, kod pacijentica s HR+/HER2- podtipom karcinoma dojke sa *PIK3CA* mutacijom u ranoj fazi bolesti, nađen je bolji DFS u odnosu na pacijentice koje nisu imale mutacije *PIK3CA* gena. No, s druge pak strane, kod pacijentica sa metastatskim HR+/HER2- karcinomom dojke sa *PIK3CA* mutacijom, nađeno je lošije sveukupno preživljenje te su češće razvijale rezistenciju na kemoterapiju i hormonsko liječenje. Prema rezultatima ovog istraživanja, kod pacijentica koje su imale mutaciju *PIK3CA* gena ($p=0.026$) kao i *PIK3CA* mutaciju u eksonu 20 ($p=0.041$), pronaden je statistički značajno duži DFS. Ovaj rezultat ide u prilog onoga što je nađeno u literaturi i slaže se s ranijim podacima iz sličnih studija [126].

HR+/HER2- podgrupa karcinoma sa mutacijom *PIK3CA* gena, osobito u eksonu 9, je prema određenim radovima, imala lošije preživljenje, a takvi tumori su kasnije razvili i otpornost na endokrinu i sistemska terapiju [127,128]. Tumorske stanice putem *PIK3CA* mutacija, učestalije u eksonu 9, su aktivacijom PI3K/AKT/mTOR puta stekle otpornost i prilagodbu na kemoterapiju te aromataza inhibitore [129-131]. U uznapredovalom karcinomu, *PIK3CA* mutacije nisu povezane sa povoljnijom prognozom, udružene su sa većim potencijalom razvoja metastatske bolesti i zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova, te sklonosti recidiviranju [133,133]. Pošto PI3K signalni put djeluje na cijeli niz signalnih putova, inhibicija tog puta u tumorima s *PIK3CA* mutacijom gena može usporiti napredovanje tumora i poboljšati stopu preživljenja te smanjiti razinu recidiva bolesti [134].

Ako se blokira PI3K signalni put koji potiče signalizaciju neovisno o estrogenskim receptorima može se na ovom nivou zaustaviti ili izvjesnije usporiti širenje tumora. Grupa pacijentica u uznapredovalom karcinomu dojke može imati koristi od primjena inhibitora PI3K signalnog puta pomoću lijeka poput lijeka alpelisiba [135,136]. Analiza *PIK3CA* gena se danas rutinski provodi u laboratorijima. Odobreni lijek alpelisib je pokazao djelotvornost u fazi III studije SOLAR-1 ako

su tumori imali *PIK3CA* mutaciju [137-139]. Obično se ovaj specifični inhibitor koristi u kombinaciji sa lijekom fulvestrantom, ako se pronađe *PIK3CA* mutacija kod pacijentica sa karcinomom dojke.

Učinkovitost ove vrste terapije i kombinacije lijekova nije dokazana u karcinomima istog kliničkog stadija, ukoliko nisu imali mutacije *PIK3CA* gena. Stoga mutacijski status *PIK3CA* gena postaje važan prognostički čimbenik o čemu ovisi progresija oboljenja kod HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke kao i samo liječenje. Prema rezultatima iz ovog istraživanja nađeno je 43.1% *PIK3CA* mutiranih HR+/HER2- tumora, što je u skladu s ranije objavljenim literaturnim podacima gdje se udio mutacije *PIK3CA* gena u HR+/HER2- tumorima kreće od 37 do 44% [140,141]. Isto tako, prema rezultatima ovog istraživanja, većina mutacija *PIK3CA* gena je smještena u eksonu 20 (26.8%) te potom slijedi ekson 9 (16.3%). Slični rezultati da je većina mutacija *PIK3CA* gena u eksonu 20, za razliku od eksona 9 mogu se pronaći i u drugim studijama [142,143].

U ovom istraživanju je nađeno da su pacijentice koje su imale tumore sa *PIK3CA* mutacijom imale bolji DFS, ali statističkom analizom nije pronađena korelacija između *PIK3CA* mutacijskog statusa i DSS. Također u ovom istraživanju karcinomi koji su imali *PIK3CA* mutaciju u području eksona 20 su učestalije bili udruženi sa histološki povoljnijim parametrima kao što su niži Ki-67 indeks (<20%), niži gradus i za vrijeme perioda praćenja imali su manje učestalu frekvenciju pojavljivanja metastaza ili recidiva tumorske bolesti.

Uspoređujući tumore, općenito s *PIK3CA* mutacijom, bez fokusiranja na specifične eksone, onda su oni češće bili povezani sa pozitivnim PD-L1 izražajem u usporedbi sa tumorima bez *PIK3CA* mutacije, no taj rezultat nije bio statistički značajan. Statistička značajnost je bila nađena u distribuciji PD-L1 izražaja u ovisnosti o položaju mutacije u *PIK3CA* genu. Tumori s mutacijom *PIK3CA* gena u eksonu 20 su statistički značajnije češće bili PD-L1 pozitivni, nego tumori s mutacijom u eksonu 9 ili tumori koji nisu pokazivali mutacijske promjene. Ti rezultati idu u prilog podataka iz literature, jer je poznato da mutacije u *PIK3CA* genu putem AKT-posredovane fosforilacije β - katenina utječu te aktiviraju PD-L1 izražaj [144].

Mutacije *PIK3CA* gena mogu uzrokovati promjene u tumorskom mikrookolišu i time promijeniti imunološki odgovor domaćina. Tako je naprimjer iz istraživanja karcinoma debelog crijeva i želuca nađena povezanost mutacija *PIK3CA* gena s povećanom infiltracijom T citotoksičnim limfocitima, većim izražajem PD-L1 na tumorskim stanicama kao i većim učinkom imunoterapije [145,146]. Postoje brojne studije koje nastoje objasniti i dokazati međusobne složene mehanizme

koji putem *PIK3CA* mutacija dovode do tumorske otpornosti na djelovanje imunološkog sustava [147,148]. Adaptacijski mehanizmi vremenom dovode do nesmetanog tumorskog rasta, povećane proliferacije i nastavka rasta. PD-L1 izražaj u HR+/HER2- podtipu karcinoma dojke je općenito vrlo nizak (iznosi oko 0- 10%), u odnosu na ostale podtipove, dok je PD-L1 izražaj u TNBC podtipu najveći [149,150]. Uvođenje terapije koja djeluje na inhibiciju PI3K puta i na imunološku modulaciju PD-L1 osovine može biti obećavajuća u terapiji karcinoma koji su vremenom razvili rezistenciju i uzrokovali nastanak metastatskog oboljenja [151,152]. Također, postoje i radovi koji imaju drugačije rezultate i dovode u vezu čak manji PD-L1 izražaj kod *PIK3CA* mutiranih karcinoma dojke i to kod TNBC podtipa karcinoma dojke. Takvi rezultati su u suprotnosti sa činjenicom da aktivacija mutacije *PIK3CA* gena dovodi do imunološke supresije mehanizmom povećanog PD-L1 izražaja [153,154].

Iz ovoga je vidljivo da odnosi regulacijskih putova i PD-L1 izražaja su vrlo složeni i još nedovoljno objašnjeni ali najviše su istraživani kod TNBC karcinoma dojke, budući da ta podvrsta karcinoma dojke ima najveći PD-L1 izražaj, pa je i logično da su istraživanja bila uglavnom rezervirana za ovaj podtip karcinoma dojke [155,156].

Prema podacima iz literature, moglo bi se reći da bi *PIK3CA* mutacijski status mogao poslužiti kao dobar prognostički i terapijski biobiljeg povoljnog odgovora na imunoterapiju te utjecati na odabir ciljane terapije kod raznih solidnih tumora. To bi se moglo osobito odnositi na tumore poput želuca, mokraćnog mjehura, vrata maternice i tumora debelog crijeva [157-159]. Prema radu Jiang W i sur., prikazan je slučaj tumora vrata maternice sa *PIK3CA* mutacijom gdje je kontinuirana monoterapija lijekom pembrolizumabom dovela do kompletne remisije recidivirajućeg tumora koji je imao sistemske manifestacije oboljenja [160]. Rezultati iz navedenog rada sugeriraju da bi određivanje mutacijskog statusa *PIK3CA* gena moglo biti od koristi kod uvođenja terapije sa pembrolizumabom kod tumora vrata maternice jer se pretpostavlja da bi upravo promjena u PI3K signalnom putu uslijed *PIK3CA* mutacije gena mogla dovesti do više razine PD-L1 izražaja i promjene u tumorskom mikrookolišu. Stoga se čini razumno da bi pembrolizumab kao PI3K inhibitor u kombinaciji sa imunoterapijom mogao značajno povećati šanse za preživljenje. Također i kod ostalih solidnih tumora opisani su zadovoljavajući rezultati liječenjem pembrolizumabom, primjerice kod tumora prostate, ovarija, endometrija i karcinoma debelog crijeva no ipak su potrebne daljnje kliničke studije za ocjenu učinkovitosti ove terapije i praćenja remisije bolesti [161,162].

Kada se promatraju rezultati studija liječenja solidnih tumora novom terapijskom linijom, u ovisnosti o *PIK3CA* mutacijskom statusu i PD-L1 izražaju, te uzevši u obzir rezultate ovog istraživanja, moguće je da bi uznapredovali HR+/HER2- karcinomi dojke sa mutacijom *PIK3CA* gena u području eksona 20 i pozitivnim PD-L1 izražajem mogli imati koristi od imunološke terapije. Također u ovoj studiji, pacijentice s HR+/HER2- karcinomima i sa *PIK3CA* mutacijom u području eksona 20 imale su i bolju prognozu s boljim kliničkim tijekom bolesti. To dokazuje važnost određivanja *PIK3CA* mutacijskog statusa i PD-L1 izražaja kod HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke, osobito jer može dati važne prognostičke podatke i utjecati na izbor multimodalne terapije.

Povezanost populacije i sastava tumorskog mikrookoliša nije u jasnoj korelaciji sa preživljenjem i prognozom oboljenja. Prema radu Ruffel i sur, tumorsko tkivo karcinoma dojke je uglavnom prožeto stanicama imunološkog sustava poput CD4, CD8, a u manjoj mjeri stanicama NK i B limfocitne linije, dok u normalnom tkivu dojke dominiraju stanice mijelo-loze uključujući makrofage, mastocite i neutrofile [163].

Sobral-Leite M i sur. svom radu navode da promjene u PI3K signalnom putu mogu biti udružene sa promjenama u sastavu tumorskog mikrookoliša kod luminalnog podtipa karcinoma dojke u smislu da takvi tumori imaju veću infiltraciju CD8 limfocitima [87]. Prema navedenom radu, karcinomi koji su imali višu razinu infiltracije CD8 stanicama su imali i veći udio mutacije *PIK3CA* gena i bili su udruženi s kraćim vremenom povrata bolesti. Primijećena je povezanost između lošijeg preživljenja, više razine CD8 infiltracije i mutacije *PIK3CA* gena, a posebno kod pacijentica koje su imale histološki stupanj karcinoma 1 i 2.

U ovom istraživanju ipak nije pronađena statistički značajna povezanost između DFS i povećane razine CD8 limfocitne infiltracije u grupi tumora koji su imali *PIK3CA* mutaciju, niti u onih koji su bili bez mutacije *PIK3CA* gena, ali je DSS bio statistički značajno duži u grupi tumora sa visokom CD8 infiltracijom i bez *PIK3CA* mutacije gena.

Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da HR+/HER2- karcinomi dojke ovisno o mutacijskom statusu *PIK3CA* gena (tumori sa mutacijom u usporedbi s tumorima bez *PIK3CA* mutacije) mogu imati tumorski mikrookoliš koji različito funkcionira, te da iste stanice u ovisnosti o statusu gena mogu biti povezane i sa različitom prognozom. U ovom istraživanju nije nađena razlika u sastavu i razini infiltracije tumora stanicama CD4, CD8, CD68 i CD163 ovisno o mutacijskom statusu *PIK3CA* gena u HR+/HER2- karcinomu dojke. Na ovaj rezultat, da nisu pronađene statistički

značajne razlike u infiltraciji CD4, CD8, CD68 i CD163 stanicama, kod tumora sa i bez *PIK3CA* mutacije, mogla je utjecati činjenica, da je HR+/HER2- skupina karcinoma dojke heterogena i sačinjena od luminal A i luminal B podtipovi karcinoma. Zbog toga je dodatno učinjena statistička analiza sastava stanica CD4, CD8, CD68 i CD163 između *PIK3CA* mutiranih i nemutiranih luminal A i B karcinoma dojke, no ni tu se nije pronašla statistički značajnija razlika u sastavu imunoloških stanica između ove dvije podgrupe tumora. Kada se učinila usporedba sastava imunoloških stanica u karcinomima dojke koji su razvili metastazu ili recidiv bolesti nađena je statistički značajna veća infiltraciju CD4 limfocitima u karcinomima bez mutacije *PIK3CA* gena. Kod *PIK3CA* mutiranih karcinoma sa metastazom ili recidivom bolesti pronađena je viša CD163 infiltracija stanica. Promatrajući grupu karcinoma sa *PIK3CA* mutacijama i bez prisutnosti metastaza ili recidiva u ovom radu je pronađen veći broj pozitivnih PD-L1 tumora u odnosu na one bez mutacija gena ali bez statističke značajnosti (Tablica 10). Zanimljiv rezultat ovog istraživanja je odnos CD4 razine infiltracije karcinoma i DSS-a ili DFS-a tj visoka CD4 infiltracija u pacijentica bez obzira na mutacijski status *PIK3CA* gena (i kod mutiranih kao i kod onih s mutacijom) je pokazivala bolje rezultate petogodišnjeg preživljenja od karcinoma i povoljniju prognozu.

U ovom radu nije zabilježen utjecaj na petogodišnje DFS, kada se promatrala povezanost razine infiltracije tumora sa CD8 stanicama. Prema radu Yui Pen Sun i sur, povećana razina CD8 stanica u tumoru ima bolji utjecaj na DFS i ukupno preživljenje, ali s druge strane utječe na promjene u hormonskoj ekspresiji. Prema navedenoj studiji povećana razina CD8 stanica je bila povoljan prognostički čimbenik [164].

Nameće se pitanje zašto infiltracija jednom vrstom stanica ima utjecaj, a drugom vrstom nema, odnosno nije povezana sa boljim petogodišnjim preživljenjem kod karcinoma dojke. Rezultati ovog rada i opažanja o različitoj ulozi CD4 i CD8 u odnosu na petogodišnje preživljenje može govoriti o različitim funkcijama tih stanica obzirom na mutacijski status *PIK3CA* gena u HR+/HER2- podtipu karcinoma dojke. Njihov međusobni odnos i složena građa tumorskog mikrookoliša može na različite načine utjecati na moguću pojavnosti recidiva a time i na ukupno preživljenje.

Infiltracija imunološkim stanicama karcinoma dojke može biti povezana sa poboljšanim preživljenjem prema nekim radovima, dok određeni radovi ne dovode u vezu vrstu infiltracije imunoloških stanica i utjecaj na prognozu. Pojedini radovi pak govore čak i o lošijoj prognozi kod

karcinoma dojke u slučaju veće razine infiltracije imunološkim stanicama, neovisno o vrsti stanica odnosno kada se promatra ukupan broj svih stanica [165,166]. Prema radu Sun, S. i sur., u bivarijatnoj analizi, kod više razine infiltracije imunološkom stanicama karcinomi dojke su bili udruženi sa znatno kraćim preživljenjem [167]. Prema pojedinim radovima CD8 stanična infiltracija u tumorskim stanicama kod HR+/HER2- podtipa može biti u korelaciji sa boljim DFS i ukupnim preživljenjem [168-172]

Također, čak i položaj infiltracije CD8 limfocitima unutar samog tumora može prema nekim radovima utjecati na prognozu bolesti. U slučaju karcinoma koji imaju višu razinu infiltracije imunim stanicama unutar same tumorske (intratumoralni) mase, čini se da je njihov učinak manji u eliminaciji tumora nego u slučaju limfocita koji su smješteni dalje od tumora odnosno u stromi. Ovo opažanje se opisuje u radu Catacchio I i sur., gdje intratumoralna infiltracija sa CD8 limfocitima može biti povezana sa lošijom prognozom, za razliku od tumora sa višom infiltracijom CD8 stanica u stromi tumora koji su imali bolju prognozu [173]. Nije jasan mehanizam na koji su način stromalni limfociti efikasniji u tumorskoj eliminaciji.

U ovom istraživanju smo našli da je viša razina CD8 infiltracije bila statistički značajno povezana sa boljim DSS preživljenjem kod pacijentica bez mutacije *PIK3CA* gena ($p=0.024$). Kod pacijentica koje su imale mutirani *PIK3CA* gen nije se našao statistički značajan rezultat kod infiltracije CD8 limfocitima i DSS-a. No kada se uzme u obzir utjecaja infiltracije CD4 stanicama na DSS, kod pacijentica koje su imale i bile bez mutacije *PIK3CA* gena viša infiltracija je u oba slučaja bila udružena sa boljom prognozom. Ovakva opažanja o povezanosti više infiltracije CD4 limfocitima i bolje prognoze se nalaze i u literaturi, i više su bazirana na TNBC budući da je ta vrsta tumora bila smatrana za više imunogeni tumor i istraživanja su bila usmjeravana upravo prema tom tipu karcinoma dojke. Radovi koji uzimaju u obzir HR+/HER2- podgrupu karcinoma tumora govore i o nepovoljnom učinku više infiltracije CD4 obzirom na prognozu. Vrlo je malo relevantnih radova da se može do kraja rasvijetliti utjecaj ovih stanica na biološko ponašanje tumora, a poglavito do danas nije istražen utjecaj *PIK3CA* mutacije u HR+/HER2- grupi karcinoma u odnosu sa staničnu infiltraciju [174-177].

Tumorski mikrookoliš kao dinamička i promjenjiva struktura je veoma podložan utjecaju signalnih molekula koje produciraju tumorske stanice. Signalnim mehanizmima dolazi do aktivacije i nakupljanja monocita i inducira se njihova polarizacija u tumor-udružene makrofage (engl. *tumor associated macrophages*) tj. M2 makrofage. Tim mehanizmima dolazi do poticanja proliferacije

tumorskih stanica, epitelno-mezenhimalne tranzicije i supresije CD8 stanica imunološkog sustava. Ovime tumorske stanice nastoje postići tzv. anti-tumorski efekt i time izbjegavaju imunološki odgovor domaćina. Na taj način dolazi do stvaranja rezistencije tumora na djelovanje imunoloških stanica. Tako nastali makrofazi M2 dobivaju ključnu ulogu u progresiji tumora. Unutar tumora M2 polarizirani makrofazi djeluju na angiogenezu, potiču limfangiogenezu tumorskih stanica, olakšavaju epitelno- mezenhimalnu tranziciju i nastanak metastaza [178,179].

Aktivirani makrofazi luče određene imunosupresivne citokine poput IL-10, zatim TGF- β , te pokazuju visok stupanj ekspresije arginaze-1 što dovodi do slabljenja imunološkog odgovora domaćina. Nastoji se djelovati na M2 makrofage, odnosno potaknuti njihovo reprogramiranje i zaustaviti time tumorsku progresiju.

Rezultati iz ovog istraživanja pokazali su da karcinomi dojke sa *PIK3CA* mutacijom i oni bez mutacije imaju različite odnose između PD-L1 izražaja i imunih stanica koje sačinjavaju tumorski mikrookoliš (Tablica 12).

Analizom dobivenih podataka u ovom radu nađeno je da karcinomi bez *PIK3CA* mutacije imaju negativnu korelaciju PD-L1 izražaja i infiltracije sa CD163 makrofazima. Obrnuto, kod tumora koji su imali mutiran *PIK3CA* gen, ta korelacija sa CD163 makrofazima i PD-L1 izražajem je statistički značajna. CD163 je marker M2 polariziranih makrofaga koji imaju pro-tumorski efekt. Kada se promatra DFS kao varijabla u ovoj studiji, pacijentice sa *PIK3CA* mutacijom gena i višom infiltracijom CD163 ne pokazuju znakove recidiva tumorskog oboljenja (rezultat testiranja je na razini statističke značajnosti (Tablica 14). Ovo opažanje je u suprotnosti sa do sada poznatim rezultatima raznih studija. Imunosupresivna obilježja makrofaga koji infiltriraju tumorske stanice su ovisna o djelovanju PI3K signalnog puta i o njegovoj regulaciji. PI3K signalni put ima središnju ulogu koji putem svog efektoru *AKT*, potiče diferencijaciju makrofaga prema M2 fenotipu koji imaju obilježja imunosupresivnog djelovanja; poticanjem tumorogeneze, nastanka metastaza i stvaranja rezistencije tumora na obrambena mehanizme domaćina [180].

Mehanizmi imunosupresije kod aktiviranih M2 makrofaga u tumorima dovode do lučenja cijelog niza medijatora poput CXCL1, koji se mogu vezati na CXCR2 na stanicama karcinoma dojke i aktivirati PI3K/Akt/NF- κ B put. Taj mehanizam dovodi do pojačanog PD-L1 izražaja što je detaljnije istraženo kod TNB podtipa karcinoma dojke [181,182]. Opažanje vezano za lošiju prognozu i DFS obzirom na infiltraciju sa CD163 u solidnim tumorima se nalazi u radu Alvaro

Lopez-Janeiro i sur., a opažena povezanost navedenih parametara je nađena kod epiteloidnih tumora te melanoma [183].

Lokalizacija odnosno smještaj CD163 makrofaga unutar samog tumora i odnos prema tumorskim stanicama i stromi može imati utjecaj na prognozu kod određenih solidnih tumora [184]. CD163 stanice koje su bile u bliskoj vezi sa tumorskim stanicama su prema radu Lindberg I i sur. bili udruženi sa lošijim prognostičkim čimbenicima [185].

To se odnosilo na veći gradus i agresivniji tip tumora te kraće preživljenje, a dodatnim statističkim analizama u radu je nađena poveznica lošije prognoze kod metastatskog karcinoma dojke i veće razine CD163 izražaja. Slični rezultati se pronadjeni u radovima kada je povećano nakupljanje bilo u stromi tumora. Utjecaj razine infiltracije CD163 stanica na prognozu oboljenja koje su smještene u stromi tumora je povezano sa lošijom prognozom bolesti. Povećana razina infiltracije CD 68 ili CD163 prema Yang M i sur. je povezana sa većim histološkim gradusom tumora , veličinom, i lošijim petogodišnjim preživljenjem [186]. Kod karcinoma debelog crijeva. visoka infiltracija je bila udružena sa lošijom ukupnim preživljenjem i OS [187,188].

Potrebne su dodatne studije da se do kraja rasvijetliti utjecaj i položaj imunoloških stanica te razina infiltracije na prognozu karcinoma dojke osobito kod podtipa HR+/HER2- jer su rezultati studija kontradiktorni i oskudni.

Ova opažanja potvrđuju koliko je karcinom dojke heterogena bolest i da mnogi čimbenici udruženi djeluju na i određuju prognozu. Za razliku od drugih istraživanja, viša razina CD163 infiltracije kod *PIK3CA* mutiranih tumora je u ovom istraživanju bila iznenađujuće povezana sa boljim DFS ($p=0.077$). Slična opažanja su nađena u radu Omilian AR i sur., gdje je povećana razina infiltracije CD163 stanicama imala povoljan utjecaj na preživljenje ali se odnosila na TNBC karcinome dojke [189]. Makrofazi u karcinomu dojke imaju vrlo heterogenu i funkcionalnu različitost, pokazuju isprepletena svojstva i možda ponekad niti M1 ni M2 ne spadaju jasno u svoje kategorije. Tumorske stanice svojim signalnim putevima mogu mijenjati ekspresije gena povezanih s M1 i M2 fenotipom što može mijenjati omjere samih M1/M2 stanica [190]. Ovo može ukazivati da je M1/M2 klasifikacija možda pojednostavljena kod karcinoma dojke i da su potrebna dodatna istraživanja da se preciznije interpretira njihov međuodnos na prognozu oboljenja i ukupno preživljenje od karcinoma dojke. M1 linija makrofaga prilikom aktivacije postaje proupalna, a te stanice imaju antitumorski učinak, proizvodnjom citokina poput TNF- α i dušično-oksidne sintetaze, što dovodi do smrti tumorskih stanica i pojačanja imunološkog odgovora domaćina u

samoj obrani od tumora. S vremenskim odmakom stanice tumora mogu promijeniti odgovor na djelovanje M1 makrofaga, postati putem aktivacije JAK-STAT3 puta izdržljivije. Ovo opažanje se osobito odnosi na stanice tumora koje su preživjele djelovanje M1 makrofaga koji djeluju prvenstveno antitumorski.

Prema radu Caronni N i sur., gdje je učinjeno RNA skevencioniranje nukleinske kiseline jedne stanice (engl. *single cell RNA sequencing*) u uzorku tkiva dukalnog adenokarcinoma gušterače, nađeno je da IL-1 β + tumorski makrofazi imaju istovremenu ekspresiju i pro-upalnih (MHCII, CD80, CD68) i pro-tumorskih markera (CD206, arg-1, PD-1) [191]. U tom radu je pronađena povezanost između tumorskih stanica i makrofaga koji infiltriraju sami tumor i luče IL-1 β , te podskupine makrofaga izazvane lokalnom sinergijom između prostaglandina E2 i čimbenika nekroze tumora. Ovim putem, pomoću IL-1 β kao signalne molekule, dolazi do mijenjanja osobina makrofaga, reprogramiranja i pojačane tumorogeneze. Time se primjerice može objasniti brzo napredovanje bolesti kod tumora gušterače i agresivna priroda bolesti. Blokada IL-1 β , te stvaranja prostaglandina E2 može zaustaviti ovaj proces reprogramiranja i zaustaviti mehanizam tumorogeneze. Moguće je da *PIK3CA* mutacije gena u HR+/HER2- karcinomu dojke mogu imati utjecaj i inducirati različite funkcije imunoloških stanica. To utječe na prognostički rezultat koji može biti suprotan od dosad uvriježenih zaključaka o anti tumorskom učinku M2 makrofaga. Promjene u *PIK3CA* mutacijskom statusu mogu utjecati na promjenu u PI3K signalnom putu koji potom dovodi do polarizacije M2 makrofaga i do promjena tumorogenog efekta.

Pošto rezultati ovog istraživanja govore da *PIK3CA* mutacije mogu imati utjecaj i na bolju prognozu tumora u ovisnosti o višoj infiltraciji M2 stanicama, potrebna su dodatna daljnja istraživanja koja će možda rasvijetliti kojim točno mehanizmom *PIK3CA* mutacija može dovesti do povoljnijeg ishoda bolesti, odnosno kako njihova uloga može imati utjecaj na bolju i lošiju prognozu tumora dojke. Potreba za dodatnim analizama imunološkog sastava tumorskog mikrookoliša i *PIK3CA* mutacijskog statusa može staviti karcinom dojke u fokus imunološkog liječenja, pogotovo podtip HR+/HER2- budući da imunoterapija nije bila do danas metoda liječenja u ovoj podgrupi karcinoma dojke.

Danas se nastoji selektivnim inhibitorima PI3K puta kod pacijentica sa uznapredovalim stadijem ili metastatskim karcinomom, kod HR+/HER2- podtipa, zaustaviti napredovanje bolesti. Lijekovi koji djeluju na regulaciju M2 makrofaga još uvijek nisu odobreni za upotrebu, usprkos obećavajućim rezultatima.

Primarno ograničenje ovog istraživanja je retrospektivni karakter studije i posljedično tome heterogenost terapijskih postupaka liječenih pacijentica iako bi ona trebala biti relativno mala budući da su sve one liječene u istom centru prema nacionalnim smjernicama. Ostala ograničenja ovog istraživanja su da je korišten alel-specifični PCR kit za analizu *PIK3CA* mutacija koji detektira samo genetske promjene na najučestaliji lokalizacijama u samom *PIK3CA* genu no one ionako imaju najvažniji klinički značaj. Korišteni su tkivnih mikročipovi (TMA) za imunohistokemijske analize, no upotrebom tri do četiri tkivna cilindra promjera od 1 mm te serijskim narezivanjem istih TMA cilindra trebao bi se umanjiti navedeni nedostatak te dobiti na heterogenosti tumorskog tkiva.

Pregledom trenutno dostupne literature gotovo da ne postoje radovi koji uspoređuju PD-L1 izražaj sa *PIK3CA* mutacijom kod HR+/HER2- karcinoma dojke. Povezanost utjecaja na promjene u tumorskom mikrookolišu *PIK3CA* mutacije i PD-L1 izražaja kod HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke do danas nije u potpunosti jasan, niti postoje radovi koji ispituju taj složeni odnos. Rezultati ovog istraživanja mogli bi imati utjecaj u boljem probiru pacijentica sa HR+/HER2- karcinomima dojke koje bi možda imale koristi od uvođenja imunološke terapije, a koja je do sada uglavnom bila indicirana za TNBC podtip. *PIK3CA* mutacije gena imaju prognostički značaj te je potrebno učiniti dodatna istraživanja da se do kraja razjasni međusobni odnos *PIK3CA* mutacije, promjena u tumorskom mikrookolišu, funkcionalnom statusu stanica mikrookoliša kao i njihov utjecaj na prognozu bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Predmet ovog rada je bio utvrditi u podgrupi karcinom dojke HR+/HER, *PIK3CA* mutacijski status, PD-L1 izražaj i sastav tumorskog mikrookoliša ovisno o *PIK3CA* mutaciji te njihov utjecaj na prognozu bolesti. Općenito je karcinom dojke za razliku od drugih solidnih tumora bio svrstavan u grupu manje imunogenih tumora i istraživanja u tom smislu su bila uglavnom usmjerena na TNBC podtip karcinoma dojke koji je od svih podtipova pokazivao najviši stupanj imunogenosti.

Uzevši u obzir rezultate ovog istraživanja mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Kod HR+/HER2- podtipa karcinoma dojke je pronađeno 43% tumora koji su imali mutaciju *PIK3CA* gena što je u skladu sa ostalim relevantnim studijama. PD-L1 izražaj je bio oko 10% (točnije 9.3%) i kod karcinoma dojke sa *PIK3CA* mutacijom bio je češće pozitivan, nego kod onih karcinoma koji nisu imali *PIK3CA* mutaciju, no navedeno nije bilo statistički značajno.
2. Nađen je statistički značajan veći udio PD-L1 pozitivnih karcinoma dojke kod *PIK3CA* mutiranih tumora i to osobito ako je mutacija bila u eksonu 20.
3. Mutacije *PIK3CA* gena su statistički značajno bile češće povezane sa nižim Ki-67 proliferacijskim indeksom te dobro i srednje diferenciranim tumorima.
4. Sastav stanica mikrookoliša (CD4, CD8, CD68, CD163) se nije statistički značajno razlikovao između HR+/HER2- karcinoma dojke koji su imali ili bili bez *PIK3CA* mutacije gena, odnosno mutacija *PIK3CA* gena nije imala utjecaj na sastav i količinu infiltracije karcinoma ispitivanim stanicama.
5. U skupini luminal A i luminal B karcinoma dojke nije nađena statistički značajna razlika u sastavu stanica mikrookoliša (CD4, CD8, CD68, CD163) kod tumora sa ili bez *PIK3CA* mutacije gena.

6. HR+/HER2- karcinomi sa višom infiltracijom CD4 limfocitima i pozitivnim PD-L1 imali su manju tendenciju razvoju recidiva i metastaza (rezultat je bio na nivou statističkog trenda).
7. Kod HR+/HER2- karcinoma dojke koji nisu imali mutaciju *PIK3CA* gena, PD-L1 izražaj je statistički značajno negativno korelirao sa razinom infiltracije CD163 stanicama, a kod *PIK3CA* mutiranih karcinomi bilo je obrnuto, PD-L1 izražaj je imao statistički značajnu pozitivnu korelaciju s infiltracijom CD163 stanicama.
8. Kod HR+/HER2- karcinoma dojke sa višom infiltracijom CD4 stanicama našao se statistički značajno bolji DSS i bolji DFS kod tumora sa i bez mutacije *PIK3CA* gena.
9. Statistički značajno bolji DSS su imale su pacijentice čiji karcinomi nisu imali *PIK3CA* mutaciju ali su imali višu razinu infiltracije CD8 stanicama.
10. Viša razina infiltracije CD8 stanicama kod karcinoma bez mutacije *PIK3CA* gena nije bila statistički značajna na petogodišnje preživljenje bez povrata bolesti (DFS).
11. Nađen je statistički značajno duži DFS kod HR+/HER2- karcinoma koji su imali *PIK3CA* mutaciju i bili pozitivni na PD-L1.
12. DFS je bio statistički značajno duži kod HR+/HER2- karcinoma koji su imali *PIK3CA* mutaciju u eksonu 20 i bili pozitivni na PD-L1.

7. LITERATURA

1. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(S3):43-6.
2. De Angelis R, Demuru E, Baili P i sur. EUROCORE-6 Working Group. Complete cancer prevalence in Europe in 2020 by disease duration and country (EUROCORE-6): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2024 Mar;25(3):293-307.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Rano otkrivanje raka dojke. Available from: <https://www.hzjz.hr/nacionalni-programi/ranootkrivanje-raka-dojke/>. [cited 2025 August 6]. Google Scholar.
5. Dimitrova N, Znaor A, Agius D i sur. SEE+ Working Group. Breast cancer in South-Eastern European countries since 2000: Rising incidence and decreasing mortality at young and middle ages. *Eur J Cancer*. 2017 Sep;83:43-55.
6. Kim J, Harper A, McCormack V i sur. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. *Nat Med*. 2025 Apr;31(4):1154-1162.
7. Znaor A, Brenner H, Hollecsek B, Gondos A. Has there been progress in cancer care in Croatia? Assessing outcomes in a partially complete mortality follow-up setting. *Eur J Cancer*. 2012 Apr;48(6):921-8.
8. Sharma R. Breast cancer incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio (MIR) are associated with human development, 1990-2016: evidence from Global Burden of Disease Study 2016. *Breast Cancer*. 2019 Jul;26(4):428-445.
9. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I i sur. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021 Apr 5.
10. Luo C, Li N, Lu B i sur. Global and regional trends in incidence and mortality of female breast cancer and associated factors at national level in 2000 to 2019. *Chin Med J (Engl)*. 2022 Jan 5;135(1):42-51.
11. Folkard E, Dowsett M. Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *Breast*. 2013 Aug;22 Suppl 2:S38-43.

12. Valencia OM, Samuel SE, Viscusi RK, Riall TS, Neumayer LA, Aziz H. The Role of Genetic Testing in Patients With Breast Cancer: A Review. *JAMA Surg.* 2017 Jun 1;152(6):589-594.
13. Manahan ER, Kuerer HM, Sebastian M i sur. Consensus Guidelines on Genetic` Testing for Hereditary Breast Cancer from the American Society of Breast Surgeons. *Ann Surg Oncol.* 2019 Oct;26(10):3025-3031.
14. Dorling L, Carvalho S i sur. Breast Cancer Risk Genes - Association Analysis in More than 113,000 Women. *N Engl J Med.* 2021;384(5):428-439.
15. Ng J, Shuryak I. Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives. *Cancer Manag Res.* 2014 Dec 17;7:1-11.
16. Li H, Terry MB, Antoniou AC i sur. Alcohol Consumption, Cigarette Smoking, and Risk of Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers: Results from The BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020;29(2):368-378.
17. Arriaga ME, Vajdic CM, Canfell K i sur. The preventable burden of breast cancers for premenopausal and postmenopausal women in Australia: A pooled cohort study. *Int J Cancer.* 2019;145(9):2383-2394.
18. Magny SJ, Shikhman R, Keppke AL. Breast Imaging Reporting and Data System. 2023 Aug 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 29083600.
19. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB i sur. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(4):290-303.
20. Nasrazadani A, Thomas RA, Oesterreich S, Lee AV. Precision Medicine in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Front Oncol.* 2018 May 4;8:144.
21. Mais DD, Nazarullah AN, Guidi AJ i sur. Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Expression Rates in Invasive Breast Carcinoma: A Study of 21 Institutions. *Arch Pathol Lab Med.* 2025;149(1):8-13.
22. Li, Z., Wei, H., Li, S., Wu, P., & Mao, X. (2022). The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug design, development and therapy*, 16, 305–314.
23. Sareyeldin RM, Gupta I, Al-Hashimi I i sur. Gene Expression and miRNAs Profiling: Function and Regulation in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(5):646. Published 2019 May 10.

24. Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol.* 2012;2012:428062.
25. Shah,S.,& Chen, B. Testing for HER2 in Breast Cancer : A Continuinug Evolution. *Pathology research international*, 2011, 903202.
26. Davey, M. G., Hynes, S. O., Kerin, M. J., Miller, N., & Lowery, A. J. (2021). Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. *Cancers*, 13(17), 4455.
27. Cho U, Kim HE, Oh WJ, Yeo MK, Song BJ, Lee A. The Long-term Prognostic Performance of Ki-67 in Primary Operable Breast Cancer and Evaluation of Its Optimal Cutoff Value. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(3):159-166.
28. Pal, M., Das, D., & Pandey, M. (2024). Understanding genetic variations associated with familial breast cancer. *World journal of surgical oncology*, 22(1), 271.
29. Liu, C., Sun, L., Niu, N i sur. Molecular classification of hormone receptor-positive /HER2-positive breast cancer reveals potential neoadjuvant therapeutic strategies. *Signal transduction and targeted therapy*, 10(1), 97.
30. Pham, T. T., Angus, S. P., & Johnson, G. L. (2013). MAP3K1: Genomic Alterations in Cancer and Function in Promoting Cell Survival or Apoptosis. *Genes & cancer*, 4(11-12), 419–426.
31. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009 Aug;9(8):537-49.
32. Wei, S., Li, Y., Zhou, J., & Xia, Y. (2025). Exploring MAP3K genes in gastric cancer: biomarkers, tumor microenvironment dynamics, and chemotherapy resistance. *Hereditas*, 162(1), 15.
33. Silwal-Pandit L, Vollan HK, Chin SF i sur. TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clin Cancer Res.* 2014;20(13):3569-3580.
34. Darb-Esfahani S, Denkert C, Stenzinger A i sur. Role of TP53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Oncotarget.* 2016;7(42):67686-67698.
35. Lin XY, Guo L, Lin X, Wang Y, Zhang G. Concomitant *PIK3CA* and *TP53* Mutations in Breast Cancer: An Analysis of Clinicopathologic and Mutational Features, Neoadjuvant Therapeutic Response, and Prognosis. *J Breast Cancer.* 2023;26(4):363-377.

36. Dibra D, Moyer SM, El-Naggar AK, Qi Y, Su X, Lozano G. Triple-negative breast tumors are dependent on mutant p53 for growth and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(34):e2308807120.
37. Cossu-Rocca P, Orrù S, Muroi MR i sur. Analysis of PIK3CA Mutations and Activation Pathways in Triple Negative Breast Cancer. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141763. Published 2015 Nov 5.
38. Li H, Prever L, Hirsch E, Gulluni F. Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 14;13(14):3517.
39. Han B, Lin X, Hu H. Regulation of PI3K signaling in cancer metabolism and PI3K-targeting therapy. *Transl Breast Cancer Res*. 2024 Oct 29;5:33.
40. Mollon LE, Anderson EJ, Dean JL, i sur.. A Systematic Literature Review of the Prognostic and Predictive Value of PIK3CA Mutations in HR⁺/HER2⁻ Metastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2020;20(3):e232-e243.
41. Mollon LE, Anderson EJ, Dean JL i sur. A Systematic Literature Review of the Prognostic and Predictive Value of PIK3CA Mutations in HR⁺/HER2⁻ Metastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2020;20(3):e232-e243.
42. Bachman KE, Argani P, Samuels Y i sur. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(8):772-775.
43. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011;13(6):224.
44. Rosin J, Svegrup E, Valachis A, Zerdes I. Discordance of PIK3CA mutational status between primary and metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2023;201(2):161-169.
45. Dirican, E., Akkiprik, M. & Özer, A. Mutation distributions and clinical correlations of PIK3CA gene mutations in breast cancer. *Tumor Biol*. 37, 7033–7045 (2016).
46. Zardavas D, Phillips WA, Loi S. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data. *Breast Cancer Res*. 2014;16(1):201. Published 2014 Jan 23.
47. Wilson, T. R., Yu J., Lu, X i sur. The molecular landscape of high-risk early breast cancer: comprehensive biomarker analysis of a phase III adjuvant population. *NPJ breast cancer*, 2, 16022.

48. Leontiadou H, Galdadas I, Athanasiou C, Cournia Z. Insights into the mechanism of the PIK3CA E545K activating mutation using MD simulations. *Sci Rep*. 2018;8(1):15544. Published 2018 Oct 19.
49. Liu YR, Jiang YZ, Zuo WJ, Yu KD, Shao ZM. PIK3CA mutations define favorable prognostic biomarkers in operable breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2014;7:543-552. Published 2014 Apr 10.
50. André F, Ciruelos E, Rubovszky G i sur. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(20):1929-1940.
51. Bello Roufai D, Gonçalves A, De La Motte Rouge T i sur. Alpelisib and fulvestrant in PIK3CA-mutated hormone receptor-positive HER2-negative advanced breast cancer included in the French early access program. *Oncogene*. 2023;42(23):1951-1956.
52. 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*. 2021;32(2):208-217.
53. Beelen K, Opdam M, Severson TM i sur.l. PIK3CA mutations, phosphatase and tensin homolog, human epidermal growth factor receptor 2, and insulin-like growth factor 1 receptor and adjuvant tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2014;16(1):R13. Published 2014 Jan 27.
54. Ebi H, Costa C, Faber AC, i sur. PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(52):21124-21129.
55. Mangone FR, Bobrovitchaia IG, Salaorni S, Manuli E, Nagai MA. PIK3CA exon 20 mutations are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(11):1285-1290.
56. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L i sur. Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2007;13(20):6064-6069.
57. Jank P, Karn T, van Mackelenbergh M i sur. An Analysis of PIK3CA Hotspot Mutations and Response to Neoadjuvant Therapy in Patients with Breast Cancer from Four Prospective Clinical Trials. *Clin Cancer Res*. 2024;30(17):3868-3880.

58. Leenhardt F, Alexandre M, Jacot W. Alpelisib for the treatment of *PIK3CA*-mutated, hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2021;22(6):667-675.
59. Konstantinova D, Kaneva R, Dimitrov R i sur. Rare mutations in the *PIK3CA* gene contribute to aggressive endometrial cancer. *DNA Cell Biol*. 2010;29(2):65-70.
60. Santen RJ, Song RX, McPherson R i sur. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002;80(2):239-256.
61. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C i sur. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*. 2012 Jun 21;486(7403):405-409.
62. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2652-7.
63. Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2002;8(6):1747-1753.
64. Yang M, Huang CZ. Mitogen-activated protein kinase signaling pathway and invasion and metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2015;21(41):11673-11679.
65. Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(11):a011254. Published 2012 Nov 1.
66. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298(5600):1911-1912.
67. Jiang W, Wang X, Zhang C, Xue L, Yang L. Expression and clinical significance of MAPK and EGFR in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett*. 2020 Mar;19(3):1842-1848.
68. Smith, A.E., Ferraro, E., Safonov, A. i sur HER2 + breast cancers evade anti-HER2 therapy via a switch in driver pathway. *Nat Commun* **12**, 6667 (2021)
69. Clusan L, Ferrière F, Flouriot G, Pakdel F. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6834. Published 2023 Apr 6.
70. Zhang Z, Richmond A, Yan C. Immunomodulatory Properties of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/MEK/ERK Inhibition Augment Response to Immune Checkpoint Blockade in Melanoma and Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 1;23(13):7353.

71. Ahn AR, Kim KM, Jang KY i sur. Correlation of *PIK3CA* mutation with programmed death ligand-1 (PD-L1) expression and their clinicopathological significance in colorectal cancer. *Ann Transl Med.* 2021;9(18):1406.
72. Ugai T, Zhao M, Shimizu T i sur. Association of *PIK3CA* mutation and PTEN loss with expression of CD274 (PD-L1) in colorectal carcinoma. *Oncoimmunology.* 2021;10(1):1956173. Published 2021 Aug 2.
73. Chew V, Toh HC, Abastado JP. Immune microenvironment in tumor progression: characteristics and challenges for therapy. *J Oncol.* 2012;2012:608406.
74. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020 Mar 1;10(3):727-742.
75. Beenen AC, Sauerer T, Schaft N, Dörrie J. Beyond Cancer: Regulation and Function of PD-L1 in Health and Immune-Related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 2;23(15):8599.
76. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH i sur. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* 2017 May 9;19(6):1189-1201.
77. Liu S, Chen S, Yuan W i sur. PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Oncotarget.* 2017;8(59):99901-99912. Published 2017 Oct 20.
78. Núñez Abad M, Calabuig-Fariñas S, Lobo de Mena M. i sur. Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) as Immunotherapy Biomarker in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(2):307. Published 2022 Jan 8.
79. Stanowska O, Kuczkiewicz-Siemion O, Dębowska M i sur.. PD-L1-Positive High-Grade Triple-Negative Breast Cancer Patients Respond Better to Standard Neoadjuvant Treatment- A Retrospective Study of PD-L1 Expression in Relation to Different Clinicopathological Parameters. *J Clin Med.* 2022;11(19):5524. Published 2022 Sep 21.
80. Rozenblit M, Huang R, Danziger N. i sur. Comparison of PD-L1 protein expression between primary tumors and metastatic lesions in triple negative breast cancers. *J Immunother Cancer.* 2020;8(2):e001558.

81. Kurozumi S, Fujii T, Matsumoto H i sur. Significance of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression in breast cancer. *Med Mol Morphol*. 2017;50(4):185-194.
82. Karnik T, Kimler BF, Fan F, Tawfik O. PD-L1 in breast cancer: comparative analysis of 3 different antibodies. *Hum Pathol*. 2018;72:28-34.
83. Jin M, Fang J, Peng J i sur. PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade in breast cancer: research insights and sensitization strategies. *Mol Cancer*. 2024;23(1):266. Published 2024 Nov 29.
84. Abdou, Y., Goudarzi, A., Yu, J.X. i sur. Immunotherapy in triple negative breast cancer: beyond checkpoint inhibitors. *npj Breast Cancer* **8**, 121 (2022).
85. Yanping Li, Jing Ma, Xiaoxi Ma, Chen Chen, Miao Ruan, Wentao Yang, Ruohong Shui, PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes: Correlations and prognostic values in Chinese triple-negative breast cancer patients with different molecular subtyping, *Pathology - Research and Practice*, Volume 262, 2024
86. Mori H, Kubo M, Yamaguchi R i sur. The combination of PD-L1 expression and decreased tumor-infiltrating lymphocytes is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Feb 28;8(9):15584-15592.
87. Rezasoltani S, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, Reza Zali M. Modulatory effects of gut microbiome in cancer immunotherapy: A novel paradigm for blockade of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Med*. 2021;10(3):1141-1154.
88. Watanabe S, Kikuchi T. Does the gut microbiota play a key role in PD-1/PD-L1 blockade therapy?. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(3):438-440.
89. Inamura K. Roles of microbiota in response to cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol*. 2020 Oct;65:164-175.
90. Matson V, Fessler J, Bao R i sur. al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018;359(6371):104-108.
91. Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM i sur. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2016;47(1):52-63.

92. Bates GJ, Fox SB, Han C i sur. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 1;24(34):5373-80.
93. Kraja FP, Jurisic VB, Hromić-Jahjefendić A i sur. Tumor-infiltrating lymphocytes in cancer immunotherapy: from chemotactic recruitment to translational modeling. *Front Immunol*. 2025 May 22;16:1601773.
94. Criscitiello, C., Vingiani, A., Maisonneuve i sur. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2– breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **183**, 347–354 (2020).
95. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2016;4:59. Published 2016 Oct 18.
96. 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. Published 2023 Jan 26.
97. Kurozumi S, Fujii T, Matsumoto H i sur. Significance of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression in breast cancer. *Med Mol Morphol*. 2017;50(4):185-194.
98. Kurozumi S, Matsumoto H, Kurosumi M i sur. Prognostic significance of tumour-infiltrating lymphocytes for oestrogen receptor-negative breast cancer without lymph node metastasis. *Oncol Lett*. 2019 Mar;17(3):2647-2656.
99. Zhang Q, Hao C, Cheng G i sur. High CD4⁺ T cell density is associated with poor prognosis in patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11510-11516. Published 2015 Sep 1.
100. Huang Y, Ma C, Zhang Q i sur. CD4⁺ and CD8⁺ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015 Jul 10;6(19):17462-78.
101. Sobral-Leite M, Salomon I, Opdam M i sur. Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res*. 2019 Aug 7;21(1):90
102. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016 Aug 12;9:5023-39.

103. Shin SJ, Jeon YK, Cho YM i sur. The Association Between PD-L1 Expression and the Clinical Outcomes to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy in Patients With Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Oncologist*. 2015;20(11):1253-1260.
104. Llano-León M, Martínez-Enriquez LC, Rodríguez-Bohórquez OM i sur. Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor immune infiltration in breast cancer patients: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2023 Apr 27;18(4):e0277714.
105. 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 Dec;107(12):1730-1735.
106. Cai X, Chen Y, Li Q i sur. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in Luminal breast cancer: A novel computational method for assessing TILs abundance and spatial distribution patterns. *Breast*. 2025 Dec;84:104634.
107. Salgado R., Denkert C., Demaria S i sur. The Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol*. 2015;26:259–271.
108. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M i sur. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2020 Apr 20;38(12):1346-1366.
109. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH i sur. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2018, Jul 10;36(20):2105-2122.
110. Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C i sur. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Mod Pathol*. 2005;18(8):1067-1078.
111. Teichgraeber DC, Guirguis MS, Whitman GJ. Breast Cancer Staging: Updates in the *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th Edition, and Current Challenges for Radiologists, From the *AJR Special Series on Cancer Staging*. *AJR Am J Roentgenol*. 2021;217(2):278-290.
112. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*. 2014;1180:31-43.

113. Ludyga N, Grünwald B, Azimzadeh O i sur. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch.* 2012;460(2):131-140.
114. Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp.* 2011 Mar 26;(49):2763.
115. Cooper CS. Applications of microarray technology in breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2001;3(3):158-75.
116. Grant GM, Fortney A, Gorreta F i sur. Microarrays in cancer research. *Anticancer Res.* 2004 Mar-Apr;24(2A):441-8.
117. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A i sur. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):844-7.
118. Harris AL. Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer.* 2005 Aug 22;93(4):385-6.
119. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM; Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer.* 2005 Aug 22;93(4):387-91.
120. Tan BK, Tan LK, Yu K i sur. Clinical validation of a customized multiple signature microarray for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 15;14(2):461-9.
121. Parker RL, Huntsman DG, Lesack DW i sur. Assessment of interlaboratory variation in the immunohistochemical determination of estrogen receptor status using a breast cancer tissue microarray. *Am J Clin Pathol.* 2002 May;117(5):723-8.
122. Zhang D, Salto-Tellez M, Do E, Putti TC, Koay ES. Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays. *Hum Pathol.* 2003 Apr;34(4):362-8.
123. Bhargava, R., Lal, P., & Chen, B. (2004). Feasibility of using tissue microarrays for the assessment of HER-2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in breast carcinoma. *Diagnostic Molecular Pathology*, 13(4), 213-216.
124. Vennapusa B, Baker B, Kowanetz M i sur. Development of a PD-L1 Complementary Diagnostic Immunohistochemistry Assay (SP142) for Atezolizumab. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2019 Feb;27(2):92-100.

125. Peg V, López-García MÁ, Comerma L i sur. PD-L1 testing based on the SP142 antibody in metastatic triple-negative breast cancer: summary of an expert round-table discussion. *Future Oncol.* 2021 Apr;17(10):1209-1218.
126. De Jong J. J., Stoop H., Boormans, J i sur. PD-L1 expression in urothelial bladder cancer varies more among specimen types than between companion assays. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 479(4), 705–713.
127. Sigurjonsdottir, G., De Marchi, T., Ehinger, A i sur. Comparison of SP142 and 22C3 PD-L1 assays in a population-based cohort of triple-negative breast cancer patients in the context of their clinically established scoring algorithms. *Breast cancer research : BCR*, 25(1), 123.
128. Guo H, Ding Q, Gong Y i sur. Comparison of three scoring methods using the FDA-approved 22C3 immunohistochemistry assay to evaluate PD-L1 expression in breast cancer and their association with clinicopathologic factors. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):69. Published 2020 Jun 23.
129. Fabriek BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology.* 2005;210(2-4):153-60.
130. Sachdev R, Sundram U. Expression of CD163 in dermatofibroma, cellular fibrous histiocytoma, and dermatofibrosarcoma protuberans: comparison with CD68, CD34, and Factor XIIIa. *J Cutan Pathol.* 2006 May;33(5):353-60.
131. Ren X, Song Y, Pang J i sur. Prognostic value of various immune cells and Immunoscore in triple-negative breast cancer. *Front Immunol.* 2023;14:1137561. Published 2023 Apr 6.
132. Denkert, C., Wienert, S., Poterie, A i sur. Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group. *Mod Pathol* **29**, 1155–1164 (2016).
133. Schüler K, Bethmann D, Kaufhold S i sur. Prognostic Value of Tumour-Infiltrating Lymphocytes in an Unselected Cohort of Breast Cancer Patients. *Diagnostics (Basel).* 2022 Oct 18;12(10):2527.
134. Kolberg-Liedtke C, Gluz O, Heinisch F i sur. Association of TILs with clinical parameters, Recurrence Score® results, and prognosis in patients with early HER2-negative breast cancer (BC)-a translational analysis of the prospective WSG PlanB trial. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):47. Published 2020 May 14.

135. Thagaard J, Broeckx G, Page DB i sur. Pitfalls in machine learning-based assessment of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: A report of the International Immunology Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *J Pathol.* 2023;260(5):498-513.
136. Cizkova, M., Susini, A., Vacher, S i sur. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast cancer research : BCR*, 14(1), R28.
137. Terán E, Lozano R, Rodríguez CA i sur. PIK3CA mutational status in tissue and plasma as a prognostic biomarker in HR+/HER2- breast cancer. *Cancer Med.* 2024 Sep;13(17):e70101.
138. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L i sur. Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2007 Oct 15;13(20):6064-9.
139. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Nov 20;29(33):4452-61.
140. Anderson EJ, Mollon LE, Dean JL i sur. A Systematic Review of the Prevalence and Diagnostic Workup of PIK3CA Mutations in HR+/HER2- Metastatic Breast Cancer. *Int J Breast Cancer.* 2020;2020:3759179. Published 2020 Jun 20.
141. Dong C, Wu J, Chen Y, Nie J, Chen C. Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Front Pharmacol.* 2021 Mar 15;12:628690.
142. Fillbrunn M, Signorovitch J, André F i sur. PIK3CA mutation status, progression and survival in advanced HR + /HER2- breast cancer: a meta-analysis of published clinical trials. *BMC Cancer.* 2022;22(1):1002. Published 2022 Sep 21.
143. Mosele F, Stefanovska B, Lusque A i sur. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2020;31(3):377-386.
144. Nunnery, S. E., & Mayer, I. A. (2020). Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Hormone-Positive Breast Cancer. *Drugs*, 80(16), 1685–1697.
145. Verret B, Cortes J, Bachelot T, Andre F, Arnedos M. Efficacy of PI3K inhibitors in advanced breast cancer. *Ann Oncol.* 2019;30 Suppl 10:x12-x20.
146. 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.* 2024;25(12):e629-e638.

147. Chang DY, Ma WL, Lu YS. Role of Alpelisib in the Treatment of PIK3CA-Mutated Breast Cancer: Patient Selection and Clinical Perspectives. *Ther Clin Risk Manag.* 2021;17:193-207. Published 2021 Mar 5.
148. Rugo HS, Raskina K, Schrock AB i sur. Biology and Targetability of the Extended Spectrum of PIK3CA Mutations Detected in Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2023;29(6):1056-1067.
149. Ciruelos EM, Rugo HS, Mayer IA i sur. Patient-Reported Outcomes in Patients With *PIK3CA*-Mutated Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer From SOLAR-1. *J Clin Oncol.* 2021;39(18):2005-2015.
150. Reinhardt K, Stückerath K, Hartung C i sur. PIK3CA-mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2022;196(3):483-493.
151. Martínez-Sáez O, Chic N, Pascual T i sur. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):45. Published 2020 May 13.
152. Lv W, Du C, Zhang Y i sur. Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of PIK3CA mutation in breast cancer patients in Northwest China. *Pathol Res Pract.* 2022;238:154063.
153. Chu J, Huang L, Wang Y, Qian M. Clinicopathological and prognostic analysis of PIK3CA mutated invasive breast cancer in Chinese women. *Clinics (Sao Paulo).* 2025;80:100702. Published 2025 Jun 4.
154. Wang Y, Rozen V, Zhao Y, Wang Z. Oncogenic activation of *PIK3CA* in cancers: Emerging targeted therapies in precision oncology. *Genes Dis.* 2024 Sep 10;12(2):101430.
155. Liu, L., Niu, L., Zheng X. i sur. PD-L1 expression-related PI3K pathway correlates with immunotherapy efficacy in gastric cancer. *Therapeutic advances in medical oncology*, 15, 17588359231205853.
156. Liu, D., Yan, J., Ma, F., Wang, J., Yan, S., & He, W. Reinvigoration of cytotoxic T lymphocytes in microsatellite instability-high colon adenocarcinoma through lysosomal degradation of PD-L1. *Nature communications*, 15(1), 6922.

157. Jia M, Liao N, Chen B i sur. PIK3CA somatic alterations in invasive breast cancers: different spectrum from Caucasians to Chinese detected by next generation sequencing. *Breast Cancer*. 2021;28(3):644-652.
158. Park YL, Kim HP, Cho YW i sur. Activation of WNT/ β -catenin signaling results in resistance to a dual PI3K/mTOR inhibitor in colorectal cancer cells harboring PIK3CA mutations. *Int J Cancer*. 2019;144(2):389-401.
159. Mittendorf, E. A., Philips, A. V., Meric-Bernstam, F. i sur. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer immunology research*, 2(4), 361–370.
160. Núñez Abad, M., Calabuig-Fariñas, S., Lobo de Mena i sur. Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) as Immunotherapy Biomarker in Breast Cancer. *Cancers*, 14(2), 307.
161. Rodgers SJ, Mitchell CA, Ooms LM. The mechanisms of class 1A PI3K and Wnt/ β -catenin coupled signaling in breast cancer. *Biochem Soc Trans*. 2023;51(4):1459-1472.
162. Wang H, Ding XH, Liu CL i sur. Genomic alterations affecting tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression patterns in triple-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2023;115(12):1586-1596.
163. Badve, S. S., Penault-Llorca, F., Reis-Filho, J. S i sur. Determining PD-L1 Status in Patients With Triple-Negative Breast Cancer: Lessons Learned From IMpassion130. *Journal of the National Cancer Institute*, 114(5), 664–675.
164. Yeong J, Goh D, Tan TJ i sur. Early Triple-Negative Breast Cancers in a Singapore Cohort Exhibit High PIK3CA Mutation Rates Associated With Low PD-L1 Expression. *Mod Pathol*. 2023;36(4):100056.
165. Angelico, G., Broggi, G., Tinnirello, G i sur. Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILS) and PD-L1 Expression in Breast Cancer: A Review of Current Evidence and Prognostic Implications from Pathologist's Perspective. *Cancers*, 15(18), 4479.
166. Salimi M. Study Break: Future of Triple Negative Breast Cancer: Can Immunotherapy Treat This Deadly Subtype of Breast Cancer?. *Iranian biomedical journal*, 22(2), 76–77.
167. Wang, H., Tang, R., Jiang, L., & Jia, Y. (2024). The role of PIK3CA gene mutations in colorectal cancer and the selection of treatment strategies. *Frontiers in pharmacology*, 15, 1494802.

168. Davoodi-Moghaddam Z, Jafari-Raddani F, Delshad M, Pourbagheri-Sigaroodi A, Bashas D. Inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway in human malignancies; trend of current clinical trials. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149(16):15293-15310.
169. Pan YH, Zhang JX, Chen X i sur. Predictive Value of the *TP53/PIK3CA/ATM* Mutation Classifier for Patients With Bladder Cancer Responding to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Front Immunol*. 2021;12:643282. Published 2021 Aug 4.
170. Jiang W, Ouyang X, Li C i sur. Targeting PI3K α increases the efficacy of anti-PD-1 antibody in cervical cancer. *Immunology*. 2023 Nov;170(3):419-438.
171. Tung HJ, Wang CC, Liu FY, Lai CH. Complete remission of advanced and recurrent cervical cancer with pembrolizumab treatment- 3 case reports. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2021;60(5):938-941.
172. Dizon DS, Dias-Santagata D, Bregar A i sur. Complete Remission Following Pembrolizumab in a Woman with Mismatch Repair-Deficient Endometrial Cancer and a Germline *BRCAl* Mutation. *Oncologist*.2018;23(6):650-653.
173. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(8):2796-2801.
174. Sun YP, Ke YL, Li X. Prognostic value of CD8⁺ tumor-infiltrating T cells in patients with breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncol Lett*. 2022 Dec 8;25(1):39.
175. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S i sur. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018;19(1):40-50.
176. Otterlei Fjørtoft M, Huse K, Rye IH. The Tumor Immune Microenvironment in Breast Cancer Progression. *Acta Oncol*. 2024;63:359-367. Published 2024 May 23.
177. Sun, S., Fei, X., Mao, Y i sur. PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 63(4), 395–406.
178. Huang Y, Ma C, Zhang i sur. CD4⁺ and CD8⁺ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015;6(19):17462-17478.
179. Zilenaite-Petrukaitiene D, Rasmusson A, Valkiuniene RB, Laurinaviciene A, Petkevicius L, Laurinavicius A. Spatial distributions of CD8 and Ki67 cells in the tumor microenvironment

independently predict breast cancer-specific survival in patients with ER+HER2- and triple-negative breast carcinoma. *PLoS One*. 2024;19(11):e0314364. Published 2024 Nov 22.

180. Niu R, Wang C, Xie Y i sur. Prognostic significance of CD8 + tumor-infiltrating lymphocytes in operable breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2025;25(1):601. Published 2025 Apr 2.
181. Al-Saleh K, Abd El-Aziz N, Ali A i sur. Predictive and prognostic significance of CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with luminal B/HER 2 negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Lett*. 2017 Jul;14(1):337-344.
182. Walker AE, Gao X, Wang Q, i sur. Prognostic Significance of CD8 T-cell Spatial Biomarkers in ER+ and ER- Breast Cancer. Preprint. *medRxiv*. 2025;2025.05.27.25328389. Published 2025 May 28.
183. 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 Mar;12(3):585-595.
184. Goldberg, J., Pastorello, R. G., Vallius, T i sur. The Immunology of Hormone Receptor Positive Breast Cancer. *Frontiers in immunology*, 12, 674192.
185. Matsumoto H, Thike AA, Li H i sur. Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;156(2):237-247.
186. Chung YR, Kim HJ, Jang MH, Park SY. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocyte subsets in breast cancer depends on hormone receptor status. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;161(3):409-420.
187. Schnellhardt S, Erber R, Büttner-Herold M i sur. Tumour-Infiltrating Inflammatory Cells in Early Breast Cancer: An Underrated Prognostic and Predictive Factor?. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8238. Published 2020 Nov 3.
188. Boutilier AJ, Elsawa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6995. Published 2021 Jun 29.
189. Basak U, Sarkar T, Mukherjee S i sur. Tumor-associated macrophages: an effective player of the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2023 Nov 16;14:1295257.

190. Yang D, Yang L, Cai J, Li H, Xing Z, Hou Y. Phosphoinositide 3-kinase/Akt and its related signaling pathways in the regulation of tumor-associated macrophages polarization. *Mol Cell Biochem.* 2022;477(10):2469-2480.
191. Zhang B, Yao G, Zhang Y i sur. M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(11):1879-1886.
192. Zhang L, Gu S, Wang L i sur. M2 macrophages promote PD-L1 expression in triple-negative breast cancer via secreting CXCL1. *Pathol Res Pract.* 2024;260:155458.
193. López-Janeiro Á, Padilla-Ansala C, de Andrea CE, Hardisson D, Melero I. Prognostic value of macrophage polarization markers in epithelial neoplasms and melanoma. A systematic review and meta-analysis. *Mod Pathol.* 2020;33(8):1458-1465.
194. Salmi, S., Siiskonen, H., Sironen, R i sur. The number and localization of CD68+ and CD163+ macrophages in different stages of cutaneous melanoma. *Melanoma research, 29(3),* 237–247.
195. Lindberg, I., Saleh, A., Tutzauer, J.i sur. Prognostic relevance of CD163⁺ immune cells in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* **74**, 42 (2025).
196. Yang M, Li Z, Ren M i sur. Stromal Infiltration of Tumor-Associated Macrophages Conferring Poor Prognosis of Patients with Basal-Like Breast Carcinoma. *J Cancer.* 2018;9(13):2308-2316. Published 2018 Jun 6.
197. Xue T, Yan K, Cai Y i sur. Prognostic significance of CD163⁺ tumor-associated macrophages in colorectal cancer. *World J Surg Oncol.* 2021;19(1):186. Published 2021 Jun 24.
198. Garvin S, Oda H, Arnesson LG, Lindström A, Shabo I. Tumor cell expression of CD163 is associated to postoperative radiotherapy and poor prognosis in patients with breast cancer treated with breast-conserving surgery. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 Jul;144(7):1253-1263.
199. Omilian AR, Cannioto R, Mendicino L i sur. CD163⁺ macrophages in the triple-negative breast tumor microenvironment are associated with improved survival in the Women's Circle of Health Study and the Women's Circle of Health Follow-Up Study. *Breast Cancer Res.* 2024;26(1):75. Published 2024 May 8.

- 200.** Oshi M, Tokumaru Y, Asaoka M i sur. M1 Macrophage and M1/M2 ratio defined by transcriptomic signatures resemble only part of their conventional clinical characteristics in breast cancer. *Sci Rep.* 2020;10(1):16554. Published 2020 Oct 6.
- 201.** Caronni N, La Terza F, Vittoria FM i sur. IL-1 β ⁺macrophages fuel pathogenic inflammation in pancreatic cancer. *Nature.* 2023;623(7986):415-422.

POPIS TABLICA

Tablica 1 . BI-RADS kategorije prilikom dijagnostike promjena na dojci.

Tablica 2 . Podtipovi karcinoma dojke.

Tablica 3 . Odobreni lijekovi od strane FDA te njihova primjena i mehanizam djelovanja na ključnim nivoima i vrste tumora kod kojih se može očekivati učinkovitost terapije

Tablica 4 . Prediktivni čimbenici za anti-PD-L1 terapiju : MMR (engl. *mismatch repair*) popravak neusklađenih baza nukleotida, MSI (engl. Microsatelite instabilitet), mikrosatelitska nestabilnost tj. brisanje ili umetanje mutacija unutar kratkih ponavljajući DNA sekvenci, TMB (engl. mutation burden) ukupan broj somatskih mutacija tumora. Određivanjem ovih čimbenika se može dati ciljana anti-tumorska terapija kod određenih solidnih tumora.

Tablica 5 . Usporedba TMA i standardne pripreme tkiva za analizu

Tablica 6 . Karakteristike korištenih protutijela, proizvođači, način pripreme i postupak otkrivanja epitopa.

Tablica 7 . Kliničko-patološka obilježja karcinoma dojke.

Tablica 8 . Usporedba karakteristika tumora HR+/HER2- podtipa tumora dojke i mutacijskog statusa *PIKCA* gena

Tablica 9 . Procjena tumor infiltrirajućih limfocita

Tablica 10 . Usporedba sastava tumorskog mikrookoliša i PD-L1 izražaja ovisno o mutacijskom statusu *PIK3CA* gena

Tablica 11 . Usporedba sadržaja tumorskog mikrookoliša kod HR+/HER2- karcinoma s metastazom/recidivom ovisno o *PIK3CA* mutacijskoga statusa i PD-L1 izražaju.

Tablica 12 . Usporedba sastava tumorskog mikrookoliša i PD-L1 izražaja kod Luminal A i Luminal B karcinoma dojke ovisno o *PIK3CA* mutacijskom statusu.

Tablica 13 . Povezanost PD-L1 izražaja u cijeloj analiziranog grupi tumora te posebno u tumorima koji imaju i oni bez mutacije *PIK3CA* gena

Tablica 14 . DSS u pacijentica sa i bez *PIK3CA* mutacije u ovisnosti o sadržaju tumorskog mikrookoliša

Tablica 15 . DFS kod pacijentica sa i bez *PIK3CA* mutacije te cijela ispitivana skupina

Tablica 16 . Multivarijatna analiza preživljenja specifična za bolest (DSS) i preživljenje bez povrata bolesti (DFS).

POPIS SLIKA

Slika 1. Apsolutni broj oboljelih žena od tumora u Republici Hrvatskoj u 2023. Karcinom dojke je sa 329308 slučajeva u 2022 godini je na vodećem mjestu obolijevanja od svih karcinoma ukupno (autorski crtež prema EUROCare-6 bazi podataka, te podacima Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske, Rak u Hrvatskoj 2023./2024. Zagreb 2026).

Slika 2. Incidencija zloćudnih tumora u Europskoj Uniji u 2022 kod žena.

Slika 3. Incidencija zloćudnih tumora kod žena u svijetu u 2022 godini

Slika 4. Mogućnosti blokade *PI3K/AKT/mTOR* na različitim mjestima uz pomoć različitih vrsta lijekova. Blokadom pojedinog puta, dolazi do promjena u metabolizmu i staničnom ciklusu što utječe na rasta i preživljenje tumorske stanice i dovodi do ubrzane stanične smrti.

Slika 5. *PIK3CA* mutacije u pojedinom podtipu karcinoma dojke prema atlasu TCGA (engl. *The Cancer Genome Atlas*). TCGA je sadrži veliku bazu podataka uključujući i rak dojke koji sadrži podatke o pojedinim podtipovima karcinoma dojke uključujući i promjena na genima.

Slika 6. Mehanizmi interakcije estrogenskog i *PI3K* signalnog puta. Djelovanjem na estrogenski receptor dolazi do promjena i u signalizaciji *p85* regulatorne podjedinice tumora.

Slika 7. Osovina *PD-1/PD-L1* i način regulacije. Tumorska stanica se veže na *PD-1* ligand na T - limfocitima uzrokujući smanjenje stanične proliferacije, aktivacije i smanjenog lučenja važnih citokina u homeostazi stanice. Dolazi do ubrzane stanične smrti tj. apoptoze.

Slika 8. Odnos tumorskih stanica, imunološkog odgovora domaćina i crijevne mikrobiote. Bakterije u crijevima putem svojih medijatora izazivaju niz imunoloških odgovora u sluznici crijeva. Time dolazi do mijenjanja sistemskog imunološkog odgovora organizma što utječe na djelovanje kemoterapije i učinkovitost u otklanjanju tumorskih stanica iz organizma.

Slika 9. Međusobni odnos imunoloških i tumorskih stanica. Ukoliko dođe do inaktivacije imunoloških stanica mehanizmima blokade imunološkog sustava, tumor nastavlja nesmetani rast. U obrnutom slučaju, ukoliko imunološki sustav nadvlada mehanizme tumorskog rasta dolazi do zaustavljanja tumorskog rasta i eliminacije tumorskih stanica iz organizma.

Slika 10. A). Uređaj za izradu mikročipova (MTA Booster OI, Alphelys, Plasir Francuska) Zavod za patologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci; B). Tkivni mikročipovi (TMA), tj. nove parafinske kocke u koje su preneseni uzorci odabranog tumorskog tkiva

Slika 11. Slika 11 pokazuje primjer imunohistokemijskog bojenja za *CD4* i *CD8*. Pod svjetlosnim mikroskopom su izabrana područja gdje su imunološke stanice najgušće raspoređene

i pod povećanjem 200X (x20 objektiv) su brojane imunološke stanice na tri odvojena mjesta.

Slika 12A. Graf korelacije infiltracije CD4 stanicama i PD-L1 izražaja u cijeloj skupini pacijentica (korišten Spearmanov koeficijent korelacije)

Slika 12B. Graf korelacije infiltracije CD8 stanicama i PD-L1 izražaja u cijeloj skupini pacijentica (korišten Spearmanov koeficijent korelacije)

Slika 12C. Graf korelacije infiltracije tumora CD68 makrofazima i PD-L1 izražaja (korišten Spearmanov koeficijent korelacije).

Slika 12D. Graf korelacije infiltracije CD163 stanicama i PD-L1 izražaja u skupini tumora bez mutacije *PIK3CA* gena (korišten Spearmanov koeficijent korelacije)

Slika 12E. Graf korelacije pokazuje odnos infiltracije CD8 stanicama i PD-L1 izražaja u skupini tumora sa mutacijom *PIK3CA* gena (korišten Spearmanov koeficijent korelacije)

Slika 12F. Graf korelacije pokazuje povezanost infiltracije tumora CD68 makrofazima i PD-L1 izražaja u *PIK3CA* mutiranih tumora (korišten Spearmanov koeficijent korelacije)

Slika 12G. Graf korelacije infiltracije CD163 stanicama i PD-L1 izražaja u skupini tumora sa *PIK3CA* mutacijom (korišten Spearmanov koeficijent korelacije)

Slika 13A. Infiltracija CD4 stanicama kod tumora koji nisu imali *PIK3CA* mutaciju i utjecaj na DSS

Slika 13B. Infiltracija CD4 stanicama kod tumora koji su imali *PIK3CA* mutaciju i utjecaj na DSS

Slika 13C. Infiltracija CD8 stanicama u tumorima bez *PIK3CA* mutacije i utjecaj na DSS

Slika 13D. Infiltracija CD8 stanicama u tumorima bez *PIK3CA* mutacije i utjecaj na DSS

Slika 13E. DSS u ovisnosti o PD-L1 izražaju

Slika 13F. DSS unutar cijele ispitivane skupine pacijentica ovisno o *PIK3CA* mutacijskom statusu

Slika 13G. DSS u cijeloj skupini pacijentica sa mutacijom *PIK3CA* gena u eksonu 9 ili 20

Slika 14A. DFS i infiltracija CD4 limfocitima kod karcinoma bez *PIK3CA* mutacije gena

Slika 14B. DFS i infiltracija CD4 limfocitima kod karcinoma sa *PIK3CA* mutacijom gena

Slika 14C. DFS i infiltracija CD163 stanicama u skupini pacijentica bez *PIK3CA* mutacije gena

Slika 14D. DFS i infiltracija CD163 stanicama u skupini pacijentica sa *PIK3CA* mutacijom gena

Slika 14E. DFS u ovisnosti o položaju mutacije *PIK3CA* gena u eksonu 9 i eksonu 20 u cijeloj ispitivanoj skupini

Slika 14F. DFS i utjecaj PD-L1 izražaja u cijeloj ispitivanoj skupini

Slika 14G. DFS u cijeloj ispitivanoj skupini ovisno o prisutnosti mutacije *PIK3CA* gena

POPIS POKRATA

AJCC- engl. *The American Joint Committee on Cancer*, Američko udruženje za rak

AUC- (engl. area under curve), područje unutar krivulje

BI-RADS- (engl. Breast Imaging Reporting and Data System), slikovna dijagnostika za ocjenu promjena u dojci

BRCA1 i *BRCA2* (engl. BREast CAncer gene), gen za tumor dojke

CI- (engl. *confidence interval*), interval pouzdanosti

CT- kompjutorizirana tomografija

DNA- deoksiribonukleinska kiselina

DFS- (engl. *disease-free survival*) ,vjerojatnost preživljenja bez bolesti

DSS- (engl. *Disease specific survival*),vjerojatnost preživljenja specifična za bolest (za određeni karcinom)

FDA- (engl. *Food and Drug Administration*), Agencija za hranu i lijekove u USA

FISH (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*), fluorescentna *in situ*

ER- estrogen receptor

HER2-(engl. *Human epidermal growth factor receptor 2*), humani epidermalni receptor čimbenika rasta 2

IVD test -(engl. *in vitro diagnostics*), dijagnostika van živog organizma u kontroliranim uvjetima

MAPK- (engl. *mitogen activated protein kinase*), mitogen aktivirajuća proteinska kinaza

MMR-(mismatch repair), neusklađeni popravaka DNK dijelova

MR- magnetska rezonanca

MSI-(engl. *microsatellite instabilitet*), nakupljanje ili brisanje kratkih DNK sekvenci zbog nedostataka u statusu popravka.

NGS- (engl. *Next generating sequencing*), novija generacija genske analize

NST-(engl.*no special breast cancer*), ne specijalni tip karcinoma dojke

OS- (engl. *Overall survival*,) ukupno preživljenje

PCR- (engl. *Poymerase chain reaction*), polimeraza lančana reakcija

PR- progesteron receptor

PI3K -fosfoinzitol-3-kinaza

PFS-(engl. *progression free interval*), vrijeme preživljenja bez bolesti

OS-(engl. *Overall survival*), ukupno preživljenje

PD-1- (engl. *Programmed cell death-1*), protein programirane stanične smrti

PD-L1- (engl. *Programmed cell death ligand-1*), ligand programirane stanične smrti

RNA -(engl. *ribonucleic acid*),ribonukleinska kiselina

ROC –(engl. *Receiver operating characteristic*), operativna krivulja analize

REMARK (engl. *Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies*), standardni protokoli za izradu tkivnih mikročipova

TCGA-(engl. *The genome cancer atlas*) , atlas genoma karcinoma

TIL- (engl. *Tumor infiltrating lymphocytes*), tumor-infiltrirajući limfociti

TMA- (engl. *Tissue micro array*), tkivni mikročip

TNM- (engl. *tumor, node, metastasis*), tumor, čvor, metastaza

TNBC-(engl. *Triple-negative breast cancer*), trostruko-negativni karcinom dojke

UICC-(engl. *Union for International Cancer Control*), Unija za međunarodnu kontrolu raka

UZV- ultrazvuk

WHO-(engl. *World Health Organization*,) Svjetska zdravstvena organizacija

w/t- (engl. *Wild type*), nemutirani *PIK3CA* karcinom dojk

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime : Danijel Lopac

Adresa : Drage Šćitara 24, 51000 Rijeka

Tel. Broj: 00385 98 720 327

Datum rođenja : 12.05.1977.

Državljanstvo: hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

2015- danas liječnik specijalist ortoped sa subspecijalizacijom iz traumatologije lokomotornog sustava u Klinici za ortopediju Lovran (uža specijalnost liječenje tumora koštano-zglobnog sustava kod odraslih i djece, te rekonstrukcije donjih ekstremiteta i 3D printane rekonstrukcije koštanih defekata)

2023-danas naslovni asistent na Katedri za ortopediju i fizikalnu medicinu, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci.

2018-2023 pomoćnik ravnatelja za kvalitetu i unapređenje zdravstvene zaštite

2011-2015 liječnik specijalist ortoped na odjelu za kirurgiju OB Gospić, te voditelj operacijskog trakta OB Gospić

2005-2011 specijalizacija iz ortopedije u Klinici za ortopediju Lovran i KBC Zagreb

2003-2004 sekundarijat na odjelu kirurgije OB Ogulin

2003-2003 liječnik u Domu zdravlja Mali Lošinj

2001-2002 pripravnički staž u KBC Rijeka

EDUKACIJA I USAVRŠAVANJA

2006-danas aktivno sudjelovao na mnogim međunarodnim i domaćim kongresima iz područja opće ortopedije i tumora muskulo-skeletnih tumora. Izdao 10-ak kongresnih priopćenja na međunarodnim ortopedskim i onkološkim kongresima.

2025 završen specijalistički poslijediplomski studij: Menadžment kvalitete u zdravstvu na Sveučilištu Libertas u Zagrebu

2018 položen subspecijalistički ispit iz područja traumatologije lokomotornog sustava

2017-2018 edukacija u Istituto Ortopedico Rizzoli Bologna iz kirurgije tumora koštano-zglobnog sustava

2017 subspecijalizacija iz ortopedije u Sveučilišnoj Bolnici Graz iz područja kirurgije tumora muskulo-skeletnog sustava

2011 završen stručni postdiplomski studij iz ortopedije na Medicinskom fakultetu u Zagrebu

2011 položen specijalistički ispit iz ortopedije pred ispitnom komisijom Ministarstva Zdravstva

2003 položen stručni ispit za doktora medicine pred ispitnom komisijom Ministarstva Zdravstva

1995-2021 Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci (doktor medicine)

1991-1995 Srednja medicinska škola u Rijeci, zanimanje zdravstveno laboratorijski tehničar

1983-1991 Osnovna škola S.S. Kranjčevića u Senju

ZNANSTVENA DJELATNOST

1. Lopac D, Babarović E, Hagen J, Valković Zujic P, Grebić D, Hadžisejdić I. Hormone Receptor Positive/HER2 Negative Breast Carcinoma: Association of *PIK3CA* Mutational Status with PD-L1 and Tumor Cell Microenvironment and Their Prognostic Significance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26(19):9489.
2. Vlatka Sotošek, Sandra Velčić Brumnjak, Krešimir Bukal, Dijana Papež Kinkela, Danijel Lopac, Nikola Gržalja, Merica Aralica, Tanja Batinac, Lara Batičić. Lumbar epidural analgesia and sciatic and femoral peripheral nerve blocks attenuate the stress-induced response in patients during the early postoperative period following total knee replacement. *Signa Vitae*. 2024. 20(1);35-42.
3. Tudor, Karlo MD; Lopac, Danijel MD; Tudor, Anton PhD; Šestan, Branko PhD. Unique case of posttraumatic atrophic proximal ulnar nonunion in a child: a review of the literature with case report. *Current Orthopaedic Practice* 33(3):p 307-310, May/June 2022.

4. Rakovac I, Mađarević , Jurković H, Šantić V, Lopac D, Baričić M The "cello technique" - description of a new technique for ultrasound assisted calcaneoplasty. Tehnika violoncelo - prikaz nove tehnike ultrazvucno asistirane kalkaneoplastike, Medicina Fluminensis 2013 49 (3). 317-322

5. Legovic, D. ,Lopac D. ,Šantić, V., Jurdana, H.,Gulan, G., Tudor A: Ttire athlets Medicina, 2007;“Medicina, 2007; 43(3): 215–223.

POGLAVLJA U KNJIGAMA

1. Marko Bergovec, Jasminka Igrec, Iva Brčić, *Danijel Lopac*, Josip Grah.

Tumori kosti i mekih tkiva. Ur: Anton Tudor, Marko Bergovec, Zdenko Ostojić.

Ortopedija i traumatologija, Medicinska, naklada, knjiga Sveučilišta u Rijeci ,Zagreb 2023, str. 196-251

2. *Danijel Lopac*, Anton Tudor . Razvojni poremećaj kuka. Ur: Anton Tudor, Marko Bergovec, Zdenko Ostojić. Ortopedija i traumatologija, Medicinska, naklada, knjiga Sveučilišta u Rijeci ,Zagreb 2023, str. 508

3. *Danijel Lopac*, Septički artritis kuka. Ur: Anton Tudor, Marko Bergovec, Zdenko Ostojić. Ortopedija i traumatologija, Medicinska, naklada, knjiga Sveučilišta u Rijeci ,Zagreb 2023, str. 532

4. *Danijel Lopac*, Endoproteza kuka (alloarthroplastika ili artroplastika kuka) Ur: Anton Tudor, Marko Bergovec, Zdenko Ostojić. Ortopedija i traumatologija, Medicinska, naklada, knjiga Sveučilišta u Rijeci ,Zagreb 2023, str. 537

5. Miroslav Hašpl, Danijel Lopac, Karlo Tudor. Propedeutika koljena. Ur: Anton Tudor, Marko Bergovec, Zdenko Ostojić. Ortopedija i traumatologija, Medicinska, naklada, knjiga Sveučilišta u Rijeci ,Zagreb 2023, str. 588

6. Miroslav Hašpl, Danijel Lopac, Karlo Tudor. Funkcionalna anatomija zgloba koljena. Ur: Anton Tudor, Marko Bergovec, Zdenko Ostojić. Ortopedija i traumatologija, Medicinska, naklada, knjiga Sveučilišta u Rijeci ,Zagreb 2023, str. 589

7. Miroslav Hašpl, Danijel Lopac, Karlo Tudor. Klinički pregled koljena. Ur: Anton Tudor, Marko Bergovec, Zdenko Ostojić. Ortopedija i traumatologija, Medicinska, naklada, knjiga Sveučilišta u Rijeci ,Zagreb 2023, str. 595
8. Danijel Lopac. Uvod, Gležanj i stopalo. Ur: Anton Tudor, Marko Bergovec, Zdenko Ostojić. Ortopedija i traumatologija, Medicinska, naklada, knjiga Sveučilišta u Rijeci ,Zagreb 2023, str. 650
9. Danijel Lopac, Karlo Tudor, Propedeutika gležnja i stopala. Ur: Anton Tudor, Marko Bergovec, Zdenko Ostojić. Ortopedija i traumatologija, Medicinska, naklada, knjiga Sveučilišta u Rijeci ,Zagreb 2023, str. 650
10. Danijel Lopac, Kika Vrkljan, Maligni tumori kosti i mekih tkiva. Ur: Anton Tudor, Tomislav Đapić. Udžbenik trenutno u procesu objave (tiska) , Zagreb 2026

ČLANSTVA

Hrvatska liječnikčka komora (HLK)

Hrvatski liječnički zbor (HLZ)

Hrvatsko ortopedsko društvo HLZ

Društvo za poboljšanje kvalitete zdravstvene zaštite (HDZPKZ) Hrvatskog liječničkog zbora

VJEŠTINE

MATERINJI JEZIK: Hrvatski

OSTALI JEZICI: Engleski (C1) i Njemački (B1)

VOZAČKA DOZVOLA: B kategorija

RAD NA KOMPJUTORU: Microsoft Office (Word, Excell, PPT, Outlook, Access), OS, AutoCAD, Photo Editor, Pecha Kucha, Tableau, SPSS, GraphPad Prism, RadiAnt DICOM Viewer