

# Prognostička vrijednost tumor - infiltrirajućih limfocita i androgenih receptora u bolesnica s ranim trostruko negativnim rakom dojke

---

Tečić Vuger, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:159607>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Tečić Vuger**

**Prognostička vrijednost  
tumor - infiltrirajućih limfocita  
i androgenih receptora  
u bolesnica s ranim  
trostruko negativnim rakom dojke**

**DOKTORSKI RAD**



**Zagreb, 2021.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Tečić Vuger**

**Prognostička vrijednost  
tumor - infiltrirajućih limfocita  
i androgenih receptora  
u bolesnica s ranim  
trostruko negativnim rakom dojke**

**DOKTORSKI RAD**

Zagreb, 2021.

Doktorski rad izrađen je u Klinici za tumore Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice,  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelji rada:

prof.dr.sc. Damir Vrbanc, dr.med., specijalist internist, subspecijalist internističke  
onkologije

prof.dr.sc. Božena Šarčević, dr.med., specijalist patologije

*Mojim najmilijima*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I SVRHA RADA .....</b>	<b>1</b>
1.1. Rak dojke danas .....	1
1.1.1. <i>Epidemiologija</i> .....	1
1.1.2. <i>Etiologija</i> .....	2
1.1.3. <i>Dijagnostički pristup</i> .....	3
1.1.4. <i>Terapijski pristup</i> .....	4
1.2. Patologija raka dojke .....	6
1.2.1. <i>Patohistološka klasifikacija</i> .....	6
1.2.2. <i>Molekularna klasifikacija</i> .....	7
1.2.3. <i>Imunohistokemijska klasifikacija</i> .....	8
1.2.4. <i>Prognostički i prediktivni čimbenici</i> .....	10
1.3. Trostruko negativni rak dojke: jedan tumor ili više različitih bolesti? .....	12
1.3.1. <i>Izazovi u klasifikaciji trostruko negativnog raka dojke</i> .....	12
1.3.2. <i>Trostruko negativni tip – bazaloidni tip – BRCA pozitivni tip</i> .....	15
1.3.3. <i>Paradoks trostruko negativnog raka dojke</i> .....	17
1.3.4. <i>Izazovi u terapijskom pristupu</i> .....	18
1.3.5. <i>Biobiljezi u trostruko negativnom raku dojke</i> .....	20
1.4. Androgeni receptori .....	21
1.4.1. <i>Struktura i funkcija androgenih receptora</i> .....	21
1.4.2. <i>Uloga androgenih receptora u ljudskim zloćudnim tumorima</i> .....	23
1.4.3. <i>Androgeni receptori u raku prostate</i> .....	24
1.4.4. <i>Androgeni receptori u raku dojke</i> .....	26
1.4.5. <i>Androgeni receptori u trostruko negativnom raku dojke</i> .....	29
1.5. Imunost i tumor .....	31
1.5.1. <i>Tumorski antigeni</i> .....	31
1.5.2. <i>Imunosni odgovor</i> .....	32
1.5.3. <i>Protumorska uloga imunosti</i> .....	34
1.5.4. <i>Imunouređivanje i bijeg tumora</i> .....	35
1.5.5. <i>Imunoterapijski pristupi</i> .....	36
1.6. Tumor – infiltrirajući limfociti .....	38
1.6.1. <i>Podrijetlo, sastav i uloga imunosnog infiltrata u tumoru</i> .....	38
1.6.2. <i>Tumor – infiltrirajući limfociti u solidnim tumorima</i> .....	40
1.6.3. <i>Tumor – infiltrirajući limfociti u raku dojke</i> .....	41
1.6.4. <i>Tumor – infiltrirajući limfociti u trostruko negativnom raku dojke</i> .....	44
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>47</b>
2.1. Obrazloženje hipoteze .....	47
<b>3. CILJEVI RADA.....</b>	<b>48</b>
3.1. Opći cilj .....	48
3.2. Specifični ciljevi .....	48
<b>4. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>49</b>
4.1. Ustroj istraživanja .....	49
4.2. Ciljana populacija .....	49
4.2.1. <i>Kriteriji uključivanja</i> .....	49
4.2.2. <i>Kriteriji neuključivanja i isključivanja</i> .....	50
4.3. Veličina i vrsta uzorka .....	50

4.4.	Ishodi .....	50
4.5.	Neovisne varijable .....	51
4.6.	Potencijalno zbunjujuće varijable .....	51
4.7.	Prikupljanje podataka i metode obrade materijala .....	51
4.7.1.	<i>Predtretman tumorskog materijala</i> .....	52
4.7.2.	<i>Evaluacija androgenih receptora</i> .....	53
4.7.3.	<i>Evaluacija tumor – infiltrirajućih limfocita</i> .....	56
4.8.	Statistička obrada podataka .....	61
4.9.	Etički aspekti istraživanja .....	62
<b>5.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>63</b>
5.1.	Uključivanje bolesnica .....	63
5.2.	Sociodemografske i kliničke karakteristike bolesnica .....	64
5.3.	Rezultati liječenja .....	67
5.3.1.	<i>Ukupno petogodišnje preživljenje</i> .....	67
5.3.2.	<i>Povezanost ukupnog petogodišnjeg preživljenja sa sociodemografskim i kliničkim karakteristikama bolesnica</i> .....	67
5.3.3.	<i>Preživljenje bez bolesti</i> .....	70
5.3.4.	<i>Ukupno preživljenje</i> .....	71
5.4.	Izraženost androgenih receptora .....	72
5.5.	Prisutnost tumor – infiltrirajućih limfocita .....	77
5.5.1.	<i>sTIL CT</i> .....	78
5.5.2.	<i>iTIL CT</i> .....	80
5.5.3.	<i>sTIL IM</i> .....	82
5.5.4.	<i>iTIL IM</i> .....	84
5.6.	Povezanost prisutnosti TIL u različitim odjeljcima .....	86
5.7.	Povezanost prisutnosti TIL i izraženosti androgenih receptora .....	88
5.8.	Ukupno petogodišnje preživljenje .....	90
5.8.1.	<i>Androgeni receptori</i> .....	90
5.8.2.	<i>sTIL</i> .....	92
5.8.3.	<i>iTIL</i> .....	92
5.8.4.	<i>sTIL CT</i> .....	93
5.8.5.	<i>iTIL CT</i> .....	95
5.8.6.	<i>sTIL IM</i> .....	97
5.8.7.	<i>iTIL IM</i> .....	99
5.8.8.	<i>TIL i androgeni receptori</i> .....	101
5.9.	Preživljenje bez bolesti .....	103
5.9.1.	<i>Androgeni receptori</i> .....	103
5.9.2.	<i>sTIL CT</i> .....	105
5.9.3.	<i>iTIL CT</i> .....	107
5.9.4.	<i>sTIL IM</i> .....	109
5.9.5.	<i>iTIL IM</i> .....	111
5.9.6.	<i>Analiza prema broju odjeljaka s TIL <math>\geq 10\%</math></i> .....	113
5.9.7.	<i>Broj odjeljaka s TIL <math>\geq 10\%</math> i androgeni receptori</i> .....	114
<b>6.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>115</b>
6.1.	Karakteristike TNRD, liječenje i preživljenje .....	115
6.2.	Androgeni receptori .....	120
6.3.	Tumor – infiltrirajući limfociti .....	130
6.4.	Interakcija AR i TIL .....	149

<b>7. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>155</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>159</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>162</b>
<b>10. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>165</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>186</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ADT	Androgen – deprivacijska terapija
AFP	Alfa – fetoprotein
AJCC	Američki združeni odbor za rak (od engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i> )
APC	Antigen – predložne stanice (od engl. <i>Antigen Presenting Cells</i> )
AR	Androgeni receptori
AREs	Elementi odgovora na androgene (od engl. <i>Androgen Response Elements</i> )
ARKO	AR – <i>Knock Out</i> miševi
BCSS	Specifično preživljenje od raka dojke (od engl. <i>Breast Cancer Specific Survival</i> )
BL 1,2	Poput bazalnog (od engl. <i>Basal – Like</i> )
BLBC	Rak dojke poput bazalnog (od engl. <i>Basal – Like Breast Cancer</i> )
BLIA	Poput bazalnog – imunoaktivni (od engl. <i>Basal – Like ImmunoActive</i> )
BLIS	Poput bazalnog – imunosuprimirani (od engl. <i>Basal – Like ImmunoSuppressed</i> )
BRCA1,2	Geni nasljednog raka dojke (od engl. <i>BRCA1 &amp; 2</i> )
CBP	<i>Core – basal</i> fenotip (od engl. <i>Core – Basal Phenotype</i> )
CD	Klasteri diferencijacije (od engl. <i>Clusters of Differentiation</i> )
CEA	Karcinoembrionski antigen
CI	Interval pouzdanosti (od engl. <i>Confidence Interval</i> )
CISH	Kromogena in situ hibridizacija
CK	Citokeratini



CMF	Ciklofosamid – Metotreksat – (5) Fluorouracil
CRPC	Kastracijski rezistentan rak prostate (od engl. <i>Castration Resistant Prostate Cancer</i> )
CSS	Specifično preživljenje od raka (od engl. <i>Cancer Specific Survival</i> )
CT	Centralni tumor
CTA	Karcinom – testis antigeni (od engl. <i>Cancer – Testicle Antigens</i> )
CTL	Citotoksični T limfociti
CTLA-4	Uz citotoksični limfocit T asocirani protein 4 (od engl. <i>Cytotoxic Lymphocyte T - Associated Protein 4</i> )
DBD	DNA – vezujuća domena (od engl. <i>DNA – Binding Domain</i> )
DC	Dendritičke stanice (od engl. <i>Dendritic Cells</i> )
DCIS	Duktalni neinvazivni karcinom (od engl. <i>Ductal Carcinoma In Situ</i> )
DDFS	Preživljenje bez udaljene bolesti (od engl. <i>Distant Disease – Free Survival</i> )
DFS	Preživljenje bez bolesti (od engl. <i>Disease - Free Survival</i> )
dMMR	Deficitan sustav popravka <i>miss-match</i> (od engl. <i>defficient MissMatch Repair</i> )
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (od engl. <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> )
EFS	Preživljenje bez događaja (od engl. <i>Event –Free Survival</i> )
EGFR	Receptor za epidermalni čimbenik rasta (od engl. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
EMT	Epitelno – mezenhimalna tranzicija
ER	Estrogeni receptori
EREs	Elementi odgovora na estrogene (od engl. <i>Estrogen Response Elements</i> )
FDR	Stopa lažnih otkrića (od engl. <i>False Discovery Rate</i> )

FGFR	Receptor za čimbenik rasta fibroblasta (od engl. <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> )
FISH	Fluorescentna in situ hibridizacija
FOXP3+	Regulatorni limfociti T
GBG	Njemačka skupina za dojku (od engl. <i>German Breast Group</i> )
GnRH	Hormon oslobađanja gonadotropina (od engl. <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i> )
GR	Glukokortikoidni receptori
HE	Hemalaun – Eozin
HeCOG	Helenska kooperativna skupina (od engl. <i>Hellenic Cooperative Group</i> )
HER2	Receptor 2 za ljudski epidermalni čimbenik rasta (od engl. <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> )
HR	Omjer hazarda (od engl. <i>Hazard Ratio</i> )
iDFS	Preživljenje bez invazivne bolesti (od engl. <i>invasive Disease – Free Survival</i> )
IFN	Interferon
IGF	Inzulinski čimbenik rasta (od engl. <i>Insuline Growth Factor</i> )
IHC	Imunohistokemija
IKR	Interkvartilni raspon
IL	Interleukin
IM	Invazivni rub/margina
ISH	<i>In – situ</i> hibridizacija
LABC	Lokalno uznapredovali rak dojke (od engl. <i>Locally – Advanced Breast Cancer</i> )

LAR	Luminalni AR
LBD	Ligand – vezujuća domena (od engl. <i>Ligand – Binding Domain</i> )
LCIS	Lobularni neinvazivni karcinom (od engl. <i>Lobular Carcinoma In Situ</i> )
LOWESS	Krivulja lokalno otežane polinomijske regresije (od engl. <i>LOcally WEighted Scatter-plot Smoother</i> )
LPBC	Limfocitno – predominantni rak dojke (od engl. <i>Lymphocyte – Predominant Breast Cancer</i> )
M, MES	Mezenhimalni
MDSC	Imunosupresivne stanice podrijetla mijeloidne loze (od engl. <i>Myeloid – Derived Suppressive Cells</i> )
MFS	Preživljenje bez rasadnica (od engl. <i>Metastasis – Free Survival</i> )
MHC	Kompleks velike tkivne podudarnosti (od engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MR	Mineralokortikoidni receptori
mRNA	Glasnička RNA (od engl. <i>messenger RNA</i> )
MSI	Mikrosatelitska nestabilnost (od engl. <i>MicroSatellite Instability</i> )
MSL	Poput mezenhimalnih zametnih stanica (od engl. <i>Mesenchymal Stem - Like</i> )
n	Broj sudionica
NAT	Neoadjuvantna terapija
NK	Stanice prirodne ubojice (od engl. <i>Natural Killer</i> )
NOS	Nespecificiran drugačije (od engl. <i>Not – Other Specified</i> )
NPI	Nottinghamski prognostički indeks
OR	Omjer izgleda (od engl. <i>Odds Ratio</i> )

OS	Ukupno preživljenje (od engl. <i>Overall Survival</i> )
p	Statistička značajnost
PARPi	Inhibitori PARP enzima (od engl. <i>Poly - ADP Ribose Polymerase</i> )
pCR	Patološki potpun odgovor (od engl. <i>pathological Complete Response</i> )
PD1	Protein programirane smrti stanice 1 (od engl. <i>Programmed Cell Death Protein 1</i> )
PR	Progesteronski receptori
R	Koeficijent multiple korelacije
R <sup>2</sup>	Koeficijent multiple determinacije
RFS	Preživljenje bez povrata bolesi (od engl. <i>Relaps – Free Survival</i> )
RNA	Ribonukleinska kiselina (od engl. <i>RiboNucleic Acid</i> )
SARM	Selektivni modulatori androgenih receptora (od engl. <i>Selective Androgen Receptor Modulators</i> )
SISH	Srebrna in situ hibridizacija
Ss	Stupnjevi slobode
TAM	Tumor – asocirani makrofagi (od engl. <i>Tumor – Associated Macrophages</i> )
TGF	Čimbenik rasta tumora (od engl. <i>Tumor Growth Factor</i> )
Th	Pomoćnički T limfociti (od engl. <i>T – helper</i> )
TNRD	Trostruko negativni rak dojke
VEGF	Vaskularni endotelni čimbenik rasta (od engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
5-NP	5 – negativni fenotip (od engl. <i>5 – Negative Phenotype</i> )

## 1. UVOD I SVRHA RADA

### 1.1. Rak dojke danas

#### 1.1.1. Epidemiologija

Rak dojke je drugi najčešći solidni zloćudni tumor u svijetu danas. Na prvom je mjestu po pojavnosti u žena. U ženskoj populaciji čini više od 25% ukupnog broja novodijagnosticiranih zloćudnih tumora, dok je kod muškaraca taj udio manji od 1%. Uzrokuje gotovo 15% svih smrti od zloćudnih bolesti među ženama. (1) Cjeloživotni rizik za žene je oko 12% i tijekom života, jedna od osam žena oboljet će od raka dojke. Godišnje u svijetu oboli oko 2 000 000 žena, a umre oko 600 000 žena. Prosječna incidencija u svijetu iznosi 46/100 000, dok je stopa smrtnosti prosječno 13/100 000. (1) Prema posljednjim podacima Hrvatskog registra za rak, u Hrvatskoj je 2017. godine dijagnosticirano 2767 novih slučajeva raka dojke, a 853 smrti od raka dojke. (2) Medijan dobi u kojoj žene obolijevaju od raka dojke jest 62 godine. Najviše je dijagnosticiranih karcinoma dojke u žena dobne skupine 60 do 75 godina, oko 20% svih karcinoma dojke javlja se u dobi prije 50. – e godine života, a samo manje od 5% prije 35. – e godine života. Ispod 20. – e godine života rak dojke je rijedak, a u starijih od 80 godina javlja se često. Incidencija počinje rasti u dobi od oko 30 – 40 godina života i svakih se deset godina do menopauze otprilike udvostruči, a nakon 50. – e godine života doseže se plato incidencije. Posljednjih godina, sve je više novooboljelih mlađih žena, u kojih je priroda i tijek bolesti agresivniji. (3) Osim prema dobnim skupinama, razlika u pojavnosti raka dojke zamjetna je i prema geografskim područjima. U područja visoke incidencije

ubrajaju se zemlje Zapada, od SAD-a preko razvijenih zemalja Zapadne Europe, dok su područja niske incidencije zemlje Dalekog Istoka, Japan, Kina te ostale manje razvijene zemlje Azije i Afrike. Ove razlike objašnjavaju se različitim stilovima života i načinom ishrane. (4) Zemlje visoke incidencije imaju istu oko 100/100 000, dok je u zemljama niske incidencije ona oko 25/100 000. (1)

### *1.1.2. Etiologija*

Uz životnu dob i geografsko područje, u rizične čimbenike za rak dojke općenito ubraja se i pripadnost bijeloj rasi, dok se pojedini specifični tipovi raka dojke češće javljaju u pripadnica afroameričke i hispanske populacije. (4) U oko 5% do 10% slučajeva raka dojke postoji obiteljska sklonost (genetska predispozicija). Tada se bolest javlja uglavnom u mlađoj dobi, česti su slučajevi obostranog raka dojke, uglavnom se radi o agresivnijim podtipovima bolesti, s lošijim tijekom i prognozom. Najpoznatiji nasljedni rak dojke jest onaj vezan uz mutacije u BRCA 1 i 2 genima, odgovornima za procese popravka oštećenja dvostrukih lanaca DNA. U žena koje nose mutaciju gena BRCA 1/2 postoji i do 90 – postotni cjeloživotni rizik od razvoja raka dojke. Osim najpoznatijih BRCA mutacija, nasljedni oblici raka dojke i obiteljske sklonosti raku dojke mogu se javiti i posljedično mutacijama u nekim drugim genima, no oni su češće manjeg utjecaja i nose manji rizik te se javljaju u sklopu rjeđih sindroma. (5) U poznate reproduktivne rizične čimbenike za razvoj raka dojke ubrajaju se rana menarha (prije 12. – e godine života), kasna menopauza (nakon 55. – e godine života), kasnija prva trudnoća (nakon 30. – e godine života) ili izostanak trudnoća te kraće dojenje. Rizik povisuje i uporaba oralnih kontraceptiva, ukoliko je ista trajala duže od četiri godine, u dobi žene prije 25. – e godine

života, kao i primjena hormonskog nadomjesnog liječenja, koje u žena starijih od 50 godina povisuje rizik hormonski ovisnog raka dojke za čak 26%. Rizik razvoja raka dojke nosi izloženost ionizirajućem zračenju bilo koje vrste, a najčešće se to u praksi viđa u žena koje su prethodno bile izložene zračenju iz terapijskih razloga, poput radioterapije prsišta u liječenju hematoloških maligniteta. (6) Među preostale okolišne čimbenike rizika ubrajaju se i sjedilački način života i izostanak tjelovježbe te ishrana bogata mastima, prekomjerna tjelesna masa te konzumacija alkohola. Iako su navedeni brojni genetski i okolišni, hormonski i prehrambeni čimbenici rizika za razvoj raka dojke, oni su poznati u samo manjem postotku slučajeva raka dojke, dok se i dalje u najvećem broju slučajeva rizične čimbenike nastanka ne može jasno definirati.

### *1.1.3. Dijagnostički pristup*

Osim aktivnosti usmjerenih na primarnu prevenciju, poput poticanja zdravog načina života, pravilne raznovrsne ishrane i tjelesne aktivnosti, u mjere preventivne politike u borbi protiv raka dojke spada i sekundarna prevencija, kojoj je cilj odgovarajući probir u populaciji od rizika, kako bi se rak dojke dijagnosticirao na vrijeme. U programe probira za rak dojke, koji su u načelu slični u većini zemalja, uključene su žene dobne skupine od 50 do 70 godina, koje bi se u intervalima od dvije godine trebale podvrgavati mamografskom snimanju. (7,8) Osim navedenog redovnog, preventivnog dijagnostičkog postupka, kada postoji sumnja na rak dojke poduzima se usmjereni dijagnostički postupak, koji podrazumijeva posjet onkologu, odgovarajući medicinski intervju i klinički pregled, slikovni dijagnostički postupak, laboratorijske pretrage i definitivni postupak dobivanja, odnosno potvrđivanja dijagnoze raka dojke – biopsiju i

patohistološku analizu sumnjivog tkiva, što predstavlja zlatni standard. (9) Nakon postavljanja dijagnoze raka dojke, dalja obrada poduzima se ovisno o kliničkoj slici. Rak dojke može se dijagnosticirati temeljem sudjelovanja u preventivnom programu probira, a da je asimptomatski, ili može uzrokovati simptome, poput boli i zatezanja u dojci, iscjетка iz bradavice, otekline, navlačenja kože, upale u području tumora, palpabilne otekline u pazušnoj jami ili slično, a najčešće je to palpabilan čvor u dojci. Danas se rak dojke najčešće dijagnosticira u stadiju lokalne bolesti, ograničene na dojku, nešto rjeđe u stadiju lokalno uznapredovale bolesti. Metastatsku bolest u trenutku dijagnoze ima oko 5% bolesnica. (10) Zahvaljujući raznim dijagnostičkim i terapijskim napretcima u onkologiji dojke, postojanju preventivnih programa probira, danas bi se rak dojke morao moći rano dijagnosticirati, stoga se postavljanje dijagnoze raka dojke većeg od dva centimetra smatra preventivsko – dijagnostičkim neuspjehom. Ukoliko postoji sumnja na diseminaciju bolesti, poduzimaju se dalje dijagnostičke pretrage, kako bi se utvrdio točan stadij bolesti i prema tome napravio dalji plan postupanja i liječenja. (11)

#### *1.1.4. Terapijski pristup*

Ovisno o tome je li rak dojke dijagnosticiran u ranoj fazi ili u stadiju proširene bolesti, terapijski pristup se primjenjuje s različitim ciljem. Ukoliko se radi o ranoj bolesti, cilj liječenja je izlječenje i sprječavanje rizika povrata bolesti, stoga se u liječenju primjenjuje agresivniji pristup, kako bi se navedeni cilj ostvario, u vidu dugoročnog preživljenja, bez znakova povrata i postojanja bolesti. (11) Metastatski rak dojke danas je još uvijek neizlječiva bolest. Pristup liječenju metastatskog raka dojke razlikuje se od liječenja rane faze izlječive bolesti. Cilj liječenja metastatskog raka dojke je postizanje kontrole bolesti,



što dužeg preživljenja, uz očuvanu kvalitetu života, koja se ne smije nedopustivo narušiti.

(12) U liječenju se primjenjuje niz lokalnih i sustavnih metoda. U najčešće korištene metode primarnog liječenja ranog raka dojke ubrajaju se lokalne metode: operacijsko liječenje i zračenje. U ranih oblika bolesti (tumora nižeg stadija) radikalne zahvate može zamijeniti pošteno operacijsko liječenje i zračenje, čime se postiže isti učinak. (13) Najčešće korištene metode sustavnog liječenja su kemoterapija, antihormonska terapija, ciljana biološka terapija, a u novije vrijeme i imunoterapija, kojima se postiže različit postotak smanjenja rizika od povrata bolesti. Primjena adjuvantnog liječenja ranog raka dojke smanjuje inicijalni rizik povrata bolesti za jednu trećinu. (14) Terapijski pristup definira sama proširenost bolesti. Ukoliko je bolest ograničena na dojku, najčešće se primjenjuje primarno i definitivno operacijsko liječenje, a potom, ovisno o postojanju rizičnih čimbenika, primjenjuje se dodatno (adjuvantno) zaštitno liječenje radioterapijom na dojku (i pazušnu jamu) te sustavnom kemoterapijom, antihormonskom terapijom ili ciljanom terapijom, ovisno o biološkom profilu tumora. (11,15) Neoadjuvantni pristup podrazumijeva primjenu sustavne terapije prije izvedbe operacijskog zahvata. Primjenjuje se iz niza onkoloških i operacijskih razloga, koji svi trebaju osigurati bolje rezultate liječenja, u medicinskom i tehničkom smislu (uživo praćenje odgovora tumora na terapiju i postizanje kompletnog odgovora, smanjenje tumorske mase i omogućavanje poštenog operacijskog zahvata). Ukoliko se postigne kompletan odgovor tumora na primijenjenu sustavnu terapiju (kompletan patološki odgovor, *pCR*) to je dokazano signal za bolje preživljenje, osobito u najagresivnijim podvrstama raka dojke. (16) U trendu poštenijeg pristupa operacijskom liječenju raka dojke, bez narušavanja dugoročne prognoze, eksploraciju pazušne jame ponekad može neinferiorno zamijeniti biopsija limfnog čvora čuvara. (17)

## 1.2. Patologija raka dojke

### 1.2.1. Patohistološka klasifikacija

Prema patohistološkoj klasifikaciji, tumore dojke dijeli se u neinvazivne (DCIS, LCIS), mikroinvazivni i invazivne karcinome. Najčešći invazivni karcinom dojke, u preko 80% slučajeva, je duktalnog tipa, nastao od epitela izvodnih kanalića u žljezdanom parenhimu dojke. Oko 10-15% karcinoma dojke su lobularnog tipa, nastali iz žljezdanog lobularnog epitela. Ostalo su specijalni histološki tipovi, poput prognostički boljih tubularnog, mucinoznog, kribriformnog, medularnog, apokrinog, i dr. (18) Poseban tip je upalni rak dojke, koji se javlja u oko 1 – 3% slučajeva i predstavlja agresivnu podvrstu, najčešće duktalnog tipa, karakteriziran uznapredovalijim stadijem u trenutku dijagnoze, edemom, upalom i ulceracijama kože, zahvaćenošću limfnih čvorova te stvaranjem tumorskih embolusa u dermalnim limfnim žilama. (19) Prema važećem, osmom izdanju AJCC, na sve DCIS i invazivne karcinome dojke primjenjuje se TNM klasifikacija, koja anatomske i patološki definira veličinu primarnog tumora u dojci (T), zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N) te postojanje udaljenih metastaza (M). (Tablica 1) Združivanjem T, N i M komponente, definira se i stadij uznapredovalosti bolesti (od 0, ako se radi o mikroinvazivnom tumoru, bez zahvaćenosti limfnih čvorova, do stadija IV, kada postoje udaljene metastaze). (20) Rani rak dojke je prema definiciji bolest koja se nije proširila izvan dojke ili pazušnih limfnih čvorova. To uključuje karcinom *in situ*, stadij I, IIA, IIB i IIIA, dok je uznapredovala bolest ona koja se proširila na torakalnu stijenku, supra i infraklavikularne limfne čvorove pa sve do udaljenih sekundarnih žarišta. (20) U osnovnom patohistološkom izvještaju, uz histološki tip tumora i TNM stadij, navode se i

slijedeći važni elementi: veličina tumora u dvije dimenzije, odnos tumora prema rubovima preparata, odnos tumora prema krvnim i limfnim žilama te živcima (limfovaskularna i perineuralna invazija), stupanj zloćudnosti – gradus tumora te mitotički stadij, definiran proliferacijskim indeksom Ki-67. Nužno je navesti i broj pregledanih te tumorom zahvaćenih limfnih čvorova. (21)

**Tablica 1.** TNM klasifikacija i stadiji bolesti raka dojke (Prilagođeno prema AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition)

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS			
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1*	N0	M0
Stage IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
Stage IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
	T2	N0	M0
Stage IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Stage IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Stage IIIC	Any T	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

### 1.2.2. Molekularna klasifikacija

Molekularnim profiliranjem raka dojke pokazalo se kako je rak dojke heterogena bolest. Prema genskoj izraženosti, postoje četiri suštinska, intrinzična tipa raka dojke: luminalni tip, HER2 tip, bazaloidni tip i tip poput normalnog tkiva dojke. Luminalni tip sadrži A, B

i C varijantu, i svi imaju izražene estrogenske receptore (ER). Tri preostala tipa nemaju izražene ER. Luminalni tip jesu tumori nastali iz luminalnog epitela, dok bazaloidni tip čine tumori koji su se razvili iz bazalnog mioepitelnog sloja stanica. (22) Temeljem intrinzičnih osobitosti raka dojke i izraženosti gena vezanih uz proliferaciju, danas postoje i dodatni multigeni testovi i molekularni modeli, poput OncoType Dx, MammaPrint i sl., kojima se pokušava, na osnovu navedenih svojstava, dodatno stratificirati rak dojke u nisko i visokorizične kategorije, odnosno predvidjeti klinički tijek, odgovor na terapiju i prognozu, kako bi se što preciznije terapijski pristupilo. (23, 24, 25)

### *1.2.3. Imunohistokemijska klasifikacija*

Cilj klasificiranja raka dojke u praksi je dobiti smjernicu za terapijsku odluku. Imunohistokemijska (IHC) klasifikacija rak dojke razvrstava temeljem izraženosti proteina na ili u stanicama tumora. Najpoznatiji i najvažniji takvi jesu hormonski (steroidni) receptori (HR) – estrogenski (ER) i progesteronski (PR), koji se imunohistokemijski definiraju kao pozitivni, ukoliko je izraženost više od 1%. (26) Osim hormonskih receptora, IHC se određuje i pojačana izraženost proteina HER2, na površini tumorske stanice. Ukoliko je ta izraženost jasna (3+), tumor se definira kao HER2 pozitivan. Ukoliko je izraženost HER2 proteina IHC dvosmisljena, odnosno nesigurna, dodatno se obavlja molekularno testiranje amplifikacije gena HER2/neu, temeljem *in situ* hibridizacijskih metoda (fluorescentna (FISH), kromogena (CISH), srebrna (SISH)). (27) Temeljem IHC analize, postoje četiri surogatna podtipa raka dojke: luminalni A podtip (HR pozitivan, HER2 negativan), luminalni B podtip HER2 negativan i luminalni B podtip HER2 pozitivan (tzv. „trostruko pozitivni“), pravi HER2 podtip (neluminalni) i

trostruko negativni podtip (TNRD, ne izražava HR niti HER2). (Tablica 2) Usporedbom s genskom, odnosno molekularnom klasifikacijom temeljenom na genskoj izraženosti, koja klasificira rak dojke u prave, intrinzične podtipove, koji se međusobno razlikuju u naravi, ponašanju i prognozi i zapravo predstavljaju različite bolesti, pokazalo se da je IHC klasifikacija dostojna zamjena u praksi, da navedeni IHC surogatni podtipovi raka dojke pouzdano odgovaraju sukladnim intrinzičnim podtipovima raka dojke i da se u praksi, u nedostatku i nemogućnosti rutinske molekularne klasifikacije, IHC može koristiti kao temeljna klasifikacija i vodič pri terapijskom odlučivanju. (22,28) Danas se, stoga, rak dojke u praksi standardno kategorizira prema imunofenotipskim surogatima intrinzičnih tipova, u četiri kategorije, kako slijedi: luminalni tip A: ER+, PR+, HER2-, Ki-67<20%, najčešći i najmanje agresivan podtip, nižeg gradusa, dobro diferenciran, bolje prognoze, dobrog odgovora na antihormonsku terapiju i češći u bolesnica starije životne dobi; luminalni tip B: ER+, PR+/-, HER2 +/-, bilo koji Ki-67, sličan luminalnom tipu A, no nešto lošijeg ponašanja i prognoze; HER2 tumor ili neluminalni HER2 tip: ER-, PR-, HER2 +, bilo koji Ki-67, zastupljen u oko 20 – 25% slučajeva, izrazito agresivan tip, visokog gradusa i slabije diferenciran, s tendencijom javljanja u mlađih žena, terapijski napredak postignut uvođenjem ciljane antiHER2 terapije; trostruko negativan rak dojke: izrazito agresivan podtip, visokog gradusa, slabo diferenciran, nema izražene ER, PR niti HER2 receptore, stoga ne postoji ciljane terapija, veći je rizik razvoja u mlađoj životnoj dobi (<40 godina), prognoza bolesti je loša, a tijek bolesti agresivan. (29) U praksi su najčešći luminalni podtipovi raka dojke, sa zastupljenošću oko 70%, dok se HER2 pozitivni neluminalni rak dojke javlja u oko petine bolesnica. TNRD je zastupljen u oko 15% svih slučajeva raka dojke. (22,25-27)

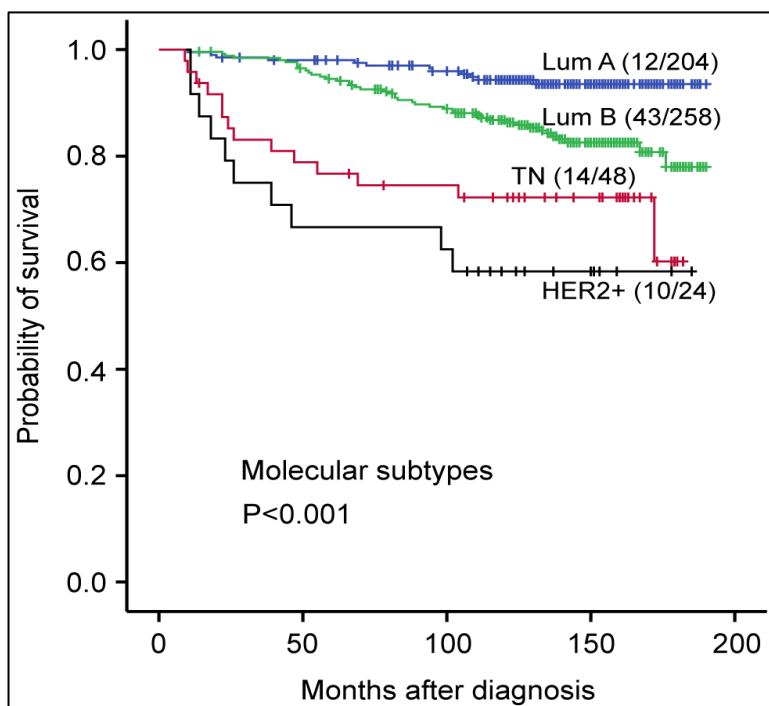
**Tablica 2.** Klasifikacija raka dojke prema St. Gallen koncenzusu (Preuzeto iz Goldhirsch, A, et al, Ann Oncol, 2013)

Breast Cancer Subtype	Definition
Luminal A	ER positive, PR positive, HER2 negative Ki-67 index low (defined as <14%) Luminal B (HER2 negative)
Luminal B	ER positive, HER2 negative and at one of: Ki-67 index high (defined as 14% and above) PR negative or low (defined as <20%) Luminal B (HER2 positive)
HER2 over-expressing	ER positive, HER2 over-expressed or amplified, any Ki-67 index, Any PR
Triple negative	HER2 over-expressed or amplified, ER and PR negative ER and PR negative, HER2 negative

#### 1.2.4. Prognostički i prediktivni čimbenici

Na odluku o terapijskom pristupu utječu čimbenici od strane bolesnice, poput dobi, menopauzalnog statusa, komorbiditeta te same želje bolesnice. Čimbenici samog tumora jesu veličina, zahvaćenost limfnih čvorova, histološki podtip, diferenciranost (gradus), izraženost HR i HER2, vaskularna invazija te rezultat molekularnog testiranja. Tradicionalni čimbenici rizika u raku dojke jesu veličina tumora, multiplost tumora, obostrani tumori, zahvaćenost limfnih čvorova, histološki gradus tumora (diferenciranost stanica), izraženost HR, proliferacijski indeks Ki-67, histološki tip tumora, vaskularna invazija i stanje resekcijskih rubova uzorka tkiva. (11) U prave prognostičke čimbenike, odnosno one koji govore o izgledima za preživljenje, bez obzira na primijenjenu terapiju, ubrajaju se patološki stadij prema TNM klasifikaciji, vaskularna invazija te izraženost ER/PR i HER2. U prediktivne čimbenike, koji ukazuju na to kakav bi mogao biti ishod liječenja, odnosno korist od pojedine terapije, ubrajaju se ER i PR te HER2 i proliferacijski indeks Ki-67. (30,31) Nottinghamski prognostički indeks (NPI) objedinjuje tri patološka kriterija: promjer tumorske lezije, broj zahvaćenih limfnih

čvorova i gradus tumora, a koristi se s ciljem određivanja prognoze u bolesnica s rakom dojke, nakon provedenog operacijskog liječenja. (32) U praksi najčešće korištena IHC podjela na četiri surogata intrinzičnim podtipovima raka dojke ukazuje na četiri prognostički posve različita entiteta, bolesti koje se drugačije ponašaju, drugačije odgovaraju na terapiju i imaju drugačije preživljenje. (29) (Slika 1) Pri tome najbolje izgleda imaju luminalni podtipovi, osobito luminalni A podtip raka dojke. HER2 pozitivni neluminalni rak dojke je u svojoj prirodi vrlo agresivna bolest, s lošom prognozom, no značajan napredak postigao se uvođenjem ciljane antiHER2 terapije, koja je potpuno promijenila biološki tijek bolesti. (33) Prognostički najlošiji podtip raka dojke, s malo terapijskih mogućnosti, danas ostaje TNRD. (34)



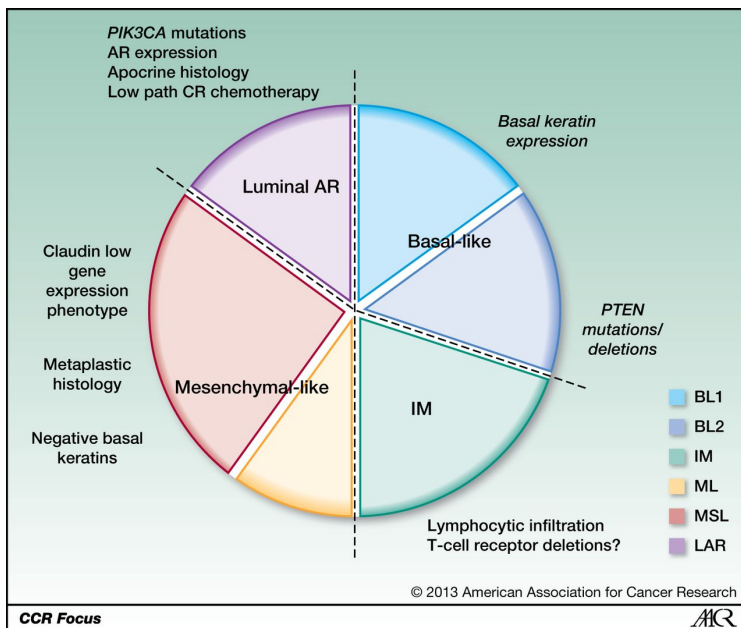
**Slika 1.** Prognoza različitih podtipova raka dojke (Preuzeto iz Knutsvik, G, et al, PlosOne, 2014)

### 1.3. Trostruko negativni rak dojke: jedan tumor ili više različitih bolesti?

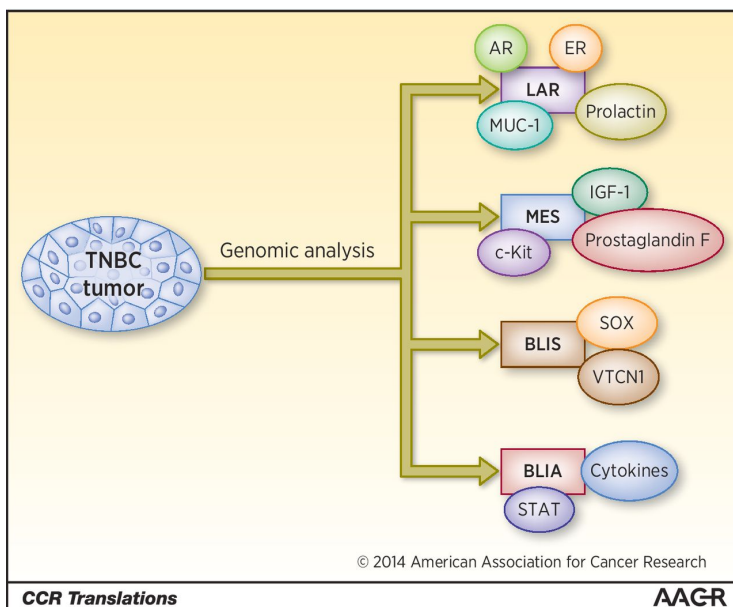
#### 1.3.1. Izazovi u klasifikaciji trostruko negativnog raka dojke

Trostruko negativni rak dojke (TNRD) definira se IHC temeljem neizraženosti hormonskih (ER i PR) te HER2 receptora. (29) Histološki je to u najvećem broju slučajeva invazivni duktalni karcinom (NOS), no TNRD može biti i neki od drugih, rjeđih histoloških podtipova, poput medularnog, adenoid – cističnog, apokrinog, metaplastičnog i sl. i ti podtipovi češće imaju bolju prognozu od uobičajene za TNRD. (35) TNRD se kao entitet prvi put u literaturi spomenuo 2005. godine i od tada je na temu TNRD objavljeno više tisuća znanstvenih radova. (36) TNRD je izrazito heterogena bolest. Različiti podtipovi TNRD imaju različitu genetsku osnovu, fenotipsku izraženost, različito se ponašaju, imaju različit odgovor na terapiju i prognozu. (37) IHC entitet TNRD se može klasificirati na temelju niza elemenata, poput genske izraženosti, uočenih DNA promjena, izraženosti proteina na stanici tumora i temeljem imunskog potencijala. Prema genskoj izraženosti, TNRD se klasificira u šest podtipova: *basal – like 1* (BL1), *basal – like 2* (BL2), imunomodulatorni tip (IM), mezenhimalni tip (M), *mesenchymal - stem - like* tip (MSL) te luminalni androgen receptor pozitivni (LAR). (38) (Slika 2) Uz ovih šest podtipova koji su temeljni podtipovi identificirani molekularnom analizom genske izraženosti, često se navodi i sedmi, nestabilni podtip. (39) Druga molekularna klasifikacija razvrstava TNRD u četiri podtipa: *basal – like – immunoactive* (BLIA), *basal – like – immunosuppressive* (BLIS), *mesenchymal – like* (MES) i LAR. (40) (Slika 3) Postoji podudarnost između dvije navedene klasifikacije pa tako BLIA odgovara BL1 i IM podtipu, BLIS odgovara M podtipu, a MES odgovara MSL podtipu.





**Slika 2.** Lehmannova klasifikacija TNRD (Preuzeto iz Turner, NC, Reis-Filho, JS, Clin Cancer Res, 2013)



**Slika 3.** Četiri podtipa TNRD prema Bursteinu (Preuzeto iz Vidula, N, Rugo, HS, Clin Cancer Res, 2015)

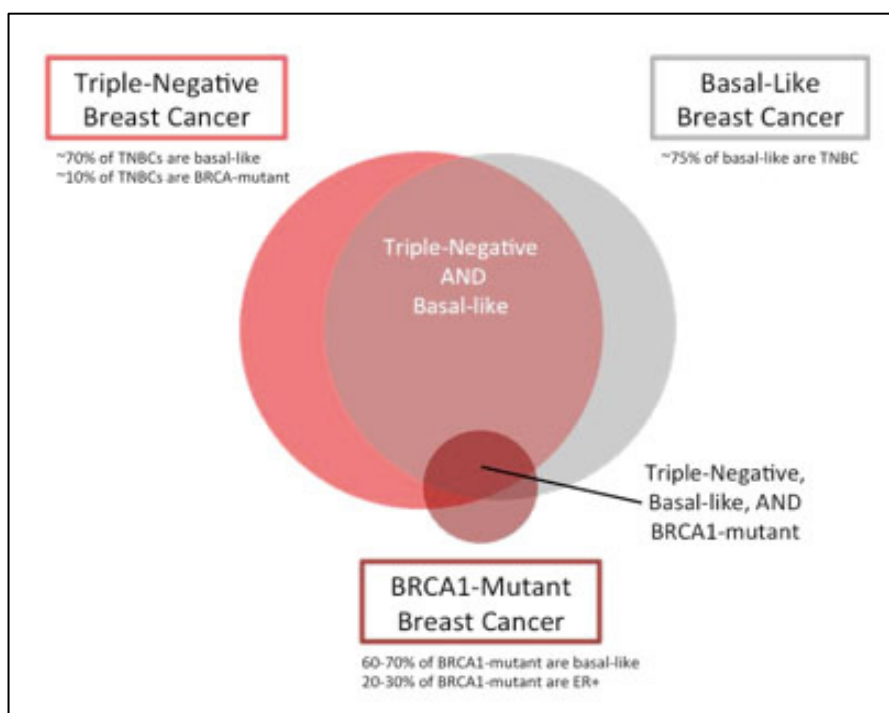
Navedeni podtipovi prema genskoj klasifikaciji predstavljaju različite entitete, koji izražavaju različite genske abnormalnosti, kao i različite signalne puteve i molekularne biljege. U BL1 podtipu izražene su abnormalnosti gena staničnog ciklusa, gena koji sudjeluju u popravku oštećenja DNA (ATR-BRCA mehanizam) te proliferacijskih gena. U BL2 podtipu naglašen je signalni put čimbenika rasta (EGFR, MET, NGF, Wnt/beta-katenin, IGF-IR), kao i izraženost bazalnih mioepitelijalnih biljega. Imunomodulatorni podtip (IM) pokazuje poremećaje u imunosnim staničnim procesima (naglašen CTLA4, IL 12 i IL 7 mehanizam) i poremećaje u prezentaciji i procesiranju tumorskih antigena. U ovom podtipu česta je medularna histologija, koja pokazuje bolju prognozu. U *mesenchymal – like* podtipu (M) često se vide poremećaji u motilitetu i diferencijaciji stanica, u signalnim putevima čimbenika rasta te se prepoznaju obrasci epitelno – mezenhimalne transformacije (EMT). U MSL podtipu javljaju se poremećaji slični M podtipu, kao i poremećaji u genima za angiogenezu. U dva navedena mezenhimalna podtipa često se javlja metaplastična histologija, u ovoj skupini su najčešći *claudine – low*, nestabilni tumori i uglavnom ne izražavaju bazalne citokeratine. Podtip LAR predstavlja entitet u kojem je izražen steroidni androgeni receptor (AR) i ima obrazac izraženosti luminalnih gena, poput ER i PR pozitivnih tumora. (38 - 40) Prema Jezequielu i sur. temeljem genskog profiliranja TNRD se može podijeliti i u tri glavna podtipa: LAR podtip, *basal – like* podtip, karakteriziran niskim imunosnim odgovorom i *basal – like* podtip obogaćen jakom imunoreaktivnošću. (41) Temeljem izraženosti bazalnih citokeratina, IHC se TNRD još kategorizira u *core – basal* tip (trostruko negativan - ER-/PR-HER2-, a CK5/6 i/ili EGFR+) ili 5 – NP tip (svih pet navedenih biljega je negativno). (42) Temeljem imunosnog potencijala, TNRD se klasificira u tri kategorije: imunogenični tumori, potencijalno imunogenični tumori i neimunogenični (hladni) tumori.

Imunogenični TNRD često se povezuju s IM, odnosno BLIA podtipom prema molekularnoj klasifikaciji, to su tumori koji izazivaju reakciju imunskog sustava, uglavnom imaju prisutan imunski infiltrat u području tumora i osjetljivi su na djelovanje imunoterapije. Potencijalno imunogenični tumori jesu oni koji u startu ne izazivaju imunski odgovor, ne detektira se prisutnost imunskog infiltrata, no terapijskim djelovanjem može se stimulirati njihova imunogeničnost. Neimunogenični (hladni) tumori nemaju imunogenični potencijal i ne stimuliraju imunski sustav. (43)

### *1.3.2. Trostruko negativni tip – bazaloidni tip – BRCA pozitivni tip*

U praksi se često TNRD i bazaloidni tip (*basal – like – breast cancer*, BLBC) smatraju sinonimima i istim entitetom, što nije točno. Kako je već navedeno, TNRD je imunohistokemijski entitet, opisan izostankom imunohistokemijske izraženosti ER, PR i HER2. (29) Bazaloidni tip raka dojke jest dijagnoza postavljena temeljem genskog mapiranja, to je entitet koji ima amplificirane gene bazalnog neluminalnog mioepitelnog sloja izvodnih kanalića i lobula dojke i izražava tipične bazalne mioepitelne biljege. (38) Imunohistokemijski biljezi za bazaloidni tip raka dojke jesu citokeratini CK5, CK6, CK14, p63, p – cadherin, vimentin, EGFR (HER1), c-kit, IGFR i drugi. (44) U literaturi se navodi zastupljenost bazaloidnih karakteristika među tumorima dojke ukupno oko 15%. Uglavnom su to TNRD, ali se bazaloidne karakteristike nađu i u oko 5% ER pozitivnih i čak i do trećine HER2 pozitivnih tumora. (45,46) Postoji oko 25% - tna diskordanca u podudarnosti TNRD i BLBC. Oko 75% TNRD jesu BLBC i oko 80% BLBC jesu TNRD, a prema nekim autorima te su brojke i manje. (45,47) Uobičajene karakteristike zajedničke TNRD i BLBC su mlađa životna dob, duktalna histologija,

visoki mitotski indeks, slaba diferenciranost (visoki gradus), prisutnost nekroze i fibroze u tumorskom tkivu, stromalni limfocitni odgovor. (45-47) Ipak, u svakodnevnoj kliničkoj praksi još uvijek nije u uporabi gensko profiliranje za detekciju BLBC i stoga definiranje TNRD temeljem IHC ostaje rutinski način određivanja, uz svijest o nepotpunom preklapanju ovih entiteta i stoga mogućnosti pogreške (Slika 4), a prema nekim autorima opravdano je uz trostruko negativni fenotip, za definiranje bazaloidnog podtipa testirati još i citokeratine 5 i 6 i EGFR. (42,48) BRCA 1 i 2 mutacije već su opisane kao najčešće mutacije odgovorne za nastanak nasljednih oblika raka dojke (>90%). (5) Većina BRCA mutiranih karcinoma dojke su TNRD, njih oko 75% i uglavnom pokazuju morfološke i imunohistokemijske sličnosti BLBC. Međutim, samo 10 do 20% svih TNRD ima BRCA 1 (16%) ili BRCA 2 (4%) mutaciju, uz značajne razlike ovisno o rasi, dobi i etničkoj pripadnosti. (45,47,49)



**Slika 4.** Preklapanje TNRD – BLBC – BRCA (Prilagođeno iz Stover, DG, et al, AJHO, 2016)

Činjenica da se sličnost s BRCA mutiranim tumorima zamjećuje i u velikog broja TNRD, a bez prisutne BRCA mutacije, vodila je u dalja istraživanja i nastanak pojma *BRCAness*. (50) *BRCAness* predstavlja sporadične tumore, bez zametne BRCA mutacije, koji imaju oštećene mehanizme popravka DNA putem homologne rekombinacije. Takvi TNRD nemaju zametnu BRCA mutaciju, a izražavaju klinički i biološki fenotip poput BRCA mutiranih tumora, zahvaljujući alternativnim mehanizmima oštećenja, kao što su drugi genetski i epigenetski mehanizmi, poput metilacije promotorske regije, somatske BRCA mutacije i izmjenjene izraženosti drugih gena, poput TP53, PALB2, ATM i HORMAD1 i stoga je prepoznavanje ovog fenomena od velike kliničke važnosti. (51)

### *1.3.3. Paradoks trostruko negativnog raka dojke*

Trostruko negativni rak dojke javlja se u oko 12 – 17% svih slučajeva raka dojke. Najčešće se javlja u mlađih žena, afroameričkog ili hispanskog podrijetla, u nositeljica BRCA mutacija ili sporadično i karakteriziran je agresivnom prirodom. To su najčešće slabo diferencirani tumori, visokog mitotskog indeksa, češće zahvaćaju limfne čvorove i limfovaskularne prostore i brže rastu. Zbog navedenih agresivnih karakteristika osjetljiviji su na kemoterapiju i u liječenju TNRD bilježe se evidentno bolji odgovori na terapiju, u odnosu na druge podtipove raka dojke, poput veće stope postignutog kompletnog patološkog odgovora (pCR) pri primjeni neoadjuvantnog liječenja. (34,52-54) Ipak, unatoč bilježenju boljih početnih odgovora na terapiju, krajnji ishodi u liječenju TNRD puno su lošiji, u odnosu na druge podtipove raka dojke. Ovaj fenomen poznat je pod nazivom paradoks trostruko negativnog raka dojke. (55) Trostruko negativni rak dojke karakterizira agresivno ponašanje: visok metastatski potencijal, veća stopa

lokalnog i udaljenog povrata bolesti, osobita sklonost davanju udaljenih, visceralnih rasadnica, najčešće u pluća i mozak te brza progresija i kratko vrijeme od pojave udaljenih rasadnica do smrti. (52,53) Opisana dinamika TNRD uočena je u prve tri do pet godina od dijagnoze, nakon čega se rizik povrata bolesti i stope povrata i diseminacije bolesti izjednačavaju s onima uočenim u drugim podtipovima raka dojke, koji imaju manji i ujednačeniji rizik povrata bolesti i smrti, no kroz duže vremensko razdoblje. (56)

#### *1.3.4. Izazovi u terapijskom pristupu*

Trostruko negativni rak dojke karakterizira odsutnost izraženosti hormonskih receptora, ER i PR te HER2 receptora. Zbog toga na TNRD nema učinka antihormonska terapija, usmjerena protiv ER/PR niti ciljana antiHER2 terapija. Okosnica liječenja TNRD danas je još uvijek klasična citotoksična terapija. Optimalan kemoterapijski pristup TNRD nije definiran i primjenjuju se principi liječenja koji se koriste i u drugim tipovima raka dojke, uz činjenicu da TNRD puno češće ima više prisutnih rizičnih čimbenika, koji utječu na terapijsku odluku. (57) TNRD pokazuje visoke stope patološkog kompletnog odgovora (pCR) na neoadjuvantno liječenje i kada je pCR postignut, često je u takvim slučajevima i dugoročno sveukupno preživljenje (OS) dobro. Međutim, u slučajevima kada se neoadjuvantnim liječenjem ne postigne pCR u TNRD, prognoza je vrlo loša i osjetno lošija u odnosu na druge tipove raka dojke, bez obzira na postizanje pCR u njih. (54,58) U pristupu TNRD najčešće se primjenjuje kemoterapija temeljena na antraciklinima i taksanima kojom se, ukupno gledajući, postiže odgovor u oko 30% slučajeva. (59,60) U odnosu na povijesne kemoterapijske standarde u liječenju, poput protokola ciklofosfamid – metotreksat – 5-fluorouracil (CMF), antraciklini su pokazali superioran učinak u

liječenju TNRD. S obzirom na čestu prisutnost defektnih mehanizama popravka DNA u TNRD, učinkovito se dokazala kemoterapija platinskim spojevima, kao i drugim agensima koji oštećuju DNA. Danas se zna da su platinski spojevi osobito učinkoviti u liječenju BRCA mutiranih TNRD, no ne mogu se zanemariti ni njihovi učinci u TNRD bez prisutnih BRCA mutacija. (59,61) Među citotoksičnim agensima, u liječenju TNRD učinkovitima su se pokazali i antimetaboliti, poput kapecitabina i gemcitabina, kao i neki drugi antimikrotubularni agensi, poput eribulina. (59) Osim klasičnom citotoksičnom terapijom, na TNRD se pokušava djelovati i nekim ciljanim terapijama. U BRCA mutiranih TNRD uspješnom se pokazala terapija PARP inhibitorima, koji djeluju na podložne stanice tumora, u kojima već postoji defekt u sustavu popravka DNA procesom homologne rekombinacije. (62) Do sada provedena istraživanja s inhibitorom angiogeneze bevacizumabom pokazala su učinak lijeka, međutim bez utjecaja na preživljenje. Terapija antiEGFR inhibitorima, poput cetuksimaba, također nije ostvarila učinak na preživljenje, iako se pokazalo da lijek može pojačati učinak kemoterapije. S obzirom da su mutacije PI3K/AKT/mTOR signalnog puta i gubitak PTEN također učestale u TNRD, danas se u liječenju TNRD istražuje i učinak mTOR inhibitora. (63,64) Kako je već opisano, određeni udio TNRD ima izražene androgene receptore (AR), koji predstavljaju privlačnu terapijsku metu. Posljednjih godina sve se više istražuje i saznaje o imunogeničnosti TNRD i imunoterapija predstavlja novi potencijalno uspješan terapijski pristup.

### 1.3.5. Biobiljezi u trostruko negativnom raku dojke

Trostruko negativni rak dojke smatra se „*orphan*“ tumorom, s obzirom da ne pokazuje izraženost niti jednog od danas dobro poznatih tumorskih biobiljega, koji predstavljaju manje ili više uspješne terapijske ciljeve. Ipak, u traganju za terapijskim metama i pokušaju dešifriranja heterogene prirode TNRD, razne molekularne i genske analize iznjedrile su do danas neke biobiljege, koji se u većem ili manjem postotku javljaju u određenim podtipovima TNRD, a koji bi u budućnosti mogli nositi određenu kliničku, odnosno terapijsku korist. Takvi su npr. već spomenuti EGFR, VEGFR, Src kinaza, mTOR, c-kit i bazalni citokeratini, PIK3CA/AKT, FGFR, JAK/STAT3, Trop-2, TRAIL, TGF-beta, P53 i mnogi drugi amplificirani geni, izraženi proteini ili citokini te signalni putevi i stanični mehanizmi, koji se ekskluzivno vezuju uz određene podtipove TNRD, no do danas nisu postignuti dovoljno snažni rezultati istraživanja, da bi postali dijelom kliničke prakse. (65-68) U posljednje vrijeme, najviše interesa pobuđuje do danas nerazjašnjen značaj AR u podtipu LAR TNRD i mogućnost djelovanja na TNRD antihormonskom terapijom, kao i prisustvo imunosnog infiltrata (tumor-infiltrirajućih limfocita, TIL) u TNRD, kao biljega endogenog imunosnog odgovora organizma na tumor i potencijalnog pokazatelja uspjeha imunoterapije.

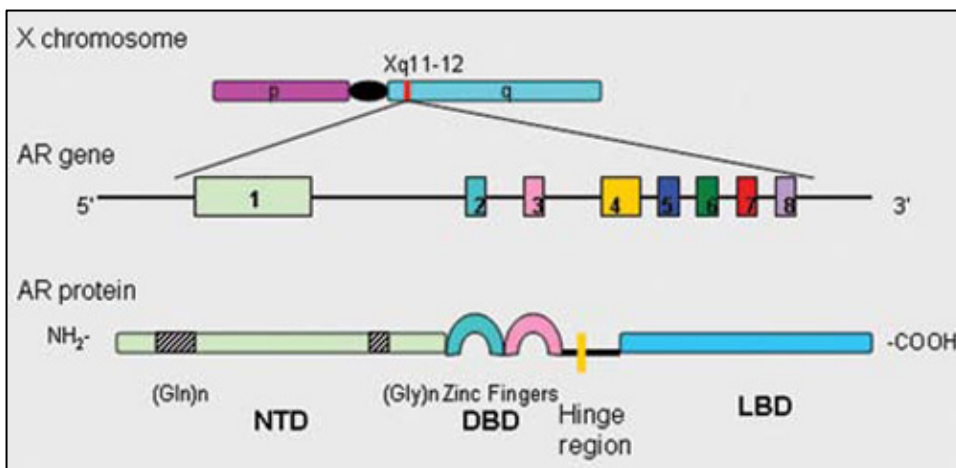


## 1.4. Androgeni receptori

### 1.4.1. Struktura i funkcija androgenih receptora

Androgeni receptori (AR) su o ligandu ovisni jezgrini transkripcijski čimbenici, koji kontroliraju izraženost specifičnih gena i pomoću kojih se odvija djelovanje androgena (testosterona i dihidrotestosterona) u organizmu. Pripadaju obitelji steroidnih hormonskih receptora jezgre, zajedno s ER, PR, glukokortikoidnim receptorima (GR) i mineralokortikoidnim receptorima (MR). Izraženi su u brojnim stanicama i tkivima i imaju različite uloge, poput onih u izgradnji i održavanju spolnog, mišićnokoštanog, krvožilnog, imunskog, živčanog i krvotvornog sustava.

AR je jedan polipeptid, koji se sastoji od tri glavne domene: N – terminalne domene za regulaciju transkripcije, DNA – vežuće domene (od engl. *DNA – binding domain*, DBD) i ligand – vežuće domene (od engl. *ligand – binding domain*, LBD) te šarkaste regije, koja povezuje DBD i LBD. (69,70) (Slika 5)



Slika 5. Struktura AR (Preuzeto iz Galani, A, et al, Hormones, 2008)

Aktivnost AR odvija se kroz o ligandu ovisne funkcije aktivacije transkripcije te o ligandu neovisne funkcije aktivacije transkripcije. O ligandu ovisne funkcije aktivacije transkripcije vezane su uz LBD i razlikuju se između različitih jezgrinih hormonskih steroidnih receptora. Postoje dva načina na koje se odvijaju ove o ligandu ovisne funkcije AR. Prvi oblik je o DNA vezivanju ovisni oblik aktivnosti AR, koji se naziva genomskim, klasičnim ili kanoničkim oblikom funkcije AR. U odsutnosti liganda, AR se nalaze u citosolu stanice, vezani s *heat – shock* i drugim *chaperon* proteinima. Vezivanje androgena (liganda) izaziva konformacijske promjene, disocijaciju vezanih citosolnih proteina za AR i prijenos AR – ligand kompleksa u jezgru, gdje dimerizira i veže se za selektivne ARE (od engl. *Androgene response elements*) u ciljanim genima, koji moduliraju proces transkripcije. Transkripcijsku aktivnost AR – androgen kompleksa moduliraju i specifični proteini – koregulatori, koji vezivanjem za aktivirani AR pojačavaju ili suprimiraju proces transkripcije. (69,70) Drugi oblik o ligandu ovisne funkcije AR je o DNA vezivanju neovisni oblik, koji se naziva i negenomskim, neklasičnim, odnosno nekanoničkim oblikom funkcije AR, pri čemu se u nekoliko trenutaka od vezivanja androgena na receptor pokreću alternativni signalni putevi poput ERK/Akt i MAPK, što je prebrzo za stvaranje signalne kaskade putem DBD, vezivanjem DNA, za regulaciju transkripcijskog i translacijskog procesa. Osim navedenih, istraženi su i još neki alternativni putevi signalizacije i neizravne regulacije procesa transkripcije i translacije, koji se javljaju u funkciji AR neovisnoj o DNA vezivanju i ovi mehanizmi uočeni su u brojnim različitim stanicama, međutim, istraživanja ovog mehanizma i dalje su na razini *in vitro* studija, bez jasnog odgovora o njihovom točnom fiziološkom značaju. O ligandu neovisne aktivnosti AR pokreću brojni različiti čimbenici rasta, a preko fosforilacije AR ili interakcije s koaktivatorima i oni naposljetku utječu na procese

transkripcije i translacije. Primjer takvog mehanizma djelovanja AR je i put preko IL – 6, koji aktivira AR preko protein kinaze A (PKA), protein kinaze C (PKC) i MAPK signalnog puta. Ovakvi mehanizmi su uočeni i od kliničkog su značaja u raku prostate. U N – terminalnoj transaktivacijskoj domeni (NTD) u sastavu AR javljaju se ponavljanja glutamina (CAG) i broj tih ponavljanja je varijabilan, što rezultira varijacijama u svim aminokiselinama u sastavu AR. Kraća glutaminska ponavljanja vezana su uz jaču transkripcijsku aktivnost AR, što povisuje i rizik maligne alteracije, a što je opaženo u muškaraca koji su češće oboljevali od raka prostate. (69-71)

#### *1.4.2. Uloga androgenih receptora u ljudskim zloćudnim tumorima*

Signalizacija putem AR može biti uključena u razvoj niza humanih zloćudnih tumora, poput raka prostate, mokraćnog mjehura, jetre, žlijezda slinovnica, bubrega, pluća, melanoma, sarkoma, dojke i mnogih drugih. (72) Uloga AR u raku prostate puno je jasnija i danas bolje objašnjena, nego AR signalizacija u drugim humanim epitelnim tumorima. (71) Ipak, danas se zna da je signalizacija putem steroidnih receptora često povezana s razvojem i napredovanjem bolesti, u nizu navedenih karcinoma. O točnom mehanizmu kojim AR signalizacija sudjeluje u promociji, razvoju i progresiji raka mokraćnog mjehura danas se još uvijek ne zna detaljno, međutim, sigurna je uloga AR u karcinogenezi i time se možda objašnjavaju i razlike uočene među muškarcima i ženama oboljelim od urotelnog karcinoma, a ovaj tumor smještaju u kategoriju hormonski ovisnih tumora. (73) Izraženost AR u većini duktalnih varijanti tumora žlijezda slinovnica, za koje se zna da lošije odgovaraju na kemoterapiju, možda će u budućnosti omogućiti liječenje ovih tumora antihormonskom terapijom. (74) Hepatocelularni karcinom, rak gušterače i

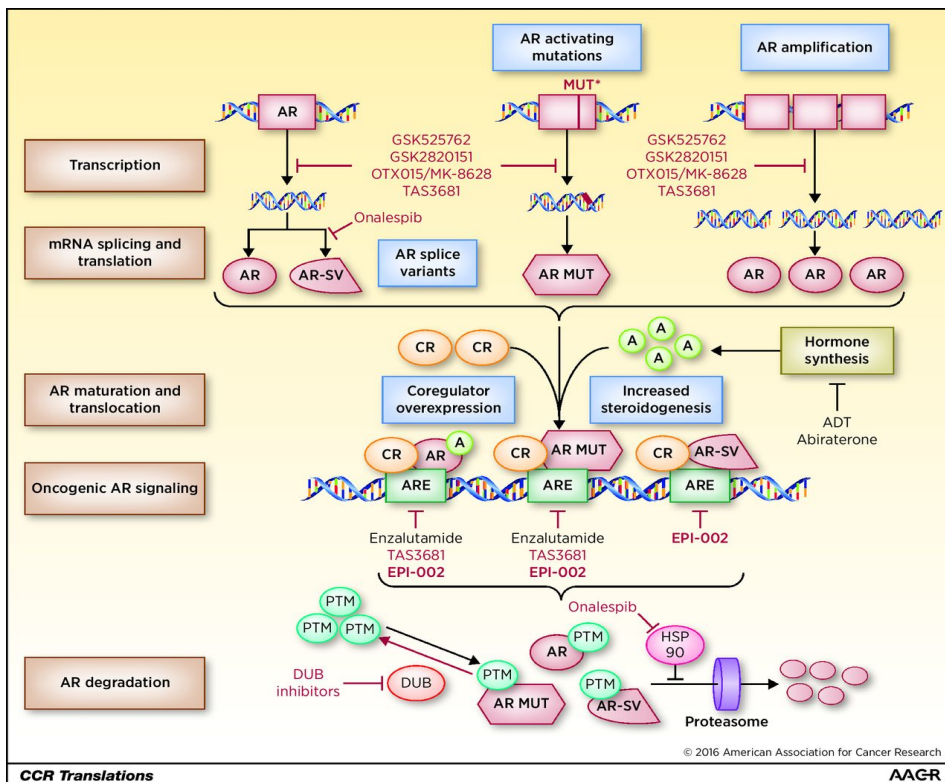
njihova okolna tkiva u određenoj mjeri sadrže AR, a sami AR, ne uključujući androgene, čini se da imaju ulogu u karcinogenezi i razvoju ovih tumora i čine potencijalno zanimljive terapijske ciljeve. (75) Prisutnost AR u stanicama malignog melanoma podržava metastatski potencijal i utječe na razvoj udaljenih rasadnica. (76) S druge strane, prisutnost AR u stanicama svjetlostaničnog ili papilarnog karcinoma bubrega čini se povezanom s boljim kliničkim tijekom i prognozom bolesti. (77) Razlike u tijeku bolesti i prognozi raka pluća između muškaraca i žena sugerirale su utjecaj steroidnih hormona i brojne su studije demonstrirale učinak ER, PR ili AR, iako često kontradiktoran. (78) Danas još uvijek nemamo definitivni odgovor o ulozi AR u pojedinim od istraženih tumora, rezultati do sada provedenih istraživanja često su međusobno oprečni, a detaljnije analize i rad na modelima, poput ARKO (AR – *knock out*) miševa pokazuju kako AR imaju zapravo različite učinke na pojedine različite stanične linije, čak i u istom tumoru. (79) Potrebna su dalja istraživanja kako bi se nedvojbeno definirala pozicija AR u tumorigenezi, metastaziranju i prognozi pojedinih hormonski ovisnih zloćudnih tumora, a s najviše podataka na tu temu danas se raspolože u problematici raka prostate i raka dojke.

#### *1.4.3. Androgeni receptori u raku prostate*

Utjecaj androgena na rast i preživljenje stanica raka prostate poznat je odavno. Androgen – deprivacijska terapija (ADT) danas je okosnica liječenja uznapredovalog, a pokazuje uspjeh i u liječenju visokorizičnog ranog raka prostate. Androgeni i AR temeljni su regulatori omjera stanične proliferacije i smrti, o kojem ovisi kontinuirani rast i opstanak tumora prostate. (80) U nastanku raka prostate ulogu ima aktivacija različitih signalnih

puteva koji promiču rast. Takav je i o androgenima ovisna *up*-regulacija transkripcijskih čimbenika koji pripadaju ETS obitelji, i to fuzijom gena promotora TMPRSS2 reguliranog od AR i kodirajuće regije gena ERG i ETV1, članova ETS obitelji. Procesom upravljaju AR, koji su time odgovorni za transkripciju, što vodi u progresiju staničnog ciklusa. Opisani mehanizam javlja se u oko 50% slučajeva raka prostate. (81) Osim navedenog, u raku prostate aktivni su i drugi signalni putevi, poput PI3K i RAS/RAF, disregulacija kojih je uočena i u ranim i u uznapredovalim stadijima raka prostate, no većina istraživanja ukazuje na značajnije alteracije u AR signalnom putu, u odnosu na sve ostale i stoga ovaj mehanizam i dalje ostaje ključnim regulatorom patogeneze raka prostate. (82) To je i temeljni razlog za uporabu metoda supresije androgena u liječenju raka prostate. Inicijalno liječenje temelji se na ideji potpune androgene blokade: konvencionalna ADT postiže se deprivacijom AR uklanjanjem testosterona nastalog u testisima, bilo kirurškom ili kemijskom (GnRH analogima) orhidektomijom, na što se često dodaje i terapija antagonistima AR, odnosno antiandrogenima. (83) Ovakva androgena blokada nije konačna i s vremenom se razvija kastracijski – rezistentan rak prostate (CRPC), kada bolest više ne odgovara na metode ADT. Dokazano je da je u podlozi razvoja CRPC nekoliko mehanizama: točkaste mutacije AR, amplifikacija AR, promjene u biosintezi androgena, promjene u kofaktorima AR, varijacije AR. (71) Najčešće se radi o prekomjernoj izraženosti AR udruženoj s kontinuiranom tumorskom steroidogenezom, vezivanju i aktivaciji AR alternativnim ligandima, poput estrogena i progesterona, glukokortioida i flutamida, o ligandu neovisnim mehanizmima aktivacije AR međudjelovanjem s Akt, HER2 i Ack1 kinazama koje fosforiliraju AR i s nekodirajućim RNA koje se vežu na AR da bi stimulirale transkripciju ciljanih gena ili u manjoj mjeri o AR neovisnim putevima preko Stat3 signalizacije ili *up* – regulacije

antiapoptotičkog Bcl-2. (70) Opisani mehanizmi ukazuju na ključnu ulogu AR i u razvoju CRPC i razvoju rezistencije na AR usmjerenu terapiju. (Slika 6)

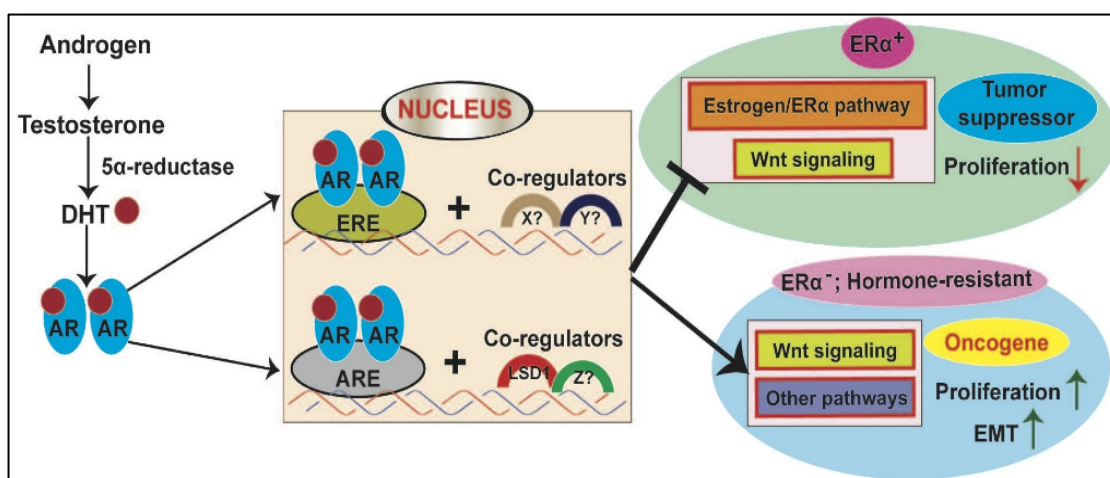


Slika 6. Uloga AR u CRPC (Preuzeto iz Sharp, A, et al, Clin Cancer Res, 2016)

#### 1.4.4. Androgeni receptori u raku dojke

AR su najučestalije izraženi hormonski receptori u raku dojke i preko 70% svih karcinoma dojke ima pozitivne AR. (84) Međutim, unatoč desetljećima istraživanja AR u različitim podtipovima raka dojke, do danas nije jasno definirana njihova uloga kao nezavisnog prediktivnog i prognostičkog čimbenika i stoga je klinički značaj danas i dalje nepotpuno jasan. AR su izraženi u dva tipa mamarnih epitelnih stanica: uglavnom uniformno i difuzno u metaplastičnim apokrinim stanicama te u oko 5 do 30% normalnih

luminalnih epitelnih stanica, bez apokrine diferencijacije. Najčešće su stoga izraženi u apokrinom i lobularnom histološkom tipu raka dojke, a najmanje su izraženi u metaplastičnom, mucinoznom i medularnom tipu. Češće su prisutni u luminalnim, ER pozitivnim karcinomima dojke i u snažnoj su korelaciji s ER i PR, a rjeđe su prisutni u ER negativnim tumorima, među kojima su češće u pozitivnoj korelaciji s izraženošću HER2 proteina. (85,86) Pretklinička istraživanja pokazala su da učinak AR u različitim staničnim linijama raka dojke može biti i stimulativan, ali i inhibitoran, ovisno o prisustvu, odnosno odsustvu ER. Prema nekim istraživanjima, u ER pozitivnom okruženju AR se smatra tumor – supresorom, jer pokazuje antiproliferacijske učinke posljedično međudjelovanju ER i AR signalnih puteva, odnosno antagoniziranju aktivnosti ER od AR, koje se odvija preko kompetitivnog izbacivanja ER i vezivanja za EREs (od engl. *Estrogene response elements*) i formiranja inaktivnog transkripcijskog kompleksa, koji ne napreduje u dalju transkripciju ciljanih ER gena. Androgenima aktivirani AR natječu se s ER za ograničenu količinu koaktivatora transkripcije, čime su ciljani ER geni inhibirani, a aktiviraju se ciljani AR geni. (87) (Slika 7)



**Slika 7.** Mehanizam djelovanja AR u raku dojke (Preuzeto iz Pakula, H, et al, Cancers, 2017)

Izraženost AR uočena je u manje agresivnim oblicima bolesti: tumorima manje veličine, nižeg gradusa, manjeg proliferacijskog indeksa, bez zahvaćenih limfnih čvorova. (88)

Više je različitih istraživanja i metaanaliza na temu uloge AR u raku dojke pokazalo zanimljive, a često i oprečne rezultate. U nekima je izraženost AR u raku dojke pozitivno korelirala s preživljenjem bez bolesti i sveukupnim preživljenjem, dok u drugima nije nađeno statistički značajne uzročno – posljedične povezanosti. (84,89,90) Neka su istraživanja pokazala kako je izraženost AR u raku dojke pozitivan pokazatelj i korelira s preživljenjem bez bolesti i sveukupnim preživljenjem u ER pozitivnim tumorima, ali ne i u ER negativnima, dok su druge studije pokazale kako je upravo u ER negativnim, odnosno TNRD uzročno – posljedična povezanost prisutnosti AR i boljeg preživljenja bez bolesti i sveukupnog preživljenja bolesnica najveća. (91-94) Slično su pokazale i studije koje su izraženost AR korelirale s molekularnim podtipovima raka dojke.

Izraženost AR u odnosu na spol pokazala je značajnu povezanost izraženosti AR s dobrim kliničkim ishodima u žena s rakom dojke, dok u muškaraca nije bilo statističke povezanosti. (90) Brojne razlike u rezultatima navedenih istraživanja često se objašnjavaju nedostatnim veličinama uzoraka za dobivanje statistički i klinički relevantnih podataka, ali i razlikama u korištenim metodama evaluacije AR, kao i definiranim graničnim vrijednostima za pozitivnost AR (84,89-94) U prediktivnom smislu, neka istraživanja ukazuju na povezanost AR s boljim odgovorom na antihormonsku terapiju, no u odgovoru na kemoterapiju čini se kako AR pozitivni tumori, bez obzira na izraženost drugih receptora (ER, PR, HER2) zadržavaju obrazac ponašanja luminalnih tumora i za očekivati je niže stope odgovora. (95) AR su kao terapijski cilj u raku dojke prepoznati još puno prije otkrića tamoksifena i inhibitora aromataze i steroidni androgeni su neselektivno korišteni u terapiji raka dojke sve dok ih, zahvaljujući i



značajnom toksičnom profilu (virilizacija i drugi maskulinizirajući učinci), nije zamijenio dolazak novih antihormonskih terapija. Rezultati usmjerenih prekliničkih istraživanja pokazuju uglavnom antiproliferacijske učinke androgena na ER i AR pozitivne tumorske stanične linije i ukazuju kako bi AR agonisti mogli biti logičan terapijski izbor u luminalnim karcinomima dojke. (96) Na kliničkoj razini, kako je spomenuto, postoje povijesne potvrde učinkovitosti unazad preko pola stoljeća, no malo je kontroliranih kliničkih studija i zbog toga nije posve jasno koji bi podtipovi najbolje odgovorili na androgene i u kojoj mjeri, kao i koje bi terapijske kombinacije, s drugim aktivnim agensima, bile one prave. (97) U tijeku su studije s novijim nesteroidnim selektivnim modulatorima androgenih receptora (SARM) i nesteroidnim androgenima, poput studije faze II s enobosarmom (NCT02463032), koje bi trebale dati odgovore na neka od tih pitanja.

#### *1.4.5. Androgeni receptori u trostruko negativnom raku dojke*

Izraženost AR u TNRD prema različitim istraživanjima izrazito je varijabilna, no najčešće je zabilježen udio od oko 25 – 35% AR pozitivnih TNRD. (98) Prema molekularnoj klasifikaciji TNRD u šest podskupina identificiran je i podtip LAR – luminalni AR podtip, karakteriziran AR signalizacijom, u kojem je uočena najznačajnija izraženost AR, u smislu najvećeg postotka AR pozitivnih tumorskih stanica i intenziteta obojenja. (38) Prema IHC podjeli TNRD na *core – basal* podtip (ER-,PR-,HER2-, CK5/6+ i/ili EGFR+) i 5-NP podtip (svih pet biljega negativno) istraživanja su pokazala veću zastupljenost AR u 5-NP podtipu. (42,99) Također, gotovo svi AR pozitivni TNRD pokazuju morfološke karakteristike u smjeru apokrine diferencijacije i stoga je, s obzirom na prognostičke i

prediktivne razlike, naglašena potreba razdiobe TNRD na apokrini podtip, koji izražava karakteristike ER pozitivnih tumora i neapokrini, duktalni, slabo diferencirani podtip. (86) Uočena je i pozitivna korelacija između izraženosti AR i BRCA1/2 mutacije te se BRCA1 smatra koaktivatorom AR signalnog puta. (100) Iako su brojna istraživanja uloge AR u TNRD kompromitirana razlikama u metodologiji i definiranim graničnim vrijednostima te često neodgovarajućom veličinom uzorka, do danas prikupljeni rezultati nedvojbeno govore za prognostički povoljan učinak AR izraženosti u TNRD. (101,102) Dok su neka istraživanja pokazala kako nema statistički značajnog pozitivnog utjecaja AR na preživljenje u TNRD, veći je broj njih pokazao kako je izraženost AR u TNRD nezavisni pokazatelj boljeg DFS i OS u ranom TNRD. (90,92,103) Izraženost AR u TNRD povezana je s boljim kliničko – patološkim prediktivnim i prognostičkim čimbenicima. Češća je u manjih tumorima, nižeg gradusa, manjeg proliferacijskog indeksa, bez zahvaćanja limfnih čvorova, nižeg kliničkog stadija. (92,99) Uglavnom nije uočena razlika u izraženosti AR između ranog TNRD i metastatske bolesti, a ukoliko jest, trend je bio prema slabijoj izraženosti AR u metastatskim sjelima i recidivu bolesti, u odnosu na primarni tumor, što se objašnjava gubitkom AR izraženosti u procesu metastaziranja. (98,99) Čini se kako je od većeg prognostičkog značaja razina intratumorske izraženosti AR, nego sama prisutnost AR: uočena je lošija prognoza u TNRD sa smanjenom intratumorskom izraženošću AR, kao i obratno, što se objašnjava suzbijanjem proliferacije tumorskih stanica antiproliferativnim utjecajem AR stimulacije. (104) U traženju biobiljega od prognostičke i prediktivne vrijednosti za TNRD, neka istraživanja pokušala su staviti AR u korelaciju i naći zajedničku korist od kombinacija s drugim biljezima, poput EGFR, s kojim je utvrđena negativna korelacija AR i E – cadherina, s kojim je AR u pozitivnoj korelaciji. (105,106) LAR podtip TNRD, odnosno izraženost

AR u TNRD pokazuju lošije stope postizanja pCR na neoadjuvantnu kemoterapiju. (39) Nasuprot tome, pokazuju dobar odgovor na antihormonsku terapiju i do sada je nekoliko kliničkih studija istraživalo učinak antiandrogene terapije ciljano na AR pozitivne TNRD, poput studija faze II s bikalutamidom i enzalutamidom, ali i kombinacija s novim terapijskim strategijama, poput PI3K inhibitora, CDK4/6 inhibitora ili mTOR inhibitora. (107-109)

## **1.5. Imunost i tumor**

### *1.5.1. Tumorski antigeni*

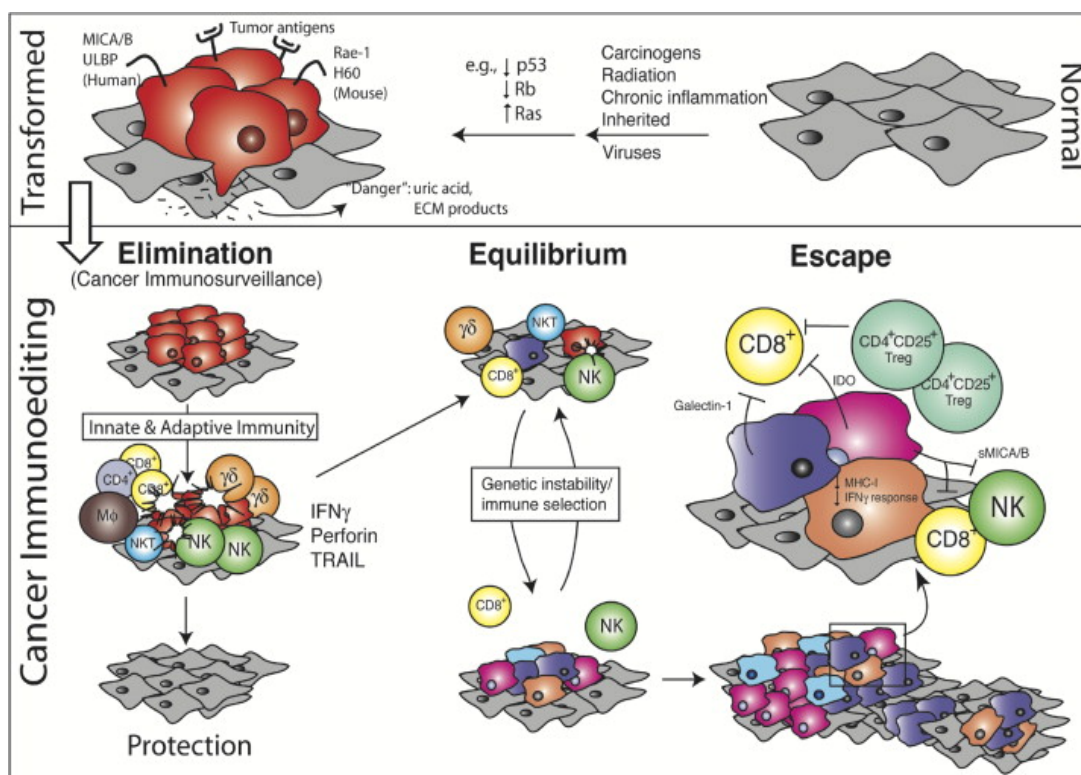
Unatoč tome što nastaju od stanica organizma domaćina, tumorske stanice za imunosti sustav predstavljaju strano tijelo i imunosti sustav na njih reagira. Imunogeničnost tumora, odnosno sposobnost da izazove imunosti odgovor organizma stvaraju tumorski antigeni. (110) Postoji nekoliko kategorija tumorskih antigena. Većinom su to proteinski neoantigeni nastali kao posljedica sporadično mutiranih gena, (tzv. prolaznih mutacija, od engl. *passenger mutations*), a rjeđe su posljedica mutacija u onkogenima ili tumor supresorskim genima, uključenima u onkogenezu (tzv. pokretačke mutacije, od engl. *driver mutations*). Druga vrsta su onkoviralni antigeni, odnosno proizvodi onkogenih virusa, koji mogu izazvati specifični T - stanični odgovor. U treću kategoriju ubrajaju se prekomjerno izraženi stanični proteini. To su proizvodi gena koji su utišani u normalnim stanicama, a oslobođeni u stanicama tumora ili proteini prisutni u normalnim stanicama, ali prekomjerno proizvedeni u tumoru. To su npr. karcinom – testis antigeni (CTA), poput

MAGE, onkogeni varijanta epidermalnog čimbenika rasta HER2/Neu te diferencijacijski antigeni poput CD na stanicama limfoma i leukemija. U tumorske antigene ubrajaju se i razni alterirani glikolipidi i glikoproteini te onkofetalni antigeni alfa fetoprotein (AFP) i karcinoembrijski antigen (CEA). (110,111)

### 1.5.2. Imunosni odgovor

Fiziološka uloga imunskog sustava je imunski nadzor (od engl. *immunosurveillance*), prepoznavanje i uništavanje klonova transformiranih stanica i prije nego izrastu u tumor te ubijanje tumora. (110,112) Dokaz da je taj sustav nadzora potreban jest i činjenica pojačane pojavnosti niza tumora u imunokompromitiranom organizmu, ali i da je nesavršen - činjenica da se i u imunokompetentnom organizmu dio tumora otima imunskom nadzoru i razvija. (Slika 8) Tumor stimulira specifične urođene i stečene imunosne mehanizme odgovora. Temeljni nositelji sustava imunskog odgovora organizma na tumor jesu T limfociti i glavni mehanizam jest ubijanje tumorskih stanica citotoksičnim T limfocitima CD8<sup>+</sup> (CTL). (110,113) CTL provode imunski nadzor tako što prepoznaju i ubijaju potencijalno zloćudne stanice koje izražavaju peptide podrijetla tumorskih antigena, prezentirane u međudjelovanju s molekulama glavne klase histokompatibilnosti I (MHC I). Dakle, da bi CD8<sup>+</sup> CTL djelovali, potrebna je prezentacija tumorskih antigena od strane antigen – prezentirajućih stanica (APC), najčešće dendritičkih stanica, u sklopu MHC I. Također, APC izražavaju i molekule kostimulatora, a one i istovremeno aktivirani pomoćnički T limfociti šalju glavne signale za diferencijaciju naivnih CD8<sup>+</sup> T limfocita u kompetentne CTL. CD4<sup>+</sup> pomoćnički T limfociti pridonose antitumorskom imunskom odgovoru na više načina: Th1 stanice

pojačavaju CD8+ T stanični odgovor i aktiviraju makrofage sekrecijom TNF i IFN  $\gamma$ , koji pojačava rad MHC I. Osim T stanica, organizam domaćin često proizvodi i protutijela protiv tumorskih antigena, no njihov značaj nije do kraja praktično jasan. Stanice prirodne ubojice (NK, od engl. *natural killer*) sposobne su ubijati različite vrste tumorskih stanica. Tumorske stanice postaju podložne ubijanju od strane NK stanica kada se smanji izraženost MHC I ili pojača izraženost liganada koji se vežu na aktivirajuće NK - stanične receptore, a djelovanje NK stanica stimuliraju i citokini, poput IL – 2 i IL – 15. Ovisno o stanju aktiviranosti, makrofagi mogu inhibirati ili promovirati tumorski rast. Klasični M1 aktivirani makrofagi ubijaju razne vrste tumorskih stanica. Njih aktivira već opisani proces proizvodnje IFN  $\gamma$ , od strane Th1 pomoćničkih CD4+ limfocita, a nije jasan način na koji ih aktiviraju tumori. (110,113,114)



**Slika 8.** Međudjelovanje tumora i imunskog sustava (Preuzeto iz Dunn, GP, et al, Immunity, 2004)

### 1.5.3. Protumorska uloga imunosti

U nekim slučajevima, imunski sustav može imati i protumorsku ulogu. Odavno se zna da je kronična upala rizični čimbenik razvoja mnogih tumora, iako se točan mehanizam te kaskade ne zna. (110) Među imunskim stanicama, stanice urođene imunosti smatraju se ključnim krivcima za protumorske učinke. Tumor – asocirani makrofagi (TAM) alternativno aktiviranog fenotipa M2, kao i neke druge stanice, izvor su vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF), koji promovira angiogenezu, kao i enzima koji modificiraju ekstracelularni prostor, čime se podupire tumorski rast i širenje. Nakupljanjem slobodnih radikala stanice urođene imunosti doprinose oštećenjima DNA i mutacijama, koje vode u malignu alteraciju, a izlučivanjem topivih čimbenika, poput NF $\kappa$ B podržavaju progresiju i preživljenje tumorskih stanica. Alternativno aktivirani makrofagi M2 i imunosupresivne stanice mijeloidne loze, MDSC (od engl. *myeloid – derived suppressive cells*), neizravno podržavaju tumorski rast potiskivanjem učinkovite antitumorske imunosti. U odgovoru na tumor, dendritičke stanice mogu uvjetovati diferencijaciju CD4<sup>+</sup> u antiinflamatorne Th2 stanice i T regulatorne stanice, koje potiskuju imunski odgovor koji uništava tumor i podržavaju razvoj M2 i drugih protumorskih staničnih linija. Opisani protumorski učinci antiinflamatornih mehanizama imunskog sustava donekle su paradoksalni, s obzirom da se zna, kako je već opisano, da inflamatorno stanje promovira tumorski rast, stoga je pronalaženje ravnoteže opisanih mehanizama izazov za potencijalne terapijske intervencije. (110,115)

#### 1.5.4. Imunouređivanje i bijeg tumora

Jedno od glavnih obilježja tumora je zaobilaženje imunskog odgovora. To sugerira činjenicu da je imunski nadzor organizma domaćina nad tumorom samo jedna od mogućih varijanti, odnosno faza u međudjelovanju s tumorom, a da je međudjelovanje tumora i domaćina najbolje opisano kroz proces imunouređivanja. Imunouređivanje (od engl. *immunoediting*) podrazumijeva međudjelovanje tumora i organizma domaćina, koje se odvija u tri faze. (116) Prva faza je faza eliminacije (od engl. *elimination*), faza u kojoj su mehanizmi imunskog nadzora odgovarajuće funkcionalni i eliminiraju potencijalno maligno alterirane stanice i tumore. U fazi ravnoteže (od engl. *equilibrium*) postignut je suživot domaćina i tumora, odnosno stanice tumora imunski sustav domaćina ne eradicira, no i ne napreduju, nego su „uspavane“ (od engl. *dormant*). Treća faza je faza bijega tumora od imunskog nadzora (od engl. *escape*). Mehanizmi izbjegavanja imunskog nadzora od strane tumora uglavnom se kategoriziraju kao aktivna inhibicija antitumorskog imunskog odgovora ili gubitak antigena koji potiču ove imunske odgovore. (110) Inhibicija aktivnog antitumorskog imunskog odgovora odvija se na nekoliko načina: međudjelovanjem inhibitornih molekula na površini T stanica i APC, koje inače imaju funkciju prevenirati autoimunosne reakcije, s ligandima, odnosno koefektornim molekulama na površini tumora, zatim suprimiranjem antitumorskog odgovora secerniranim molekulama, poput TGF  $\beta$ , zatim proizvodnjom regulatornih T stanica, koje su u naravi zapravo imunosupresivne te nakupljanjem već opisanih nezrelih MDSC, heterogene skupine stanica poput dendritičkih, monocita i neutrofila, koji suprimiraju urođenu imunost i T - stanično posredovane antitumorske imunske mehanizme, bilo sekrecijom imunosupresivnih citokina ili poticanjem akumulacije

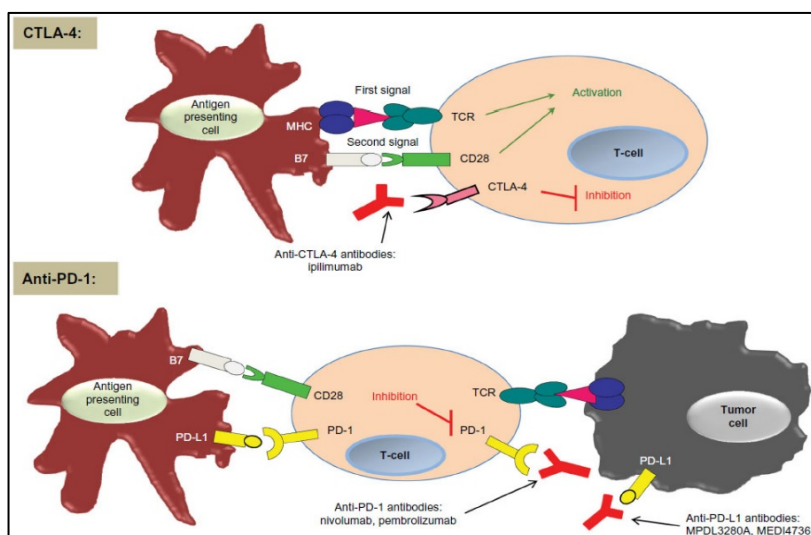
regulatornih T stanica. Najpoznatiji inhibitorni signalni putevi T stanica i APC, koji prirodno služe uglavnom izbjegavanju i kontroliranju autoimunskih reakcija, a u slučaju tumorskog bijega imunom nadzoru su najčešće zlorabljeni putevi, jesu signalni put preko CTLA – 4 i PD – 1. (110,116,117) Osim opisanih mehanizama inhibicije aktivnog protutumorskog imunskog odgovora, izbjegavanje imunskog nadzora tumoru omogućuje i gubitak izraženosti tumorskih antigena, odnosno smanjenje imunogeničnosti, koje uobičajeno prati i smanjena aktivnost antigen prezentirajućih molekula. (110)

#### *1.5.5. Imunoterapijski pristupi*

Imunoterapija je definirana kao svaki pokušaj korištenja bilo koje komponente imunskog sustava kako bi se pojačao ili poboljšao intrinzični domaćinov odgovor na tumor. (118) Dva su glavna principa u imunoterapijskom pristupu: i urođena i stečena imunost uključene su u borbu protiv tumora, mehanizmima sličnim onima koje koriste u borbi protiv vanjskih patogena, a onkogeneza i progresija tumora odvijaju se kroz selekciju i nadržavanje tumorskih stanica smanjene imunogeničnosti i uz stvaranje imunosupresivnog mikrookoliša. (119) Stoga su se terapijske strategije fokusirale na poticanje oba imunosa mehanizma, kako bi inducirali smrt tumorskih stanica. Te strategije podrazumijevaju terapiju različitim citokinima, čimbenicima rasta, i imunomodulatornim agensima, utjecaj na tumorski mikrookoliš, pasivnu imunoterapiju monoklonskim protutijelima, vakcinaciju tumorskim antigenima, adoptivnu staničnu terapiju antitumorskim T stanicama i blokadu nadzornih točaka (T staničnih inhibitornih puteva). Blokada nadzornih točaka, odnosno T staničnih inhibitornih mehanizama, u



posljednje je vrijeme donijela najbolje rezultate u imunoterapijskom pristupu liječenju raka i dala svojevrsnu nadu da će djelovanje na imunski sustav u borbi protiv tumora sigurno donijeti rješenja, kakvima se nije moglo nadati u eri klasične neselektivne citotoksične terapije. Blokatori nadzornih točaka razvijeni su i dokazani u prekliničkim i u posljednje vrijeme kliničkim istraživanjima faze I, II, ali i III te odobreni u liječenju brojnih solidnih tumora i hemoblastoza. (120) Djeluju na principu inhibiranja inhibicije, i to uglavnom na dva načina: interferiranjem u inhibitorni CTLA-4 put i interferiranjem u PD-1/ PDL-1 inhibitorni put. (Slika 9) Vezivanjem na T stanični receptor u jednom slučaju, kostimulatornu molekulu u drugom slučaju, ili ligand na tumorskoj stanici u trećem slučaju, inhibitori, koji su po strukturi monoklonska protutijela, zaposjedaju inhibitorne molekule i na taj način oslobađaju T stanične mehanizme prethodne inhibicije i omogućuju aktivan antitumorski odgovor, koji je izostao. (119) Najbolje rezultate u liječenju raka dojke do danas su pokazali pembrolizumab i atezolizumab, a njihova učinkovitost najznačajnija je u liječenju TNRD. (121,122)



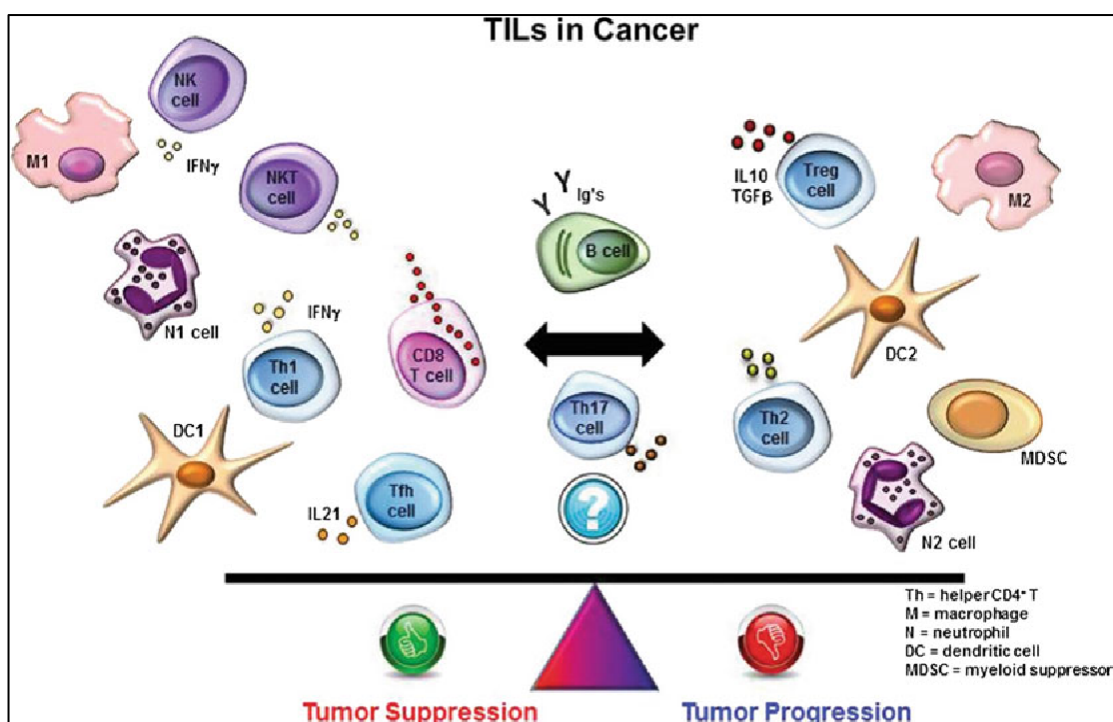
**Slika 9.** Nadzorne točke CTLA-4 i PD1/PDL1 – terapijski ciljevi u imunoterapiji (Preuzeto iz Momtaz, P, Postow, MA, Pharmacogenomics and Personalized Medicine, 2014)

## 1.6. Tumor – infiltrirajući limfociti

### 1.6.1. Podrijetlo, sastav i uloga imunosnog infiltrata u tumoru

Tumor je kompleksan sustav, sastavljen od dvije glavne komponente: tumorskih stanica i stromalnih odjeljka. Stromalni odjeljak čine normalne stanice i tkivo domaćina, poput fibroblasta i krvnožilnih stanica, živaca te molekule ekstracelularnog matriksa, koje podržavaju biokemijski i strukturno okruženje koje osigurava opstanak tumora. (119) Kao jedna od glavnih domaćinovitih staničnih linija, u tom stromalnom odjeljku, nalaze se imunosne stanice, odnosno imunosni infiltrat. (*Slika 10*) Imunosni infiltrat u tumoru je heterogen, i sastav se često razlikuje među različitim tumorima i tumorskim sijelima. (123) Uglavnom se dijeli na dvije glavne stanične loze: limfoidnu i mijeloidnu. Do danas prikupljeni dokazi istraživanja ukazuju da su stanice mijeloidne loze leukocita, poput TAM, dendritičkih stanica (DC) i MDSC glavne odgovorne, posredstvom čimbenika koje proizvode, za stvaranje mikrookoliša u smjeru imunostimulatornog antitumorskog ili tumor – podržavajućeg, a antitumorske T stanice, migracijom u ovakvo okruženje posljedično mogu biti aktivirane ili suprimirane. Povratno, i same T stanice reguliraju regrutaciju makrofaga u smjeru funkcionalnih M1 ili protumorskih M2, što ukazuje na važnost međustanične interakcije. (110) Isto tako, o vrsti staničnih linija u imunosnom infiltratu ovisi klinički odgovor u različitim tumorima. (119) Kako se zna da stečena imunost, posredovana T i B limfocitima, ima ključnu ulogu u učinkovitom antitumorskom odgovoru, pokazalo se i da je infiltracija citotoksičnim CD8<sup>+</sup> stanicama povezana s boljim odgovorom na terapiju i preživljenjem. (124) Prisustvo CD4<sup>+</sup> regulatornih limfocita može biti prognostički i dobro i loše, a od ostalih staničnih

subpopulacija, Th1 stanice koje izlučuju  $IFN\gamma$  pokazale su se povezanima s dobrom prognozom, a Th2 sa smanjenjem antitumorskog odgovora. (105,119,125) Prisustvo Th17 stanica, proizvođača proinflamatornih citokina IL – 17, ima varijabilne učinke, ovisno o citokinskom okruženju u kojem se nalaze, što može ovisiti i o tipu tumora i organskom sijelu. (110,119) Precizna uloga B limfocitnog infiltrata još uvijek nije posve jasna. Zaključno, prisustvo  $CD8^+$ , Th1, NK, M1 i DC1 povezano je s dobrim antitumorskim odgovorom, a prisustvo Th2, M2, DC2, MDSC i FOXP3+ regulatornih T limfocita, koji izlučuju IL – 10 i  $TGF\beta$ , ima imunosupresivne učinke. (110,119) Na stanicama imunosnog infiltrata, osobito citotoksičnim  $CD8^+$  limfocitima, kao i na tumorskim stanicama, izraženi su CTLA-4, PD1 i PDL1, koji su, kako je već opisano ranije, danas od posebnog značaja kao mete za imunoterapiju. (126)



**Slika 10.** Imunosni infiltrat, TIL (Preuzeto iz Salgado, R, et al, Ann Oncol, 2015)

### 1.6.2. Tumor – infiltrirajući limfociti u solidnim tumorima

Kako je već navedeno, sastav imunosnog infiltrata može varirati, ovisno o kojem se tumoru i organskom sijelu radi. Isto tako, ovisno o sastavu imunosnog infiltrata u pojedinim tumorima, zabilježeni su različiti klinički odgovori i različite razine prognostičke vrijednosti evaluacije imunosnog infiltrata. (119,123,127,128) Prognostička uloga prisustva tumor – infiltrirajućih limfocita (TIL) u melanomu je poznata odavno i danas je melanom jedan od tumora koji su najuspješnije liječeni imunoterapijom. (129) Proveden je niz studija koje su na različite načine evaluirale TIL u melanomu, koristeći različite metode i tehnike evaluacije (HE, IHC), u primarnom sijelu i metastatskim lezijama, a većina istraživanja pokazala je povezanost prisustva limfocitnog infiltrata s dobrom prognozom i dobrim odgovorom na terapiju. (130) Slično, prognostički potencijal TIL u kolorektalnom karcinomu također je odavno poznat. Od osobitog je interesa zbog mogućnosti da se samo jednostavnom HE evaluacijom TIL u tumoru, s većom ili manjom preciznošću, predvidi MSI (od engl. *microsatellite instability*) status tumora, koji je biljeg dMMR (od engl. *deficient MismatchRepair*), jednog od dva glavna patogenetska puta nastanka kolorektalnog raka, a što je od prognostičkog i prediktivnog značaja. (131) Osim navedenog, TIL su se pokazali nezavisnim prognostičkim čimbenikom u svim vrstama kolorektalnog karcinoma, nevezano uz MSI status, kao i prediktorom odgovora na neoadjuvantnu terapiju u raku rektuma. (132) Što se tiče ostalih tumora gastrointestinalnog sustava, provedena su istraživanja uloge TIL u raku želuca, gušterače i hepatocelularnog karcinoma, no u ovom trenutku bez konkretnih pozitivnih rezultata i s potrebom provođenja većih prospektivnih studija. (130) U skupini ginekoloških tumora, interes za TIL u karcinomu endometrija je uglavnom vezan uz mogućnost predviđanja

MSI/dMMR statusa, slično kolorektalnom karcinomu, a ohrabrujući rezultati uočeni su u istraživanjima uloge TIL u raku jajnika, iako su zabilježene evidentne razlike u prognostičkoj ulozi TIL, ovisno o kojem tipu staničnog infiltrata se radilo, kao i u kojem odjeljku su evaluirani. (130,133) U urogenitalnoj skupini tumora rezultati se razlikuju, od evidentno imunogeničnog raka mokraćnog mjehura, kod kojeg je dokazana ne samo prognostička, nego i prediktivna uloga TIL, preko raka bubrega, u kojem su neke studije jasno istaknule negativnu korelaciju TIL s prognozom, što se pokazalo da je na račun prisustva imunosupresivnih stanica u infiltratu (poput T regulatornih stanica), do jasno neimunogeničnog raka prostate, čiji se odgovor na imunoterapiju još treba istražiti. (130) Nesitnostanični rak pluća smatra se jako imunogeničnim tumorom, s obzirom na mnoštvo detektiranih mutacija i posljedičnu genomsku nestabilnost i nastanak neoantigena, zbog čega su mehanizmi imunosnog odgovora bili od velikog kliničkog interesa i dobro su istraženi. TIL su se pokazali povezanim s dobrom prognozom, a rak pluća je također jedan od tumora s odličnim rezultatom u liječenju imunoterapijom. (134,135) Uloga TIL istražuje se i u heterogenoj skupini tumora glave i vrata, kao i u tumorima mozga, a čini se kako će se u budućnosti preciznija, jednostavna i standardizirana metodologija, kao takva razvijena najprije uz rak dojke, a potom reproducirana u ostalim navedenim tumorskim sijelima, iskoristiti za evaluaciju kliničke vrijednosti TIL i u drugim sijelima solidnih tumora. (130)

### *1.6.3. Tumor – infiltrirajući limfociti u raku dojke*

Brojna istraživanja evaluirala su vrijednost limfocitnog infiltrata u raku dojke i temeljem tih prikupljenih znanja, na modelu raka dojke ostvaren je i prvi konzensus na temu

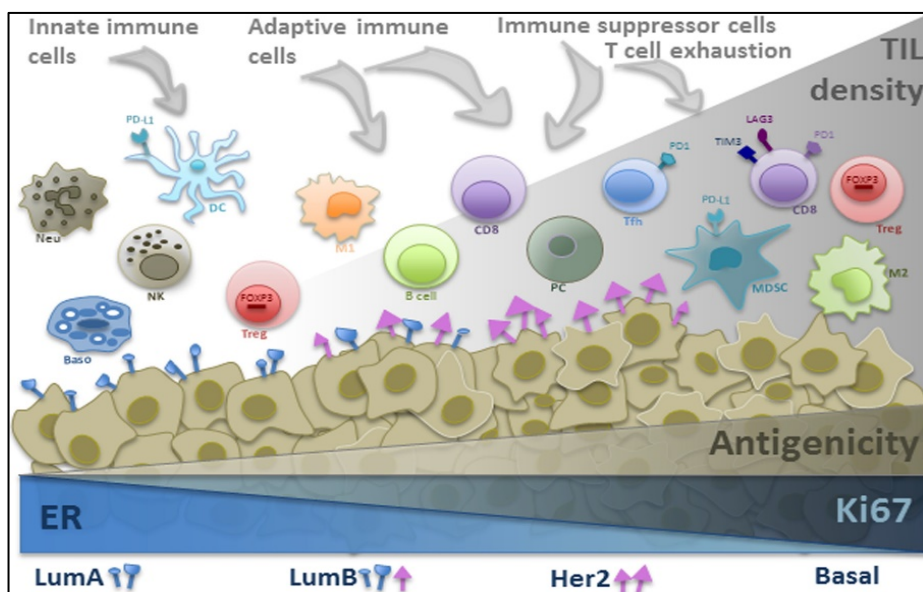
standardiziranja načina evaluacije TIL u solidnim tumorima. (136) U istraživanjima TIL u raku dojke korištene su različite metode evaluacije, od HE, IHC do molekularnih metoda genske izraženosti. (137-139) Većina relevantnih studija jesu retrospektivne analize TIL na uzorcima iz velikih prospektivnih kohortnih studija, provedenih bilo u populaciji bolesnica s ranim ili lokalno uznapredovalim, luminalnim, HER2 pozitivnim ili trostruko negativnim rakom dojke, a koje su istraživale učinak nekog kemoterapijskog pristupa, u adjuvantnom ili neoadjuvantnom setingu, na uzorcima tumorskog tkiva dobivenim biopsijom širokom iglom (eng. *core* biopsijom) ili resekcijskim uzorcima dobivenim operacijski, kao i u uparenim uzorcima primarnog tumora i metastatskog sijela, u slučaju proširene bolesti. (137,140-145) Istraživanja su pokazala vrlo raznolike rezultate, a te razlike uglavnom se objašnjavaju upravo razlikama u primjenjenoj metodologiji i tehnologiji, načinu evaluacije i odabiru odjeljka infiltrata za evaluaciju, kao i različitim veličinama uzoraka na kojima je evaluacija provedena, što utječe na statističku značajnost dobivenih rezultata. Ipak, retrospektivna priroda većine studija, koje su dale prve i do sada ključne informacije, dokazala se neinferiornom u ovom slučaju i dobiveni rezultati mogu se smatrati relevantnima. (146) Većina karcinoma dojke pokazuje neki stupanj limfocitnog infiltrata. Prisutnost većeg udjela TIL uočena je u agresivnijim karcinomima, s negativnim hormonskim receptorima, visokim gradusom, bazaloidnim karakteristikama i BRCA mutiranim. Limfocitno predominantni tip raka dojke definiran je kao onaj u kojem je 50 – 60% tumora infiltrirano limfocitima. On je učestaliji među tumorima trostruko negativnog (20%) ili HER2 pozitivnog imunofenotipa (16%), u odnosu na luminalne, ER pozitivne (6%). (147) Metodom HE uglavnom su evaluirani stromalni TIL, koji su se pokazali od najvećeg značaja, dok su intratumorski imali manju ulogu, što također može biti posljedično ograničenjima same HE metode,

zbog čega se uloga i značaj intratumorskih TIL dalje evaluira IHC (objašnjeno kasnije, u poglavlju Materijal i metode, Metode obrade materijala, Evaluacija tumor – infiltrirajućih limfocita). (130,136) Utvrđeno je da evaluacija TIL na uzorcima *core* biopsija usko korelira s analizom na postoperacijskim uzorcima i da se mogu jednakovrijedno koristiti oba preparata. (130) Studije koje su koristile HE metodu evaluacije TIL u rezultatima su visoko korelirale sa studijama koje su koristile IHC metodu, kao i mRNA profiliranje. (130,136-139) Prisutnost limfocitnog infiltrata uočena je i u preparatima s DCIS, najčešće onima HER2 pozitivnima, a čini se da je postotak zastupljenosti otprilike između onog u normalnom tkivu dojke (gdje je nizak) i onog u invazivnom karcinomu (gdje je visok). (148) U odnosu na primarno sijelo, u metastatskim lezijama pokazala se manja zastupljenost limfocitnog infiltrata, što je u skladu s teorijom imunouređivanja i tumorskog bijega imunosnom nadzoru. (130,145) U prognostičkom smislu, TIL su povezani s boljim preživljenjem bez bolesti (DFS) i sveukupnim preživljenjem (OS) najpouzdanije u TNRD i HER2 pozitivnom tipu raka dojke, a u luminalnim tumorima (osobito u luminal A varijanti) nije uočeno statistički značajnog benefita. (149,150) Nadalje, kada su bili prognostički povoljan pokazatelj, TIL su pokazali da se za svakih 10% pojačanja infiltrata, za oko 10-20% smanjuje rizik povrata bolesti i smrti, što ukazuje na potrebu izražavanja TIL kao kontinuirane varijable. (130,136,142,143) S obzirom da i kemoterapija i antihormonska terapija u određenoj mjeri svoje učinke ostvaruju imunomodulatornim mehanizmima, ne iznenađuju i rezultati koji pokazuju prediktivnu ulogu TIL prisutnih u preterapijskom bioptičkom uzorku za odgovor na neoadjuvantnu terapiju antraciklinima, gdje su se pokazali nezavisnim prediktorom postizanja pCR, ili adjuvantnu kombinaciju antraciklina i taksana, kao i na terapiji aromataznim inhibitorom, a pokazali su se i dobrim prediktorom odgovora na

terapiju trastuzumabom. (140,141,143,151) Dakle, opisani rezultati ukazuju na prediktivnu i prognostičku ulogu TIL u TNRD i HER2 pozitivnom raku dojke, a klinička vrijednost evaluacije TIL u raku dojke vezana je uz razvoj prediktivnih modela rizika, (s obzirom na kontinuiranost varijable), kao i uz terapijske odluke o primjeni adjuvantne i neoadjuvantne kemoterapije, prve i daljih linija liječenja proširene bolesti te uz danas vrlo istraživanu korist od imunoterapije.

#### 1.6.4. Tumor – infiltrirajući limfociti u trostruko negativnom raku dojke

TNRD je uz HER2 pozitivni najagresivniji podtip raka dojke, tumor opterećen s puno mutacija i time genomskom nestabilnošću, rezultat koje je mnoštvo tumorskih neoantigena, čime je TNRD najimunogeničniji rak dojke. Time se objašnjava i najveća zastupljenost limfocitnog infiltrata u trostruko negativnim karcinomima, kao i najveća učestalost LPBC među ovom vrstom raka dojke. (147,152) (Slika 11)



Slika 11. Imunost i rak dojke (Preuzeto iz Hammerl, D, et al, Sem Cancer Biol, 2018)



Istraživanja uloge TIL u raku dojke do sada najznačajnije rezultate dala su upravo u populaciji oboljelih s TNRD. Niz je studija i metaanaliza pokazao moguću povezanost TIL s prognozom u TNRD. (137,141,142,149,150,153) Rezultati se odnose na utjecaj TIL na poboljšano preživljenje bez bolesti (DFS), sveukupno preživljenje (OS), preživljenje bez udaljene diseminacije (DDFS), smanjenje rizika povrata bolesti lokalno i udaljeno. (153) Taj povoljan prognostički utjecaj TIL pokazao se neovisnim o dobi, statusu limfnih čvorova, veličini i histološkom gradusu tumora, peritumorskoj vaskularnoj invaziji ili proliferacijskom indeksu Ki-67. (154) Daljom podjelom TNRD na *core – basal* tip (CBP) i 5-NP nije uočeno značajnije razlike u kliničkoj vrijednosti prisutnosti TIL. Neka istraživanja su pokazala izostanak statistički značajnog utjecaja na OS u 5-NP, međutim relevantni podaci za 5-NP populaciju su za sada oskudni. (153,155) Unatoč različitim i u pojedinim studijama međusobno konfliktnim rezultatima prognostičke vrijednosti IHC analiziranih različitih subpopulacija TIL (CD8+, FOXP3+), zbirne analize pokazuju kako zapravo nema dovoljno snažnih podataka koji bi podupirali postojanje te razlike u kliničkoj vrijednosti. (153) Isto tako, prema nekim studijama čini se kako je prognostička vrijednost TIL u TNRD značajnija, ukoliko analizirana bez utjecaja kemoterapije: HR (omjer hazarda, od engl. *hazard ratio*) za OS u TIL bogatim tumorima u prisutnosti kemoterapije pokazao se manji u odnosu na onaj bez primjene kemoterapije. (155), no više je studija i zbirnih multivarijabilnih analiza pokazalo kako je TIL dobar nezavisni prediktivni pokazatelj odgovora na kemoterapiju. (139,143,156-158) Kako je već spomenuto, prisustvo TIL u preterapijskom bioptičkom uzorku može predvidjeti dobar odgovor na terapiju i postizanje pCR, a prisustvo TIL u rezidualnom tumorskom tkivu, nakon provedenog liječenja, također je prognostički pokazatelj boljeg preživljenja bez metastaza i sveukupnog preživljenja. (159-162) Na kraju, dokazana je

pojačana izraženost PD1 i PDL1 na aktiviranim imunskim stanicama, puno više nego na tumorskim stanicama, u TIL bogatim TNRD. (163,164) Zna se da je navedeni signalni put cilj današnjih imunoterapijskih pristupa blokatorima nadzornih točaka, stoga se TIL u TNRD, kao neizravni pokazatelj PDL1 izraženosti, zbog jednostavnosti i ekonomičnosti detekcije, ozbiljno razmatra za uporabu kao biljeg u rutinskoj kliničkoj praksi.

## **2. HIPOTEZA**

Bolesnice s ranim trostruko negativnim rakom dojke (TNRD) i prisutnošću androgenih receptora (AR), prisutnošću tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL) ili oboje, imaju bolju prognozu, odnosno bolje sveukupno preživljenje (OS), u odnosu na bolesnice s ranim TNRD, koje nemaju izražene AR niti prisutne TIL.

### **2.1. Obrazloženje hipoteze**

TNRD je najagresivniji podtip raka dojke, s većom stopom povrata bolesti i lošijim preživljenjem, u odnosu na druge podtipove. Dodatni problem stvara činjenica da TNRD ne izražava nikakve klinički relevantne biobiljege, pomoću kojih bi se odredio terapijski pristup ili predvidjela prognoza. U novije vrijeme istraživanja su pokazala da su AR povezani s manje agresivnim karakteristikama bolesti i da pozitivno utječu na preživljenje. Imunosni infiltrat u tumoru, građen ponajviše od infiltrirajućih limfocita (TIL), najzastupljeniji je u TNRD i pokazalo se da povoljno utječe na postizanje odgovora na terapiju i preživljenje. Pretpostavka je da su navedena dva parametra svaki za sebe, odvojeno, ali i zajedno, nezavisni prediktori dužeg preživljenja bez bolesti, kao i sveukupnog preživljenja, a time bolje prognoze za bolesnice s ranim TNRD.

### **3. CILJEVI RADA**

#### **3.1. Opći cilj**

Opći cilj rada je istražiti prognostičku vrijednost izraženosti AR i prisutnosti TIL te oba parametra zajedno, u bolesnica s ranim TNRD.

#### **3.2. Specifični ciljevi**

- 1) Istražiti učestalost izraženosti AR u bolesnica s ranim TNRD
- 2) Istražiti učestalost prisutnosti TIL u bolesnica s ranim TNRD
- 3) Istražiti učestalost istovremeno izraženih AR i prisutnih TIL u bolesnica s ranim TNRD
- 4) Istražiti povezanost AR, TIL i oboje s preživljenjem bez bolesti (DFS)
- 5) Istražiti povezanost AR, TIL i oboje s petogodišnjim ukupnim preživljenjem (OS)
- 6) Istražiti odnos AR i TIL prema drugim istraženim kliničkim, sociodemografskim i patohistološkim karakteristikama
- 7) Utvrditi prognostičku vrijednost AR i TIL neovisnu o drugim kliničkim, sociodemografskim, patohistološkim te terapijskim varijablama

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. Ustroj istraživanja**

Provedena je retrospektivna kohortna studija u Klinici za tumore KBC Sestre milosrdnice.

### **4.2. Ciljana populacija**

Ciljanu populaciju čine bolesnice s ranim trostruko negativnim rakom dojke, u dobi  $\geq 18$  godina, liječene od ranog TNRD. Odabran je susljedni uzorak svih žena, prema redosljedu dolaska, koje su u razdoblju od 1. siječnja 2009. godine do 31. prosinca 2012. godine dijagnosticirane i liječene od ranog TNRD u Klinici za tumore. U istraživanje su uključene 164 bolesnice.

#### *4.2.1. Kriteriji uključivanja*

Kriteriji uključivanja bili su: dijagnoza i liječenje u Klinici za tumore, dob  $\geq 18$  godina, u navedenom razdoblju postavljena dijagnoza TNRD, prvi zloćudni tumor u životu (isključujući bazocelularni rak kože), prvi put u životu postavljena dijagnoza raka dojke, patohistološka (IHC) potvrda ranog trostruko negativnog raka dojke, bez udaljenih metastaza.

#### 4.2.2. Kriteriji neuključivanja i isključivanja

Kriteriji neuključivanja i isključivanja bili su: dijagnoza drugog zloćudnog tumora, recidiv raka dojke, uznapredovala (metastatska) bolest, obostrani rak dojke, bez obzira na biologiju bolesti, multipli rak dojke ako su žarišta tumora dokazano različite biologije, oboljeli muškog spola.

#### 4.3. Veličina i vrsta uzorka

Minimalna potrebna veličina uzorka izračunata je uz slijedeće pretpostavke: razina statističke značajnosti  $p < 0,05$ , željena statistička snaga od 80%, dva prediktora (AR, TIL), 18 zbunjujućih varijabli čiji smo učinak statistički kontrolirali, minimalni parcijalni koeficijent determinacije koji smatramo klinički relevantnim  $R^2 \geq 0,10$ . Pod tim pretpostavkama završno je bila potrebna veličina uzorka od  $n=152$ . S obzirom na retrospektivnu narav istraživanja, računali smo s  $\leq 15\%$  bolesnica kojima će neki podaci nedostajati. Zato smo inicijalno planirali uključiti najmanje  $n=169$  bolesnica.

#### 4.4. Ishodi

Primarni ishod istraživanja bilo je ukupno petogodišnje preživljenje (OS; od engl. *overall survival*) bolesnica s ranim TNRD. Sekundarni ishod bilo je preživljenje bez bolesti (DFS; od engl. *disease free survival*).

#### **4.5. Neovisne varijable**

Prediktori, odnosno neovisne varijable bili su androgeni receptori (AR) i tumor - infiltrirajući limfociti (TIL).

#### **4.6. Potencijalno zbunjujuće varijable**

Potencijalno zbunjujuće (engl. *confounding*) varijable bile su dob, menopauzalni status, tjelesna visina i masa, komorbiditeti, obiteljska anamneza, histološki tip tumora, veličina tumora, status limfnih čvorova, TNM stadij bolesti, histološki gradus tumora, proliferacijski indeks Ki-67, primijenjeno operacijsko liječenje, disekcija limfnih čvorova, adjuvantno sustavno liječenje, vrsta primjenjene kemoterapije, zračenje.

#### **4.7. Prikupljanje podataka i metode obrade materijala**

Prvi dio istraživanja podrazumijevao je analizu tumorskih preparata na zadane parametre. Drugi dio podrazumijevao je prikupljanje podataka o ostalim odabranim kliničkim, sociodemografskim, patohistološkim i terapijskim varijablama. Analiza je provedena na uzorcima tumorskog tkiva obrađenog standardnom patohistološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafin (FFPE uzorci) 180 ranih TNRD, preuzetih prilikom biopsije u Klinici za tumore KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu, u navedenom razdoblju. Standardni rezovi obojani su rutinski hemalaun – eozinom (H.E.). Dodatni rezovi tumorskog tkiva obrađeni su imunohistokemijski na ER, PR, HER2 i proliferacijski indeks Ki-67, kako bi se utvrdio

imunofenotip tumora. Na preparatima obojenim H.E. analizirana je prisutnost TIL, dok se na još jednom dodatnom rezu tumorskog tkiva IHC određivala izraženost AR. Iz patohistoloških nalaza pohranjenih u arhivi Zavoda za patologiju Klinike za tumore preuzeti su podaci o svojstvima rasta i agresivnosti tumora, poput histološkog tipa, veličine tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova, TNM stadija, histološkog gradusa, proliferacijskog indeksa Ki-67, izraženosti hormonskih receptora (ER i PR), izraženosti HER2, IHC i u slučaju ekvivokalnog nalaza ISH. Iz medicinske dokumentacije pohranjene u računalnoj arhivi Odjela internističke onkologije Klinike za tumore preuzeti su podaci o relevantnim kliničkim, sociodemografskim i terapijskim varijablama, poput dobi u vrijeme dijagnoze, menopauzalnom statusu, visini i tjelesnoj masi, komorbiditetima, obiteljskoj anamnezi, vrsti primjenjenog operativnog liječenja, operativnom liječenju pazušne jame, primjeni zračenja, primjeni adjuvantnog sustavnog liječenja, odabranim kemoterapijskim protokolima, odgovoru na liječenje, eventualnom povratu bolesti, lokalizaciji rasadnica, liječenju recidiva/uznapredovale bolesti i smrti.

#### *4.7.1. Predtretman tumorskog materijala*

Patolog je prethodnim pregledom izabrao odgovarajuće uzorke tumorskog tkiva, koji sadrže tumor s limfocitnom infiltracijom. Mikrotomom su izrezana dva reza debljine 2-3 µm po uzorku, rezovi su razvučeni u vodenoj kupelji na 55 °C i osušeni u termostatu, sat vremena na 60 °C. Prije bojanja preparate je bilo potrebno deparafinizirati u ksilenu i silaznom gradijentu etanola (100%, 95%, 70%) te rehidrirati u destiliranoj vodi. Jedan rez je deparafiniran i obojen standardnim H.E. bojenjem, kako bi se mogla analizirati prisutnost tumor infiltrirajućih limfocita. Formalin, koji se koristi kao fiksativ, čuva



morfologiju tkiva, ali ujedno može i narušiti trodimenzionalnu strukturu i elektrostatički naboj ciljanog antigena, što bi onemogućilo njegovo prepoznavanje od strane protutijela. Iz tog razloga antigene se demaskiralo kuhanjem u vodenoj kupelji 20 minuta na 97 °C u Tris/EDTA puferu pH=9,0 (Target Retrieval solution, kat. br. S2367, Dako Danska). Drugi rez obojen je IHC na AR, uporabom primarnog mišjeg monoklonskog protutijela (AR, klon AR441, kat.br. M3652, *Ready – to – use*, DAKO, Danska). U imunohistokemijskom postupku drugi rez, deparafinirani i demaskirani rez tumorskog tkiva, tretiran je pet minuta 3%-tnim vodikovim peroksidom, kako bi se inhibirale endogene peroksidaze. Nakon ispiranja puferom za pranje na preparate s uzorcima primjenjeno je primarno protutijelo. Nakon 30-minutne inkubacije primarnim protutijelom i ispiranja nastali kompleks antigena i antitijela tretiran je EnVision™ FLEX/HRP detekcijskim reagensom (EnVision Flex, High pH sustav; kat. br. K8010, DAKO, Danska) 30 minuta. Specifična reakcija antigena i protutijela konačno se vizualizirala inkubacijom s DAB kromogenom, 10 minuta. Pozadinskim bojanjem preparata u hematoksilinu, 2 minute, kontrastnim plavim bojanjem vizualizirane su ostale strukture i morfologija tkiva. Bojanje je izvršeno automatizirano u DAKO Autostainer uređaju (DAKO, Danska).

#### 4.7.2. *Evaluacija androgenih receptora*

Nakon imunohistokemijskog bojanja preparata (opisano u Predtretman tumorskog materijala) evaluacija izraženosti AR provedena je po uzoru na općeprihvaćeni, klasični način evaluacije endokrinih receptora u raku dojke (ER i PR), prema posljednjem, danas važećem koncenzusu Američkog društva za kliničku onkologiju/Udruženja američkih

patologa (ASCO/CAP). (26) (Slika 12) Za evaluaciju AR ne postoji specifična standardizirana smjernica i u istraživanjima AR do danas koristile su se navedene preporuke. Rezultati izraženosti AR u jezgrama tumorskih stanica izraženi su u postotku pozitivnih jezgara (na 1000 tumorskih stanica) i intenzitetu obojenja (npr. “50% pozitivnih tumorskih stanica srednjeg intenziteta”). Nalaz AR smatra se pozitivnim, ukoliko je minimalno 1% tumorskih stanica pozitivno za AR.

Tijekom evaluacije, pratila su se slijedeća pravila preporuka:

- detektiran je postotak (udio) tumorskih stanica koje su pokazale pozitivnu reakciju obojenja
- evaluirana su sva područja preparata koja sadrže tumor
- postotak se dobio procjenom ili brojanjem stanica
- detektiran je postotak obojenja i okarakteriziran kao slab, umjeren ili jak
- opis intenziteta obojenja odgovara procijenjenom prosječnom intenzitetu obojenja svih pozitivnih stanica na preparatu, u odnosu na pozitivnu kontrolu

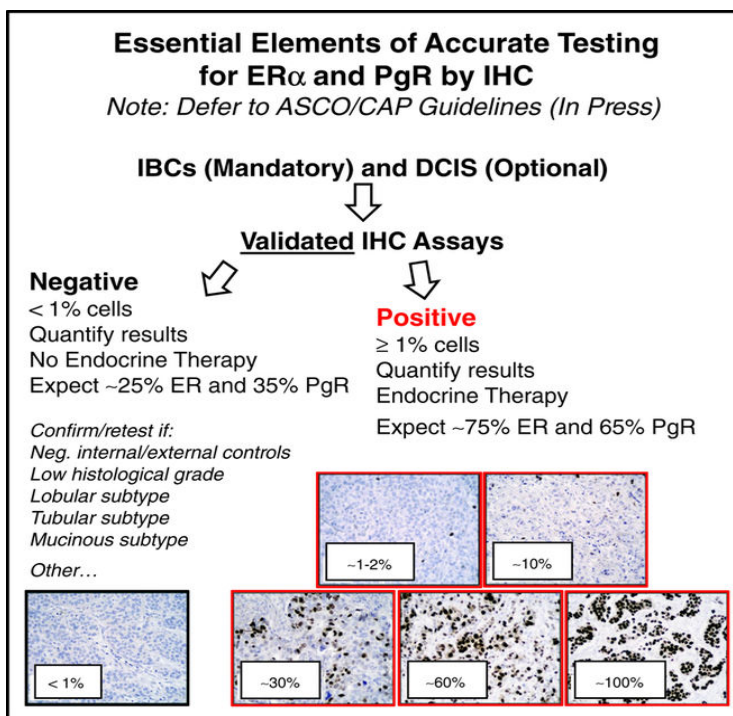
Prema preporukama, uzimajući u obzir prethodne naputke, nalaz je interpretiran temeljem slijedećeg:

1. AR pozitivan nalaz – granična vrijednost od minimalno 1% pozitivnih stanica
2. AR negativan nalaz – tumor s manje od 1% stanica pozitivnih za AR, bilo kojeg intenziteta obojenja; nalaz je adekvatan samo uz prisustvo valjane ekstrinzične i intrinzične kontrole
3. Nalaz nije moguće interpretirati – ukoliko uzorak nije odgovarajuće pripremljen, predtretiran, test nije valjan; nisu praćene smjernice za evaluaciju, korišten je

neodgovarajući fiksativ, bioptički uzorci fiksirani kraće od 6h ili duže od 72h, ukoliko je fiksacija preparata izostala više od 1h, preparati dekalcinirani korištenjem jakih kiselina, uzorci bez odgovarajućih kontrola. Ovisno o uzroku nemogućnosti interpretacije nalaza, potrebno je ponoviti testiranje ili napraviti testiranje na drugom uzorku.

Također, dodatno je istaknuto slijedeće:

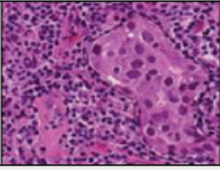
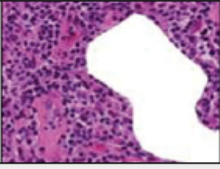
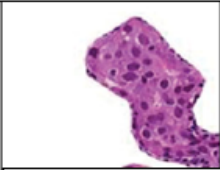
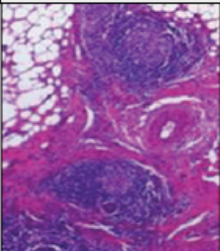
- ukoliko se radi o nekim histologijama raka dojke uz koje najčešće ide pozitivnost endokrinih receptora, poput tubularnih, lobularnih, mucinoznih, ili tumora Nottingham prognostičkog indeksa 1, a nalaz je negativan, to se naglasilo
- koristeći postotak i intenzitet obojenja, AR su izraženi kao kontinuirana varijabla, a potom su naknadno, prema statističkoj značajnosti, određene semikvantitativne kategorije



**Slika 12.** ASCO/CAP IHC evaluacija ER i PR u raku dojke (Preuzeto iz Allred DC, Modern Pathology, 2010)

#### 4.7.3. *Evaluacija tumor – infiltrirajućih limfocita*

Iako je heterogenost imunskog infiltrata nedvojbeno, a predominacija pojedine stanične linije može usmjeriti njegovu prognostičku vrijednost i u pozitivnom i u negativnom smjeru, na primjeru raka dojke i jednostavna evaluacija TIL metodom HE, bez detaljnije evaluacije pojedinih stanica u sastavu infiltrata (npr. IHC), pokazala se prognostičkom i prediktivnom, osobito za TNRD i HER2 pozitivne tumore. (130,136 175,176) Temeljem takvih saznanja, na modelu raka dojke ostvaren je i prvi konsenzus na temu standardiziranja načina evaluacije TIL u solidnim tumorima. (136 176) Jednostavnom, ekonomičnom i reproducibilnom metodom HE bojanja, dane su jasne upute koje dijelove tumorskog preparata i kako evaluirati. Definirana su područja od interesa u tumorskom preparatu, koja je, prema standardnim preporukama, potrebno evaluirati: stromalni i intratumorski odjeljak u pravom, centralnom tumoru te invazivna margina. (*Slika 13*) Međunarodna radna skupina za imunoonkološke biobiljege recentno je revidirala te preporuke te im pridružila dodatne korisne smjernice. (130 175) Navedeno danas predstavlja standard evaluacije TIL u solidnim tumorima HE metodom i ista je korištena i u ovom istraživanju. (*Slika 14*)

Morfologija	Definicija, biološki značaj	Dijagnostički značaj
<b>Limfocitno predominantni rak dojke (LPBC)</b>		
	Radna kategorija, tumori s više limfocita nego tumorskih stanica	Definicija varira kroz studije, granična vrijednost: <u>stromalni TIL</u> 50-60%. LPBC za opis tumora s vrlo jakim <u>imunskim infiltratom</u> . Oprez: TIL su kontinuirani parametar, granične vrijednosti su arbitrarne.
<b>Stromalni TIL</b>		
	Indikator povećane akumulacije imunskih stanica u tumorskom tkivu	<u>Stromalni TIL</u> su se pokazali <u>prediktivnima</u> za poboljšanje odgovora na NAKT, kao i poboljšanje ishoda nakon <u>adijuvantne KT</u> . Najbolji parametar za karakterizaciju TIL.
<b>Intratumorski TIL</b>		
	TIL u izravnom kontaktu s tumorskim stanicama, mogući indikator izravnog staničnog antitumorskog učinka	Niz studija pokazao da su <u>intratumorski TIL</u> teži za <u>evaluaciju</u> , ne daju dodatnu <u>prediktivnu/prognostičku</u> informaciju.
<b>TIL na invazivnoj margini</b>		
TIL lokalizirani na invazivnom rubu, uključeni u evaluaciji prema preporukama	<b>Za rak dojke nema studija s odvojenom evaluacijom TIL na invazivnom rubu.</b> U praktične svrhe, pouzdana evaluacija invazivnog ruba može biti problem na <u>bioptičkim uzorcima</u> .	
<b>Tercijarne limfoidne strukture (TLS)</b>		
	Uobičajeno u okolnom području oko tumora. TLS mogu biti i u normalnom tkivu u izravnom dodiru s tumorom (T stanične zone uz B stanične folikule, često uz <u>germinativne centre</u> ).	Strukture važne za razumijevanje biologije imunost – tumor reakcija, no nisu spremne za primjenu u praksi. Glavni problem je prostorna heterogenost, često nisu u polju evaluacije, osobito na <u>bioptičkim uzorcima</u> , a često je teško razlikovati <u>limfoidne agregate</u> od pravih TLS, osobit kada se ne vidi <u>germinativni centar</u> .

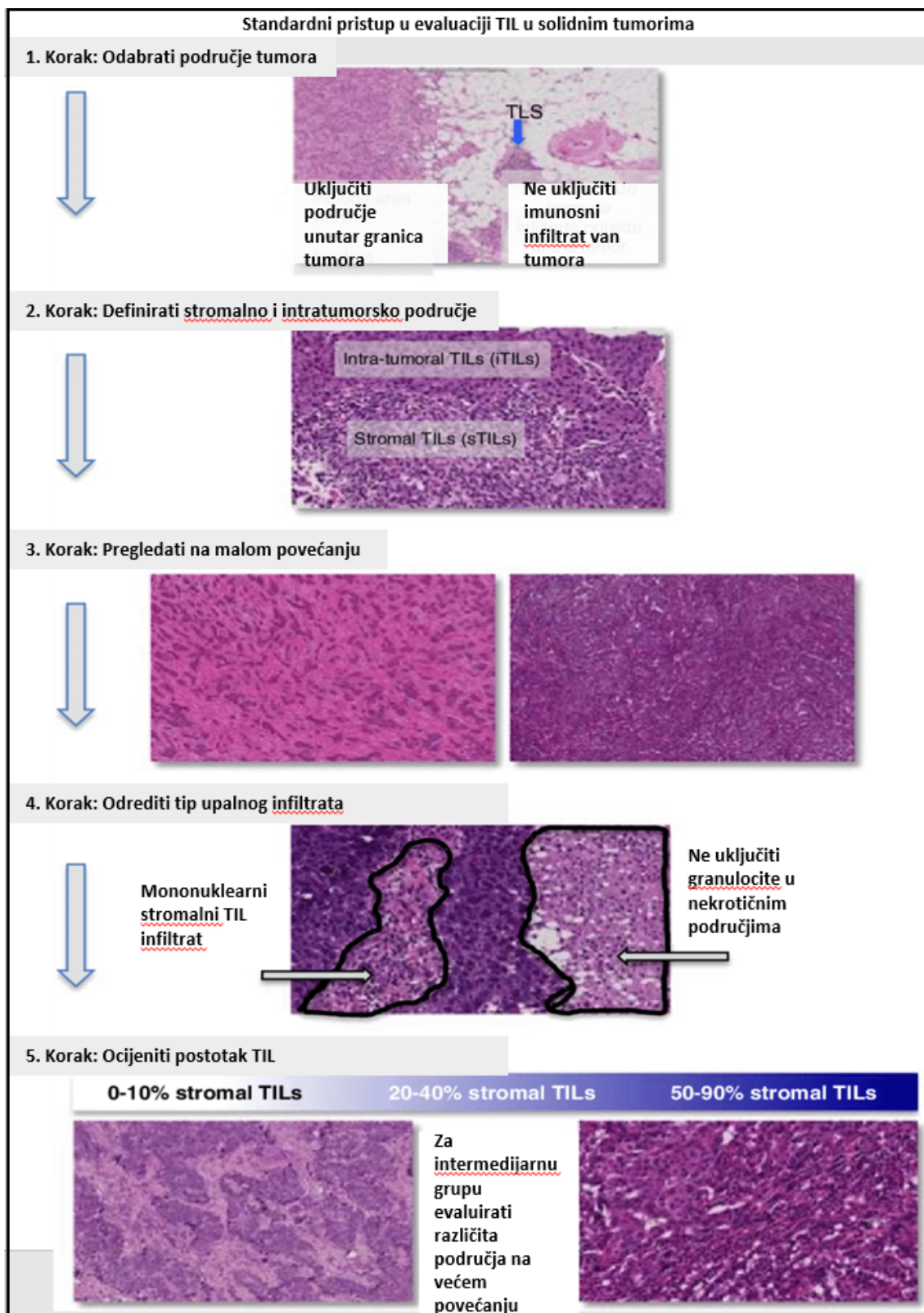
**Slika 13.** Morfologija, definicije, biološka i dijagnostička relevantnost različitih imunskih infiltrata u raku dojke (Preuzeto iz Salgado R, et al, Ann Oncol, 2015)

Po uzoru na navedene preporuke standardnog načina evaluacije TIL metodom HE, pratila su se sljedeća pravila preporuka:

- odvojeno su evaluirana područja stromalnog (stromalni TIL, sTIL) i tumorskog odjeljka (intratumorski TIL, iTIL)

- intratumorski TIL (iTIL) definirani su kao TIL koji imaju izravan , *cell – to – cell*, kontakt s tumorskim stanicama, u gnijezdima tumora
- stromalni TIL (sTIL) raspršeni su u tumorskoj stromi, između tumorskih stanica, s kojima se ne dotiču izravno
- prisutnost TIL u pojedinom odjeljku izražena je u postotku TIL, u odnosu na referentni prostor, za sTIL to je područje stromalnih tkiva (područje preparata ispunjeno mononuklearnim upalnim stanicama, u odnosu na cijelu stromu), a iTIL se referiraju na tumorske stanice
- razlog odvojene evaluacije dva navedena odjeljka je što je gustoća TIL u njima često različita i što bi referiranje samo na tumorsko područje utjecalo na broj TIL
- evaluirani su TIL unutar margina invazivnog tumora, uključujući i centralni tumor (CT) i invazivnu marginu (IM), odvojeno
- invazivna margina (IM) definirana je kao područje od 1mm smješteno na granicu koja odvaja gnijezda zloćudnih stanica od tkiva domaćina
- isključeni su TIL na udaljenosti van rubova tumora, dakle zone izvan invazivnog tumora
- isključene su zone oko DCIS i zone oko normalnih lobula
- isključene su zone artefakata, nekroze, regresivne hijalinizacije te sijela prethodne core biopsije, ako je učinjena
- ocijenjene su sve mononuklearne stanice, uključujući limfocite i plazma stanice, a isključeni su polimorfonukleari
- po preparatu (bolesnici) evaluiran je jedan standardni rez (4-5um, povećanja 200x400)
- korišteni su cjeloviti postoperativni preparati

- učinjena je cjelovita procjena postotka upalnog odgovora, unutar čitavog opsega evaluiranog tumorskog tkiva (centralni tumor (CT) i invazivna margina (IM)), ne samo “*hotspots*” preparata
- zastupljenost limfocita ocijenjena je u postotku, kao kontinuirana varijabla, a potom je razvrstana u kategorije infiltracije, prema procijenjenoj statističkoj značajnosti, kako slijedi: 0 – 10% (slaba), 20 – 40% (intermedijarna), 50 – 90% (jaka infiltracija)



**Slika 14.** Standardni pristup evaluaciji TIL (Preuzeto iz Salgado R, et al, Ann Oncol, 2015)



#### 4.8. Statistička obrada podataka

Normalnost raspodjela kontinuiranih varijabli provjerena je Shapiro-Wilk testom. U slučaju statistički značajnih odstupanja od teorijski očekivanih normalnih raspodjela umjesto aritmetičke sredine i standardnih devijacija, raspodjele su opisane medijanima i interkvartilnim rasponima. Bivarijabilna povezanost prediktora i zbunjujućih varijabli s primarnim ishodom provjerena je serijom binarnih logističkih regresijskih analiza. Sve varijable koje su se na bivarijabilnoj razini pokazale statistički značajno povezanima s kriterijem na razini  $P < 0,25$  uključene su u multivarijabilni, binarni, logistički model. Ukupna prognostička vrijednost modela analizirana je površinom ispod ROC krivulje, postotkom pravilno klasificiranih te Nagelkerke pseudokoeficijentom determinacije. Osim ukupne prognostičke vrijednosti modela, izračunate su osjetljivost i specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrijednost, pozitivni i negativni omjeri izgleda. Sekundarni ishodi analizirani su Coxovom i binarnom logističkom regresijom.

Nedostajali su podaci za komorbiditete kod 6 (3,9%) bolesnica. U multivarijabilnim analizama u kojima smo koristili tu varijablu, podaci koji su nedostajali nadomješteni su nulom, kao da komorbiditeta nije bilo. U svim takvim slučajevima kao analizu osjetljivosti, ponovili smo analizu i samo na uzorku bolesnica za koje su prikupljeni svi podaci. Radi prevelikog broja podataka koji su nedostajali, pozitivna obiteljska anamneza nije korištena u analizama. Za rak u obitelji nedostajalo je 42 (27,6%), a za rak dojke u obitelji 43 (28,3%) podataka. U analizama nismo koristili ni podatak o indeksu tjelesne mase jer je on nedostajao za 50 (34,2%) bolesnica. Korekciju za višestruka testiranja proveli smo Benjamini-Hochbergovom metodom, uz stopu lažnih otkrića (FDR) unaprijed određenu na  $< 15\%$ . Razina dvosmjerne statističke značajnosti bila je određena

na razini  $p < 0,05$  i sve intervale pouzdanosti izračunali smo na 95%-tnoj razini. Statistička analiza napravljena je u programu StataCorp. 2019. Stata Statistical Software: Release 16. College Station, TX: StataCorp LLC.

#### **4.9. Etički aspekti istraživanja**

Protokol istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno u skladu sa svim primjenjivim smjernicama i pravilima, uključujući Helsinšku deklaraciju Svjetske zdravstvene organizacije iz 1975. godine, kako je promijenjena 2013. godine (165–177), Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske. Identitet bolesnica čiji su podaci korišteni u ovoj retrospektivnoj analizi poznat je samo istraživaču, i to samo prilikom upisa podataka, a u bazi podataka su šifrirani njihovi podaci. Svakoj bolesnici pridružena je jedna lozinka. Lozinka pod kojom se krije pojedina bolesnica poznata je samo istraživaču. Patohistološka analiza preparata učinjena je također uz lozinku pojedine bolesnice (svakom patohistološkom preparatu pridružena je odgovarajuća lozinka). S financijskog aspekta, ovo istraživanje nije uzrokovalo nikakvo dodatno opterećenje za sustav, s obzirom na rutinske metode patohistološke dijagnostike, na kojima počiva. Potrebni materijal za provođenje istih pribavljen je iz privatnih izvora.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Uključivanje bolesnica

Ukupno su uključene 164 bolesnice, nakon čega je njih 12 (7,3%) isključeno jer su im nedostajali podaci na svim neovisnim varijablama te jedna (0,6%) bolesnica kojoj su nedostajali podaci o sTIL IM i iTIL IM. Jednoj bolesnici nedostajao je podatak o AR, ona je isključena samo iz analiza AR, a zadržana u svim drugim analizama. Bolesnice koje smo potpuno isključili iz analiza bile su mlađe od uključenih bolesnica s potpunim podacima. Medijan (IKR) dobi isključenih bolesnica iznosio je 49 (44-61) godina, a uključenih 58 (47-70) godina. Sukladno tome, među isključenima, manji je broj bio u menopauzi, 5/12 (41,7%), nego među zadržanima u uzorku za analizu, 98/152 (64,5%). Kod isključenih bolesnica gotovo je dvostruko češće učinjen radikalni zahvat, 8/12 (66,7%) u odnosu na 59/152 (38,8%) kod bolesnica za koje smo imali sve podatke. U njih je i ukupno preživljenje bilo nešto bolje, 9/11 (81,8%), (pri čemu jedna bolesnica nije imala podatak o preživljenju), kao i preživljenje bez relapsa, 11/12 (91,7%), u odnosu na 112/152 (73,7%) i 115/152 (75,7%) kod uključenih. Usprkos tim relevantnim razlikama, analiza je učinjena samo na uzorku bolesnica sa svim podacima (engl. *per protocol*) zato što je ukupan udio isključenih bio <10%, što je granična vrijednost koju smo unaprijed odredili kao kriterij za ponavljanje svih analiza i u *intention-to-treat* populaciji.

## 5.2. Sociodemografske i kliničke karakteristike bolesnica

Dob uključenih bolesnica bila je od 26 do 85 godina. Raspodjela dobi statistički je značajno odstupala od teorijski očekivane normalne raspodjele (Shapiro-Wilk test,  $n=152$ ,  $W=0,98$ ;  $V=2,44$ ;  $z=2,03$ ;  $p=0.021$ ;  $FDR<15\%$ ). Medijan (IKR) dobi uzorka bolesnica bio je 58 (47-70) godina (Tablica 3), a nešto više od dvije trećine bilo je u menopauzi. Nedostajao je razmjerno velik broj podataka o obiteljskoj anamnezi: za rak 42 (27,6%), a za rak dojke 43 (28,3%). Kod bolesnica za koje smo imali pravilno prikupljene podatke, pozitivnu obiteljsku anamnezu za rak dojke imalo je 18/109 (16,5%) (Tablica 3). Bolesnice s pozitivnom obiteljskom anamnezom za rak dojke bile su mlađe, s medijanom (IKR) dobi 43 (38-54) godine, od bolesnica bez raka dojke u obitelji (medijan (IKR) dobi 57 (47-69) godine).

**Tablica 3.** Karakteristike bolesnica pri uključivanju ( $n=152$ )

	n (%)
Godina dijagnoze	
2009	32 (21,1)
2010	34 (22,4)
2011	40 (26,3)
2012	46 (30,3)
Dob (u godinama), medijan (IKR)	58 (47-70)
Dob (u godinama)	
<45	32 (21,1)
45-54	33 (21,7)
55-64	35 (23,3)
≥65	52 (34,2)
Menopauza	98 (64,5)
Komorbiditeti*	89 (61,0)
Rak u obitelji†	39 (35,5)
Rak dojke u obitelji†	18 (16,5)

Podaci su prikazani kao broj (postotak) bolesnica, ako nije drukčije naznačeno

Kratice: IKR = interkvartilni raspon

\* Nedostajali su podaci za komorbiditete kod 6 (3,9%) bolesnica

† Radi prevelikog broja podataka koji su nedostajali, pozitivna obiteljska anamneza nije korištena u analizama; za rak u obitelji nedostajalo je 42 (27,6%), a za rak dojke u obitelji 43 (28,3%) podataka

U najvećem broju slučajeva u našem uzorku radilo se o duktalnom invazivnom karcinomu, odnosno NOS (od eng. *Non Other Specified*), medijana (IKR) veličine tumora 2,2 (1,55-2,95) cm, sa 62 (40,8%) bolesnice s pozitivnim limfnim čvorovima, 124 (81,6%) s tumorom gradusa III i medijanom (IKR) proliferacijskog indeksa Ki-67 57 (29-77) (Tablica 4). Za sve bolesnice uspješno su prikupljeni svi podaci prikazani u tablici.

**Tablica 4.** Karakteristike tumora pri uključivanju (n=152)

	n (%)
Zahvaćena dojka	
lijeva	91 (60,0)
desna	61 (40,1)
PHD	
duktalni karcinom/NOS	128 (84,2)
lobularni karcinom	1 (0,7)
medularni karcinom	14 (9,21)
apokrini karcinom	4 (2,63)
ostalo	5 (3,29)
Veličina tumora (cm), medijan (IKR)	2,2 (1,55-2,95)
Veličina tumora	
T1	57 (37,5)
T2	83 (54,6)
T3	12 (7,9)
Limfni čvorovi	
N0	90 (59,2)
N1	35 (23,0)
N2	12 (7,9)
N3	15 (9,9)
Pregledanih limfnih č, medijan (IKR)	16 (12-20)
Pozitivnih limfnih čvorova	62 (40,8)
Stadij	
IA	34 (22,4)
IIA	67 (44,1)
IIB	22 (14,5)
IIIA	14 (9,2)
IIIC	15 (9,9)
Gradus	
I	3 (2,0)
II	25 (16,5)
III	124 (81,6)
Ki-67, medijan (IKR)	57 (29-77)
Ki-67<20	23 (15,1)
Ki-67≥20	129 (84,9)

Podaci su prikazani kao broj (postotak) bolesnica, ako nije drukčije naznačeno  
 Kratice: IKR = interkvartilni raspon

Raspodjela veličina tumora (u cm) statistički je značajno odstupala od normalne raspodjele (Shapiro-Wilk test,  $n=152$ ,  $W=0,79$ ;  $V=23,65$ ;  $z=7,18$ ;  $p<0.001$ ). Raspodjela proliferacijskog indeksa Ki-67 bila je u rasponu od 3 do 100 i statistički značajno je odstupala od normalne raspodjele (Shapiro-Wilk test,  $n=152$ ,  $W=0,95$ ;  $V=5,72$ ;  $z=3,96$ ;  $p<0.001$ ). Kod nešto više od jedne trećine bolesnica učinjena je radikalna operacija (Tablica 5) i gotovo svima je učinjena disekcija pazušne jame. Adjuvantnom kemoterapijom liječeno je 130/148 (87,8%) bolesnica, u 114/128 (89,1%) slučajeva antraciklinima ili kombinacijom antraciklina i taksana. Adjuvantnom radioterapijom liječene su 103/140 (73,6%) bolesnice. Nijedna bolesnica nije liječena neoadjuvantnim pristupom.

**Tablica 5.** Način liječenja bolesnica ( $n=152$ )

	n (%)
Vrsta operacije	
poštedna	93 (61,2)
radikalna	59 (38,8)
Disekcija pazušne jame	150 (98,7)
Adjuvantna kemoterapija	131 (88,5)
Vrsta adjuvantne kemoterapije	
antraciklini	71 (55,5)
antraciklini i taksani	43 (33,6)
CMF	11 (8,6)
taksani	1 (0,8)
ostali protokoli	2 (1,6)
Adjuvantna radioterapija	103 (73,6)

Podaci su prikazani kao broj (postotak) bolesnica, ako nije drukčije naznačeno

Kratice: CMF = ciklofosfamid, metotreksat, 5-fluorouracil

Nedostajali su podaci za adjuvantnu kemoterapiju kod 4 (2,6%), za vrstu adjuvantne kemoterapije kod 3 (2,3%) od 131 bolesnice liječene adjuvantnom kemoterapijom, za adjuvantnu radioterapiju kod 12 (7,9%) bolesnica

### 5.3. Rezultati liječenja

#### 5.3.1. Ukupno petogodišnje preživljenje

Tijekom petogodišnjeg praćenja od operacije raka dojke, povrat bolesti ili smrt doživjelo je 50 bolesnica, odnosno njih 32,9% (95% CI 25,5% - 41,0%), a njih 40, odnosno 26,3% je umrlo (95% CI 19,5% - 34,1%) (*Tablica 6*). Dakle, ukupno petogodišnje preživljenje bilo je 112/152, odnosno 73,7% (95% CI 65,9% - 80,5%).

**Tablica 6.** Ishodi liječenja tijekom petogodišnjeg praćenja (n=152)

	n (%)	(95% CI)
Povrat bolesti ili smrt	50 (32,9)	(25,5-41,0)
Smrt	40 (26,3)	(19,5-34,1)
Petogodišnje preživljenje	112 (73,7)	(65,9-80,5)

Podaci su prikazani kao broj (postotak) bolesnica

#### 5.3.2. Povezanost ukupnog petogodišnjeg preživljenja sa sociodemografskim i kliničkim karakteristikama bolesnica

Ukupno petogodišnje preživljenje bilo je statistički značajno negativno povezano s dobi bolesnica (OR=0,96; 95% CI 0,94-0,99; p=0,005; SLO<15%), veličinom tumora (OR=0,69; 95% CI 0,54-0,88; p=0,003; FDR<15%), brojem pozitivnih limfnih čvorova (OR=0,75; 95% CI 0,65-0,85; p<0,001; FDR<15%), stadijem (stadij III u odnosu na stadij I: OR=0,11; 95% CI 0,03-0,35; p<0,001; FDR<15%), vrstom operacije (radikalna operacija u odnosu na poštednu, OR=0,16; 95% CI 0,07-0,36; p<0,001; FDR<15%) te pozitivno s adjuvantnom kemoterapijom (antraciklinska u odnosu na neliječenje

adjuvantnom kemoterapijom OR=6,66; 95% CI 2,24-19,80; p=0,001; FDR<15%) (Tablica 7). I u multivarijabilnoj analizi, u koju su zajedno uvršteni svi ti sociodemografski i klinički čimbenici, osim vrste operacije i adjuvantne kemoterapije, slijedeća tri čimbenika ostala su statistički značajno, neovisno o drugim čimbenicima, negativno povezanima s ukupnim petogodišnjim preživljenjem: dob (OR=0,91; 95% CI 0,86-0,96; p=0,001; FDR<15%), veličina tumora (OR=0,63; 95% CI 0,46-0,87; p=0,004; FDR<15%), broj pozitivnih limfnih čvorova (OR=0,75; 95% CI 0,64-0,88; p<0,001; FDR<15%). Nakon prilagodbe za sve druge čimbenike multivarijabilnom binarnom logističkom regresijom i menopauzalni status postao je statistički značajno povezan s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OR=6,89; 95% CI 1,18-40,21; p=0,032; FDR<15%). Međutim, za razliku od druga tri čimbenika, povezanost menopauzalnog statusa i ukupnog petogodišnjeg preživljenja bila je pozitivna. Nakon prilagodbe za dob i sve ostale čimbenike, bolesnice u postmenopauzi imale su gotovo sedam puta veće izgleda za preživljenje pet godina nakon operacije, u odnosu na bolesnice koje nisu bile u postmenopauzi. Ta je procjena bila izrazito slabe pouzdanosti i nakon korekcije za višestruka testiranja stopa lažnih otkrića bila je veća od unaprijed postavljene granične vrijednosti od 10%. U potpunoj multivarijabilnoj analizi, u koju su uvršteni svi navedeni sociodemografski i klinički čimbenici, kao i vrsta operacije i adjuvantna kemoterapija, s ukupnim petogodišnjim preživljenjem ostali su statistički značajno negativno povezani samo veličina tumora (OR=0,68; 95% CI 0,47-0,98; p=0,038; FDR<15%) i broj pozitivnih limfnih čvorova (OR=0,77; 95% CI 0,64-0,93; p=0,007; FDR<15%).



**Tablica 7.** Bivarijabilne analize povezanosti ukupnog petogodišnjeg preživljenja sa sociodemografskim i kliničkim karakteristikama bolesnica (n=152)

	n (%)	OR (95% CI)	p
Dob (u godinama)	- -	0,96 (0,94-0,99)	0,005*
<45	27 (84,4)	1	
45-54	25 (75,8)	0,58 (0,17-2,01)	0,388
55-64	29 (82,9)	0,90 (0,24-3,28)	0,867
≥65	31 (59,6)	0,27 (0,09-0,82)	0,021*
Menopauza			
ne	43 (79,6)	1	
da	69 (70,4)	0,61 (0,28-1,34)	0,219
Komorbiditeti†			
ne	45 (71,4)	1	
da	67 (75,3)	1,22 (0,59-2,52)	0,595
PHD			
ostalo	19 (79,2)	1	
duktalni karcinom	93 (72,7)	0,70 (0,24-2,02)	0,508
Veličina tumora	- -	0,69 (0,54-0,88)	0,003*
Veličina tumora			
T1	46 (80,7)	1	
T2	61 (73,5)	0,66 (0,29-1,50)	0,325
T3	5 (41,7)	0,17 (0,05-0,64)	0,009*
Broj pozitivnih limfnih čvorova	- -	0,75 (0,65-0,85)	<0,001*
Limfni čvorovi			
N0	74 (82,2)	1	
N1	28 (80,0)	0,86 (0,32-2,33)	0,774
N2	7 (58,3)	0,30 (0,09-1,08)	0,065
N3	3 (20,0)	0,05 (0,01-0,21)	<0,001*
Stadij			
I	29 (85,3)	1	
II	72 (80,9)	0,73 (0,25-2,16)	0,571
III	11 (37,9)	0,11 (0,03-0,35)	<0,001*
Gradus			
I-II	20 (71,4)	1	
III	92 (74,2)	1,15 (0,46-2,87)	0,764
Ki-67	- -	1,01 (1,00-1,02)	0,154
Ki-67			
<20	16 (69,6)	1	
≥20	96 (74,4)	1,27 (0,48-3,36)	0,627
Vrsta operacije			
poštedna	81 (87,1)	1	
radikalna	31 (52,5)	0,16 (0,07-0,36)	<0,001*
Adjuvantna kemoterapija			
bez adjuvantne kemoterapije	13 (54,2)	1	
ostali protokoli	5 (35,7)	0,47 (0,12-1,82)	0,275
antraciklini	63 (88,7)	6,66 (2,24-19,80)	0,001*
antraciklini i taksani	31 (72,1)	2,19 (0,77-6,21)	0,142

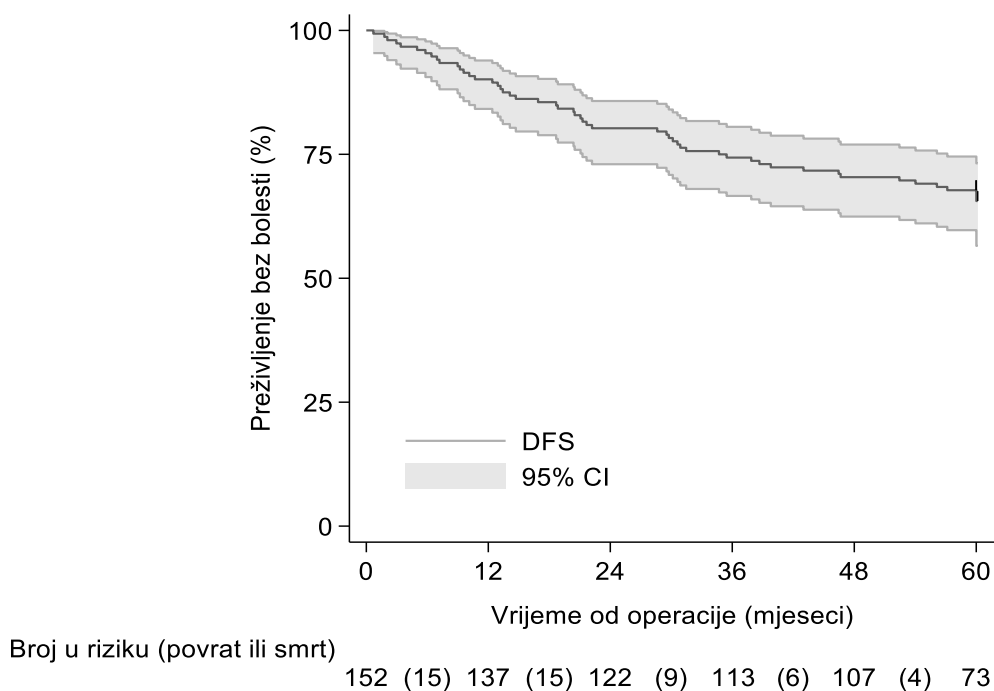
Kratice: - = nije primjenjivo; n = broj bolesnica; OR = omjer izgleda; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata bivarijabilnim, binarnim logističkim regresijama

† Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

\* FDR<15%

### 5.3.3. Preživljenje bez bolesti

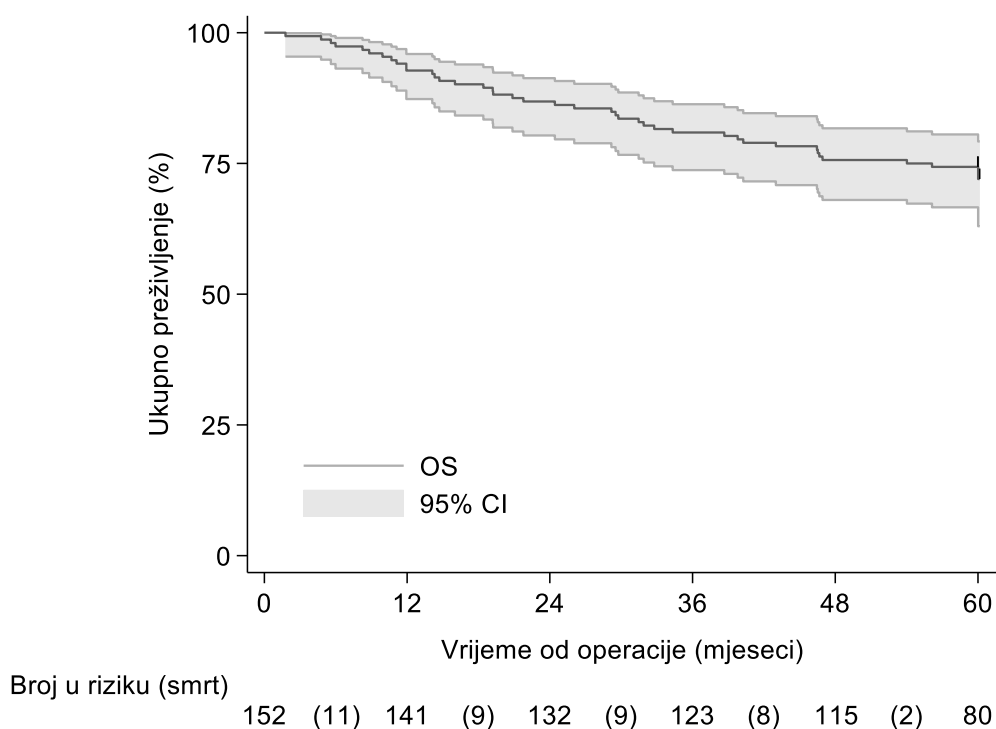
Tijekom petogodišnjeg praćenja 152 bolesnice, ukupno vrijeme provedeno u riziku za povrat bolesti ili smrt iznosilo je 7611 mjeseci. Tijekom praćenog razdoblja zabilježeni su povrat bolesti ili smrt kod 50 (32,9%) bolesnica. Medijan (IKR) preživljenja od operacije do povrata bolesti ili smrti nije dostignut, odnosno na kraju petogodišnjeg praćenja živih i bez povrata bolesti bilo je više od 50% svih bolesnica, točnije njih 102/152, odnosno 67,1% (*Slika 15*). Donji kvartil preživljenja (25. percentil) iznosio je 60 mjeseci. Aritmetička sredina preživljenja bez povrata bolesti iznosila je 48 mjeseci (95% CI 45-51 mjesec). Povrat bolesti u prvoj je godini praćenja doživjelo 14 (38,9%) bolesnica, u drugoj 13 (36,1%) u trećoj 6 (16,7%), u četvrtoj 1 (2,8%) te u petoj 2 (5,6%) bolesnica. (Mjesto povrata bolesti bile su pluća kod 16 (44,4%) bolesnika, kosti kod 10 (27,8%), limfni čvorovi kod 9 (25,0%), jetra kod 8 (22,2%), koža kod 6 (16,7%), mozak kod 3 (8,3%) te ostalo kod 3 (8,3%).



**Slika 15.** Kaplan-Meierova krivulja trajanja preživljenja bez povrata bolesti ili smrti u mjesecima od datuma operacije; DFS = preživljenje bez povrata bolesti (od engl. *disease free survival*); CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*) (n=152)

#### 5.3.4. Ukupno preživljenje

Tijekom petogodišnjeg praćenja 152 bolesnice, ukupno vrijeme provedeno u riziku za smrt iz bilo kojeg razloga iznosilo je 7757 mjeseci. Tijekom praćenog razdoblja umrlo je 40 (26,3%) bolesnica. Medijan (IKR) preživljenja od operacije nije dostignut u pet godina praćenja, odnosno na kraju petogodišnjeg praćenja živih je bilo više od 50%, točnije njih 112/152 (73,7%) (Slika 16). Donji kvartil preživljenja (25. percentil) iznosio je 54 mjeseca. Aritmetička sredina preživljenja iznosila je 51 mjesec (95% CI 48-54 mjeseca).



**Slika 16.** Kaplan-Meierova krivulja preživljenja u mjesecima od datuma operacije; OS = ukupno preživljenje (od engl. *overall survival*); CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*) (n=152)

#### 5.4. Izraženost androgenih receptora

Podatak o izraženosti androgenih receptora (AR) nedostajao je za jednu (0,7%) bolesnicu. Pozitivne androgene receptore, dakle izražene  $\geq 1\%$ , imalo je 47/151, odnosno 31,1% bolesnica (95% CI 0,24% - 0,39%) (*Tablica 8, Slika 17*). Dakle, izražene AR nije imalo 104/151, odnosno 68,9% bolesnica. Raspodjela izraženosti AR bila je izrazito pozitivno asimetrična i statistički značajno različita od normalne raspodjele (Shapiro-Wilk test, n=151, W=0,83; V=20,07; z=6,8; p<0.001) (*Slika 17*). Ako se naša hipoteza pokaže točnom, takva raspodjela AR imala bi za posljedicu eventualni blagotvorni učinak AR

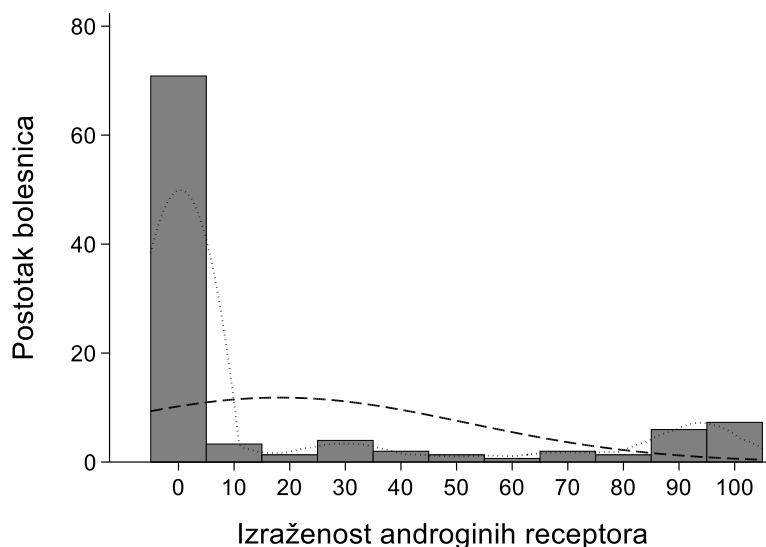
samo u manjem dijelu populacije žena s ranim TNRD. Iako bi to smanjilo kliničku važnost eventualne potvrde naše hipoteze, ne bi smanjilo njenu teorijsku važnost za razumijevanje patogeneze i prognoze ranog TNRD.

**Tablica 8.** Izraženost AR (n=151\*)

	n	(%)	(95% CI)
0%	104	(68,9)	
≥1%	47	(31,1)	(23,8% - 39,2%)
>5%	44	(29,1)	(22,0% - 37,1%)
>10%	40	(26,5)	(19,6% - 34,3%)
>20%	38	(25,2)	(18,5% - 32,9%)
>50%	28	(18,5)	(12,7% - 25,7%)

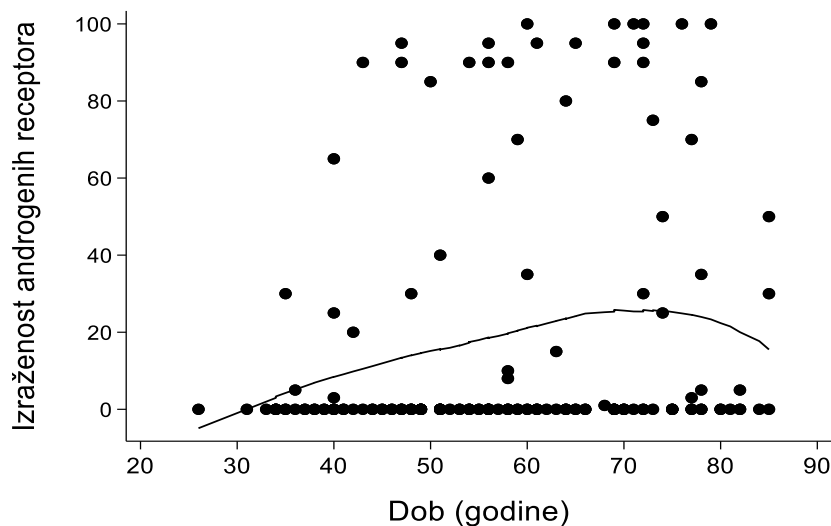
Podaci su prikazani kao broj (postotak) bolesnica, ako nije drukčije naznačeno

\* Podaci o izraženosti androgenih receptora nisu prikupljeni za jednu (0,7%) bolesnicu

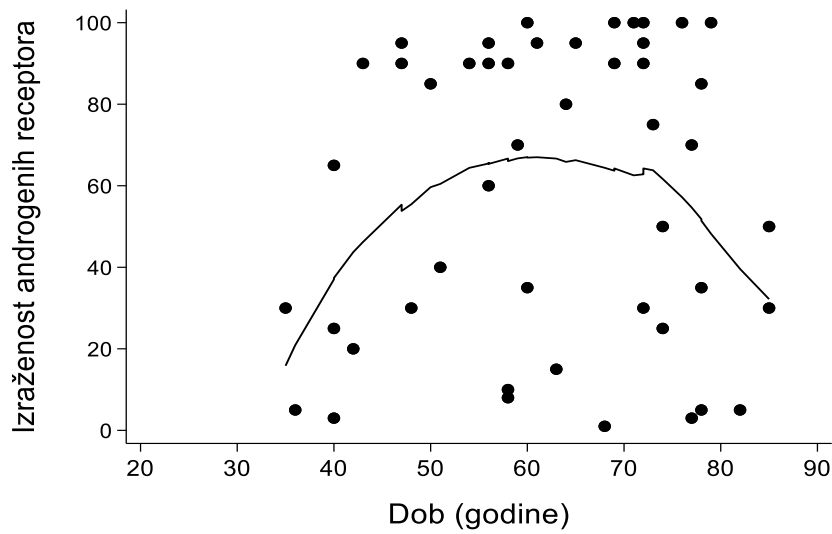


**Slika 17.** Histogram raspodjele izraženosti AR; isprekidana crta predstavlja krivulju normalne raspodjele; točkasta crta predstavlja kernel funkciju gustoće (n=152)

Prevalencija izraženosti AR bila je statistički značajno pozitivno povezana s dobi (OR=1,03; 95% CI 1,01-1,06; p=0,011; FDR<15%). Dakle, sa svakom godinom starosti više, izgledi da će bolesnica imati AR izražene  $\geq 1\%$  bili su veći za 3% (95% CI 1% do 6%). Međutim, povezanost originalnih rezultata izraženosti AR i dobi nije bila linearna (Slika 18, Slika 19). U subpopulaciji bolesnica s izraženošću AR  $\geq 1\%$  tu povezanost je najbolje i statistički značajno opisivala kvadratna funkcija ( $F(2,44)=3,66$ ;  $p=0,034$ ;  $FDR<15\%$ ;  $R^2$  prilagođen za broj prediktora=0.10) (Slika 19). Vertex krivulje, odnosno točka u kojoj s daljim porastom dobi više nije dolazilo do povećanja izraženosti AR, već se ona počela smanjivati, iznosio je 62 godine.



**Slika 18.** Točkasti dijagram povezanosti izraženosti AR i dobi; krivulja predstavlja 80% lokalno otežanu polinomijsku regresijsku krivulju (n=151)



**Slika 19.** Točkasti dijagram povezanosti izraženosti AR i dobi; krivulja predstavlja 80% lokalno otežanu polinomijsku regresijsku krivulju; prikazani su rezultati bolesnica s izraženošću AR  $\geq 1\%$  (n=47)

Prevalencija izraženosti AR bila je statistički značajno pozitivno povezana i s menopauzalnim statusom i proliferacijskim indeksom Ki-67  $\geq 20\%$  (Tablica 9), a negativno s veličinom tumora, stadijem i gradusom.

1

**Tablica 9.** Prevalencija izraženosti AR  $\geq 1\%$  u različitim sociodemografskim i kliničkim skupinama bolesnica (n=151)

	n (%)	OR (95% CI)	p
Cijeli uzorak	47 (31,1)		
Dob (u godinama)			
<45	7 (21,9)	1	
45-54	6 (18,8)	0,82 (0,24-2,79)	0,756
55-64	12 (34,3)	1,86 (0,63-5,55)	0,263
$\geq 65$	22 (42,31)	2,62 (0,967,14)	0,060
Menopauza			
ne	11 (20,8)	1	
da	36 (36,7)	2,22 (1,02-4,84)	0,046
Komorbidity†			
ne	17 (30,4)	1	
da	28 (31,5)	1,05 (0,51-2,17)	0,889
PHD			
ostalo	9 (37,5)	1	
duktalni karcinom	38 (29,9)	0,71 (0,29-1,77)	0,463
Veličina tumora			
T1	26 (45,6)	1	
T2	18 (22,0)	0,34 (0,16-0,70)	0,004*
T3	3 (25,0)	0,29 (0,10-1,62)	0,199
Limfni čvorovi			
N0	27 (30,0)	1	
N1	10 (28,6)	0,93 (0,39-2,21)	0,875
N2	5 (41,7)	1,67 (0,49-5,72)	0,417
N3	5 (35,7)	1,30 (0,40-4,23)	0,667
Stadij			
I	15 (44,1)	1	
II	22 (24,7)	0,42 (0,18-0,95)	0,038*
III	10 (35,7)	0,70 (0,25-1,97)	0,503
Gradus			
I-II	16 (57,1)	1	
III	31 (25,2)	0,25 (0,11-0,59)	0,002*
Ki-67			
<20	15 (65,2)	1	
$\geq 20$	32 (25,0)	0,18 (0,07-0,46)	<0,001*

Kratice: OR = omjer izgleda za izraženost AR  $\geq 1\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata bivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

† Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbidity

\* FDR<15%



## 5.5. Prisutnost tumor – infiltrirajućih limfocita

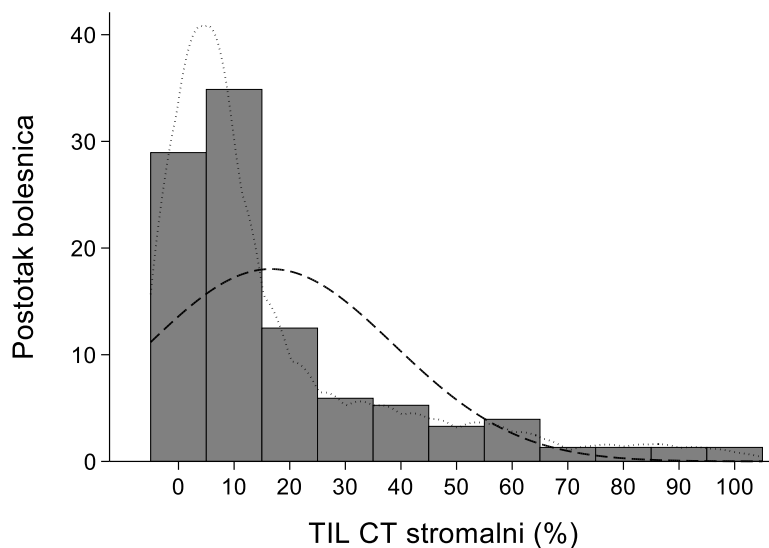
Sveukupno i općenito (uključujući sve evaluirane odjeljke, CT i IM, sTIL i iTIL) prisutnost TIL pokazala je obrazac sličan raspodjeli izraženosti AR (*Tablica 10*). Sve su raspodjele TIL bile snažno pozitivno asimetrične. To znači da raspodjele TIL u populaciji bolesnica s ranim TNRD nisu normalne, već da najveći broj bolesnica ima niske, a manji broj značajne prisutnosti TIL (*Slika 20, Slika 21, Slika 22, Slika 23*).

**Tablica 10.** Prisutnost TIL (n=152)

	medijan (IKR)	Izraženost ≥10% (95% CI)	
		n (%)	
sTIL CT (%)	5 (1-20)	73 (48,0)	(39,9% - 56,3%)
iTIL CT (%)	1 (1-6)	35 (23,0)	(16,6% - 30,5%)
sTIL IM (%)	30 (10-45)	130 (85,5)	(78,9% - 90,7%)
iTIL IM (%)	5 (5-15)	72 (47,4)	(39,2% - 55,6%)
sTIL	19 (7,5-36,3)	130 (85,5)	(78,9% - 90,7%)
iTIL	5 (2,5-12,5)	75 (49,3)	(41,4% - 57,3%)
TIL (s+i) CT	4,8 (1-13,8)	53 (34,9)	(27,7% - 42,8%)
TIL (s+i) IM	17,5 (7,5-31,3)	112 (73,7)	(66,1% - 80,1%)

Kratice: IKR = interkvartilni raspon

### 5.5.1. sTIL CT



**Slika 20.** Prisutnost sTIL CT; isprekidana crta predstavlja krivulju normalne raspodjele; točkasta crta predstavlja kernel funkciju gustoće (n=152)

Prisutnost stromalnih tumor – infiltrirajućih limfocita u centralnom tumoru (sTIL CT)  $\geq 10\%$  bila je statistički značajno pozitivno povezana s menopauzalnim statusom i veličinom tumora (*Tablica 11*). Povezanost s menopauzalnim statusom dijelom je bilo moguće objasniti povezanošću prisutnosti sTIL CT s dobi. Dob je bila statistički značajno pozitivno povezana s prisutnošću sTIL CT (OR=1,03; 95% CI 1,01-1,06; p=0,011; FDR<15%), a nakon prilagodbe za dob, menopauzalni status više nije bio statistički značajno povezan s prisutnošću sTIL CT (OR=0,57; 95% CI 0,19-1,69; p=0,308; FDR>15%).

**Tablica 11.** Prevalencija prisutnosti sTIL CT  $\geq 10\%$  u različitim sociodemografskim i kliničkim skupinama bolesnica (n=152)

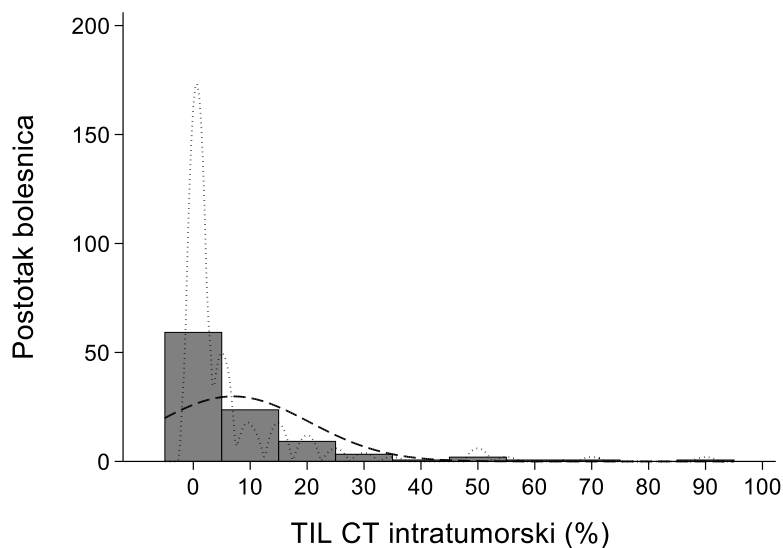
	n (%)	OR (95% CI)	p
Cijeli uzorak	73 (48,0)		
Dob (u godinama)			
<45	18 (56,3)	1	
45-54	23 (69,7)	1,79 (0,6-4,96)	0,263
55-64	12 (34,3)	0,41 (0,15-1,09)	0,073
$\geq 65$	20 (38,5)	0,49 (0,20-1,19)	0,114
Menopauza			
ne	33 (61,1)	1	
da	40 (40,8)	0,44 (0,22-0,87)	0,018*
Komorbidity†			
ne	29 (50,9)	1	
da	43 (48,3)	0,90 (0,46-1,76)	0,763
PHD			
ostalo	14 (58,3)	1	
duktalni karcinom	59 (46,1)	0,61 (0,25-1,48)	0,274
Veličina tumora			
T1	22 (38,6)	1	
T2	47 (56,6)	2,00 (1,04-4,13)	0,037*
T3	4 (33,3)	0,80 (0,21-2,96)	0,733
Limfni čvorovi			
N0	43 (47,8)	1	
N1	18 (51,4)	1,16 (0,53-2,53)	0,714
N2	7 (58,3)	1,53 (0,45-5,18)	0,494
N3	5 (33,3)	0,55 (0,17-1,73)	0,303
Stadij			
I	13 (38,2)	1	
II	47 (52,8)	1,81 (0,81-4,05)	0,151
III	13 (44,8)	1,31 (0,48-3,59)	0,597
Gradus			
I-II	9 (32,1)	1	
III	64 (51,6)	2,25 (0,95-65,36)	0,067
Ki-67			
<20	8 (34,8)	1	
$\geq 20$	65 (50,4)	1,90 (0,76-4,80)	0,172

Kratice: OR = omjer izgleda za prisutnost sTIL CT  $\geq 10\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata bivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

† Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbidity

\* FDR <15%

### 5.5.2. iTIL CT



**Slika 21.** Prisutnost iTIL CT; isprekidana crta predstavlja krivulju normalne raspodjele; točkasta crta predstavlja kernel funkciju gustoće (n=152)

Prisutnost intratumorskih TIL u centralnom tumoru (iTIL CT)  $\geq 10\%$  bila je statistički značajno povezana s duktalnim karcinomom, u odnosu na sve ostale patohistološke tipove zajedno (Tablica 12) te negativno s menopauzalnim statusom. Kao i kod sTIL CT, tu povezanost s menopauzalnim statusom u značajnoj je mjeri bilo moguće objasniti povezanošću s dobi, koja je bila statistički značajno negativno povezana s prisutnošću iTIL CT (OR=0,97; 95% CI 0,95-1,00; p=0,048; FDR>15%).

**Tablica 12.** Prevalencija prisutnosti iTIL CT $\geq$ 10% u različitim sociodemografskim i kliničkim skupinama bolesnica (n=152)

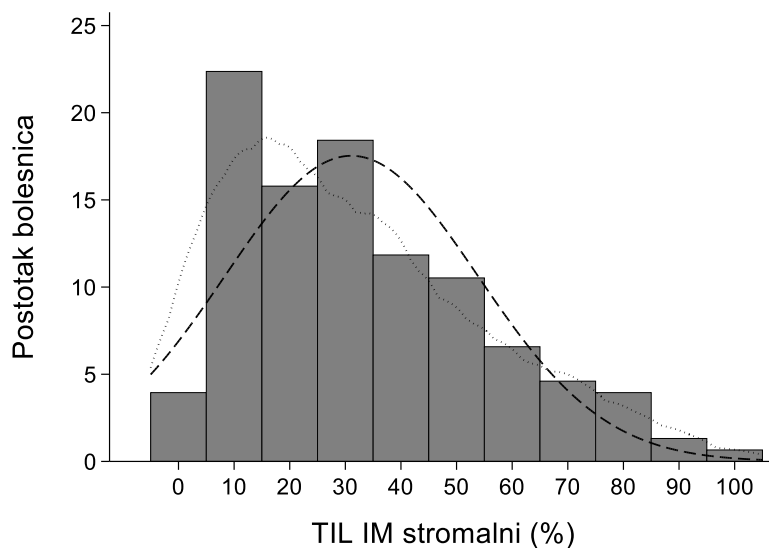
	n	OR (95% CI)	p
Cijeli uzorak	35 (23,0)		
Dob (u godinama)			
<45	9 (28,1)	1	
45-54	12 (36,4)	1,46 (0,51-4,16)	0,479
55-64	7 (13,5)	0,64 (0,21-1,98)	0,438
$\geq$ 65	7 (13,5)	0,40 (0,13-1,20)	0,103
Menopauza			
ne	18 (33,3)	1	
da	17 (17,4)	0,42 (0,19-0,91)	0,027
Komorbidity*			
ne	13 (22,8)	1	
da	22 (24,7)	1,11 (0,51-2,43)	0,792
PHD			
ostalo	10 (41,7)	1	
duktalni karcinom	25 (19,5)	0,34 (0,14-0,85)	0,022
Veličina tumora			
T1	13 (22,8)	1	
T2	21 (25,3)	1,15 (0,52-2,53)	0,735
T3	1 (8,3)	0,31 (0,04-2,61)	0,280
Limfni čvorovi			
N0	24 (26,7)	1	
N1	6 (17,1)	0,57 (0,21-1,54)	0,267
N2	3 (25,0)	0,92 (0,23-3,67)	0,902
N3	2 (13,3)	0,42 (0,09-2,01)	0,280
Stadij			
I	10 (29,4)	1	
II	19 (21,4)	0,65 (0,27-1,59)	0,348
III	6 (20,7)	0,63 (0,20-2,00)	0,430
Gradus			
I-II	6 (21,4)	1	
III	29 (23,4)	1,12 (0,41-3,02)	0,824
Ki-67			
<20	3 (13,0)	1	
$\geq$ 20	32 (24,8)	2,20 (0,61-7,89)	0,227

Kratice: OR = omjer izgleda za prisutnost iTIL CT  $\geq$ 10%; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata bivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom, x = vrijednost nije bilo moguće izračunati

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbidity

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

### 5.5.3. sTIL IM



**Slika 22.** Prisutnost sTIL IM; isprekidana crta predstavlja krivulju normalne raspodjele; točkasta crta predstavlja kernel funkciju gustoće (n=152)

Prisutnost stromalnih TIL na invazivnoj margini (sTIL IM)  $\geq 10\%$  bila je statistički značajno pozitivno povezana sa gradusom tumora i proliferacijskim indeksom Ki-67  $\geq 20\%$  (Tablica 13).

**Tablica 13.** Prevalencija prisutnosti sTIL IM  $\geq 10\%$  u različitim sociodemografskim i kliničkim skupinama bolesnica (n=152)

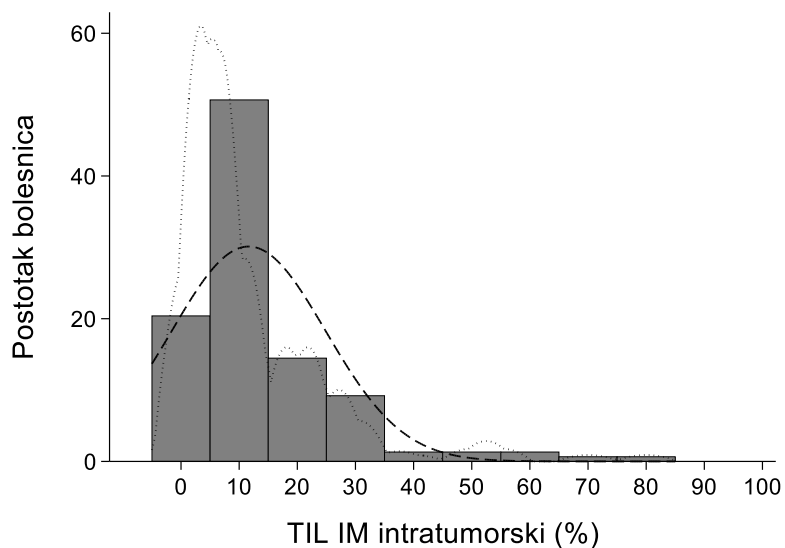
	n (%)	OR (95% CI)	p
Cijeli uzorak	130 (85,5)		
Dob (u godinama)			
<45	27 (84,4)	1	
45-54	31 (93,9)	2,87 (0,51-16,01)	0,229
55-64	29 (82,9)	0,90 (0,24-3,28)	0,867
$\geq 65$	43 (82,7)	0,88 (0,27-2,92)	0,841
Menopauza			
ne	48 (88,9)	1	
da	82 (83,7)	0,64 (0,23-1,75)	0,384
Komorbiditeti*			
ne	52 (91,2)	1	
da	76 (85,4)	0,56 (0,19-1,67)	0,300
PHD			
ostalo	19 (79,2)	1	
duktalni karcinom	111 (86,72)	1,72 (0,57-5,21)	0,339
Veličina tumora			
T1	47 (82,5)	1	
T2	74 (89,2)	1,75 (0,66-4,62)	0,259
T3	9 (75,0)	0,64 (0,15-2,79)	0,551
Limfni čvorovi			
N0	78 (86,7)	1	
N1	30 (85,7)	0,92 (0,30-2,84)	0,889
N2	10 (83,3)	0,77 (0,15-3,95)	0,753
N3	12 (80,0)	0,62 (0,15-2,50)	0,498
Stadij			
I	28 (82,4)	1	
II	79 (88,8)	1,69 (0,56-5,09)	0,348
III	23 (79,3)	0,82 (0,23-2,89)	0,759
Gradus			
I-II	19 (67,9)	1	
III	111 (89,5)	4,04 (1,52-10,77)	0,005
Ki-67			
<20	15 (65,2)	1	
$\geq 20$	115 (89,2)	4,38 (1,58-12,17)	0,005

Kratice: OR = omjer izgleda za prisutnost sTIL IM  $\geq 10\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata bivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

#### 5.5.4. iTIL IM



**Slika 23.** Prisutnost iTIL IM; isprekidana crta predstavlja krivulju normalne raspodjele; točkasta crta predstavlja kernel funkciju gustoće (n=152)

Kao kod sTIL IM, i kod intratumorskih TIL na invazivnoj margini (iTIL IM) prisutnost  $\geq 10\%$  bila je statistički značajno pozitivno povezana s gradusom tumora i proliferacijskim indeksom Ki-67  $\geq 20$  (Tablica 14).



**Tablica 14.** Prevalencija prisutnosti iTIL IM  $\geq 10\%$  u različitim sociodemografskim i kliničkim skupinama bolesnica (n=152)

	n (%)	OR (95% CI)	p
Cijeli uzorak	72 (47,4)		
Dob (u godinama)			
<45	19 (59,4)	1	
45-54	18 (54,6)	2,87 (0,51-16,01)	0,229
55-64	15 (42,9)	0,90 (0,24-3,28)	0,867
$\geq 65$	20 (38,5)	0,88 (0,27-2,92)	0,841
Menopauza			
ne	32 (59,3)	1	
da	40 (40,8)	0,64 (0,23-1,75)	0,384
Komorbiditeti*			
ne	32 (56,1)	1	
da	39 (43,8)	0,56 (0,19-1,67)	0,300
PHD			
ostalo	16 (66,7)	1	
duktalni karcinom	56 (43,8)	1,72 (0,57-5,21)	0,339
Veličina tumora			
T1	27 (47,4)	1	
T2	43 (51,8)	1,75 (0,66-4,62)	0,259
T3	2 (16,7)	0,64 (0,15-2,79)	0,551
Limfni čvorovi			
N0	43 (46,7)	1	
N1	17 (48,6)	0,92 (0,30-2,84)	0,889
N2	6 (50,0)	0,77 (0,15-3,95)	0,753
N3	7 (46,7)	0,62 (0,15-2,50)	0,498
Stadij			
I	14 (41,2)	1	
II	44 (49,4)	1,40 (0,63-3,11)	0,413
III	14 (48,3)	1,33 (0,49-3,62)	0,572
Gradus			
I-II	8 (28,6)	1	
III	64 (51,6)	4,04 (1,52-10,77)	0,005
Ki-67			
<20	9 (39,1)	1	
$\geq 20$	63 (48,8)	4,38 (1,58-12,17)	0,005

Kratice: OR = omjer izgleda za prisutnost iTIL IM  $\geq 10\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata bivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

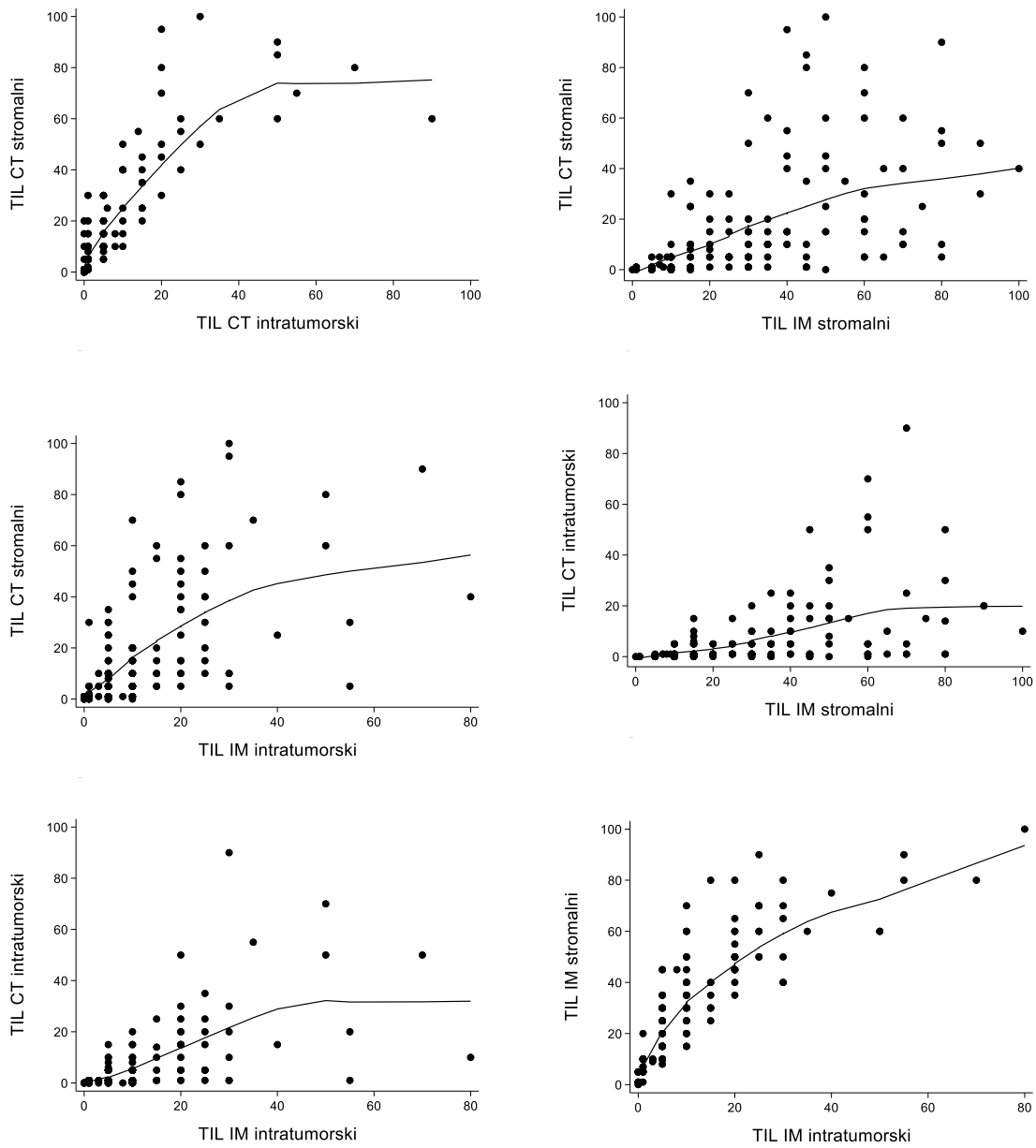
## 5.6. Povezanost prisutnosti TIL u različitim odjeljcima

Stromalni i intratumorski TIL bili su statistički značajno, pozitivno povezani (Spearmanova korelacija ranga,  $\rho=0,91$ ;  $p<0,001$ ;  $FDR<15\%$ ). Prisutnosti TIL u sva četiri evaluirana odjeljka bile su međusobno statistički značajno povezane (Tablica 15, Slika 24). Sve povezanosti na razini ovog konkretnog uzorka bile su veće kod nižih vrijednosti TIL. Čini se, dakle, da su povezanosti pojedinih TIL bile nelinearne, odnosno da su slabile ili se gubile nakon nekih vrijednosti. Povezanosti između sTIL i iTIL bile su, očekivano, više unutar CT odnosno IM, nego između njih.

**Tablica 15.** Povezanost prisutnosti TIL u različitim odjeljcima (n=152)

	sTIL CT		iTIL CT		sTIL IM	
	$\rho$ (95% CI)	p	$\rho$ (95% CI)	p	$\rho$ (95% CI)	p
sTIL CT	1,0					
iTIL CT	0,88 (0,84-0,91)	<0,001	1,0			
sTIL IM	0,66 (0,56-0,74)	<0,001	0,60 (0,49-0,69)	<0,001	1,0	
iTIL IM	0,71 (0,63-0,78)	<0,001	0,69 (0,60-0,77)	<0,001	0,89 (0,85-0,92)	<0,001

Kratice:  $\rho$  = Spearmanov koeficijent korelacije ranga; CI = interval pouzdanosti; p = statistička značajnost koeficijenta korelacije



**Slika 24.** Točkasti dijagrami povezanosti prisutnosti TIL u pojedinim odjeljcima; krivulja predstavlja 80% lokalno otežanu polinomijsku regresijsku krivulju (n=152)

## 5.7. Povezanost prisutnosti TIL i izraženosti androgenih receptora

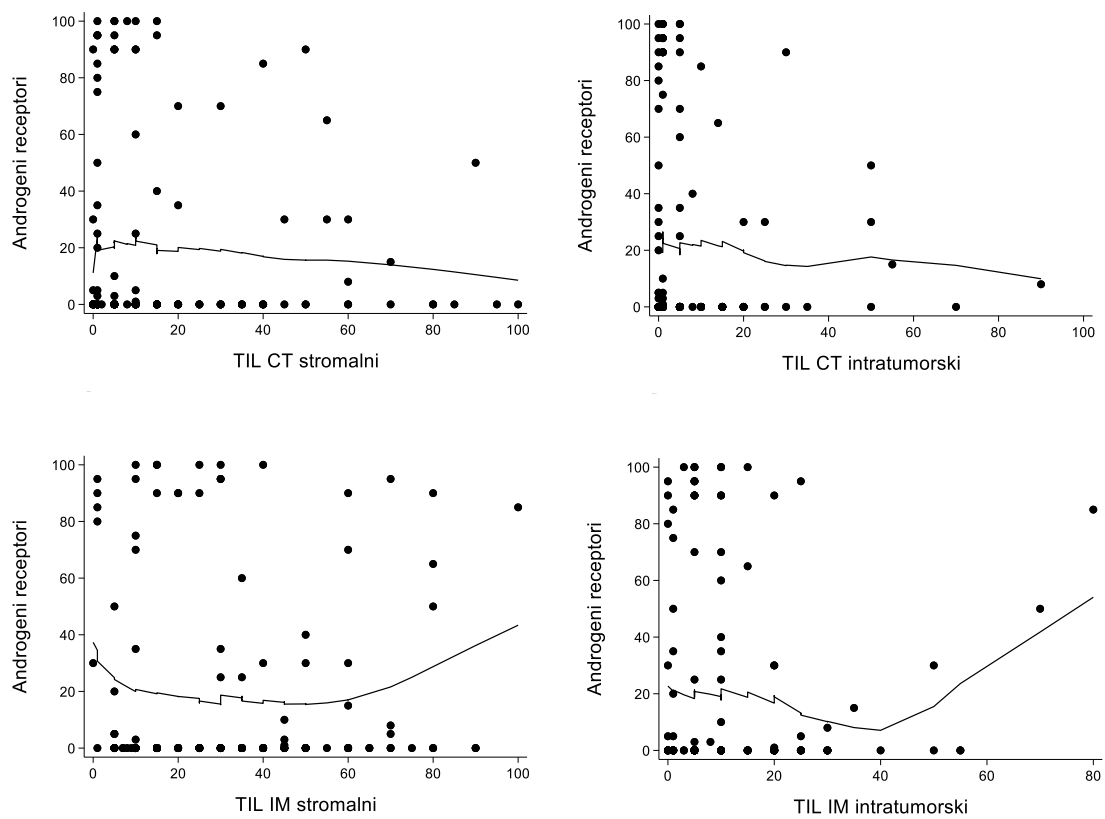
Izraženost AR nije bila statistički značajno povezana s prisutnosti stromalnih i intratumorskih niti TIL u pojedinim odjeljcima (*Tablica 16, Slika 25*). Na razini ovog konkretnog uzorka povezanosti AR s TIL bile su izrazito niske ( $\rho < 0,08$ ) i negativne. Na uzorku ove veličine i s ovom empirijskom raspodjelom AR nemoguće je pouzdano analizirati te odnose, ali na temelju naših rezultata moguće je postaviti hipotezu za buduća istraživanja na većim uzorcima, da kod sTIL IM i iTIL IM, nakon neke približne vrijednosti od 60 kod sTIL IM i 40 kod iTIL IM, AR i TIL postaju pozitivno povezani.

**Tablica 16.** Povezanost izraženosti AR i prisutnosti TIL u pojedinim odjeljcima (n=151)

	AR	
	$\rho$ (95% CI)	p
sTIL	-0,04 (-0,21-0,12)	0,598
iTIL	-0,05 (-0,21-0,10)	0,516
sTIL CT	-0,06 (-0,22-0,10)	0,463
iTIL CT	-0,08 (-0,24-0,09)	0,349
sTIL IM	-0,05 (-0,21-0,11)	0,549
iTIL IM	-0,07 (-0,23-0,09)	0,403

Kratice:  $\rho$  = Spearmanov koeficijent korelacije ranga; CI = interval pouzdanosti;

p = statistička značajnost koeficijenta korelacije



**Slika 25.** Točkasti dijagrami povezanosti izraženosti AR s prisutnosti TIL u pojedinim odjeljcima; krivulja predstavlja 80% lokalno otežanu polinomijsku regresijsku krivulju (n=151)

## 5.8. Ukupno petogodišnje preživljenje

### 5.8.1. Androgeni receptori

Izraženost AR nije bila statistički značajno, bivarijabilno povezana s ukupnim petogodišnjem preživljenjem (OR=1,00; 95% CI 0,99-1,01; p=0,696; FDR>15%). Ni izraženost AR  $\geq 1\%$  nije bila statistički značajno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OR=0,87; 95% CI 0,40-1,90; p=0,730; FDR>15%). Jednako tako, nakon prilagodbe za sve sociodemografske i kliničke čimbenike s potencijalno zbunjujućim učinkom, izraženost AR (*Tablica 17*) niti izraženost AR  $\geq 1\%$  (*Tablica 18*) nisu bile statistički značajnim prediktorima ukupnog petogodišnjeg preživljenja.

**Tablica 17.** Multivarijabilna analiza povezanosti izraženosti AR s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=151)

	OR (95% CI)	p
Izraženost AR	1,01 (0,99-1,02)	0,612
Prilagođeno za: dob, menopauzalni status, komorbiditete*, PHD, veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova, stadij, gradus, Ki-67, vrstu operacije i adjuvantnu kemoterapiju†		

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

**Tablica 18.** Multivarijabilna analiza povezanosti izraženosti AR  $\geq 1\%$  s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=151)

	OR (95% CI)	p
Izraženost AR $\geq 1\%$		
ne	1	
da	1,29 (0,38-4,34)	0,680
Prilagođeno za: dob, menopauzalni status, komorbiditete*, PHD, veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova, stadij, gradus, Ki-67, vrstu operacije i adjuvantnu kemoterapiju†		

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

### 5.8.2. *sTIL*

Prisutnost *sTIL* bila je statistički značajno, bivarijabilno povezana s ukupnim petogodišnjem preživljenjem (OR=1,05; 95% CI 1,02-1,08; p=0,010; FDR<15%). Prisutnost *sTIL*≥10% nije bila statistički značajno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OR=2,00; 95% CI 0,93-4,29; p=0,075; FDR<15%). Nakon prilagodbe za sve sociodemografske i kliničke čimbenike s potencijalno zbunjujućim učinkom, prisutnost *sTIL* bila je statistički značajno povezana s petogodišnjim preživljenjem (OR=1,05; 95% CI 1,01-1,09; p=0,013; FDR<15%). Prisutnost *sTIL*≥10% nije bila statistički značajno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem ni nakon prilagodbe za moguće zbunjujuće čimbenike.

### 5.8.3. *iTIL*

Prisutnost *iTIL* bila je bivarijabilno, statistički značajno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OR=1,09; 95% CI 1,02-1,16; p=0,010; FDR<15%). Nakon prilagodbe za moguće zbunjujuće varijable ta se povezanost smanjila i nije više bila statistički značajna (OR=1,06; 95% CI 0,99-1,13; p=0,106; FDR>5%). Prisutnost *iTIL* ≥10% bila je statistički značajno povezana s preživljenjem i u bivarijabilnoj analizi (OR=7,69; 95% CI 2,23-26,47; p=0,001; FDR<15%) i u multivarijabilnoj analizi nakon prilagodbe za moguće zbunjujuće varijable (OR=6,19; 95% CI 1,31-29,32; p=0,022; FDR<15%).



#### 5.8.4. sTIL CT

Prisutnost sTIL CT bila je statistički značajno, bivarijabilno povezana s ukupnim petogodišnjem preživljenjem (OR=1,04; 95% CI 1,01-1,07; p=0,010; FDR<15%). Prisutnost sTIL CT  $\geq 10\%$  bila je također statistički značajno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OR=3,27; 95% CI 1,49-7,19; p=0,003; FDR<15%). Nakon prilagodbe za sve sociodemografske i kliničke čimbenike s potencijalno zbunjujućim učinkom, prisutnost sTIL CT (*Tablica 19*), kao niti prisutnost  $\geq 10\%$  (*Tablica 20*), nisu više bile statistički značajno povezane s ukupnim petogodišnjim preživljenjem.

**Tablica 19.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti sTIL CT s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=152)

	OR (95% CI)	p
sTIL CT	1,03 (1,00-1,07)	0,065

Prilagođeno za:  
dob, menopauzalni status,  
komorbiditete\*, PHD, veličinu  
tumora, broj pozitivnih limfnih  
čvorova, stadij, gradus, Ki-67,  
vrstu operacije i adjuvantnu  
kemoterapiju†

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

**Tablica 20.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti sTIL CT  $\geq 10\%$  s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=152)

	OR (95% CI)	p
sTIL CT $\geq 10\%$		
ne	1	
da	2,74 (0,98-7,68)	0,055
Prilagođeno za: dob, menopauzalni status, komorbiditete*, PHD, veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova, stadij, gradus, Ki-67, vrstu operacije i adjuvantnu kemoterapiju†		

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

### 5.8.5. iTIL CT

Prisutnost iTIL CT nije bila (OR=1,06; 95% CI 1,00-1,12; p=0,056; FDR>15%), ali je prisutnost iTIL CT  $\geq 10\%$  bila visoko statistički značajno, bivarijabilno povezana s ukupnim petogodišnjem preživljenjem (OR=17,00; 95% CI 2,24-128,84; p=0,006; FDR<15%). Nakon prilagodbe za sve sociodemografske i kliničke čimbenike s potencijalno zbunjujućim učinkom, prisutnost iTIL CT (*Tablica 21*), kao niti prisutnost  $\geq 10\%$  (*Tablica 22*), nisu više bile statistički značajno povezane s ukupnim petogodišnjim preživljenjem.

**Tablica 21.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti iTIL CT s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=152)

	OR (95% CI)	p
iTIL CT	1,03 (0,97-1,08)	0,366

Prilagođeno za:  
dob, menopauzalni status,  
komorbiditete\*, PHD, veličinu  
tumora, broj pozitivnih limfnih  
čvorova, stadij, gradus, Ki-67,  
vrstu operacije i adjuvantnu  
kemoterapiju†

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

**Tablica 22.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti iTIL CT $\geq$ 10% s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=152)

	OR (95% CI)	p
iTIL CT $\geq$ 10%		
ne	1	
da	14,05 (1,54-128,33)	0,019
Prilagođeno za: dob, menopauzalni status, komorbiditete*, PHD, veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova, stadij, gradus, Ki-67, vrstu operacije i adjuvantnu kemoterapiju†		

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

### 5.8.6. sTIL IM

Prisutnost sTIL IM bila je statistički značajno, bivarijabilno povezana s ukupnim petogodišnjem preživljenjem (OR=1,04; 95% CI 1,02-1,06; p=0,001; FDR<15%). Prisutnost sTIL IM  $\geq 10\%$  nije bila statistički značajno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OR=2,21; 95% CI 0,86-5,66; p=0,098; FDR>15%). I nakon prilagodbe za sve praćene sociodemografske i kliničke čimbenike, prisutnost sTIL IM (Tablica 23) ostala je statistički značajno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem, a prisutnost sTIL IM  $\geq 10\%$  ne (Tablica 24).

**Tablica 23.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti sTIL IM s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=152)

	OR (95% CI)	p
sTIL IM	1,04 (1,01-1,07)	0,015*

Prilagođeno za:  
dob, menopauzalni status,  
komorbiditete†, PHD, veličinu  
tumora, broj pozitivnih limfnih  
čvorova, stadij, gradus, vrstu  
operacije i adjuvantnu  
kemoterapiju‡

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

† Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

‡ Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

**Tablica 24.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti sTIL IM  $\geq 10\%$  s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=152)

	OR (95% CI)	p
sTIL IM $\geq 10\%$		
ne	1	
da	1,35 (0,33-5,46)	0,677
Prilagođeno za: dob, menopauzalni status, komorbiditete*, PHD, veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova, stadij, gradus, Ki-67, vrstu operacije i adjuvantnu kemoterapiju†		

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

### 5.8.7. iTIL IM

Prisutnost iTIL IM i prisutnost iTIL IM  $\geq 10\%$  bile su bivarijabilno statistički značajno povezane s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OR=1,08; 95% CI 1,02-1,14; p=0,005; FDR<15%; OR=3,72; 95% CI 1,66-8,34; p=0,001; FDR<15%, prema redoslijedu navođenja). Nakon prilagodbe za sve sociodemografske i kliničke čimbenike s potencijalno zbunjujućim učinkom, prisutnost iTIL IM (Tablica 25) nije više bila statistički značajno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem, ali prisutnost iTIL IM  $\geq 10\%$  jest (Tablica 26).

**Tablica 25.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti iTIL IM s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=152)

	OR (95% CI)	p
iTIL IM	1,05 (0,99-1,11)	0,103

Prilagođeno za:  
dob, menopauzalni status,  
komorbiditete†, PHD, veličinu  
tumora, broj pozitivnih limfnih  
čvorova, stadij, gradus, Ki-67,  
vrstu operacije i adjuvantnu  
kemoterapiju‡

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

**Tablica 26.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti iTIL IM $\geq$ 10% s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=152)

	OR (95% CI)	p
iTIL IM $\geq$ 10%		
ne	1	
da	3,76 (1,09-13,03)	0,036*
Prilagođeno za: dob, menopauzalni status, komorbiditete*, PHD, veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova, stadij, gradus, Ki-67, vrstu operacije i adjuvantnu kemoterapiju†		

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

† Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

‡ Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

\* FDR<15%



### 5.8.8. TIL i androgeni receptori

Nakon što su u multivarijabilni model uključena sva četiri odjeljka TIL i AR te sve planirane sociodemografske i kliničke varijable, prisutnost iTIL CT bila je statistički značajno, ali negativno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (*Tablica 27*). Prisutnost TIL  $\geq 10\%$  i AR  $\geq 1\%$  nije bila statistički značajan, neovisni prediktor ukupnog petogodišnjeg preživljenja (*Tablica 28*).

**Tablica 27.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti TIL i izraženosti AR s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=151)

	OR (95% CI)	p
sTIL CT	1,05 (1,00-1,11)	0,060
iTIL CT	0,93 (0,86-1,00)	0,039*
sTIL IM	1,05 (0,99-1,11)	0,099
iTIL IM	0,97 (0,88-1,07)	0,525
AR	1,00 (0,99-1,02)	0,673

Prilagođeno za:  
dob, menopauzalni status,  
komorbiditete\*, PHD, veličinu  
tumora, broj pozitivnih limfnih  
čvorova, stadij, gradus, Ki-67,  
vrstu operacije i adjuvantnu  
kemoterapiju†

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

**Tablica 28.** Multivarijabilna analiza povezanosti prisutnosti TIL i izraženosti AR  $\geq 10\%$  s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (n=152)

	OR (95% CI)	p
sTIL CT	1,43 (0,42-4,90)	0,572
iTIL CT	9,16 (0,81-103,54)	0,074
sTIL IM	0,60 (0,13-2,74)	0,507
iTIL IM	1,82 (0,42-7,88)	0,421
AR	1,30 (0,37-4,63)	0,683
Prilagođeno za: dob, menopauzalni status, komorbiditete*, PHD, veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova, stadij, gradus, Ki-67, vrstu operacije i adjuvantnu kemoterapiju†		

Kratice: OR = omjer izgleda za ukupno petogodišnje preživljenje; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

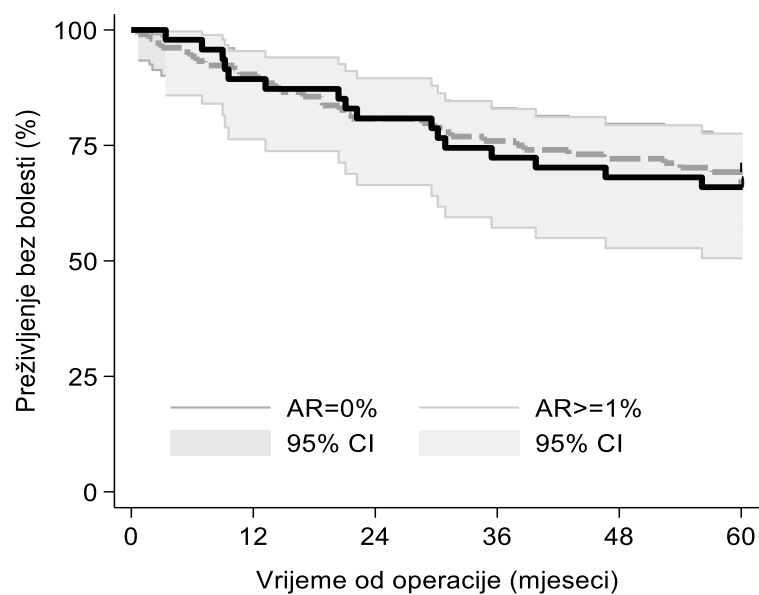
\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

## 5.9. Preživljenje bez bolesti

### 5.9.1. Androgeni receptori

Log-rank test nije ukazao na statistički značajnu razliku u preživljenju bez bolesti između bolesnica s izraženošću AR  $\geq 1\%$  i onih bez izraženih AR ( $X^2=0,07$ ;  $ss=1$ ;  $p=0,789$ ;  $FDR>15\%$ ) (Slika 26). Medijan preživljenja nije dosegnut niti u jednoj od dvije skupine bolesnica. Aritmetička sredina preživljenja bez bolesti iznosila je 48 (95% CI 45-52) mjeseci u bolesnica bez izraženih AR te 48 (95% CI 42-53) u bolesnica s AR  $\geq 1\%$ . Omjer hazarda za povrat bolesti ili smrt iznosio je HR=1,08 (95% CI 0,60-1,97);  $p=0,789$ ;  $FDR>15\%$ , za bolesnice s AR  $\geq 1\%$ , odnosno – kada je analizirana kontinuirana varijabla izraženosti AR HR=1,00 (95% CI 0,99-1,01);  $p=0,513$ ;  $FDR>15\%$ , za svaki postotak više izraženih AR. Nakon prilagodbe za sve potencijalno zbunjujuće varijable Coxovom regresijom, omjer hazarda za povrat bolesti ili smrt iznosio je HR=0,91 (95% CI 0,43-1,96);  $p=0,816$ ;  $FDR>15\%$ . u bolesnica s AR  $\geq 1\%$ , odnosno HR=1,00 (95% CI 0,99-1,01);  $p=0,716$ ;  $FDR>15\%$ , za svaki postotak više izraženih AR.



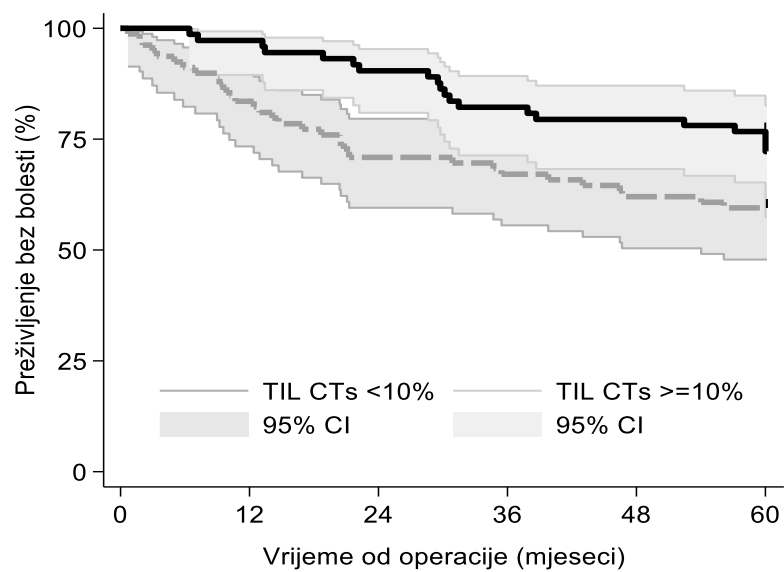
Broj u riziku (povrat ili smrt)

AR=0%	104	(10)	94	(10)	84	(5)	79	(4)	75	(3)	54
AR>=1%	47	(5)	42	(4)	38	(4)	34	(2)	32	(1)	19

**Slika 26.** Kaplan-Meierova krivulja trajanja preživljenja bez povrata bolesti ili smrti u mjesecima od datuma operacije prema izraženosti  $AR \geq 1\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*) (n=151)

### 5.9.2. sTIL CT

U bivarijabilnoj analizi pokazalo se da je svaki postotak više prisutnih sTIL CT povezan s omjerom hazarda za povrat bolesti ili smrt od HR=0,98 (95% CI 0,96-1,00); p=0,028; FDR<15%. Dakle, svaki postotak više prisutnih sTIL CT za približno 2% je smanjivao hazard. Log-rank test također je pokazao statistički značajnu razliku ( $X^2=5,26$ ; ss=1; p=0,022; FDR<15%). Taj učinak nije ostao statistički značajnim nakon prilagodbe za sve sociodemografske i kliničke čimbenike: HR=0,99 (95% CI 0,97-1,01); p=0,168; FDR>15%. Jednako tako je u bivarijabilnoj analizi prisutnost sTIL CT $\geq$ 10% bila povezana sa statistički značajno manjim hazardom za povrat bolesti ili smrt u odnosu na bolesnice s prisutnošću sTIL CT<10% HR=0,51 (95% CI 0,29-0,92); p=0,024; FDR<15%. (Slika 27), ali to više nije bio slučaj nakon prilagodbe za sociodemografske i kliničke čimbenike: HR=0,71 (95% CI 0,37-1,36); p=0,298; FDR $\diamond$ 5%. Medijan preživljenja bez povrata bolesti ili smrti nije dosegnut niti u jednoj skupini prema prisutnosti sTIL CT <10% ili  $\geq$ 10%. Aritmetička sredina (95% CI) preživljenja iznosila je 44 (39-49) mjeseca u skupini bolesnica s sTIL CT <10%, odnosno 52 (49-56) mjeseci u skupini s prisutnošću sTIL CT  $\geq$ 10%.

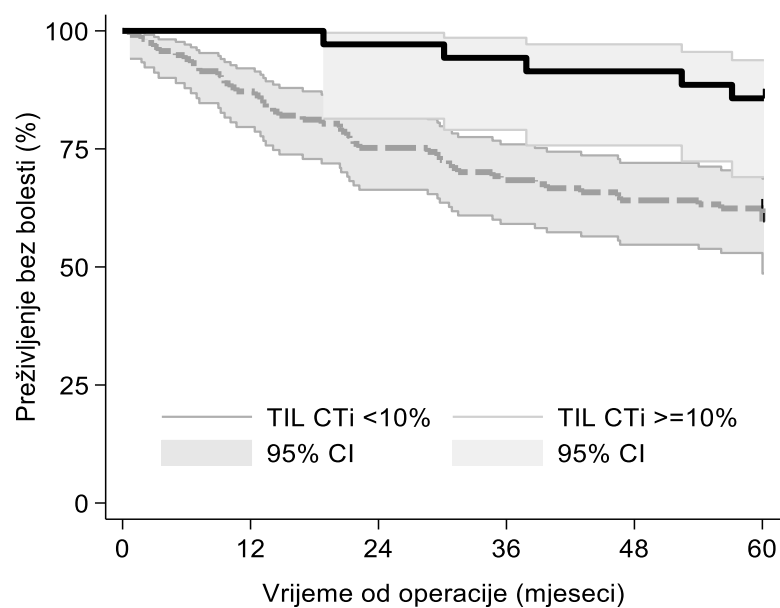


Broj u riziku (povrat ili smrt)	TIL CTs <10%					TIL CTs ≥10%					
	79	(13)	66	(10)	56	(3)	53	(4)	49	(2)	32
	73	(2)	71	(5)	66	(6)	60	(2)	58	(2)	41

**Slika 27.** Kaplan-Meierova krivulja trajanja preživljenja bez povrata bolesti ili smrti u mjesecima od datuma operacije prema prisutnosti stromalnih TIL u CT (TIL CTs)  $\geq 10\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*) (n=152)

### 5.9.3. iTIL CT

Medijan preživljenja nije ostvaren niti u jednoj skupini oblikovanoj prema prisutnosti iTIL CT. Aritmetička sredina (95% CI) preživljenja bez bolesti iznosila je 45 (41-49) mjeseci u bolesnica s prisutnošću iTIL CT <10% te 57 (54-60) mjeseci u bolesnica s prisutnošću iTIL CT  $\geq$ 10%. U bivarijabilnoj analizi omjer hazarda između te dvije skupine bolesnica iznosio je HR=0,30 (95% CI 0,12-0,76); p=0,011; FDR<15% (*Slika 28*). I Log-rank testom utvrđena je statistički značajna razlika ( $X^2=7,24$ ; ss=1; p=0,007; FDR<15%). Bivarijabilna analiza originalne, numeričke raspodjele prisutnosti iTIL CT nije pokazala statistički značajnu razliku: HR=0,97; 95% CI 0,94-1,01); p=0,112; FDR>15%. Nakon prilagodbe za sociodemografske i kliničke čimbenike, razlika između bolesnica s prisutnošću iTIL CT <10% ili  $\geq$ 10% nije bila statistički značajna: HR=0,40 (95% CI 0,15-1,09); p=0,072; FDR>15%.



Broj u riziku (povrat ili smrt)

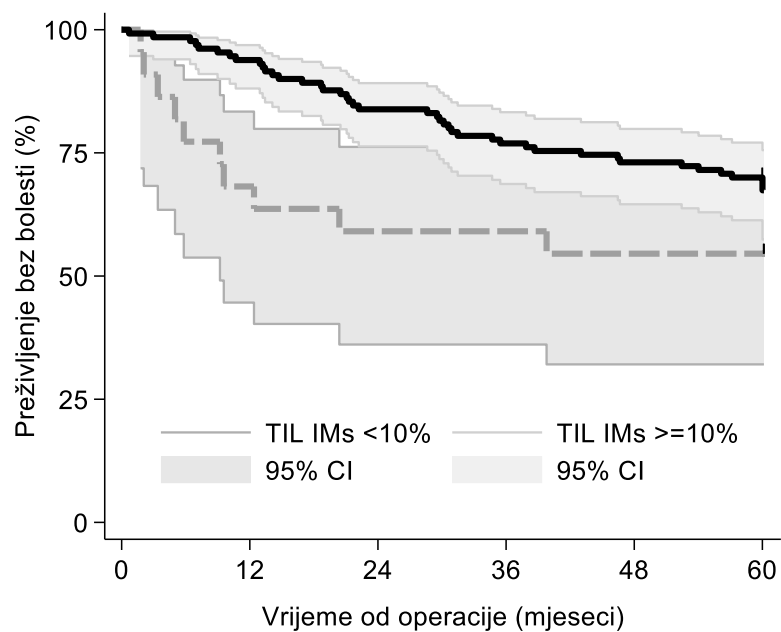
TIL CTi <10%	117	(15)	102	(14)	88	(8)	80	(5)	75	(2)	49
TIL CTi >=10%	35	(0)	35	(1)	34	(1)	33	(1)	32	(2)	24

**Slika 28.** Kaplan-Meierova krivulja trajanja preživljenja bez povrata bolesti ili smrti u mjesecima od datuma operacije prema prisutnosti intratumorskih TIL u CT (TIL CTi)  $\geq 10\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*) (n=152)



#### 5.9.4. sTIL IM

U bivarijabilnoj analizi originalna, numerička mjera prisutnosti sTIL IM bila je statistički značajno povezana s nižim hazardom za povrat bolesti ili smrt: HR=0,98 (95% CI 0,96-0,99); p=0,003; FDR<15%. Dakle, svaki postotak više prisutnih sTIL IM za približno 2% je smanjivao hazard. Log-rank test nije pokazao statistički značajnu razliku između bolesnica s prisutnošću sTIL IM<10% i onih s izraženošću  $\geq 10\%$  ( $X^2=3,63$ ; ss=1; p=0,057; FDR>15%) (Slika 29). Ta razlika između kategoriziranih prisutnosti sTIL IM nije bila statistički značajna ni nakon prilagodbe za sve moguće zbunjujuće čimbenike: HR=0,58 (95% CI 0,25-1,31); p=0,189; FDR>15%. Međutim, i nakon prilagodbe za ostale sociodemografske i kliničke čimbenike, originalna, numerička mjera prisutnosti sTIL IM bila je statistički značajno povezana s hazardom za povrat bolesti ili smrt: HR=0,98 (95% CI 0,96-1,00); p=0,034; FDR<15%. Medijan preživljenja nije ostvaren niti u jednoj od dvije skupine oblikovane prema prisutnosti sTIL IM <10% ili  $\geq 10\%$ , a aritmetička sredina (95% CI) preživljenja bila je 38 (27-48) mjeseci u bolesnica s <10% prisutnosti, odnosno 50 (47-53) mjeseci u bolesnica s  $\geq 10\%$  prisutnosti sTIL IM.



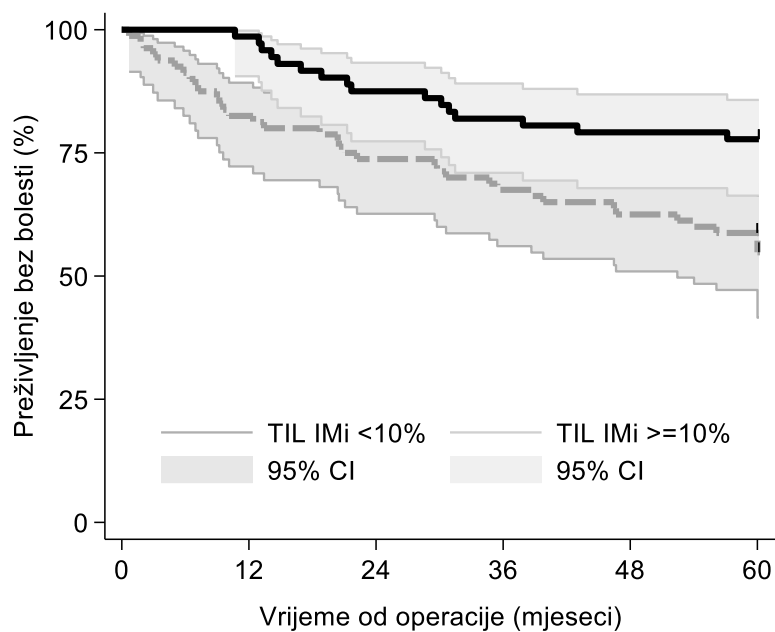
Broj u riziku (povrat ili smrt)

TIL IMs <10%	22	(7)	15	(2)	13	(0)	13	(1)	12	(0)	10
TIL IMs ≥10%	130	(8)	122	(13)	109	(9)	100	(5)	95	(4)	63

**Slika 29.** Kaplan-Meierova krivulja trajanja preživljenja bez povrata bolesti ili smrti u mjesecima od datuma operacije prema prisutnosti stromalnih TIL u IM (TIL IMs)  $\geq 10\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*) (n=152)

### 5.9.5. iTIL IM

Medijan preživljenja nije ostvaren niti u jednoj skupini oblikovanoj prema prisutnosti iTIL IM. Aritmetička sredina (95% CI) preživljenja bez bolesti iznosila je 44 (39-49) mjeseca u bolesnica s prisutnošću iTIL IM <10% te 52 (49-56) mjeseca u bolesnica s prisutnošću iTIL IM  $\geq$ 10%. U bivarijabilnoj analizi Log-rank testom utvrđena je statistički značajna razlika u preživljenju bez bolesti između te dvije skupine bolesnica ( $X^2=7,46$ ;  $ss=1$ ;  $p=0,006$ ;  $FDR<15\%$ ) (Slika 30). Bivarijabilna analiza originalne, numeričke raspodjele prisutnosti iTIL IM nije pokazala statistički značajan učinak:  $HR=0,97$ ; 95% CI 0,94-1,01);  $p=0,062$ ;  $FDR>15\%$ . Nakon prilagodbe za sociodemografske i kliničke čimbenike, razlika između bolesnica s prisutnošću iTIL IM <10% ili  $\geq$ 10% nije bila statistički značajna:  $HR=0,58$  (95% CI 0,27-1,25);  $p=0,264$ ;  $FDR>15\%$ . Ni učinak originalne, numeričke mjere prisutnosti iTIL IM nije bio statistički značajno povezan s preživljenjem bez povrata bolesti, nakon prilagodbe za moguće zbunjujuće varijable:  $HR=0,99$  (95% CI 0,96-1,01);  $p=0,317$ ;  $FDR>15\%$ .



Broj u riziku (povrat ili smrt)

TIL IMi <10%	80	(14)	66	(7)	59	(5)	54	(4)	50	(3)	31
TIL IMi >=10%	72	(1)	71	(8)	63	(4)	59	(2)	57	(1)	42

**Slika 30.** Kaplan-Meierova krivulja trajanja preživljenja bez povrata bolesti ili smrti u mjesecima od datuma operacije prema prisutnosti intratumorskih TIL u IM (TIL IMi)  $\geq 10\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*) (n=152)

### 5.9.6. Analiza prema broju odjeljaka s TIL $\geq 10\%$

Nakon prilagodbe za ostale sociodemografske i kliničke čimbenike, bolesnice sa sva četiri mjerena odjeljka TIL  $\geq 10\%$  imale su statistički značajno manji hazard za povrat bolesti ili smrt, odnosno bolje preživljenje bez bolesti nego bolesnice s TIL  $< 10\%$ : HR=0,24 (95% CI 0,07-0,90); p=0,034; FDR $< 15\%$ . (Tablica 29). Medijan preživljenja nije dosegnut. Aritmetička sredina (95% CI) preživljenja bez bolesti iznosila je 38 (27-48) mjeseci za bolesnice sa sva četiri odjeljka TIL  $< 10\%$ , 48 (42-54) za bolesnice s jednim odjeljkom TIL  $\geq 10\%$ , 39 (32-47) za bolesnice s dva, 54 (49-59) za bolesnice s tri i 57 (54-60) mjeseci za bolesnice sa sva četiri odjeljka TIL  $\geq 10\%$ .

**Tablica 29.** Hazard za povrat bolesti ili smrt tijekom petogodišnjeg praćenja, prema broju odjeljaka s TIL  $\geq 10\%$  (n=152)

	HR (95% CI)	p
Broj odjeljaka s TIL $\geq 10\%$		
0	1	
1	0,58 (0,22-1,49)	0,254
2	0,93 (0,36-2,37)	0,873
3	0,41 (0,12-1,46)	0,170
4	0,24 (0,07-0,90)	0,034

Prilagođeno za:

dob, menopauzalni status,  
komorbiditete\*, PHD, veličinu  
tumora, broj pozitivnih limfnih  
čvorova, stadij, gradus, Ki-67,  
vrstu operacije i adjuvantnu  
kemoterapiju†

Kratice: HR = omjer hazarda za povrat bolesti ili smrt u odnosu na bolesnice s TIL  $< 10\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

### 5.9.7. Broj odjeljaka s TIL $\geq 10\%$ i androgeni receptori

Nakon što je u multivarijabilni Coxov model uz prilagodbu za sociodemografske i kliničke čimbenike, uz broj odjeljaka s TIL  $\geq 10\%$  dodana i izraženost AR  $\geq 1\%$ , i dalje je statistički značajna razlika u omjeru hazarda za povrat bolesti ili smrt u odnosu na bolesnice bez odjeljaka s TIL  $\geq 10\%$  postojala kod bolesnica sa sva četiri odjeljaka s TIL  $\geq 10\%$  (Tablica 30). Izraženost AR nije bila statistički značajno povezana s preživljenjem bez bolesti. Jednako tako, s preživljenjem bez bolesti nije bila statistički značajno povezana ni interakcija izraženosti AR  $\geq 1\%$  i broja odjeljaka s TIL  $\geq 10\%$ .

**Tablica 30.** Hazard za povrat bolesti ili smrt tijekom petogodišnjeg praćenja, prema broju odjeljaka s TIL  $\geq 10\%$  i AR  $\geq 1\%$  (n=152)

	HR (95% CI)	p
Broj odjeljaka s TIL $\geq 10\%$		
0	1	
1	0,61 (0,23-1,56)	0,300
2	0,94 (0,36-2,45)	0,901
3	0,44 (0,12-1,56)	0,203
4	0,26 (0,07-0,98)	0,046
AR $\geq 1\%$	1,04 (0,49-2,21)	0,921
Prilagođeno za: dob, menopauzalni status, komorbiditete*, PHD, veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova, stadij, gradus, Ki-67, vrstu operacije i adjuvantnu kemoterapiju†		

Kratice: HR = omjer hazarda za povrat bolesti ili smrt u odnosu na bolesnice s TIL  $< 10\%$ ; CI = interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*); p = statistička značajnost izračunata multivarijabilnom, binarnom logističkom regresijom

\* Podaci koji su nedostajali za 6 (3,9%) bolesnica, nadomješteni su kao da te bolesnice nisu imale komorbiditete

† Podaci koji su nedostajali za 4 (2,6%) bolesnica, nadomješteni su kao te bolesnice nisu liječene adjuvantnom kemoterapijom

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Karakteristike TNRD, liječenje i preživljenje

U ovom radu analizirana je kohorta od 152 bolesnice, u rasponu dobi od 26 do 85 godina, koje su dijagnosticirane i liječene prvi put u životu od ranog TNRD u Klinici za tumore KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu, u razdoblju od 1. siječnja 2009. do 31. prosinca 2012. godine. S medijanom dobi od 58 godina ova kohorta bolesnica usporediva je s kohortama u nekoliko sličnih analiza bolesnica s ranim TNRD u posljednjih nekoliko godina, u susjednoj geografskoj oblasti (Slovenija, Italija), ali i drugim dijelovima Svijeta (Kanada, Novi Zeland, Brazil). (56,166-170) Desetak godina mlađe bolesnice bile su u analizama iz Indije, Kuvajta i Turske, što je u skladu s poznatom sociodemografskom činjenicom da su bolesnice s TNRD iz tih dijelova Svijeta uglavnom mlađe dobi, u odnosu na ostale geografske oblasti. (171-173) U skladu s tim, slična je i zastupljenost postmenopauzalnih bolesnica, cca 60% u našoj i sličnim analizama. (166,168,170) Unatoč nedostatku dijela podataka o obiteljskoj predispoziciji, u oko šestine analiziranih (16,5%) bolesnica opažena je pozitivna obiteljska anamneza za rak dojke i te su bolesnice bile čak 15 – ak godina mlađe u odnosu na bolesnice bez opterećene obiteljske anamneze, što je u skladu s očekivanim za populaciju bolesnica s nasljednom sklonošću. (5) Najzastupljeniji histološki podtip TNRD bio je duktalni invazivni karcinom, ili NOS, dok je primjetna i zastupljenost medularnog karcinoma, kojeg je, iako spada u rijetke specijalne histološke podtipove raka dojke, za očekivati najviše među TNRD. (166-168,188) U našoj kohorti definicija TNRD podrazumijevala je, osim negativnog nalaza HER2 (bilo IHC ili ISH), IHC negativne ER i PR prema vrijedećim preporukama ASCO/CAP, što je <1%

izraženosti. (26) Isti obrazac korišten je u nekoliko usporednih analiza novijeg datuma (168), a razlikuje se od sličnih analiza u kojima je za graničnu vrijednost uzeta IHC izraženost ER/PR od 10% i tzv. *borderline* tumori (1-9% IHC ER/PR) ulazili su u analizu kao TNRD. (56,166,167,174) Navedeno treba uzeti u obzir prilikom interpretacije dobivenih rezultata, kao moguće objašnjenje uočenih razlika u uspoređivanim kohortama. (26,175) Kao i u sličnim analizama, naše bolesnice s ranim TNRD najčešće su pri dijagnozi bile u stadiju II bolesti, najčešće tumora većeg od 2 cm i u čak gotovo 40% njih s pozitivnim limfnim čvorovima već pri dijagnozi, što se slaže s poznatim činjenicama o TNRD kao najagresivnijem i rapidno progredirajućem tumoru, koji vrlo rano i uz male primarne tumore daje rasadnice u limfne čvorove (47,52-54,169,170,176). Navedeno je relativizirano u studiji američkih autora, koji su pokazali najmanju povezanost trostruko negativnog fenotipa s pozitivnim limfnim čvorovima, međutim ovaj uočeni fenomen nije jasno objašnjen. (177) Gotovo petina (17.8%) bolesnica imalo je zahvaćene limfne čvorove stadija N2 ili N3, što su po definiciji inicijalno granično ili jasno neoperabilne bolesti, odnosno opisuju lokalno uznapredovali stadij bolesti (LABC) i impliciraju potrebu primarnog sustavnog liječenja (neoadjuvantnog pristupa). (20) Ipak, bolesnice u ovoj kohorti, iz razdoblja 2009. do 2012., bile su liječene isključivo primarno operativnim zahvatom te potom adjuvantnom sustavnom terapijom i zračenjem, bez primjene neoadjuvantnog pristupa unatoč dijagnozi LABC, što govori o evoluciji skrbi za bolesnice od vremena liječenja ove kohorte do danas, kada se zna da one imaju jasnu indikaciju za neoadjuvantno liječenje. (11,12,15,54) Bolesnice u našoj kohorti, očekivano i srodno opaženom u drugim sličnim analizama (166-171,176) imale su visoki gradus tumora i značajno visok proliferacijski indeks Ki-67, što također potvrđuje agresivniju prirodu TNRD u odnosu na druge podtipove raka dojke. (15) Za razliku od preko 80%



mastektomija zabilježenih u sličnoj kineskoj analizi, u ovoj kohorti bolesnica u preko 60% slučajeva učinjen je poštedni operativni zahvat. (174) Iako je i u nekim usporedivim analizama postotak primjene poštednih operativnih zahvata bio sličan, odnosno nešto manji, ali ipak značajan, vidljiva je razlika među kohortama u uznapredovalosti bolesti pri dijagnozi (značajno više LABC u našoj kohorti), čime i indiciranosti poštednog operativnog zahvata. (168,170) Ukoliko se uzme u obzir prethodno istaknuta činjenica o nekorištenju neoadjuvantnog pristupa u liječenju, a značajan broj lokalno uznapredovalog stadija bolesti pri dijagnozi u našoj kohorti bolesnica, to svakako nije odraz kritičnosti, iz današnje perspektive, međutim, jest odraz standarda skrbi u analiziranom razdoblju. Kemoterapija je najčešće bila temeljena na antraciklinima i taksanima, koji su i do danas ostali standardni odabir za sustavno liječenje agresivnijih podtipova raka dojke. (11,15) Bolesnice u analiziranoj kohorti praćene su u medijanu (IKR) 65 (20 do 84) mjeseci. Najduže trajanje praćenja iznosilo je 120 mjeseci. Analize su učinjene za razdoblje petogodišnjeg praćenja. Ukupno petogodišnje preživljenje u analiziranoj kohorti bolesnica iznosilo je 73.7%, što je izrazito slično preživljenju zabilježenom u analizi slovenskih, talijanskih i novozelandskih autora, osjetno manje od petogodišnjeg preživljenja (88.51%) u analiziranoj kohorti kineskih bolesnica, ali znatno bolje od indijske kohorte bolesnica, analizirane u vrlo sličnom razdoblju, sa zabilježenim trogodišnjim OS od 65.6% te analizi brazilskih autora s OS u TNRD od 62%. (166,168-171,174) Slični rezultati preživljenja naše kohorte bolesnica s onima slovenskih i talijanskih autora mogu se tumačiti i vrlo sličnim karakteristikama analiziranih bolesnica, koje pripadaju sličnom geografskom području te načinom primjenjenog liječenja (slična primjena operativnog liječenja, zračenja i kemoterapije). Isto tako, čini se kako se razlog za bolji OS bolesnica u kineskoj studiji možda može tumačiti i činjenicom da su te

bolesnice imale manje uznapredovalu bolest (>70% stadija I i II), a radikalnije su liječene (>80% mastektomija). Indijska kohorta bolesnica, promatrana u istom razdoblju kao i naša, zabilježila je veliki primarni tumor u značajnog broja bolesnica (88.8% bolesnica s tumorom >2cm) i gotovo 60% slučajeva pozitivnih limfnih čvorova. Samo malo manje brojke su zabilježene i u brazilskoj studiji, što vjerojatno objašnjava i navedene lošije ishode. (169) Povrat bolesti ili smrt, u promatranom petogodišnjem razdoblju, doživjelo je 32.9% bolesnica, slično slovenskoj (31.8%), kao i talijanskoj kohorti bolesnica s nešto kraćim razdobljem praćenja (33.3% nakon 4.3 godine praćenja).(166,168) Dakle, medijan preživljenja od operativnog zahvata do povrata bolesti ili smrti nije dosegnut, odnosno nakon petogodišnjeg razdoblja praćenja, živih i bez bolesti bilo je 67.1% u našoj promatranoj kohorti bolesnica. Povrat bolesti najčešće je zabilježen u prvoj (38,9%) i drugoj (36,1%) godini od dijagnoze. U 70% slučajeva povrata bolesti isti je bio lokalni, dok je u 30% bolesnica zabilježen udaljeni povrat bolesti, najčešće u pluća, kosti, limfne čvorove i jetru, što gotovo u cijelosti odgovara rezultatima zabilježenim u sličnim analizama susjednih geografskih područja, ali i udaljenih regija, a u skladu je s poznatim obrascem ponašanja TNRD. (56,166,168,170,171,173,174,178) Očekivano, najznačajniji prognostički čimbenici preživljenja bili su dobro poznati, klasični čimbenici, poput dobi bolesnica, veličine tumora i pozitivnih limfnih čvorova, odnosno stadija bolesti. (11,30,31) Kao i u ostalim navedenim analizama, što su bolesnice imale veći tumor i više zahvaćenih limfnih čvorova, odnosno uznapredovaliji stadij bolesti, imale su lošiju prognozu.(166-168,170-174) Također, postmenopauzalne bolesnice imale su manji rizik povrata bolesti i smrti. Za razliku od naših rezultata, gdje su mlađe bolesnice imale veći rizik povrata bolesti i smrti, što je u skladu s poznatim činjenicama o većoj agresivnosti bolesti u mlađoj dobi i vjerojatno različitoj suštinskoj biologiji od bolesti u starijoj

populaciji, u slovenskoj analizi starije su bolesnice bile većeg rizika, što je objašnjeno i činjenicom da je puno manji postotak starijih bolesnica liječen adjuvantnom kemoterapijom. (166) Proliferacijski indeks Ki-67 proporcionalno je podizao rizik povrata bolesti i smrti, što još jednom neizravno ukazuje i na opisani paradoks trostruko negativnog raka (55), gdje je agresivniji tumor, u značajnijem stupnju visoke proliferacije stanica, očekivano kemosenzitivniji, međutim, zbog izrazito velikog postotka lokalnih, a osobito udaljenih povrata bolesti, ipak ima lošije preživljenje. Zabilježeno preživljenje po stadijima bolesti pri dijagnozi, 85,3% u stadiju I, 80,9% u stadiju II te 37,9% u stadiju III, u skladu je s preživljenjem po stadijima zabilježenim u sličnim kohortama bolesnica. (166-168,170,174) Očekivano lošije preživljenje bolesnica s TNRD, osobito u lokalno uznapredovalom stadiju bolesti (stadij III), u odnosu na druge podtipove raka dojke, opaženo i u ovoj kohorti (petogodišnje preživljenje stadija III bolesti 37,9% u odnosu na 85,3% u I te 80,9% u stadiju II), uzimajući u obzir sve čimbenike, od kliničkih, sociodemografskih i patohistoloških, do terapijskih, još jednom potvrđuje ranije istaknutu potrebu za pronalaženjem rješenja za ovu skupinu bolesnica, koje nadilazi trenutne terapijske standarde, u smislu prilagodbe operativnog liječenja i izbora kemoterapije. Jedan od definitivno obećavajućih načina je i potraga za novim terapijskim ciljevima, odnosno biobiljezima koji bi usmjeravali terapijsku odluku, kao što su to androgeni receptori u LAR podtipu TNRD, koji ukazuju na moguću primjenu antihormonske terapije, i prisutnost infiltrata imunskih stanica, koji signalizira budnost i mogućnost terapijskog eksploatiranja imunskog sustava.

## 6.2. Androgeni receptori

Iako se AR smatraju najčešće izraženim receptorima među raznim podtipovima BC, s udjelom čak i do 90% u nekim studijama, preko 80% u indolentnijim i čak blizu 50% u visokogradusnim tumorima, situacija s TNRD nešto je drugačija. (84,179,180) Očekivana prisutnost AR u TNRD uglavnom je na račun LAR podtipa, iako AR mogu biti prisutni i u drugim molekularnim podtipovima TNRD. (181) Udio u studijama zabilježenih AR pozitivnih TNRD uglavnom ne prelazi trećinu. (85,94,98,104,182-190) U našoj analiziranoj kohorti bolesnica, pozitivni AR definirani kao AR izraženi u  $\geq 1\%$  zabilježeni su u ukupno 47, odnosno 31.1% bolesnica. Sličan postotak AR u TNRD zabilježen je u najvećem broju komparabilnih analiza i u skladu je s tom očekivanom izraženošću AR u neselekcioniranoj populaciji TNRD. (86,98,185) Ipak, izraženost AR u TNRD bilježi veliku varijabilnost kroz niz studija (zabilježen je raspon od čak 6 do 75%). (84,85,89,94,99,104,185,190-193) Ta heterogenost objašnjava se različitom veličinom uzorka u pojedinim analizama, kao i razlikom u postavljenoj graničnoj vrijednosti koja definira pozitivnu izraženost AR (1 vs 10%), a vrlo je vjerojatan razlog i u različitoj zastupljenosti pojedinih histoloških podtipova (s većom ili manjom vjerojatnošću pozitivnih AR) u različitim analiziranim kohortama. (86,109) Od ukupno 47 bolesnica s pozitivnim AR, samo je sedam bolesnica (15%) imalo AR izraženost u rangi 1 – 10%. U preostalih 40 bolesnica s pozitivnim AR postotak izraženosti bio je iznad 10%, a čak gotovo 60% njih imale su AR >50%. To specifično grupiranje u većem intenzitetu izraženosti AR opaženo je i u studiji Carmele Ricciardelli i suradnika, koji su analizirali izraženost AR u raku dojke i zaključili kako postavljanje granične vrijednosti prema uvriježenoj ideji ekstrapolacije prema ER/PR na 10%, odnosno 1%, nije bilo od

prognostičkog značaja, nego je ROC analiza pokazala da je postavljanje granice na puno višu razinu (78%) intenziteta izraženosti AR bilo optimalno za njihovu prediktivnu i prognostičku vrijednost! (194) Slično su pokazale i druge studije u neselekcioniranoj populaciji bolesnica s rakom dojke, postavljanjem granice za AR najčešće na razinu izračunatog medijana. (195,196) Iako su navedene studije opisani fenomen i pravilnost pokazale u neselekcioniranoj populaciji bolesnica s rakom dojke, a rezultati su bili pouzdaniji u podskupini s ER pozitivnim tumorima, činjenica da smo i mi u svojoj analizi izolirane populacije samo TNRD bolesnica uočili slično, iako na malenom broju bolesnica i stoga bez statističke značajnosti, bilo bi svakako od velike kliničke vrijednosti provjeriti opisano u velikoj prospektivnoj analizi, na ciljanoj populaciji. S obzirom da je velika većina uzoraka u našoj kohorti bila invazivni duktalni karcinom dojke, odnosno NOS (od eng. *Not Other Specified*), s vrlo malim udjelom specijalnih histoloških podtipova (osim medularnog, tek četiri apokrina tumora i jedan lobularni), nije bilo moguće prepoznati očekivano veću zastupljenost AR u pojedinim specijalnim histološkim podtipovima, poput apokrinog. (179,197,198,199) Neočekivano, među 14 medularnih karcinoma, histologije za koju je poznato da je uglavnom AR negativna (zajedno uz mucinozne i metaplastične karcinome dojke), u čak tri uzorka bili su pozitivni AR (izraženost 15% i 30%), no brojka je i dalje premala i nije statistički značajna za zaključivanje. Praktična važnost povezivanja pojedinog histološkog podtipa TNRD i izraženosti AR jest u tome što AR prisutni u različitim histologijama (osobito apokrine vs. neapokrine vrste stanica), prema nekim izvješćima, imaju različitu vrijednost kao terapijske mete, stoga bi bilo od potencijalne kliničke koristi određivati AR osobito u pojedinim opisanim histološkim podtipovima TNRD. (86) Osim histoloških specifičnosti, izraženost AR u studijama se vezivala i uz neke od molekularnih biljega

TNRD. Tako je jedna studija pokazala da se koreliranjem izraženosti AR i EGFR u TNRD može definirati prognostički model, od tri međusobno jasno različite skupine tumora: niskorizični AR pozitivni, EGFR negativni (najrjeđi, vjerojatno nebazalni – LAR tip), zatim intermedijarni podtip, koji čine AR-/EGFR- ili AR+/EGFR+ tumori te prognostički najlošiji AR-EGFR+, koji su zapravo bazalni podtip TNRD, s visokim proliferacijskim indeksom, češćim povratom bolesti i lošijim rezultatima preživljenja. (101,200) Također, pokazana je češća povezanost AR izraženosti s PIK3CA mutacijom u TNRD, u odnosu na divlji tip. (195) Maeda i suradnici su pokazali da AR gotovo nikad nisu zajednički izraženi s CK5/6, biljekom bazaloidnog podtipa TNRD, koji se povezuje s povratom bolesti, a time i lošijom prognozom, a Tang i suradnici pokazali su usporedbom izraženosti AR i E – cadherina u TNRD da je upravo profil izraženosti AR pozitivni/ E cadherin negativni podložan povratu bolesti i udaljenim rasadnicama. (188,201) Kao i u nekoliko komparabilnih analiza AR u TNRD, i u našoj kohorti bolesnica izraženost AR bila je povezana s dobi. (86,92,193,195) Nasuprot tome, dob nije značajnije korelirala s izraženošću AR u sličnoj analizi hrvatskih kolega, kao niti u analizama TNRD američkih i talijanskih autora, ali i neselekcionirane populacije bolesnica s rakom dojke u analizi korejskih autora. (85,98,185,202) Izraženost AR pozitivno je korelirala i s menopauzalnim statusom, što vjerojatno ide pod ruku s prethodno opisanom odnosom prema dobi, odnosno starenju, kao i u drugim komparabilnim analizama. (92,94,188) Slično opisuje i meta - analiza Wang i suradnika na preko 2800 bolesnica s TNRD, dok u vrlo sličnoj našoj, spomenutoj analizi talijanskih autora, nije utvrđena korelacija AR i menopauzalnog statusa. (202,203) U skladu s općim stavovima da su AR, kao steroidni receptori srodni ER i PR, biljeg indolentnijih tumora boljih karakteristika, poput manjih tumora, negativnih limfnih čvorova, nižeg gradusa, bez drugih prisutnih rizičnih

čimbenika, u našoj analizi statistički značajna negativna korelacija pokazala se u odnosu AR i veličine tumora te gradusa. Dakle, izraženost AR bila je češća među manjim tumorima, manjeg gradusa. Izraženost AR u našoj analizi nije se pokazala povezanom sa statusom limfnih čvorova. U odnosu na stadij bolesti, uočili smo da su AR više izraženi kod bolesnica s tumorom u stadiju I, nego u stadiju II. Slično, nepostojanje statistički značajne pozitivne korelacije izraženosti AR sa statusom limfnih čvorova i TNM stadijem pokazala je i korejska analiza na 413 primarnih karcinoma dojke, međutim, bez posebne analize za TNRD podskupinu. (85) Srodne rezultate onima dobivenim u našoj analizi pokazale su brojne komparabilne studije u kojima su pozitivni AR najčešće bili povezani s nižim gradusom i manjim tumorima, u skladu s teorijom o antiproliferativnim učincima, a nešto rjeđe s negativnim limfnim čvorovima i izostankom drugih rizičnih čimbenika, poput limfovaskularne invazije. (88,92,94,99, 186,187,201,204-207) Nasuprot tome, ranije spomenuta analiza 121 bolesnice s TNRD, među kojima su bile i bolesnice s ranim i metastatskim TNRD, nije pokazala statistički značajne povezanosti izraženosti AR s veličinom tumora i histološkim gradusom. (98) U analizi talijanskih autora, osim proliferacijskog indeksa Ki-67 i limfovaskularne invazije, nijedan od slijedećih: veličina tumora, gradus, status limfnih čvorova, nije statistički značajno korelirao s izraženošću AR. (202) Naposljetku, McGhan i suradnici pokazali su čak i veću učestalost pozitivnih limfnih čvorova i uznapredovalijeg stadija bolesti u bolesnica s AR pozitivnim TNRD, što, upravo suprotno od prethodno opisanih studija, ukazuje na agresivnije tumore i tim drugačijim rezultatom u odnosu na većinu ostalih analiza još jednom ukazuje na specifičnost AR pozitivnog podtipa TNRD kao entiteta. (193) Iako se generalno i unatoč nekonzistentnim rezultatima kroz studije, izraženost AR, kako je već navedeno, smatra biljegom boljih karakteristika tumora, među kojima i nižim proliferacijskim indeksom

Ki-67, i tako je u većini studija, kao i u našoj analizi, zabilježena negativna korelacija Ki-67 i AR, zanimljiva analiza 400 uzoraka raka dojke, koja je ponudila niz vrijednih spoznaja o AR u raku dojke i TNRD, zabilježila je najvišu vrijednost Ki-67 među četverostruko negativnim (ER-, PR-, HER2, AR-) i upravo TNRD AR+ podtipom, s medijanom vrijednosti Ki-67 od čak 54%. (86) Nadalje, neke studije nisu uopće pokazale statistički značajne povezanosti AR i proliferacijskog biljega Ki-67. (94) Opisanu nekonzistentnost u rezultatima, kao i kod drugih kliničko – patoloških parametara, teško je komentirati bez analize svih karakteristika tumora, odnosno, sve navedene studije u načelu su analizirale zastupljenost AR u imunohistokemijskim entitetima raka dojke, bez usporedbe, primjerice, različitih histoloških podtipova AR pozitivnog raka dojke, ili različitih molekularnih podtipova TNRD s izraženim AR. Međutim, većina AR pozitivnih TNRD u navedenoj analizi bili su umjereno do slabo diferencirani tumori, što govori u prilog da se AR, barem u apokrinim tumorima, mogu razviti i u primitivnim stanicama u brzom proliferaciji, za razliku od ER i PR za koje je, čini se, potrebna značajnija stanična diferencijacija. (86) S druge strane, neke studije su pokazale kako AR mogu imati i stimulativan, ali i antiproliferativan učinak, ovisno o kojoj populaciji stanica na koju djeluju se radi. Tako u tumorima s ER/PR pozitivnim staničnim linijama AR inhibiraju rast, a u ER/PR negativnih tumorima djeluju stimulacijom proliferacije. (93,208,209) Ipak, činjenica da su u većem broju studija pozitivni AR korelirali s nižim proliferacijskim indeksom Ki-67, u odnosu na AR negativne TNRD, koji su imali viši proliferacijski indeks, govori suprotno od navedene teorije. U našoj analizi nije utvrđena statistički značajna povezanost izraženosti AR s prognozom bolesnika. Izraženost AR nije se pokazala povezanom s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OS), kao niti s preživljenjem bez bolesti (DFS). Nije bilo razlike u preživljenju bez bolesti i ukupnom



preživljenju između bolesnica s izraženim AR, odnosno s  $AR \geq 1\%$ , u odnosu na bolesnice bez izraženih AR, a medijan preživljenja u petogodišnjem praćenju nije dosegnut niti za jednu promatranu skupinu bolesnica. Sveukupno, do danas, rezultati niza studija po tom pitanju su heterogeni i čak konfliktni. Brojne studije pokazale su povoljan prognostički utjecaj AR u TNRD, odnosno bolje preživljenje bez bolesti, preživljenje bez povrata bolesti, preživljenje bez udaljenih metastaza, ukupno preživljenje ili više od navedenih parametara istovremeno. (89,94,98,99,104,188,190,201,206,210) Pregledni tekst iz 2013. godine osvrnuo se na problem trenutnog znanja o AR u TNRD, činjenicu da se rezultati bazičnih i kliničkih studija razlikuju, odnosno da postoji jasna diskrepanca: dok bazične studije na staničnim linijama pokazuju kako androgeni povećavaju proliferaciju i stoga su i logični preliminarni rezultati poboljšanja prognoze AR pozitivnih TNRD djelovanjem antiandrogena, eksperimenti transfekcije staničnih linija i analize preživljenja pokazuju kako su AR zapravo uglavnom benigni, odnosno predviđaju bolje preživljenje i stoga autori naglašavaju potrebu daljih translacijskih istraživanja za rasvjetljenje ove nejasnoće. (104) Studija kineskih autora na gotovo 700 bolesnica s TNRD pokazala je povoljan prognostički utjecaj AR na DFS i trend prema poboljšanju OS, kao i smanjenu vjerojatnost povrata bolesti i metastaza u AR pozitivnih TNRD, u prvih pet godina. Dodatna snaga u ovim rezultatima je i činjenica da su podrazumijevali i bazaloidni podtip tumora. (206) S druge strane, međunarodna studija Gasparinija i kolega iz iste godine, koja je uključila 398 bolesnica s TNRD, pokazala je povoljan prognostički utjecaj AR isključivo na nebazaloidni podtip TNRD. (99) Iako su studije od ranije uglavnom ukazivale na to da AR imaju prognostički povoljan utjecaj u ER pozitivnim tumorima i svojevrsnu povezanost s HER2 izraženošću, a manje siguran prognostički utjecaj u TNRD, kineska studija na 137 bolesnica s TNRD pokazala je jasan

povoljan prognostički utjecaj AR upravo na TNRD, dok istovremeno AR nisu imali utjecaja na prognozu u skupini od 132 bolesnice s ne-TNRD. (94) Slično, studija GBG neoadjuvantno liječenih žena pokazala je sveukupno povoljan prognostički utjecaj AR na DFS i OS, ali posve na račun uloge AR u TNRD, dok u drugim podtipovima raka dojke nije bilo tako. Kod nepostizanja pCR, bolesnice s pozitivnim AR imale su bolje preživljenje. S druge strane, bolesnice s negativnim AR imale su veću šansu postizanja pCR. (190) U kombiniranoj retrospektivnoj studiji i meta - analizi kineskih autora iz 2013. godine, AR su pokazali povoljan prognostički utjecaj na DFS i u ER pozitivnih, ER negativnih i trostruko negativnih karcinoma, s trendom boljeg OS samo u ER pozitivnih bolesnica, a dobivene rezultate objašnjavaju vjerojatno i premalim uzorcima u podgrupnim analizama svoje analizirane kohorte, kao i velikom heterogenošću studija koje su ušle u meta – analizu. (89) Retrospektivna analiza iz 2012. godine na 287 bolesnica s TNRD pokazala je povoljan prognostički utjecaj na DFS, dok se povoljan utjecaj na OS nije potvrdio u multivarijabilnoj analizi. (210) Maeda i suradnici u zanimljivoj analizi iz 2016. godine pokazali su na uzorku od pedesetak bolesnica s TNRD kako su AR povoljan prognostički pokazatelj u CK5/6 negativnih tumora, ali akumulacija p53 narušavala je taj povoljan utjecaj. (201) U studiji američkih autora na uzorku od 121 bolesnice s TNRD, pokazalo se da izostanak AR izraženosti vjerojatno predstavlja veći rizik za razvoj udaljenih rasadnica i da su AR prognostički povoljni u TNRD. (98) Nasuprot tome, jedna analiza na 127 bolesnica s TNRD, koja je usporedila izraženost AR i E – cadherina, pokazala je kako su AR pozitivni, E – cadherin negativni TNRD upravo podložni povratu bolesti i metastaziranju, no ipak, u usporedbi s AR pozitivnim, bolesnice s AR negativnim TNRD imale su lošije preživljenje. (188) S druge strane, nije mali broj ni onih studija koje su pokazale negativan prognostički utjecaj AR u TNRD, odnosno

raniju deterioraciju, brži povrat bolesti i pojavu udaljenih rasadnica, odnosno lošije preživljenje bez bolesti i sveukupno preživljenje u bolesnica s AR pozitivnim TNRD, u odnosu na AR negativne TNRD. (92,192,193,199) Na kraju, postoji i niz analiza, koje, poput naše, nisu pokazale statistički značajnu povezanost izraženosti AR u TNRD s prognozom, odnosno preživljenjem bez bolesti, rasadnica ili ukupnim preživljenjem. (93,101,185,189,195,202,207) Ova heterogenost u rezultatima vjerojatno se za početak može objasniti istim razlozima koji su navedeni kao mogući uzrok heterogenosti rezultata u analizama povezanosti AR i različitih kliničko-patoloških karakteristika bolesnica i tumora. Među njima su, od poznatih čimbenika, različite veličine analiziranih uzoraka, dobna i druge heterogenosti kohorti, različite granične vrijednosti AR za definiciju AR pozitivnosti, različita protutijela korištena u IHC analizi, a vjerojatno je još i više onih čimbenika koji nisu do kraja razjašnjeni ili im se utjecaj tek prepoznaje, kao i čimbenici koji nisu u svakoj analizi uzeti u obzir, poput različitih histologija tumora ili različitih molekularnih podtipova TNRD. Kako je spomenuto ranije, zna se da je u apokrinih tumora puno češća AR pozitivnost, kao i da su AR u tim tumorima od vjerojatno drugačijeg prediktivnog i prognostičkog značaja, nego u ostalim histologijama, što nije zanemariv podatak prilikom usporedbe rezultata različitih analiza. (197) Preciznije, zna se da su molekularni apokrini TNRD poseban podtip, i genske studije su pokazale kako imaju paradoksalnu izraženost gena tipičnih za ER pozitivne karcinome dojke, posljedično upravo AR vođenoj transkripciji ER signalnog puta, a istovremeno, to su tumori s lošijom prognozom, što svakako može poništavati povoljne učinke AR u ovim tumorima i time značajno utjecati na krajnje rezultate u analizama utjecaja AR na preživljenje u TNRD. (211) Isto tako, već je opisano kako se AR pozitivnost različito povezuje s drugim molekularnim karakteristikama TNRD i da u kombinaciji s nekima

čini i prognostički posve različite skupine tumora, poput već opisanih prognostički dobrih AR+ EGFR- TNRD, odnosno prognostički loših AR- EGFR+ bazaloidnih TNRD. (101) Svakako, iako se zna da AR mogu biti izraženi u različitim molekularnim podtipovima TNRD, zasigurno nemaju istu magnitudu učinka u svima. (181) Nadalje, jasno je i da su analize koje su koristile graničnu vrijednost za pozitivnost AR od 10% različite od studija u kojima je granična vrijednost za AR 1% i da je usporedivost takvih kohorti samo djelomično moguća, odnosno bila bi moguća uz prilagodbu po podskupinama, što često nije moguće napraviti. Danas znamo da su analize s graničnom vrijednošću za AR od 1% takve da omogućuju uključanje većeg broja bolesnika, za razliku od onih s graničnom vrijednošću od 10%, u kojih svi borderline tumori, s izraženošću od 1 do 9% otpadaju iz analize AR pozitivnih (po uzoru na ER/PR pozitivne tumore), odnosno smatraju se srodnima trostruko negativnim tumorima, bez dobiti antihormonske terapije. S druge strane, činjenica da se već s 1% tumor smatra AR pozitivnim, vjerojatno omogućuje u analizu uključiti i agresivnije tumore, koji mogu utjecati negativnim doprinosom na krajnje ishode u preživljenju, uzme li se u obzir činjenica da se tumori s takvim niskim steroidnim receptorima pokazuju agresivnijima od visoko hormonski osjetljivih tumora (ekstrapolirano iz ER/PR pozitivnih tumora). (175) Svi navedeni čimbenici doprinose heterogenosti rezultata prikupljenih kroz niz različitih studija i ograničavaju njihovu međusobnu usporedivost. Opisano dodatno relativiziraju i studije koje pokazuju kako niti predefiniranih 1 niti 10% nisu optimalne granične vrijednosti za evaluaciju prognostičke i prediktivne vrijednosti AR, nego je ona negdje daleko iznad, najčešće oko medijana izraženosti i da su AR pouzdano prognostički povoljni tek kada su visoko izraženi (čak oko 70%). (101,194-196) Na kraju, ne znamo pouzdano koliko i kako sa svime navedenim interferira primjena različitih modaliteta adjuvantnog liječenja, a svakako nije

nevažno spomenuti različita razdoblja praćenja u različitim analizama. U posljednjih nekoliko godina, nekoliko je kvalitetnih sustavnih pregleda i meta-analiza pokušalo sumirati brojne od opisanih rezultata i dati objektivan pogled na čvrstoću dokaza o utjecaju AR u TNRD, ponajviše upravo iz razloga potencijalne terapijske koristi od endokrine terapije antiandrogenima u TNRD. Uglavnom su bez jednoznačnog zaključka i ukazuju na potrebu daljih istraživanja, iako se neki od analiziranih rezultata mogu interpretirati povoljnima, u smislu prognostički povoljnog utjecaja AR u TNRD, dok su se uglavnom pokazali negativnim prediktivnim čimbenikom za učinak terapije. (109,203,212,213) Naposlijetku, recentno publicirana multiinstitucionalna studija prognostičke uloge AR u TNRD, na nekoliko međunarodnih kohorti bolesnica, pokazala je kako status AR pokazuje za pojedinu populaciju specifične obrasce ponašanja i utjecaja na preživljenje, kada se pritom kontrolira utjecaj drugih mogućih zbunjujućih varijabli, poput dobi, gradusa tumora i utjecaja kemoterapije, a rezultati se nisu mijenjali ni promjenom granične vrijednosti za AR pozitivnost u drugu arbitrarnu vrijednost od 10%, kao niti u drugu, optimalnu graničnu vrijednost. Autori su stoga zaključili kako AR nisu pouzdan prognostički biljeg u TNRD i kako su nužne detaljnije analize prema molekularnim podtipovima i usporedba kohorti prema tim elementima. (214) Ovaj fenomen nije se ranije posebno analizirao niti evaluirao u drugim studijama na ovaj način, no međupopulacijske razlike, ovdje vidljive na jednom mjestu, mogu se primjetiti i neizravno, usporedbom različitih rezultata među studijama koje su analizirale različite populacije. To je zasigurno isto tako jedno od objašnjenja heterogenosti rezultata, ukazujući snažnije na već spomenuti utjecaj nekih čimbenika samih bolesnica, ali i tumora, koje još uvijek tek postupno prepoznajemo.

### 6.3. Tumor – infiltrirajući limfociti

Niz studija koje su koristile različite metode evaluacije TIL pokazale su visoku korelaciju između rezultata dobivenih evaluacijom opsega imunosne infiltracije jednostavnom metodom HE, s metodama IHC i mRNA. (130,136-139,144) Unatoč poznatoj funkcionalnoj heterogenosti intratumorskog limfocitnog infiltrata, posljedično čemu je za očekivati i različit klinički značaj, nije uočena klinički relevantna dodatna vrijednost evaluacije TIL drugim metodama, mimo jednostavne HE, koja se u TNRD pokazala prediktivnom i prognostičkom, stoga je ona metoda izbora u danas vrijedećim preporukama za evaluaciju opsega TIL u TNRD, koja je korištena i u ovoj analizi. (130,136,137,141,153,216) Kako je spomenuto, HE metoda evaluacije TIL koristila se i u najvećem broju relevantnih studija, koje su iznjedrile danas poznate činjenice o ulozi TIL u raku dojke, poput najpoznatijih analiza velikih randomiziranih kliničkih istraživanja BIG 02-98, E2197 i E1199 te FINHER u adjuvantnom setingu i GeparDuo/GeparTrio i GeparQuinto u neoadjuvantnom setingu. (137,141,143,216,217) Za navedenu metodologiju, H.E. evaluaciju stromalnih TIL (sTIL), proveden je i projekt usklađivanja i standardiziranja metode među patolozima, koji je rezultirao visokom stopom podudarnosti u analizi. (218) S druge strane, niz je analiza koje su koristile i IHC metodu evaluacije različitih subpopulacija TIL, osobito CD3, CD8+, CD4+ i FOXP3+, također i u adjuvantnom i u neoadjuvantnom setingu, ali i tehniku mRNA, odnosno genske izraženosti, kao i kombinaciju metoda. (138,143,219-224) Ono što se kombinacijom H.E. i IHC te molekularnih metoda prepoznalo jest trend kvantitativne i kvalitativne razlike u TIL između normalnog tkiva dojke, u kojem je prisutan samo sporadičan, maleni broj leukocita, preko premalignih lezija i DCIS, u kojima je povećana

infiltracija limfocita, osobito u HER2 pozitivnim i trostruko negativnim, a dominantna skupina imunskih stanica su aktivirani T limfociti, s manje imunosupresivnih stanica, pa sve do invazivnih karcinoma, u kojima je sveukupno prevalencija TIL visoka, s varijacijama u opsegu i sastavu imunskog infiltrata, ovisno o molekularnom podtipu raka dojke, a s osobito visokim opsegom TIL infiltrata u ER negativnim, agresivnijim podtipovima, poput HER2 pozitivnog raka dojke i TNRD. (148) U našoj analizi, vodeći se navedenim preporukama, analizirali smo H.E. metodom TIL u četiri odjeljka, stromalne (sTIL) i intratumorske (iTIL), u centralnom tumoru (CT) i na invazivnoj margini (IM). Potom smo analizirali zbirno oba odjeljka sTIL (CT i IM) te oba odjeljka iTIL (CT i IM). (130,136) Analiza je provedena na postoperativnim cjelovitim uzorcima ranog TNRD, na jednom standardnom rezu, provodeći cjelovitu procjenu postotka upalnog infiltrata unutar čitavog opsega evaluiranog tumorskog tkiva, vrednujući isključivo mononuklearni upalni infiltrat. U većini ranije navedenih analiza najčešće su evaluirani sTIL i eventualno iTIL, s tim da se evaluacija stromalnog odjeljka pokazala lakše reproducibilnom kroz studije, dok su iTIL bili uglavnom manje prisutni, heterogeniji i teži za uočiti na H.E. preparatima, iako su se u neoadjuvantnom setingu s TNRD i iTIL pokazali prediktivnima za odgovor na NAT. (137,138,141, 155,216,217,225) Prema prvom konsenzusu, TIL na invazivnom rubu (margini, TIL IM) treba promatrati odvojeno samo unutar istraživanja, dok ih se u praksi ne treba odvajati od sTIL u CT, no novije preporuke jasno navode odvojenu evaluaciju CT i IM odjeljka. (130,136) Potrebu za sustavnom evaluacijom TIL na cijelom uzorku, u svim odjeljcima, podržava i činjenica kako je intenzitet i raspodjela TIL u raku dojke često heterogena. (226,227) Sveukupno, uključujući sve evaluirane odjeljke, sTIL i iTIL u CT i IM, prisutnost TIL u našoj analizi pokazala je obrazac sličan onome koji smo uočili u

raspodjeli AR, odnosno snažnu asimetričnu raspodjelu svih varijabli. To znači da je najveći broj bolesnica imao evidentirane prisutne TIL u barem nekom od evaluiranih odjeljaka, ali uglavnom u vrlo niskom postotku, što se prema vrijedećim preporukama arbitrarno kategorizira kao kategorija slabe zastupljenosti TIL (do 10%). Unatoč poznatoj činjenici da je LPBC (uglavnom definiran s TIL>50%) najčešće od svih podtipova raka dojke prisutan u TNRD, i smatra se da oko 20% TNRD imaju LPBC fenotip, u našoj kohorti uočili smo tek mali udio (4,6%) bolesnica sa zastupljenošću TIL >50%, i to uglavnom na račun sTIL na IM, kojih je i ukupno bilo najviše. (147,153,216,228) Niz je studija novijeg doba, koje su, s idejom kliničke vrijednosti imunosnog infiltrata, analizirale TIL. Takva je Denkertova retrospektivna analiza iz 2010., koja je dala temeljne naputke o načinu evaluacije TIL H.E. metodom, koja je danas jasno definirana preporukama, a analizirani su sTIL i iTIL, s TIL  $\geq$ 10% u oko trećine bolesnica, s LPBC u oko 10%, no bez detaljnije analize TNRD populacije. (143) Slično opisanim rezultatima pokazale su i ostale studije, pregledi i meta-analize studija TIL provedenih u proteklih nekoliko godina, u neselecioniranoj populaciji bolesnica s rakom dojke, ili u podskupini bolesnica s TNRD, bilo u adjuvantnom ili neoadjuvantnom setingu, koje su, prema preporukama većine patologa, najčešće analizirale sTIL i prikazivale ih kao kontinuiranu varijablu, s po 10% inkrementalne vrijednosti, a potom arbitrarno kategorizirajući, ili izdvajajući LPBC skupinu, što se i pokazalo smislenim za analizu povezanosti TIL s drugim varijablama i ishodima, odnosno odgovorom na liječenje i preživljenjem, na što je većina navedenih analiza i bila fokusirana. (137,141,142,149,154,160,215,216,229-239) Koliko nam je poznato, niti jedna od analiza nije zasebno evaluirala sTIL i iTIL u CT i na IM, kao što je to učinjeno u našoj analizi. Međusobnom usporedbom zastupljenosti TIL u pojedinim odjeljcima (sTIL i iTIL, u CT i na IM), kao i sTIL s iTIL,



u našoj analizi pokazali su se međusobno statistički značajno povezanima. Slično, međusobna povezanost sTIL i iTIL, kao i korelacija s ukupnim TIL uočena je i u većini prethodno navedenih analiza TIL, a u nekima se čak ukupni TIL ističu kao možda i pouzdaniji od sTIL, kojima se prema trenutno vrijedećim preporukama daje prednost. (130,136,143,144,216,232,240) Kako je prethodno istaknuto, u većini studija sTIL su bili značajnije prisutni i lakše evaluirani, dok su iTIL bili puno manje zastupljeni i stoga teže ocijenjeni i rjeđe prisutni u izvještaju. U većini studija koje su evaluirale i iTIL navodi se kako su dobro korelirali sa sTIL, a u analizi Adams i suradnika uz navedeno se ističe i kako su iTIL zapravo bili ovisni o sTIL, odnosno, svi uzorci s prisutnim iTIL imali su istovremeno u nekom opsegu prisutne i sTIL, dok obratno nije nužno bio slučaj. (137,233) Navedeno ide u prilog stajalištu kako su sTIL relevantniji za evaluaciju i ocjenu kliničke vrijednosti. Nakon evaluacije TIL u svim odjeljcima kao kontinuirane varijable, razmatrali smo povezanost TIL s ostalim varijablama, općenito, i na način da smo za graničnu vrijednost TIL odabrali granicu između slabe i intermedijarne kategorije, od 10%. Analizom povezanosti  $TIL \geq 10\%$  s ostalim sociodemografskim, kliničkim i patohistološkim varijablama, poput dobi i menopauzalnog statusa bolesnica, histološkog podtipa tumora, veličine tumora i statusa limfnih čvorova te stadija bolesti, gradusa tumora i proliferacijskog indeksa Ki-67, dobili smo da su sTIL u CT (prisutni u 48% uzoraka) statistički značajno povezani s dobi i posljedično menopauzalnim statusom te veličinom tumora, ali bez povezanosti s drugim varijablama, poput histološkog podtipa, statusa limfnih čvorova, gradusa tumora i proliferacijskog indeksa Ki-67. Za razliku od toga, iTIL u CT (prisutni u 23% uzoraka) pokazali su se statistički značajno povezanima s histološkim podtipom, odnosno duktalnim karcinomom (NOS), ali i negativno s dobi i menopauzalnim statusom, upravo suprotno od sTIL u ovom odjeljku (CT), a također bez

povezanosti s drugim karakteristikama tumora, poput veličine tumora, statusa limfnih čvorova, gradusa ili proliferacijskog indeksa. Stromalni TIL (sTIL) na invazivnoj margini (IM), prisutni u najvećeg broja bolesnica, i u najvećem postotku zastupljenosti (medijana 30%) pokazali su se statistički značajno povezanima s gradusom tumora i proliferacijskim indeksom Ki-67. Što je bio veći gradus tumora i viši Ki-67, to je bila vjerojatnija prisutnost sTIL na IM. Na kraju, i iTIL na IM bili su statistički značajno povezani s gradusom tumora i proliferacijskim indeksom Ki-67. Niti sTIL na IM, kao niti iTIL na IM nisu pokazali povezanosti s dobi bolesnica i menopauzalnim statusom. Srodno našim rezultatima, povezanost TIL evaluiranih HE metodom s određenim kliničkopatološkim varijablama uočena je u nizu analiza. U pivotalnoj Denkertovoj analizi iz 2010. godine, kao i u srodnu analizu iz 2015. godine, u multivarijatnu analizu utjecaja sTIL na odgovor na NAT uključene su i ostale varijable, poput dobi bolesnica, veličine i histologije tumora, gradusa, statusa steroidnih receptora (s obzirom na neselektivnost kohorte) i kliničkog statusa limfnih čvorova, no bez izvještaja o međusobnoj korelaciji navedenih parametara i TIL. (143,240) U analizi BIG 2-098 sTIL i iTIL bili su povezani s duktalnom histologijom, visokim histološkim gradusom, negativnim HR te visokom izraženošću Ki-67, a nije bilo statistički značajne povezanosti s dobi bolesnica, menopauzalnim statusom, veličinom tumora niti obuhvaćanjem limfnih čvorova, a slično, i u analizi FINHER, visoke razine sTIL bile su statistički značajno povezane s ER negativnošću, HER2 pozitivnošću, duktalnom histologijom, višim histološkim gradusom i višim Ki-67, većim tumorima, ali i s više involviranih limfnih čvorova. (141,216) Adams i suradnici na 481 bolesnici s ranim TNRD također su opazili tu povezanost većeg opsega limfocitnog infiltrata s većim brojem patoloških limfnih čvorova. Nije uočena povezanost TIL s veličinom tumora, kao niti osobinama bolesnica, poput dobi ili menopauzalnog statusa.

(137) S veličinom tumora, kao niti s dobi i menopauzalnim statusom, ali niti sa statusom limfnih čvorova TIL nisu bili statistički povezani niti u ranije navedenoj grčkoj analizi, ali se i tu potvrdila povezanost TIL s većim gradusom i Ki-67. Dodatno, u ovoj analizi opažena je i značajno češća prisutnost TIL u medularnoj histologiji (s čak 96% uzoraka u kojima su TIL bili >25%), dok su istovremeno bili izrazito rijetki među drugim specijalnim histologijama. (231) U Prunerijevoj analizi 897 TNRD ukupni TIL bili su, srodno prethodnim primjerima, pozitivno povezani s višim histološkim gradusom i Ki-67. (154) U meta-analizi kineskih autora iz 2016. godine o utjecaju TIL na prognozu BC, također se spominje povezanost TIL s visokim gradusom tumora i pozitivnim limfnim čvorovima, a u analizama autora iz instituta Jules Bordet jasno se kao i u prethodnim primjerima ističe povezanost visoke gustoće TIL infiltrata s visokim gradusom i proliferacijskim indeksom, a uočena je i povezanost s mlađom dobi bolesnica. (144,149,232) Slično se je pokazala i zbirna analiza preko 9000 bolesnica s rakom dojke, iz šest prethodno opisivanih studija, autora Denkerta i suradnika, iz 2018. godine. (233) U recentnoj analizi korejskih autora na 72 bolesnice s ranim TNRD, nije uočena povezanost TIL s patološkim statusom limfnih čvorova, kao niti veličinom primarnog tumora, a, suprotno od prethodno navedenih primjera, niska razina TIL pokazala se statistički značajno povezanom s duktalnom histologijom, odnosno NOS, dok je istovremeno analiza japanskih autora pokazala još jednom kako je visoka zastupljenost TIL značajno povezana s tumorima većeg gradusa. (234,235) Navedeno je još jednom istaknuo i u nedavno publiciranoj zbirnoj analizi na preko 2000 bolesnica s ranim TNRD, Sherene Loi i suradnika, što potvrđuje kako gustoća TIL opada s dobi, odnosno više TIL prisutno je u mlađih bolesnica, ali i u tumora većeg gradusa, međutim, u manjeg opterećenja tumorom, dok u uznapredovalijoj bolesti, opseg limfocitnog infiltrata opada.

(142) Opaženi rezultati kroz niz studija sukladni su prepostavci o TIL kao surogatnom biljegu intrinzičnog imunskog odgovora organizma, koji je biološki aktivniji i kompetentniji u mlađem organizmu, na agresivnijeg neprijatelja, kao što su visokogradusni, nediferencirani, visokoproliferativni tumori, motiviran i tom genomskom nestabilnosti tumora. Napredovanjem bolesti, odnosno bijegom tumora imunskom nadzoru, imunski sustav pokazuje znakove iscrpljenja, što se posljedično odražava i u opadanju razine imunskog infiltrata prisutnog u uznapređovalijim stadijima lokoregionalnog tumorskog opterećenja i metastatskim lezijama. Na kraju, spomenuta Denkertova analiza iz 2018. godine zaključuje kako se, unatoč tome što se TIL često nastoji umjetno kategorizirati u predefinicirane kategorije arbitrarnih graničnih vrijednosti, TIL su zaista, poput proliferacijskog indeksa Ki-67, kontinuirana varijabla, koja ne podliježe umjetnoj podjeli, što govori o tome da je prisustvo TIL samo surogat, kontinuirani pokazatelj kontinuirane interakcije imunskog sustava i tumora, a ne samo biljeg posebnog, imuno-aktiviranog podtipa tumora. (233) Iako su povijesne analize imunskog infiltrata u raku dojke višekratno pokazale kako su TIL vrlo često značajno povezani s medularnom histologijom, analize novijeg datuma, osim nekih sporadičnih koje su o tome izvjestile, nisu značajnije doprinijele u definiranju važnosti tog opažanja. (231,241,242) Što se tiče rizika povrata bolesti, sTIL u našoj analizi nisu bili povezani s povratom bolesti, ali iTIL jesu. U spomenutoj Parkovoj analizi iz 2019. godine, sveukupni intenzitet prisutnosti TIL značajno je korelirao s obrascem povrata bolesti, odnosno u slučajevima s niskom razinom TIL bilo je značajno više udaljenih metastaza, iako nije uočena statistički značajna povezanost između TIL i povrata bolesti sveukupno (lokoregionalno i udaljeno). (235) Slično je uočeno i u FINHER analizi, gdje su TIL kao kontinuirana varijabla bili značajan prediktor smanjenja rizika udaljene diseminacije

bolesti i produljenim vremenom do pojave udaljenih rasadnica, kao i u drugih nekoliko ranije spominjanih relevantnih studija, pregleda literature i meta – analiza. (137,141,149,153,154,228,234,237,240,243,244) Što se tiče utjecaja na preživljenje, slično većini publiciranih rezultata, u našoj analizi prisutnost sTIL pokazala se statistički značajno povezanom s ukupnim preživljenjem, dok je takav rezultat za iTIL ostao statistički značajan, samo ukoliko su bili prisutni u intenzitetu >10%. Nadalje, prema odjeljcima, sTIL u CT, i ukupno i u kategoriji  $\geq 10\%$ , pokazali su se statistički značajno povezanima s ukupnim petogodišnjim preživljenjem u bivarijabilnoj analizi, no nakon prilagodbe za sve zbunjujuće varijable, u multivarijabilnoj analizi nije više bilo statistički značajne povezanosti. Nasuprot tome, iTIL u CT, ali samo u slučaju zastupljenosti od  $\geq 10\%$ , pokazali su se statistički značajno povezanima s ukupnim petogodišnjim preživljenjem u bivarijabilnoj analizi, što se potvrdilo i u multivarijabilnoj analizi. Na invazivnoj margini (IM) prisutnost sTIL bila je i u bivarijabilnoj analizi i u multivarijabilnoj analizi statistički značajno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem, dok kategorizacija TIL s  $\geq 10\%$  nije. Intratumorski TIL (iTIL) na IM u bivarijabilnoj analizi bili su, i ukupno i u slučaju kategorizacije na  $\geq 10\%$ , statistički značajno povezani s ukupnim petogodišnjim preživljenjem, dok se taj rezultat u multivarijabilnoj analizi zadržao samo za iTIL IM  $\geq 10\%$ . Analizom povezanosti TIL s preživljenjem bez bolesti (DFS) pokazalo se da, nakon prilagodbe za sve sociodemografske, kliničke i patohistološke čimbenike, sTIL u CT nisu imali utjecaja na smanjenje rizika od povrata bolesti, odnosno na produljenje preživljenja bez bolesti (DFS), a medijan preživljenja bez povrata bolesti ili smrti u praćenom razdoblju nije dosegnut niti u jednoj skupini (sTIL u CT <10% vs.  $\geq 10\%$ ). Isti rezultat pokazala je i analiza iTIL u CT. Nasuprot tome, analiza utjecaja sTIL na IM na preživljenje bez bolesti

(DFS) pokazala je da su statistički značajno utjecali na smanjenje rizika od povrata bolesti i smrti, i to da je za svaki postotak više prisutnih sTIL na IM, za oko 2% smanjivan hazard, bez razlike u odnosu na postotak zastupljenosti TIL (<10% vs. ≥10%). Posljednji odjeljak, iTIL na IM, u multivarijabilnoj analizi nije pokazao učinka TIL na DFS. Analizom prema broju odjeljaka s TIL≥10% pokazalo se da su bolesnice u kojih su TIL bili ≥10% u sva četiri evaluirana odjeljka (sTIL i iTIL u CT i na IM) imale statistički značajno manji rizik od povrata bolesti ili smrti, odnosno bolje preživljenje bez bolesti (DFS), u odnosu na bolesnice s TIL<10%. Zbirno, bolesnice s iTIL ≥10% doživjele su povrat bolesti u 17,3% slučajeva, a one s iTIL<10% u 38,7% slučajeva. Iako do danas ostaje predmet značajnog interesa i bez jednoznačnog, nedvojbenog i sigurnog službenog stava, kao niti preporuke kako je točno interpretirati, odnosno koristiti u kliničkoj praksi, prognostička uloga TIL u raku dojke, odnosno povezanost imunosnog infiltrata s preživljenjem, najčešće je istraživani parametar, kada govorimo o TIL i raku dojke. Gotovo sve studije, kako ovdje spomenute analize, tako i mnoge druge, provedene u proteklih nekoliko godina od posebnog interesa za TIL, ali i u ranijim, povijesnim studijama, dotakle su se u nekom obliku utjecaja TIL na prognozu. Temeljem te količine podataka, i brojni su pregledi i meta-analize pokušali dati sumarne prikaze i uvid u kvalitetu i vrijednost podataka, kako bi ponudili orijentir, gdje se u ovom trenutku s tim saznanjima nalazimo. Kako je navedeno, pitanje prognostičkog utjecaja TIL u raku dojke, istraživano je u nizu različito dizajniranih studija, od retrospektivnih analiza, preko prospektivnih praćenja, u sustavnim pregledima i statističkim izračunima meta-analiza, u neoadjuvantnom i adjuvantnom setingu, na neselekcioniranoj populaciji bolesnica s rakom dojke, ali i u izdvojenim populacijama luminalnih, HER2 pozitivnih i bolesnica s TNRD. Analize su provedene na različito velikim uzorcima, različitim metodama, od

jednostavne H.E., preko IHC analize pojedinih subpopulacija imunskih stanica u infiltratu, do genskih, odnosno mRNA analiza. Analizirani su različiti odjeljci limfocitnog infiltrata, stromalni, intratumorski ili ukupni. U nekim analizama uzeti su u obzir i dobro su balansirani i kontrolirani brojni potencijalno zbunjujući čimbenici, poput niza relevantnih sociodemografskih i kliničkopatoloških varijabli, dok su u nekima detaljnije analize povezanosti i međudnosa izostale. Temeljem svega navedenog, rezultati koje danas imamo vrlo su heterogeni i potrebno ih je s oprezom i temeljito analizirati. Nužno je, također, istaknuti kako su heterogenosti podataka uvelike pridonijele i razlike u analiziranim subpopulacijama TIL, kada su provedene IHC ili mRNA tehnikama evaluacije i da se vrlo vjerojatno upravo time može objasniti najveći dio oprečnosti u rezultatima. Sveukupno, najveći broj poznatih analiza TIL u raku dojke, osobito jednostavnom H.E. metodom, pokazao je, izravno ili neizravno, njihovu povoljnu prognostičku ulogu. (137,139,154,161,216,223,231,232,236,238) Najčešće se pokazalo da su TIL povoljno utjecali na OS, ali i na DFS, kao i na druge oblike ishoda, poput preživljenja bez povrata bolesti (RFS), bez udaljenih rasadnica (MFS/DDFS) ili specifično preživljenje od raka (CSS), odnosno raka dojke (izostanak specifične smrtnosti zbog raka dojke, BCSS) i preživljenje bez specifičnog događaja (EFS). (124,137-139,141,142,149,153-155,216,223,229,234,236,238,246,247) Prognostički povoljnu ulogu, odnosno utjecaj na bolje preživljenje, kroz bilo koji od navedenih ishoda, TIL su najčešće pokazali u agresivnijim podtipovima raka dojke, HER2 pozitivnim i TNRD. (137,141,154,216,236) Osobito se istaknula prognostička uloga TIL u TNRD, za koju se čini da je i od najvećeg značaja i najpouzdanija utvrđena povezanost TIL s nekim ishodom. (142,149,153) Dvije pivotalne analize TIL u populaciji iz adjuvantnih studija BIG 2-098 i FINHER, Loi i suradnika, među prvima su pokazale kako je porast gustoće

limfocitnog infiltrata odličan prognostički pokazatelj u ER- HER2- raku dojke, dok to nije bio slučaj u ER pozitivnih tumora. To govori u prilog teoriji o imunosnom nadzoru i slabodiferenciranim visokogradusnim tumorima poput TNRD kao snažnije imunogeničnima, koji jače potiču na antitumorski odgovor imunosnog sustava domaćina. Također, istaknuta je kontinuirana priroda povoljnog utjecaja TIL na preživljenje, s najboljim rezultatima u visoko TIL – infiltriranim tumorima (LPBC). (141,216) Slično je pokazala i Prunerijeva analiza, s čak 96% - tnom stopom 10-godišnjeg preživljenja u LPBC TNRD bolesnica. (154) Validacija navedenih rezultata pokazala se uspješnom u analizi Dieci i suradnika iz 2015. godine, kojom su potvrdili prognostičku ulogu TIL u TNRD, uz također potencijalno povoljan učinak TIL i na prognozu HER2 pozitivne bolesti. Za razliku od prethodnih, u analizi Dieci i suradnika i sTIL i iTIL pokazali su se statistički značajno povezanim s OS u multivarijabilnoj analizi, a desetogodišnje stope preživljenja TNRD i HER2 pozitivnih bolesnica s visokom infiltriranošću TIL bile su gotovo 20% veće od onih u bolesnica s niskim ili negativnim TIL. (236) Grčka zbirna analiza prognostičke uloge TIL u četiri prospektivne adjuvantne studije, na preko 2600 bolesnica, pokazala je značajan povoljan utjecaj na prognozu, izostanak povrata bolesti i preživljenje u LPBC kohortama i HER2 pozitivnih i TNRD bolesnica. Štoviše, u slučaju LPBC, odnosno izrazito visokog limfocitnog infiltrata, inače lošija prognoza u bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima bila je značajno bolja, osobito u slučaju TNRD. (231) Recentna japanska analiza pokazala je kako su i preživljenje bez povrata bolesti i specifično preživljenje od raka značajno bolji u slučaju visokog limfocitnog infiltrata, u ER negativnim tumorima. (234) U recentno objavljenoj korejskoj analizi prikazan je prognostički utjecaj TIL u operiranih, ali adjuvantno neliječenih bolesnica s ranim TNRD, dakle bez utjecaja primjenjene sustavne terapije na ishode. Analiza je pokazala



kako je mala gustoća TIL (<10% infiltriranosti) statistički značajno bila povezana s većom stopom udaljenog povrata bolesti i lošijim desetogodišnjim specifičnim preživljenjem od raka dojke (BCSS, od eng. *breast cancer specific survival*), što upućuje na zaključak da su TIL, nevezano uz primjenjeno liječenje, zaista intrinzični nezavisni prognostički čimbenik u ranom, sustavno neliječenom TNRD, čak i u vrlo niskom stadiju, odnosno lokalno ograničenoj bolesti. (235) Među najvrijednijim pregledima, odnosno zbirnim analizama individualnih podataka bolesnika i meta-analizama prognostičke uloge TIL u raku dojke svakako su i meta – analiza Ibrahima i suradnika, iz 2014. godine, sustavni pregled i meta-analiza Maa i suradnika iz 2016. godine te zbirna analiza individualnih podataka bolesnica, Sherene Loi i suradnika, objavljena 2019. godine. (142,149,153) U prvoj od navedenih, razmatra se prognostička uloga TIL u TNRD i to je prva meta-analiza koja je ekskluzivno analizirala isključivo trostruko negativni podtip raka dojke. U analizu je uključeno osam relevantnih studija, odnosno podaci o gotovo 3000 bolesnica s ranim TNRD i s medijanom praćenja od gotovo deset godina. Pokazalo se da su TIL – bogati tumori imali 30% redukciju rizika povrata bolesti, 22% redukciju rizika udaljenih povrata i 34% redukciju rizika smrti. Tumori s bogatim limfocitnim infiltratom imali su bolji OS, nevezano uz detalje, poput lokacije limfocitnog infiltrata (sTIL ili iTIL), ili fenotipa bolesti i čak i vrste korištene dijagnostičke metode za evaluaciju. (153) Kineski sustavni pregled i meta-analiza iz 2016. godine uključila je 25 objavljenih istraživanja, s gotovo 23 000 bolesnica s rakom dojke i pokazalo se da TIL nisu bili statistički značajan prognostički čimbenik za DFS i OS u sveukupnoj populaciji, ali da su bili povezani s poboljšanjem DFS i OS u TNRD populaciji. Osobito je povoljan utjecaj na prognozu uočen u LPBC. (149) Posljednja u nizu, zbirna analiza Loi i suradnika iz 2019. godine, uključila je individualne podatke 2148 bolesnica s ranim TNRD iz devet

studija. U multivarijabilnoj analizi sTIL su se pokazali statistički značajnim nezavisnim prognostičkim čimbenikom za sve ishode, poput preživljenja bez invazivne bolesti (iDFS), DDFS i OS, što potvrđuje njihovu važnost za ovu populaciju bolesnica i sugerira integraciju kao parametra u kliničkopatološki prognostički model za bolesnice s TNRD.

(142) Možda najdetaljniji prikaz prognostičke uloge TIL, odnosno međuodnosa limfocitnog imunogenog infiltrata i ishoda za bolesnice, ponudile su ranije opisane analize Loi i suradnika, koje su pokazale vrlo zanimljiv obrazac i pravilnost. Prema tom obrascu, sa svakih 10% porasta limfocitnog infiltrata (bilo sTIL ili iTIL) 15 – 17% opada rizik povrata bolesti, odnosno 17-27% opada rizik smrti, odnosno svakih 10% porasta gustoće TIL značajno je povezano s nižom stopom udaljenih rasadnica. (141,216) Slično je uočila i Adams, u čijoj analizi 481 bolesnice s TNRD svaki porast sTIL gustoće za 10% za 14% smanjuje rizik povrata bolesti, za 18% rizik udaljenih rasadnica i za 19% rizik smrti. (137)

Opisana pravilnost potvrđena je i u navedenim meta-analizama, gdje se, zbirno gledano, za svakih 10% porasta gustoće TIL, za 15-20% smanjivala stopa bilo kojeg neželjenog ishoda: povrata bolesti, udaljenih rasadnica ili smrtnosti. (153) Opisano je vjerojatno i naj snažniji dokaz u prilog promatranju TIL kao kontinuirane varijable, odnosno odnosa imunogenog sustava i tumora kao kontinuirane interakcije, a ne pokušaju umjetne kategorizacije, odnosno definiranja posebnog podtipa bolesti. Osim prognostičke uloge TIL, odnosno utjecaja na preživljenje u raku dojke, u većini ovdje spomenutih i uopće relevantnih analiza TIL, evaluirana je njihova prediktivna vrijednost, dakle utjecaj na odgovor na terapiju i interakciju s pojedinom vrstom sustavne terapije. (156,159,217,240,248) Sveukupno, TIL, sTIL, ali i iTIL, pokazali su se prediktivnima za odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju. Osobito je taj utjecaj bio značajan u TNRD i HER2 pozitivnih, uz terapiju antraciklinima, taksanima i platinom. (156,160,233,240)

Veća gustoća limfocitnog infiltrata u preterapijskom bioptičkom uzorku, značila je i veću stopu pCR, za koji je dokazano da je u slučaju najagresivnijih podtipova raka dojke, poput TNRD i HER2 pozitivnog, pouzdan surogatni biljeg povoljne prognoze, odnosno boljeg preživljenja. (158,233,244) To podržava teoriju o imunomodulatornom djelovanju kemoterapije i potencijalnom udruženom djelovanju kemoterapijske destrukcije tumorskih stanica i intrinzičnog imunskog odgovora, u postizanju kompletnog odgovora na liječenje, s najvećim uspjehom upravo u tih tzv. imunoosjetljivih tumora. (143,228)

Osim uloge TIL u preterapijskom bioptičkom uzorku u predikciji, odnosno utjecaju na odgovor na terapiju i postizanje pCR u neoadjuvantnom setingu, značajnom se pokazala i prisutnost TIL u postterapijskom uzorku u rezidualnom tkivu. (161,228,237,250)

Naime, prisustvo TIL u rezidualnom tumorskom tkivu nakon NAT, bez postignutog pCR, dobar je prognostički pokazatelj i povoljno utječe na prognozu u toj inače nezavidnoj situaciji, u kojoj su za očekivati lošiji ishodi, osobito u TNRD. Štoviše, pokazalo se da su TIL prisutni u rezidualnom tkivu, mjereni kao kontinuirana varijabla, sa svakih 10% porasta u gustoći infiltrata, za preko 20% smanjivali vjerojatnost metastaziranja i smrti, a najjači prognostički utjecaj imali su u skupini s najvećim teretom ostatnog tumorskog tkiva (najlošijim odgovorom na NAT). (161) Iako je niz studija istraživao ulogu TIL, ne samo u ukupnoj populaciji bolesnica s rakom dojke, nego i u selekcioniranim populacijama luminalnih, HER2 pozitivnih i TNRD, i danas se zna kako su TIL od posebnog značaja u TNRD, a postoje također i podaci o značajnijoj povezanosti TIL i s nekim histološkim podtipovima raka dojke, poput dukalnog (NOS), ali i medularnog, nema puno podataka o povezanosti TIL s različitim molekularnim podtipovima TNRD. (141,154,216,231,238,251) Sporadična opažanja ističu kako se čini da je povoljna prognostička uloga gustog limfocitnog infiltrata u TNRD neovisna o fenotipu, odnosno

jednako ukazuje na bolje preživljenje i u TNRD i u pravih bazaloidnih tumora. Istovremeno, nedostaje podataka o 5-NP podtipu (svi biljezi negativni, ER, PR, HER2, EGFR i CK5/6), ali se čini kako u ovom podtipu gustoća TIL nije imala statistički značajnog utjecaja na prognozu. (153,155) Iako je prema genskom profiliranju poznato šest podtipova TNRD, odnosno četiri od potencijalnog prognostičkog značaja, do danas nema podataka o stvarnom prognostičkom utjecaju intrinzičnih molekularnih podtipova, definiranih prema bilo kojem genskom profiliranju i ne zna se jesu li imunomodulatorni (IM) ili BLIA (basal – like immuno – activated) molekularni podtip TNRD upravo oni koji su najviše udruženi s prisutnim TIL infiltratom. (25,38,40,228,252) Najbliže je objašnjenju došao Lehmann, modifikacijom podjele TNRD, čime je imunomodulatorni tip (IM), za koji se pokazalo da je vjerojatno potpis prisutnih TIL u tumoru, a ne zaseban entitet, postao refleksija imunosne infiltracije u drugim podtipovima, što se potvrdilo i u analizi Harana i suradnika, koja je pokazala da je IM potpisa najviše u BL1 podtipu, a najmanje u BL2 i M podtipu, čime bi se mogli objasniti i dobiveni rezultati u odgovoru na terapiju, ali i prognozi. (252,253) Kako je već rečeno, osim u TNRD, uloga i klinička vrijednost TIL istražena je i u HER2 pozitivnom i luminalnom podtipu raka dojke. Za razliku od TNRD, u kojem je povoljna uloga TIL, kako u prognozi, tako i u predikciji odgovora na NAT, najviše istaknuta i višekratno potvrđena, rezultati za luminalni podtip raka dojke nešto su drugačiji. U usporedbi s TNRD i HER2+ tumorima, u luminalnom, HR+ HER2- tumoru puno je rjeđe i u manjem opsegu prisutan limfocitni infiltrat, a čak i kada jest, ne pokazuje dobrobit u preživljenju, ili ima čak i negativan utjecaj. (216,231,251,233) Čini se da je razlog tome ER promocija imunosupresivnog mikrookoliša. (254) Nasuprot tome, u HER2 pozitivnom podtipu raka dojke analize uloge TIL pokazale su rezultate puno bliže onima u TNRD. Tako su se TIL u HER2 + raku

dojke pokazali povezanima s dobrim odgovorom na terapiju, kao i povoljnom prognozom, odnosno boljim DFS i OS, u nekim studijama čak i neovisno o ciljanoj antiHER2 terapiji. (141,216,231,236) Slično patofiziologiji u ER+, čini se da je i ovdje u podlozi sklonost stvaranju određenog mikrookoliša (u ovom slučaju usmjerenog prema Th1 odgovoru), u kojem se razvija ili suprimira imunski odgovor organizma. (244,254) Većina analiza TIL u raku dojke, poput i ovdje navedenih, evaluirala je limfocitni infiltrat u uzorcima ranog stadija bolesti, bilo lokalnog ili lokoregionalno uznapredovalog. Puno manje se zna o zastupljenosti i ulozi TIL u metastatskoj bolesti. Kako je ranije navedeno, proučavanjem prisutnosti TIL i ponašanja bolesti, čini se kako TIL pouzdano reflektiraju teoriju o imunskom nadzoru i bijegu tumora, gdje se veće količine imunokompetentnih stanica, u vidu limfocitnog infiltrata, uglavnom nalaze u slučaju manjeg opterećenja tumorom, dok napredovanjem bolesti imunski sustav posustaje i to iscrpljenje odražava se upravo u smanjenju količine prisutnog limfocitnog infiltrata u uznapredovalijim stadijima bolesti. (142) Taj zaključak potvrdile su i analize u kojima su evaluirani TIL u uparenim uzorcima primarnog tumora i metastatskih lezija, koje su pokazale značajno viši postotak TIL (gotovo duplo viši) u primarnim tumorima, u odnosu na metastatske lezije, osobito u TNRD i HER2+ tumora. (145,255) Sveukupno, prisustvo TIL u metastatskim lezijama bilo je vrlo nisko, s nešto većom zastupljenošću u plućnim rasadnicama. (256) Unatoč tome, čini se kako su i u metastatskoj bolesti prisutni TIL bili povoljan prognostički pokazatelj, jer se pokazalo da su bolji OS imale one bolesnice s metastatskom bolešću, u kojih je bilo više TIL, odnosno barem intermedijarno zastupljenih TIL, u odnosu na vrlo malo ili nimalo, što govori u prilog imunodepleciji u vrlo agresivnim tumorima. (145,257) Ipak, ta situacija nije jednoznačna, na prisustvo TIL u metastatskoj bolesti utječe niz čimbenika i interakcija između organizma, bolesti i

primjenjenog liječenja. Dodatno ju kompliciraju i ponešto oprečni rezultati dobiveni u nekim drugim analizama, i stoga su nužna dalja istraživanja i prospektivne analize. (256)

U ovom radu za analizu TIL korištena je validirana standardna jednostavna metoda HE morfološke evaluacije TIL na kompletnim postoperativnim uzorcima tumorskog tkiva. Poput naše, i velika većina ovdje prikazanih analiza, koristila je tu istu metodu, bilo na postoperativnim ili preterapijskim bioptičkim uzorcima, uz poneke prilagodbe u izvještavanju rezultata. Kao što je već ranije istaknuto, postoji također niz studija koje su evaluirale različite subpopulacije TIL metodama poput IHC ili mRNA. (138,139, 219,223,258) Dodatna vrijednost koju su takve metode osigurale jest i uvid u heterogenost limfocitnog infiltrata, odnosno evaluacija različitih populacija stanica prisutnih u TIL. S jedne strane, to je vrijedno znati jer je puno tih studija pokazalo kako prognostički utjecaj TIL može biti različit i čak posve oprečan, u ovisnosti upravo o tome koja subpopulacija stanica u infiltratu dominira. (147,149,153,243,244) Tako se pokazalo da je najčešća populacija stanica u imunosnom infiltratu uglavnom populacija CD8+ citotoksičnih limfocita T i ona predstavlja povoljan pokazatelj te, ukoliko je zaista infiltrat većinom sastavljen od te vrste stanica, za očekivati je i pokaže se najčešće dobar prognostički utjecaj i bolje preživljenje. (149,155,246,250) Ukoliko su u infiltratu češće prisutne FOXP3+ regulatorne T stanice, njihov utjecaj na prognozu često nije povoljan ili se pokaže deteriorirajućim na sve mjerene ishode u takvoj populaciji bolesnika. (149,259,261) Dodatno, tehnikom IHC evaluira se i sastav tercijarnih limfoidnih struktura, u koje često agregiraju TIL u peritumoralnoj stromi, a za koje se također čini kako imaju izvjesnu kliničku vrijednost. (232) Ipak, zbog heterogenosti i nekonzistentnosti rezultata te nedostatka statističke značajnosti u mnogima od tih analiza, s jedne strane, i neekonomičnosti, kompliciranosti izvedbe i skupoće metoda s druge

strane, ova metodologija nije se sveukupno pokazala superiornijom u odnosu na prethodno spomenutu morfološku H.E. metodu, koja do danas ostaje standardom evaluacije TIL, kako u raku dojke, tako i u ostalim sijelima solidnih tumora. (130) Danas učinkovita imunoterapija u liječenju solidnih tumora, pa tako i raka dojke, počiva na principu inhibicije fizioloških inhibitornih imunskih nadzornih točaka, CTLA4 i PD1/PDL1 signalnog puta. Monoklonalna protutijela koja se koriste kao blokatori tih nadzornih točaka vežu se na neku od njih i time oslobađaju imunski odgovor, do tada posve spregnut tumorskom zlorabom. Do danas nisu u potpunosti definirani biobiljezi koji bi ciljano pomogli u navođenju terapijske odluke, odnosno, ne zna se precizno kome će opisana imunoterapija najviše pomoći, a ni zašto. (262) Prema trenutnom znanju, količina PDL1 liganda, izražena bilo na tumorskoj ili na imunosnoj stanici, prediktivna je za učinak terapije, no u različitim studijama PDL1 je različito evaluiran, postavljane su različite arbitrarne granične vrijednosti, korišteni različiti testovi, a naposljetku i različite stanice na kojima se detektirao (tumorske vs. imunosne). (263) Ipak, u nedostatku preciznijeg, to je jedini trenutni ciljani biobiljeg, koji možemo koristiti u kliničkoj praksi. Osim PDL1, sve je više dokaza kako su vrlo korisni kao neizravni biobiljezi u imunoterapiji i opterećenje tumora mutacijama (TMB, od eng. *tumor mutational burden*) koje je nažalost komplicirano i skupo, ali i nejasno kako najbolje, određivati, ali i limfocitni infiltrat, odnosno TIL. (264) Povezanost prisustva TIL s izraženosti PDL1 potvrđena je kroz niz studija, od kojih su neke mRNA biljezima, među kojima je i PDL1, validirale povoljnu prognostičku ulogu TIL i potvrdile pojačanu angažiranost tih imunosupresivnih signalnih puteva u TIL pozitivnim tumorima dojke. (223,240) Dokazano je da je *up*-regulacija PD1/PDL1 na TIL i tumorskim stanicama često prisutna, osobito u TNRD, što je i bio motiv za istraživanja imunoterapije u tom podtipu raka dojke.

(254) Studije izvještavaju o izrazito varijabilnoj izraženosti PD1/PDL1 na imunskim, odnosno tumorskim stanicama raka dojke, s najčešće otprilike 30-50% PDL1+ tumorskih stanica, odnosno čak do 50% PD1+ imunskih stanica i oko 20-30% slučajeva s istovremeno prisutna oba biljega. (163,164,223,265,268) Općenito, unatoč heterogenim rezultatima, uočeno je da je u raku dojke, uz PD1 prisutan isključivo na imunskim stanicama, i PDL1 prisutan najčešće na imunskim stanicama, s vrlo malo PDL1+ tumorskih stanica. (232) U svakom slučaju, iako je uočeno da se postotak prisutnosti PDL1/2 na TIL mijenja tijekom procesa diseminacije bolesti, i stoga je vrlo važan i trenutak evaluacije, a neke studije izvještavaju o slaboj povezanosti PDL1 i TIL u metastatskom setingu, mnoštvo analiza potvrdilo je da prisustvo PDL1 na tumorskim stanicama ili u mikrookolišu tumora korelira s količinom TIL u raku dojke, najčešće se vezuje uz TNRD, i zajedno povoljno utječu na odgovor na terapiju i preživljenje. (145,163,164,237,267,269) S obzirom na navedeno, unatoč svim preprekama koje još treba razriješiti, danas je sasvim sigurno potencijalno najveća konkretna korist definiranja točne uloge i koristi TIL u raku dojke te uvođenja evaluacije TIL u kliničku praksu, upravo u njegovoj ulozi jeftinog, ekonomičnog, lako detektabilnog i široko dostupnog neizravnog prediktivnog biljega učinkovitosti imunoterapije blokatorima imunskih nadzornih točaka. (270)



#### 6.4. Interakcija AR i TIL

U našoj analizi izraženost AR nije bila statistički značajno povezana s prisutnošću TIL ukupno, zasebno sTIL i iTIL, kao niti po pojedinom evaluiranom odjeljku (sTIL CT i IM, iTIL CT i IM). U analizi preživljenja, nakon što su u multivarijabilni model uključena sva četiri odjeljka TIL i AR te sve ostale planirane sociodemografske i kliničkopatološke varijable, prisutnost iTIL u CT bila je statistički značajno negativno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OS), u AR pozitivnih tumora, dok prisutnost  $TIL \geq 10\%$  i  $AR \geq 1\%$  nije bila statistički značajan, neovisni prediktor OS. Kako je ranije navedeno, analiza je pokazala da su bolesnice s  $TIL \geq 10\%$  u svim evaluiranim odjeljcima imale statistički značajno manji rizik povrata bolesti i smrti, odnosno preživljenje bez bolesti (DFS), u odnosu na bolesnice s  $TIL < 10\%$ . Nakon što je u multivarijabilni Coxov model, uz prilagodbu za sociodemografske i kliničkopatološke čimbenike, uz broj odjeljaka s prisutnošću  $TIL \geq 10\%$  dodana i izraženost  $AR \geq 1\%$ , i dalje je postojala statistički značajna razlika u riziku za povrat bolesti ili smrt, u odnosu na bolesnice bez odjeljaka s  $TIL \geq 10\%$ . Izraženost AR nije bila statistički značajno povezana s DFS, a jednako tako, s DFS nije bila statistički značajno povezana niti interakcija izraženosti  $AR \geq 1\%$  i broja odjeljaka s  $TIL \geq 10\%$ . Povezanost AR i TIL u raku dojke, osobito u TNRD, zanimanje je pobudila tek recentno. Iako je ta korelacija i međudjelovanje androgenog signalnog puta i imunskog infiltrata od ranije poznata, primjerice, u raku prostate i raku mokraćnog mjehura, osim nekoliko kongresnih izvješća sporadičnih monoinstitucijskih analiza na manjem broju bolesnica, za rak dojke na ovu temu nema puno literaturnih podataka. (271,272) Španjolski autori su na godišnjem ESMO kongresu 2018. godine prikazali analizu povezanosti AR i TIL u 50 ranih TNRD, stadija I do III. AR su definirani kao

pozitivni  $\geq 1\%$ , a TIL su analizirani prema vrijedećim preporukama H.E. metodom, uz arbitrarnu graničnu vrijednost za visoku infiltraciju, od čak 80% te IHC na CD4, CD8 i CD20. (130,218) Pokazalo se da je visoku infiltraciju TIL ( $>80\%$ ) imalo čak 70% uzoraka, a AR njih 26%. Nije nađeno statistički značajne povezanosti AR i TIL, ali se pokazalo da su CD8 bili češće prisutni u AR+ tumorima, a CD4 u AR- tumorima. Izraženost AR bila je češća u tumora s niskim Ki-67, ali, neobično, u mlađih bolesnica i u N+ bolesti. Visoka infiltracija TIL bila je češća u agresivnijih tumora, s visokim gradusom i Ki-67, ali su ti tumori pokazali niže stope povrata bolesti i smrti. Istovremeno, u njih je zabilježena niža razina CD8. (273) U 2019. godini na ESMO Breast kongresu prikazana je egipatska analiza povezanosti AR i TIL u 36 bolesnica s ranim i metastatskim TNRD. Uz AR granicu od  $\geq 1\%$ , TIL su evaluirani HE metodom, uz izdvajanje LPBC ako sTIL  $\geq 50\%$  i IHC na CD3, CD4, CD8 i CD20. (130,136) Pozitivni AR bili su u 19.4% bolesnica, a medijan TIL bio je 15% u AR+ i 33% u AR-, no bez statističkog značaja u razlici. S druge strane, T stanični biljeg CD3 bio je češći u AR+, a dok je CD20 bio češći u AR-. Zastupljenost CD8 nije se statistički razlikovala među AR+ i AR-, ali je CD8 bilo značajno manje prisutan u uznapredovalijim stadijima bolesti (III i IV), u odnosu na niže (I i II). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između CD8 i CD3, ali i negativna između CD3 i CD20 te CD4 i CD8. (274) Istovremeno, na ASCO-u 2019. prikazana je nizozemska analiza prognostičke uloge AR u 139 bolesnica s ranim i metastatskim TNRD, usporedbom uparenih slučajeva s razvijenom i nerazvijenom diseminacijom bolesti te se pokazalo da su AR prognostički povoljan pokazatelj, osobito u TNRD koji nisu liječeni sustavnom antineoplastičnom terapijom, a u liječenih slučajeva najbolji ishod bio je u skupini s niskom izraženošću AR (od 1 do 34%). U analizu je uključena i prisutnost sTIL, no bez izvješća o statistički značajnoj korelaciji između ta dva parametra.

(275) Osim opisanih izvještaja sporadičnih analiza manjih kohorti, o povezanosti AR i TIL u TNRD vrlo je malo podataka u znanstvenim publikacijama. Vjerojatno jedina analiza unazad nekoliko godina, koja spominje vezu AR i imunskog infiltrata u raku dojke jest ona Jezequiela i suradnika, iz 2015. godine, u kojoj se analizom genske izraženosti u TNRD definiraju tri podskupine tumora, nebazaloidni, LAR podtip s oskudnim imunskim odgovorom, u oko petine slučajeva, BL s oskudnim imunskim odgovorom i M2 makrofagima u gotovo polovine TNRD i bazaloidni – obogaćeni jakim imunskim odgovorom i s malo M2 makrofaga u oko trećine slučajeva. (41) Ponešto se saznalo iz istraživanja nizozemskih autora, publiciranog 2018. godine, koje je analiziralo AR i TIL na uzorcima 150 bolesnica s metastatskim HER2 pozitivnim rakom dojke, s pretpostavkom da AR i TIL utječu na odgovor na trastuzumab i mogu zbog toga eventualno poslužiti kao dodatni terapijski cilj. Pokazalo se kako je u preko 80% slučajeva bila prisutna izraženost AR (ER su bili pozitivni u preko 50% slučajeva) te kako je izraženost AR negativno korelirala s M2 TAM (od eng. *Tumor Associated Macrophages*), ali i CD8 i CD3, no samo u slučaju ER+. Sveukupno se pokazalo kako su AR bili jače izraženi u uzorcima sa slabim imunskim infiltratom, kao i obratno, tumori s visokim postotkom imunskog infiltrata bili su češće AR negativni, no ne i isključivo: ukupno je bilo oko 20% slučajeva visoke imunosne infiltracije i niske izraženosti AR, 15% slučajeva visoke imunosne infiltracije i visoke izraženosti AR te oko 50% slučajeva s visokim AR i niskim imunskim infiltratom. Još važnije, iako samo u eksploratornim analizama, pokazalo se da su statistički značajno bolje ukupno preživljenje imale bolesnice s visokom izraženošću AR i visokom imunskom infiltracijom, u usporedbi s tumorima s niskom izraženošću AR i visokim imunskim infiltratom, dok među ostalim skupinama nije bilo razlike u OS. Svakako, treba istaknuti kako je u studiji također

utvrđeno da se korelacija AR i imunosnog infiltrata, odnosno svake pojedine linije imunskih stanica IHC evaluiranih, razlikovala u ovisnosti i o izraženosti ER. (276) U 2019. godini nešto je više podataka. Studija španjolskih autora na temu povezanosti luminalnih i imunoloških karakteristika evaluirala je kliničke i podatke o genskoj izraženosti upravo u kohorti TNRD. U studiji su, prema teoriji o matičnim stanicama, definirane četiri podskupine TNRD: luminalni AR+, bazaloidni te *claudine – low* i *claudine – high*, što se ponešto razlikuje od ranijih molekularnih kategorizacija TNRD (38,40,252), ali uz značajna preklapanja. Dodatno su utvrđene i dvije podskupine prema imunskoj aktivnosti, koja se pokazala prognostičkom u ukupnoj populaciji i zasebno, u podskupini luminalnog tipa. Sveukupno, korištenjem novih analitičkih pristupa, autori zaključuju kako su barem dva ključna nezavisna izvora biološke informacije u TNRD, stanični i imunosni, a osim klasične molekularne iznjedrili su i, dijelom preklapajuću, imunosnu klasifikaciju TNRD. Tim preklapanjem, pokazalo se da imunosna aktivnost (IM+) nema prognostičku ulogu u bazaloidnom podtipu i *claudine –low skupini*. U *claudine – high*, koja je ukupno imala najlošiju prognozu, vidljiv je trend bolje prognoze u IM+, ali bez statističke značajnosti. Najznačajnije, tzv. luminalni – imunosni podtip tumora, dakle luminal AR+ IM+, imao je jasno bolju prognozu, u odnosu na imuno-negativni. (277) Opisani rezultati u skladu su s Lehmannovom modifikacijom molekularne kategorizacije TNRD, u kojoj IM podtip definira kao imunosni pečat, moguće prisutan, u različitoj mjeri, u ostalim molekularnim podtipovima, čime modificira njihove karakteristike i prognozu, a ne kao zaseban entitet. (252) Dieci i suradnici su, također, u analizi prognostičke uloge AR u TNRD kohorti, pokazali kako su AR pozitivni tumori bili statistički značajno povezanim s nižim vrijednostima TIL. S druge strane, iako su AR utjecali na prognozu, neovisno o stadiju bolesti, dodatkom TIL kao varijable

u analizu, samo TIL su uz stadij bili snažan nezavisni prognostički čimbenik. U navedenoj studiji, AR pozitivni tumori imali su značajno lošiji DDFS, u odnosu na AR negativne. (278) U nedavnoj objavljenoj suradnoj studiji američkih i japanskih autora na ER pozitivnim tumorima utvrđena je načelno povezanost tumora s visokom AR izraženošću i protumorskih regulatornih T stanica, dok su AR negativni tumori bili udruženi s protutumorskim imunskim stanicama, poput CD4, CD8, gama-delta-T stanicama i memorijskim B stanicama, iako nalazi nisu bili konzistentni niti u potpunosti jednoznačni. AR pozitivni tumori slabije su odgovarali na terapiju (postizali manje stope pCR), ali su imali bolje preživljenje. (279) Navedeni rezultati razlikuju se od prethodno opisanih u populaciji TNRD, ali i HER2+, što još jednom ukazuje na kompleksniju mrežu međudjelovanja svih navedenih molekula koje definiraju podtipove raka dojke, i modulorni utjecaj svakog pojedinog na korelaciju drugih. Na kraju, vrlo nedavno objavljena talijanska analiza pokazala je kako su TIL u TNRD povoljan prognostički pokazatelj, kako su AR u TNRD negativan prognostički pokazatelj, kako su AR+ tumori uglavnom imali slabu infiltraciju TIL, najgori DFS bio je u TIL-/AR+ u odnosu na druge kombinacije ovih parametara u tumoru te kako su sveukupno, TIL, AR i transkripcijski čimbenik FOXA1 zajedno utjecali na ishode u bolesnica s TNRD. Čini se kako su TIL u TIL+/AR+ podskupini odigrali protektivnu ulogu, sprječavajući povrat bolesti i lošije ishode za te bolesnice. U ovoj studiji utvrđeno je i da su TIL+/PDL1+ tumori imali trend ka boljem DFS, dok nije uočeno povezanosti AR i PDL1. (280) Opisanoj heterogenosti rezultata po pitanju odnosa AR i TIL među različitim podtipovima raka dojke donekle se moglo očekivati, s obzirom na trend različitih uloga svakog parametra pojedinačno u ER+, HER2+ i TNRD, međutim puno je intrigantnija činjenica da i u sličnim kohortama nisu svi autori dobili srodne rezultate, što se može djelomično racionalizirati razlikama u

veličini analiziranog uzoorka, korištenim metodama i graničnim vrijednostima za pojedine parametre, no svakako ostaje za promisliti koliko još čimbenika utječe na odnose među istraživanim paramterima, čiji utjecaj još nije definiran niti kvantificiran. Po uzoru na modulatorni utjecaj primjerice ER na odnos AR i TIL, slično se može promišljati i po pitanju drugih molekularnih parametara, osobito u kategoriji TNRD. Svakako, nemalo je istraživanja pokazalo statistički značajne rezultate, bilo u pozitivnom ili negativnom smjeru, svakog pojedinačnog od navedenih parametara, kao i njihovog međusobnog odnosa, demonstrirajući snažnu prognostičku ulogu TIL, unatoč negativnom utjecaju AR, ili demonstrirajući dobar prognostički utjecaj AR, bez promjene u odnosu na imunosni infiltrat. Kako god bilo, opisani odnos dva naoko nepovezana parametra, luminalnog (AR+) podtipa tumorskih stanica i aktivacije intrinzičnog imunosnog odgovora domaćina definitivno nosi potencijal i u prediktivnom i u prognostičkom smislu, koji tek treba biti sustavnije i podrobnije istražen.

Prikazana je retrospektivna analiza podataka za određeno vremensko razdoblje u jednom centru velikog volumena. S obzirom na dostupne podatke iz literature, svakako bi bilo vrijedno vidjeti rezultate multicentričnog prospektivnog praćenja, primjerice prikaz stanja u jednoj većoj, ali homogenoj populaciji, poput cijele zemlje. Ipak, koliko nam je iz dostupne literature poznato, ovo je jedna od prvih i rijetkih analiza, koja je na ovaj način, detaljno analizirala oba navedena parametra, i AR i TIL, u homogenoj kohorti bolesnica s ranim TNRD, liječenih operativno i eventualno adjuvantno, s analizom međusobne korelacije te dvije varijable i njihovim zajedničkim utjecajem na prognozu bolesnica, što je područje od velikog potencijala, koje tek treba detaljnije istražiti.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Analizirana kohorta od 152 bolesnice bila je medijana dobi 58 godina, 64% postmenopauzalne žene, najčešće u stadiju bolesti II, s tumorom većim od 2cm i u 40% s pozitivnim limfnim čvorovima, medijana Ki-67 57%, u gotovo 82% njih gradusa III tumora, liječene operativno u 100% slučajeva, potom adjuvantnom kemoterapijom u 88.5%, najčešće antraciklinima i taksanima te adjuvantnom radioterapijom u 73.6% slučajeva. U pet godina praćenja povrat bolesti zabilježen je u 33% bolesnica. Povrat bolesti dogodio se najčešće u prvoj godini, a bio je u obliku udaljene diseminacije, u pluća i kosti te limfne čvorove i jetru. Petogodišnji DFS iznosio je 67.1%, a OS 73.7%. Uz povrat bolesti i smrt najznačajnije su bili povezani čimbenici poput mlađe dobi, većih tumora, zahvaćenih limfnih čvorova, odnosno višeg stadija bolesti te višeg proliferacijskog indeksa Ki-67. Petogodišnje preživljenje po stadijima bolesti iznosilo je: za stadij I 85.3%, za stadij II 80.9%, a za stadij III bolesti 37.9%.
2. Učestalost izraženosti AR u bolesnica s ranim TNRD u našoj analizi iznosi 31.1%. Njih 47 od ukupno 151 bolesnice s evaluiranim AR imalo je pozitivne AR, odnosno  $AR \geq 1\%$ . Ukupno 28 bolesnica (18.5%) imalo je  $AR > 50\%$ .
3. Prisutnost TIL u našoj kohorti bolesnica s ranim TNRD bila je slijedeća: medijan prisutnosti ukupnih sTIL je 19%, a u 85.5% bolesnica sTIL su prisutni u intenzitetu  $\geq 10\%$ . Medijan prisutnosti ukupnih iTIL iznosi 5%, a u 49.3% bolesnica iTIL su prisutni intenzitetom  $\geq 10\%$ . Prema odjeljcima, ukupni TIL u

CT (dakle s+i) bili su prisutni u medijanu intenzitetom od cca 5%, a u gotovo 35% bolesnica bili su prisutni u intenzitetu  $\geq 10\%$ . Ukupni TIL (s+i) na IM bili su prisutni u medijanu intenzitetom od 17.5%, a u gotovo 74% bolesnica TIL na IM bili su u intenzitetu od  $\geq 10\%$ . Pojedina vrsta TIL po pojedinom odjeljku: medijan intenziteta prisutnosti sTIL u CT iznosi 5%, a u 48% bolesnica su prisutni u intenzitetu  $\geq 10\%$ ; medijan intenziteta prisutnosti iTIL u CT iznosi 1%, a u 23% bolesnica su prisutni u intenzitetu  $\geq 10\%$ ; medijan intenziteta prisutnosti sTIL na IM iznosi 30%, a u čak 85.5% bolesnica su prisutni u intenzitetu  $\geq 10\%$ ; medijan intenziteta prisutnosti iTIL na IM iznosi 5%, a u 47.4% bolesnica su prisutni u intenzitetu  $\geq 10\%$ . Ukupno je 25% bolesnica imalo TIL $>50\%$  u nekom od evaluiranih odjeljaka.

4. Istovremeno izražene AR ( $\geq 1\%$ ) i prisutne TIL ( $> 1\%$ ) imalo je 30% bolesnica, a istovremeno prisutne AR ( $\geq 1\%$ ) i prisutne TIL $\geq 10\%$  imalo je 25% bolesnica u našem uzorku. Izraženost AR nije bila statistički značajno povezana s prisutnosti sTIL niti iTIL, kao niti TIL po pojedinim odjeljcima.
5. AR $\geq 1\%$  nisu pokazali statistički značajnu povezanost s DFS; medijan preživljenja bez bolesti nije dosegnut, a prosječno preživljenje bez bolesti iznosilo je 48 mjeseci za obje skupine bolesnica, one s AR $\geq 1\%$ , kao i one bez AR, uz HR za povrat bolesti ili smrt od 1.08. Povezanost TIL s DFS bila je slijedeća: sTIL u CT nisu imali utjecaja na smanjenje rizika od povrata bolesti, odnosno na produženje preživljenja bez bolesti, a medijan preživljenja bez povrata bolesti ili smrti u praćenom razdoblju nije dosegnut niti u jednoj skupini (sTIL u CT  $< 10\%$  vs.



$\geq 10\%$ ); isti rezultat pokazala je i iTIL u CT. Nasuprot tome, analiza utjecaja sTIL na IM na DFS pokazala je statistički značajno smanjenje rizika od povrata bolesti i smrti, za svaki postotak više prisutnih sTIL na IM. Analiza iTIL na IM nije pokazala statistički značajnog utjecaja na DFS. Sveukupno, pokazalo se da su bolesnice koje su imale  $TIL \geq 10\%$  u sva četiri evaluirana odjeljka (sTIL i iTIL, u CT i na IM) imale statistički značajno manji rizik od povrata bolesti ili smrti, odnosno bolji DFS, u odnosu na one s  $TIL < 10\%$ . Taj rezultat zadržao se i kada je u multivarijabilnu analizu dodan i parametar  $AR \geq 1\%$ , iako s DFS nije bila statistički značajno povezana interakcija izraženosti  $AR \geq 1\%$ , s brojem odjeljaka s  $TIL \geq 10\%$ .

6. AR nisu bili statistički značajno povezani s OS, nije bilo razlike u petogodišnjem preživljenju bolesnica s  $AR \geq 1\%$ , u odnosu na one s  $AR < 1\%$ , a medijan preživljenja nije dosegnut ni u jednoj skupini. Povezanost TIL s OS bila je statistički značajna, na slijedeći način: sTIL su statistički značajno utjecali na OS, iTIL samo u slučaju  $\geq 10\%$ , a prema odjeljcima – sTIL u CT nakon prilagodbe u multivarijabilnoj analizi nisu zadržali statističku značajnost, dok iTIL u CT jesu u slučaju  $\geq 10\%$ . Na IM sTIL su bili statistički značajan prediktor boljeg OS, a iTIL na IM samo u slučaju  $\geq 10\%$ . Zajednički, AR i TIL, u analizi preživljenja, nakon što su u multivarijabilni model uključena sva četiri odjeljka TIL i AR i sve ostale planirane sociodemografske i kliničkopatološke varijable, prisutnost iTIL u CT bila je statistički značajno negativno povezana s ukupnim petogodišnjim preživljenjem (OS) u AR pozitivnih tumora, dok prisutnost  $TIL \geq 10\%$  i  $AR \geq 1\%$  nije bila statistički značajan, neovisni prediktor OS.

7. AR su se pokazali statistički značajno pozitivno povezanima s dobi i menopauzalnim statusom, a negativno s veličinom tumora, gradusom i Ki-67, kao i stadijem bolesti. Analizom povezanosti  $TIL \geq 10\%$  sa sociodemografskim, kliničkim i patohistološkim varijablama, pokazalo se da su: sTIL u CT statistički značajno povezani s dobi i posljedično menopauzalnim statusom te veličinom tumora, ali bez povezanosti s drugim varijablama, poput histološkog podtipa, statusa limfnih čvorova, gradusa tumora i proliferacijskog indeksa Ki-67; iTIL u CT statistički značajno povezani s histološkim podtipom, odnosno duktalnim karcinomom (NOS), ali i negativno s dobi i menopauzalnim statusom, upravo suprotno od sTIL u ovom odjeljku, a također bez povezanosti s drugim karakteristikama tumora, poput veličine tumora, statusa limfnih čvorova, gradusa ili Ki 67 indeksa; sTIL na IM, kao i iTIL na IM, pokazali su statistički značajnu povezanost s gradusom tumora i proliferacijskim indeksom Ki-67, a bez povezanosti s dobi i menopauzalnim statusom.
8. U ovoj analizi AR se nisu pokazali samostalnim neovisnim čimbenikom prognoze bolesnica s ranim TNRD. TIL su se, kako je već opisano, pokazali statistički značajnim neovisnim prediktorom prognoze, a rezultat je, očekivano, najviše na račun stromalnih TIL. Evaluacija TIL po pojedinim odjeljcima ukazala je na prognostičku vrijednost sTIL na IM. U ovoj analizi se također pokazalo kako se potencijalna dodatna prognostička vrijednost krije i u interakciji AR s sTIL i iTIL na IM, iako su rezultati vrlo male preciznosti i pouzdanosti.

## 8. SAŽETAK

Trostruko negativni rak dojke (TNRD) javlja se u oko šestine svih bolesnica s rakom dojke, najagresivnijeg je ponašanja i najgore prognoze. To je heterogena bolest, sa specifičnim molekularnim karakteristikama i prirodnom dinamikom ranog recidiva i brze progresije. U nedostatku valjanog biobiljega, i time bilo kakvog ciljanog liječenja, danas je okosnica liječenja TNRD kemoterapija, pri čemu se uočava tzv. TNRD paradoks – bolja kemosenzitivnost i odgovor na terapiju, no lošije preživljenje. Danas se sve više nade polaže u pronalazak biobiljega koji će biti od prediktivnog i prognostičkog značaja u TNRD, kao što su to androgeni receptori (AR) i tumor – infiltrirajući limfociti (TIL). Provedena je retrospektivna kohortna studija na susljednom uzorku od 152 bolesnice dijagnosticirane i liječene od ranog TNRD u Klinici za tumore, KBC Sestre milosrdnice, u razdoblju od 1.1.2009. do 31.12.2012. godine. Analizirane su sociodemografske i kliničkopatološke varijable dostupne iz računalnog zapisa te je učinjena imunohistokemijska analiza AR te morfološka HE analiza TIL. Granična vrijednost za pozitivnost AR iznosila je  $\geq 1\%$ , a TIL su analizirani potpuno, stromalni (sTIL) i intratumorski (iTIL), u centralnom tumoru (CT) i na invazivnoj margini (IM). Izračunate su korelacije svih navedenih parametara te petogodišnje preživljenje bez bolesti (DFS) i sveukupno preživljenje (OS). Bolesnice su bile medijana dobi 58 godina, većinom postmenopauzalne, najčešće stadija II bolesti, gradusa III i medijana Ki-67 57%. Liječene su operacijski i potom u gotovo 90% slučajeva adjuvantnom kemoterapijom, uglavnom antraciklinima i taksanima te adjuvantnom radioterapijom. U petogodišnjem praćenju povrat bolesti bilježi se u trećine bolesnica, najčešće u prvoj godini od dijagnoze, uglavnom u obliku udaljene diseminacije u pluća i kosti. Petogodišnji DFS iznosi 67.1%,

a OS 73.7%. Uz povrat bolesti i smrt najznačajnije su bili povezani čimbenici poput mlađe dobi, većih tumora, zahvaćenih limfnih čvorova, odnosno višeg stadija bolesti te višeg proliferacijskog indeksa Ki-67. AR su bili izraženi ( $\geq 1\%$ ) u 31.1% bolesnica, a u njih 18.5% AR su  $>50\%$ . Evaluacijom TIL prema navedenim odjeljcima, najgušće zastupljeni bili su sTIL na IM, s medijanom intenziteta od 30%, i čak 85.5% bolesnica s  $\geq 10\%$ , dok su najrjeđi i najmanjeg intenziteta bili iTIL u CT, s medijanom intenziteta od 1% i tek 23% bolesnica s  $\geq 10\%$  intenzitetom. Ukupno je četvrtina bolesnica imala TIL  $>50\%$  u nekom od evaluiranih odjeljaka. Istovremeno izražene AR ( $\geq 1\%$ ) i prisutne TIL ( $> 1\%$ ) imalo je 30% bolesnica, a izraženost AR nije bila statistički značajno povezana s prisutnošću TIL. Izraženost AR nije pokazala statistički značajan utjecaj na preživljenje bez bolesti, kao niti na ukupno preživljenje. Evaluacija TIL pokazala je statistički značajan povoljan utjecaj na DFS od sTIL na IM, ali ne i od ostalih odjeljaka. Sveukupno, pokazalo se da su bolesnice koje su imale TIL  $\geq 10\%$  u sva četiri evaluirana odjeljka (sTIL i iTIL, u CT i na IM) imale statistički značajno bolji DFS, u odnosu na one s TIL  $< 10\%$ . Stromalni TIL su statistički značajno utjecali na OS, iTIL samo u slučaju  $\geq 10\%$ , sTIL na IM su bili statistički značajan prediktor boljeg OS, a iTIL na IM samo u slučaju intenziteta  $\geq 10\%$ . AR i TIL u analizi preživljenja pokazali su kako je prisutnost iTIL u CT bila statistički značajno negativno povezana s petogodišnjim OS u AR+, dok prisutnost TIL  $\geq 10\%$  i AR  $\geq 1\%$  nije bila statistički značajan, neovisni prediktor OS. AR su se pokazali statistički značajno pozitivno povezanim s dobi i menopauzalnim statusom, a negativno s veličinom tumora, gradusom i Ki-67, kao i stadijem bolesti. Stromalni TIL u CT bili su statistički značajno povezani s dobi i posljedično menopauzalnim statusom te veličinom tumora, ali bez povezanosti s drugim varijablama, poput histološkog podtipa, statusa limfnih čvorova, gradusa i Ki-67; iTIL u CT statistički značajno su pozitivno

povezani s histološkim podtipom, odnosno duktalnim karcinomom (NOS), ali i negativno s dobi i menopauzalnim statusom, upravo suprotno od sTIL u ovom odjeljku, a također bez povezanosti s drugim karakteristikama tumora, poput veličine tumora, statusa limfnih čvorova, gradusa ili Ki 67 indeksa; sTIL na IM, kao i iTIL na IM, pokazali su statistički značajnu povezanost s gradusom tumora i proliferacijskim indeksom Ki-67, a bez povezanosti s dobi i menopauzalnim statusom. U ovoj analizi AR se nisu pokazali samostalnim neovisnim čimbenikom prognoze bolesnica s ranim TNRD. TIL su se, kako je već opisano, pokazali statistički značajnim neovisnim prediktorom prognoze, a rezultat je, očekivano, najviše na račun stromalnih TIL. Evaluacija TIL po pojedinim odjeljcima ukazala je na prognostičku vrijednost sTIL na IM. U ovoj analizi se također pokazalo kako se potencijalna dodatna prognostička vrijednost krije i u interakciji AR s sTIL i iTIL na IM, iako su rezultati vrlo male preciznosti i pouzdanosti. Naši rezultati preživljenja bolesnica s ranim TNRD u skladu su sa sličnim analizama na kohortama bolesnica iz susjednih, ali i udaljenih geografskih oblasti. Kao i u većini analiza, prognostički utjecaj AR nije se pokazao statistički značajnim. Po prvi put, TIL analizirani su sTIL i iTIL, u CT i na IM i uočena je vjerojatno različita, prognostički značajna uloga pojedinog morfološkog odjeljka u tumoru, osobito IM. Svakako najzanimljiviji dio analize bila je korelacija inače neovisnih parametara, AR i TIL, o čemu se danas tek ponešto zna iz sporadičnih osvrta o utjecaju imunosti na molekularne podtipove TNRD i u čemu još nedostaje finalni zaključak, zbog čega i ovom analizom dobiveni zanimljivi preliminarni rezultati svakako zahtijevaju validaciju u većoj, prospektivnoj studiji.

## 9. SUMMARY

Triple-negative breast cancer (TNBC) occurs in about one-sixth of all BC patients, with the most aggressive behavior and the worst prognosis. It is a heterogeneous disease, with specific molecular characteristics and natural dynamics of early relapse and rapid progression. In the absence of a valid biomarker, and thus any targeted treatment, chemotherapy is nowadays still the backbone of treatment, with the so-called. TNBC paradox - better chemosensitivity and response to therapy, but worse survival. Today, more hope lies in finding new biomarkers that will be predictive and prognostic in TNBC, such as androgen receptors (AR) and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL). Retrospective cohort study was conducted on a consecutive sample of 152 patients diagnosed and treated for early TNBC at the University Hospital for Tumors, Sestre milosrdnice University Hospital Center, from Jan 1st 2009 until Dec 31st 2012. Sociodemographic and clinicopathological variables available from the hospital record were analyzed and IHC AR analysis and TIL morphological analysis by HE were performed. Limit for AR positivity was  $\geq 1\%$ , and TILs were fully analyzed, stromal (sTIL) and intratumoral (iTIL), in the central tumor (CT) and at the invasive margin (IM). Correlations of all parameters were calculated as well as 5y DFS and OS. Patients were at median age of 58, mostly postmenopausal, most commonly stage II disease, grade III, and a median Ki-67 of 57%. They were treated surgically and then in almost 90% of cases with adjuvant chemotherapy, mainly anthracyclines and taxanes and adjuvant radiotherapy. At 5y follow-up, disease recurrences are reported in one third of patients, most often in the first year after diagnosis, mainly in the form of distant metastases to the lungs and bones. The 5y DFS was 67.1% and the OS was 73.7%. Factors such as younger age, larger tumors,

involved lymph nodes, or a higher stage of disease, and a higher Ki 67 were most significantly associated with disease recurrence and death. AR were expressed ( $\geq 1\%$ ) in 31.1% of patients, and in 18.5% of them AR were  $> 50\%$ . By evaluating TIL according to the above mentioned technique, sTIL on IM were most frequently represented, with a median intensity of 30%, and as many as 85.5% of patients with  $\geq 10\%$ , while the rarest and of lowest intensity were iTIL in CT, with a median intensity of 1% and 23% of patients with  $\geq 10\%$ . In total, quarter of patients had TIL  $> 50\%$  in any of the evaluated compartments. Around 30% of patients had expressed AR ( $\geq 1\%$ ) and present TIL ( $> 1\%$ ) at the same time, and AR expression was not statistically significantly associated with the presence of TIL. Expression of AR showed no statistically significant effect on DFS, or OS. Evaluation of TIL showed a statistically significant favorable effect on DFS of sTIL on IM, but not of the other compartments. Overall, patients with TIL  $\geq 10\%$  in all four evaluated compartments (sTIL and iTIL, in CT and IM) were shown to have statistically significantly better DFS, compared to those with TIL  $< 10\%$ . Stromal TIL had statistically significant effect on OS, iTIL only in the case of  $\geq 10\%$  intensity, sTIL on IM were statistically significant predictor of better OS, and iTIL on IM only in the case of  $\geq 10\%$  intensity. AR and TIL in the survival analysis showed that the presence of iTIL in CT was significantly negatively associated with 5y OS in AR+ tumors, whereas presence of TIL  $\geq 10\%$  and AR  $\geq 1\%$  was not statistically significant, independent predictor of OS. AR were found to be statistically significantly positively correlated with age and menopausal status, and negatively with tumor size, grade and Ki-67, as well as disease stage. Stromal TIL in CT were statistically significantly associated with age and consequently menopausal status and tumor size, but without correlation with other variables, such as histologic subtype, lymph node status, gradus, and Ki-67; iTIL in CT were statistically

significantly positively associated with histologic subtype, ie NOS, but also negatively with age and menopausal status, exactly opposite to sTIL in this section, and also without association with other tumor characteristics, such as tumor size, status lymph nodes, gradients or Ki 67; sTIL on IM, as well as iTIL on IM, showed statistically significant association with tumor grade and Ki-67, and no association with age and menopausal status. In this analysis, AR did not prove to be an independent factor in the prognosis of patients with early TNBC. TIL, as described above, proved to be a statistically significant independent predictor of prognosis, with the result expected to be mostly at the expense of stromal TIL. Evaluation of TIL by individual compartments indicated the prognostic value of sTIL on IM. This analysis also showed that the potential additional prognostic value lies in the interaction of AR with sTIL and iTIL on IM, although the results are of very low precision and reliability. Our survival outcomes for patients with early TNBC are consistent with similar analyzes in cohorts of patients from neighboring as well as distant geographic areas. As in most analyzes, the prognostic impact of AR did not prove statistically significant. For the first time, TIL were analyzed with sTIL and iTIL, in CT and on IM, and a probably different, prognostically significant role of a particular morphological compartment in the tumor, especially IM, was observed. By far the most interesting part of the analysis was the correlation of otherwise independent parameters, AR and TIL, of which little is known today from sporadic reviews on the effect of immunity on molecular subtypes of TNBC, and which still lacks a definitive conclusion, which is why also this analysis, providing interesting preliminary results, requires validation in a larger, prospective study.



## 10. POPIS LITERATURE

1. Ferlay E, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, i ostali. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J cancer*. 2015.;136(5):E359-86.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj. Bilten br. 42; 2017.
3. Lehrer S, Green S, Rosenzweig KE. Affluence and Breast Cancer. *Breast J*. rujan 2016.;22(5):564–7.
4. Bray F, Ren J-S, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 01. ožujak 2013.;132(5):1133–45.
5. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, i ostali. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol*. rujan 2016.;27(suppl\_5):v103–10.
6. Singletary SE. Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Ann Surg*. travanj 2003.;237(4):474–82.
7. Plescia M, White MC. The National Prevention Strategy and Breast Cancer Screening: Scientific Evidence for Public Health Action. *Am J Public Health*. rujan 2013.;103(9):1545–8.
8. HZJZ. Nacionalni programi ranog otkrivanja raka dojke [Internet]. Nacionalni program ranog otkrivanja raka. 2018 [citirano 01. kolovoz 2019.]. str. <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/nacionalni-program>. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/nacionalni-program-ranog-otkrivanja-raka-dojke/>
9. Dedić Plavetić N, Silovski T, Tečić Vuger A, Pavlović M, Vazdar L, Herceg D, i ostali. Smjernice za provođenje dijagnostičkih pretraga prije početka liječenja onkološkog bolesnika – Kliničke preporuke Hrvatskog društva za internističku onkologiju HLZ II. dio: rak dojke, ginekološki tumori (rak jajnika, rak tijela maternice, rak vrata mate. *Liječ Vjesn*. 2018.;140:92–105.
10. Warner ET, Tamimi RM, Hughes ME, Ottesen RA, Wong Y-N, Edge SB, i ostali. Time to diagnosis and breast cancer stage by race/ethnicity. *Breast Cancer Res Treat*. 26. prosinac 2012.;136(3):813–21.
11. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, Zackrisson S, Senkus E, on behalf of the ESMO Guidelines Committee. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 4. srpanj 2019.;30:1194–1220.
12. Cardoso F, Senkus E, Costa A, Papadopoulos E, Aapro M, André F, i ostali. 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 01. kolovoz 2018.;29(8):1634–57.

13. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, i ostali. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 17. listopad 2002.;347(16):1233–41.
14. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet (London, England).* 2005.;365(9472):1687–717.
15. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnani M, Dubsky P, Loibl S, i ostali. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol.* 01. kolovoz 2017.;28(8):1700–12.
16. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, i ostali. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet.* srpanj 2014.;384(9938):164–72.
17. Giuliano AE, Ballman K V., McCall L, Beitsch PD, Brennan MB, Kelemen PR, i ostali. Effect of Axillary Dissection vs No Axillary Dissection on 10-Year Overall Survival Among Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis. *JAMA.* 12. rujan 2017.;318(10):918.
18. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol Oncol.* lipanj 2010.;4(3):192–208.
19. Mamouch F, Berrada N, Aoullay Z, El Khanoussi B, Errihani H. Inflammatory Breast Cancer: A Literature Review. *World J Oncol.* 2018.;9(5–6):129–35.
20. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi GN. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 18. srpanj 2018.;25(7):1783–5.
21. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. Author Commentary. *Histopathology.* rujan 2002.;41(3a):151–151.
22. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, i ostali. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci.* 11. rujan 2001.;98(19):10869–74.
23. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, i ostali. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 12. srpanj 2018.;379(2):111–21.
24. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, i ostali. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med.* 25. kolovoz 2016.;375(8):717–29.
25. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, i ostali. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast.* studeni 2015.;24:S26–35.
26. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, i ostali.

- American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* lipanj 2010.;134(6):907–22.
27. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, i ostali. 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.* 10. srpanj 2018.;36(20):2105–22.
  28. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, i ostali. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health Recurrence Score in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 10. studeni 2011.;29(32):4273–8.
  29. Vasconcelos I, Hussainzada A, Berger S, Fietze E, Linke J, Siedentopf F, i ostali. The St. Gallen surrogate classification for breast cancer subtypes successfully predicts tumor presenting features, nodal involvement, recurrence patterns and disease free survival. *The Breast.* listopad 2016.;29:181–5.
  30. Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* lipanj 2001.;27(3):137–42.
  31. Cianfrocca M. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *Oncologist.* 01. studeni 2004.;9(6):606–16.
  32. Rakha EA, Soria D, Green AR, Lemetre C, Powe DG, Nolan CC, i ostali. Nottingham Prognostic Index Plus (NPI+): a modern clinical decision making tool in breast cancer. *Br J Cancer.* 11. travanj 2014.;110(7):1688–97.
  33. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, i ostali. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 20. listopad 2005.;353(16):1659–72.
  34. Hudis CA, Gianni L. Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *Oncologist.* 01. siječanj 2011.;16(Supplement 1):1–11.
  35. Mills MN, Yang GQ, Oliver DE, Liveringhouse CL, Ahmed KA, Orman AG, i ostali. Histologic heterogeneity of triple negative breast cancer: A National Cancer Centre Database analysis. *Eur J Cancer.* srpanj 2018.;98:48–58.
  36. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application? *J Clin Oncol.* 10. listopad 2005.;23(29):7350–60.
  37. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, i ostali. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol.* 01. travanj 2018.;29(4):895–902.
  38. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, i ostali. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 01. srpanj 2011.;121(7):2750–67.

39. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, i ostali. Differential Response to Neoadjuvant Chemotherapy Among 7 Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes. *Clin Cancer Res.* 01. listopad 2013.;19(19):5533–40.
40. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, i ostali. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 01. travanj 2015.;21(7):1688–98.
41. Jézéquel P, Loussouarn D, Guérin-Charbonnel C, Champion L, Vanier A, Gouraud W, i ostali. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res.* 20. prosinac 2015.;17(1):43.
42. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, i ostali. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res.* 01. ožujak 2008.;14(5):1368–76.
43. He Y, Jiang Z, Chen C, Wang X. Classification of triple-negative breast cancers based on Immunogenomic profiling. *J Exp Clin Cancer Res.* 29. prosinac 2018.;37(1):327.
44. Choo JR, Nielsen TO. Biomarkers for Basal-like Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 28. svibanj 2010.;2(2):1040–65.
45. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol.* 28. prosinac 2010.;7(12):683–92.
46. Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D. Basal Breast Cancer: A Complex and Deadly Molecular Subtype. *Curr Mol Med.* 01. siječanj 2012.;12(1):96–110.
47. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 11. studeni 2010.;363(20):1938–48.
48. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology.* 13. prosinac 2007.;52(1):108–18.
49. Peshkin BN, Alabek ML, Isaacs C. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. Eng-Wong J, Zujewski JA, urednici. *Breast Dis.* 15. ožujak 2011.;32(1–2):25–33.
50. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of „BRCAness“ in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer.* listopad 2004.;4(10):814–9.
51. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer.* 18. veljača 2016.;16(2):110–20.
52. Anders CK, Carey LA. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* lipanj 2009.;9:S73–81.
53. Jitariu A-A, Cîmpean AM, Ribatti D, Raica M. Triple negative breast cancer: the kiss of death. *Oncotarget.* 11. srpanj 2017.;8(28):46652–62.
54. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, i ostali. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 10. ožujak 2008.;26(8):1275–81.

55. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, i ostali. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemoresensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clin Cancer Res.* 15. travanj 2007.;13(8):2329–34.
56. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, i ostali. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res.* 01. kolovoz 2007.;13(15):4429–34.
57. Gadi VK, Davidson NE. Practical Approach to Triple-Negative Breast Cancer. *J Oncol Pract.* svibanj 2017.;13(5):293–300.
58. Amos KD, Adamo B, Anders CK. Triple-Negative Breast Cancer: An Update on Neoadjuvant Clinical Trials. *Int J Breast Cancer.* 2012.;2012:1–7.
59. Isakoff SJ. Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer J.* siječanj 2010.;16(1):53–61.
60. Mustacchi G, De Laurentiis M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. *Drug Des Devel Ther.* kolovoz 2015.;4303.
61. Curigliano G. Addition of platinum salts to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a new standard of care? *Lancet Oncol.* travanj 2018.;19(4):434–6.
62. Papadimitriou M, Mountzios G, Papadimitriou CA. The role of PARP inhibition in triple-negative breast cancer: Unraveling the wide spectrum of synthetic lethality. *Cancer Treat Rev.* lipanj 2018.;67:34–44.
63. Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med.* lipanj 2015.;12(2):106–16.
64. Jerusalem G, Collignon J, Schroeder H, Lousberg L. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer Targets Ther.* svibanj 2016.;93.
65. Lehmann BD, Pietenpol JA, Tan AR. Triple-Negative Breast Cancer: Molecular Subtypes and New Targets for Therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ B.* 2015.;35:e31–9.
66. Yadav BS. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J Clin Oncol.* 2015.;6(6):252.
67. Millis SZ, Gatalica Z, Winkler J, Vranic S, Kimbrough J, Reddy S, i ostali. Predictive Biomarker Profiling of > 6000 Breast Cancer Patients Shows Heterogeneity in TNBC, With Treatment Implications. *Clin Breast Cancer.* prosinac 2015.;15(6):473-481.e3.
68. Uscanga-Perales GI, Santuario-Facio SK, Ortiz-López R. Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Med Univ.* travanj 2016.;18(71):105–14.
69. Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev.* veljača 2016.;37(1):3–15.
70. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 09. siječanj 2015.;36(1):3–23.
71. Fujita K, Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health.* 2018.;36.

72. Antonarakis E. AR Signaling in Human Malignancies: Prostate Cancer and Beyond. *Cancers (Basel)*. 18. siječanj 2018.;10(1):22.
73. Li P, Chen J, Miyamoto H. Androgen Receptor Signaling in Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 22. veljača 2017.;9(12):20.
74. Dalin M, Watson P, Ho A, Morris L. Androgen Receptor Signaling in Salivary Gland Cancer. *Cancers (Basel)*. 08. veljača 2017.;9(12):17.
75. Kanda T, Jiang X, Yokosuka O. Androgen receptor signaling in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancers. *World J Gastroenterol*. 28. srpanj 2014.;20(28):9229–36.
76. Wang Y, Ou Z, Sun Y, Yeh S, Wang X, Long J, i ostali. Androgen receptor promotes melanoma metastasis via altering the miRNA-539-3p/USP13/MITF/AXL signals. *Oncogene*. 21. ožujak 2017.;36(12):1644–54.
77. Foersch S, Schindeldecker M, Keith M, Tagscherer KE, Fernandez A, Stenzel PJ, i ostali. Prognostic relevance of androgen receptor expression in renal cell carcinomas. *Oncotarget*. 03. listopad 2017.;8(45).
78. Berardi R, Morgese F, Santinelli A, Onofri A, Biscotti T, Brunelli A, i ostali. Hormonal receptors in lung adenocarcinoma: expression and difference in outcome by sex. *Oncotarget*. 13. prosinac 2016.;7(50).
79. Pang TPS, Clarke M V., Ghasem-Zadeh A, Lee NKL, Davey RA, MacLean HE. A physiological role for androgen actions in the absence of androgen receptor DNA binding activity. *Mol Cell Endocrinol*. siječanj 2012.;348(1):189–97.
80. Grossmann M, Cheung AS, Zajac JD. Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. kolovoz 2013.;27(4):603–16.
81. Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common Gene Rearrangements in Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 20. rujan 2011.;29(27):3659–68.
82. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, i ostali. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell*. srpanj 2010.;18(1):11–22.
83. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, Tannock I, i ostali. Prostate cancer. *Lancet*. siječanj 2016.;387(10013):70–82.
84. Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P, Diaz-Padilla I, Bedard PL, Al-Mubarak M, i ostali. Androgen Receptor Expression and Outcomes in Early Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 01. siječanj 2014.;106(1):djt319–djt319.
85. Park S, Koo J, Park HS, Kim J-H, Choi S-Y, Lee JH, i ostali. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol*. 01. ožujak 2010.;21(3):488–92.
86. Safarpour D, Pakneshan S, Tavassoli FA. Androgen receptor (AR) expression in 400 breast carcinomas: is routine AR assessment justified? *Am J Cancer Res*. 2014.;4(4):353–68.
87. Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Centenera MM, Harris JM, i

- ostali. Androgen Receptor Inhibits Estrogen Receptor- Activity and Is Prognostic in Breast Cancer. *Cancer Res.* 01. kolovoz 2009.;69(15):6131–40.
88. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ, Tamimi RM. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol.* 06. srpanj 2011.;24(7):924–31.
  89. Qu Q, Mao Y, Fei X, Shen K. The Impact of Androgen Receptor Expression on Breast Cancer Survival: A Retrospective Study and Meta-Analysis. Aziz SA, urednik. *PLoS One.* 04. prosinac 2013.;8(12):e82650.
  90. Kim Y, Jae E, Yoon M. Influence of Androgen Receptor Expression on the Survival Outcomes in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *J Breast Cancer.* 2015.;18(2):134.
  91. Castellano I, Allia E, Accortanzo V, Vandone AM, Chiusa L, Arisio R, i ostali. Androgen receptor expression is a significant prognostic factor in estrogen receptor positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 03. prosinac 2010.;124(3):607–17.
  92. Hu R, Dawood S, Holmes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Cole K, i ostali. Androgen Receptor Expression and Breast Cancer Survival in Postmenopausal Women. *Clin Cancer Res.* 01. travanj 2011.;17(7):1867–74.
  93. Agoff, MD SN, Swanson, MD PE, Linden, MD H, Hawes, PhD SE, Lawton, MD TJ. Androgen Receptor Expression in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer Immunohistochemical, Clinical, and Prognostic Associations. *Am J Clin Pathol.* 01. studeni 2003.;120(5):725–31.
  94. Luo X, Shi Y-X, Li Z-M, Jiang W-Q. Expression and clinical significance of androgen receptor in triple negative breast cancer. *Chin J Cancer.* lipanj 2010.;29(6):585–90.
  95. Narayanan R, Dalton JT. Androgen Receptor: A Complex Therapeutic Target for Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2016.;8(12).
  96. Rahim B, O'Regan R. AR Signaling in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 24. veljača 2017.;9(12):21.
  97. Giovannelli P, Di Donato M, Galasso G, Di Zazzo E, Bilancio A, Migliaccio A. The Androgen Receptor in Breast Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 28. kolovoz 2018.;9.
  98. Sutton LM, Cao D, Sarode V, Molberg KH, Torgbe K, Haley B, i ostali. Decreased Androgen Receptor Expression Is Associated With Distant Metastases in Patients With Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 01. listopad 2012.;138(4):511–6.
  99. Gasparini P, Fassan M, Cascione L, Guler G, Balci S, Irkkan C, i ostali. Androgen Receptor Status Is a Prognostic Marker in Non-Basal Triple Negative Breast Cancers and Determines Novel Therapeutic Options. Sapino A, urednik. *PLoS One.* 05. veljača 2014.;9(2):e88525.
  100. Park JJ, Irvine RA, Buchanan G, Koh SS, Park JM, Tilley WD, i ostali. Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) is a coactivator of the androgen receptor. *Cancer Res.* 01. studeni 2000.;60(21):5946–9.

101. Astvatsaturyan K, Yue Y, Walts AE, Bose S. Androgen receptor positive triple negative breast cancer: Clinicopathologic, prognostic, and predictive features. Ahmad A, urednik. PLoS One. 08. lipanj 2018.;13(6):e0197827.
102. Kucukzeybek BB, Bayoglu I V., Kucukzeybek Y, Yıldız Y, Oflazoglu U, Atahan MK, i ostali. Prognostic significance of androgen receptor expression in HER2-positive and triple-negative breast cancer. Polish J Pathol. 2018.;69(2):157–68.
103. Bozovic-Spasojevic I, Zardavas D, Brohée S, Ameye L, Fumagalli D, Ades F, i ostali. The Prognostic Role of Androgen Receptor in Patients with Early-Stage Breast Cancer: A Meta-analysis of Clinical and Gene Expression Data. Clin Cancer Res. 01. lipanj 2017.;23(11):2702–12.
104. McNamara KM, Yoda T, Takagi K, Miki Y, Suzuki T, Sasano H. Androgen receptor in triple negative breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. siječanj 2013.;133:66–76.
105. Zhang Q, Qin J, Zhong L, Gong L, Zhang B, Zhang Y, i ostali. CCL5-Mediated Th2 Immune Polarization Promotes Metastasis in Luminal Breast Cancer. Cancer Res. 15. listopad 2015.;75(20):4312–21.
106. Ricciardi GRR, Adamo B, Ieni A, Licata L, Cardia R, Ferraro G, i ostali. Androgen Receptor (AR), E-Cadherin, and Ki-67 as Emerging Targets and Novel Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Patients. Santini D, urednik. PLoS One. 03. lipanj 2015.;10(6):e0128368.
107. Gucaip A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, i ostali. Phase II Trial of Bicalutamide in Patients with Androgen Receptor-Positive, Estrogen Receptor-Negative Metastatic Breast Cancer. Clin Cancer Res. 01. listopad 2013.;19(19):5505–12.
108. Traina TA, Miller K, Yardley DA, Eakle J, Schwartzberg LS, O'Shaughnessy J, i ostali. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. J Clin Oncol. 20. ožujak 2018.;36(9):884–90.
109. Rampurwala M, Wisinski KB, O'Regan R. Role of the androgen receptor in triple-negative breast cancer. Clin Adv Hematol Oncol. ožujak 2016.;14(3):186–93.
110. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 9. izd. Elsevier; 2017.
111. Vigneron N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. Biomed Res Int. 2015.;2015:1–17.
112. Finn OJ. A Believer's Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy. J Immunol. 15. siječanj 2018.;200(2):385–91.
113. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. J Clin Invest. 01. svibanj 2007.;117(5):1137–46.
114. Whiteside TL. Immune responses to malignancies. J Allergy Clin Immunol. veljača 2010.;125(2):S272–83.
115. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Cell. ožujak 2010.;140(6):883–99.



116. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol.* travanj 2004.;22(1):329–60.
117. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. *Am J Clin Oncol.* veljača 2016.;39(1):98–106.
118. Nathan MR, Schmid P. The emerging world of breast cancer immunotherapy. *The Breast.* veljača 2018.;37:200–6.
119. Nakasone ES, Hurvitz SA, McCann KE. Harnessing the immune system in the battle against breast cancer. *Drugs Context.* 12. veljača 2018.;7:1–21.
120. Sharma P, Allison JP. Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential. *Cell.* travanj 2015.;161(2):205–14.
121. Nanda R, Liu MC, Yau C, Asare S, Hylton N, Veer LV, i ostali. Pembrolizumab plus standard neoadjuvant therapy for high-risk breast cancer (BC): Results from I-SPY 2. *J Clin Oncol.* 20. svibanj 2017.;35(15\_suppl):506–506.
122. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, i ostali. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 29. studeni 2018.;379(22):2108–21.
123. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* ožujak 2011.;144(5):646–74.
124. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, i ostali. Tumor-Infiltrating CD8 + Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 20. svibanj 2011.;29(15):1949–55.
125. Oldford SA, Robb JD, Codner D, Gadag V, Watson PH, Drover S. Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int Immunol.* 05. rujun 2006.;18(11):1591–602.
126. Brunner-Weinzierl MC, Rudd CE. CTLA-4 and PD-1 Control of T-Cell Motility and Migration: Implications for Tumor Immunotherapy. *Front Immunol.* 27. studeni 2018.;9.
127. Santegoets SJ, van Ham VJ, Ehsan I, Charoentong P, Durland CL, van Unen V, i ostali. The Anatomical Location Shapes the Immune Infiltrate in Tumors of Same Etiology and Affects Survival. *Clin Cancer Res.* 01. siječanj 2019.;25(1):240–52.
128. Stoll G, Zitvogel L, Kroemer G. Immune infiltrate in cancer. *Aging (Albany NY).* 25. lipanj 2015.;7(6):358–9.
129. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 26. rujun 2015.;26(suppl 5):v126–32.
130. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, i ostali. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for

Further Research . *Adv Anat Pathol.* 2017.;24(5):235–51.

131. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer.* 15. lipanj 2001.;91(12):2417–22.
132. Rozek LS, Schmit SL, Greenson JK, Tomsho LP, Rennert HS, Rennert G, i ostali. Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Crohn's-Like Lymphoid Reaction, and Survival From Colorectal Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst.* kolovoz 2016.;108(8).
133. Hwang W-T, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol.* veljača 2012.;124(2):192–8.
134. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, Hald SM, i ostali. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol.* veljača 2016.;27(2):225–32.
135. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, i ostali. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 01. listopad 2018.;29(Supplement\_4):iv192–237.
136. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, i ostali. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* veljača 2015.;26(2):259–71.
137. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, i ostali. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol.* 20. rujan 2014.;32(27):2959–66.
138. Ali HR, Provenzano E, Dawson S-J, Blows FM, Liu B, Shah M, i ostali. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann Oncol.* kolovoz 2014.;25(8):1536–43.
139. West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 08. prosinac 2011.;13(6):R126.
140. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, i ostali. Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* ožujak 2013.;31(7):860–7.
141. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, i ostali. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol.* kolovoz 2014.;25(8):1544–50.
142. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, i ostali. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-

Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol.* ožujak 2019.;37(7):559–69.

143. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, i ostali. Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* siječanj 2010.;28(1):105–13.
144. Buisseret L, Desmedt C, Garaud S, Fornili M, Wang X, Van den Eyden G, i ostali. Reliability of tumor-infiltrating lymphocyte and tertiary lymphoid structure assessment in human breast cancer. *Mod Pathol.* 16. rujanj 2017.;30(9):1204–12.
145. Ogiya R, Niikura N, Kumaki N, Bianchini G, Kitano S, Iwamoto T, i ostali. Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. *Cancer Sci.* prosinac 2016.;107(12):1730–5.
146. Pruneri G, Vingiani A, Denkert C. Tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. *The Breast.* veljača 2018.;37:207–14.
147. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer.* 18. prosinac 2016.;4(1):59.
148. Hammerl D, Smid M, Timmermans AM, Sleijfer S, Martens JWM, Debets R. Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. *Semin Cancer Biol.* 2018.;52(Pt 2):178–88.
149. Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen K. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 13. travanj 2016.;11(4):e0152500.
150. Yu X, Zhang Z, Wang Z, Wu P, Qiu F, Huang J. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol.* 12. svibanj 2016.;18(5):497–506.
151. Chan MS, Wang L, Felizola SJ, Ueno T, Toi M, Loo W, i ostali. Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients – an immunohistochemical study of cd8+ and foxp3+ using double immunostaining with correlation to the pat. *Int J Biol Markers.* 2012.;27(4):295–304.
152. Liu Z, Li M, Jiang Z, Wang X. A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer. *Transl Oncol.* travanj 2018.;11(2):311–29.
153. Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* prosinac 2014.;148(3):467–76.
154. Pruneri G, Vingiani A, Bagnardi V, Rotmensz N, De Rose A, Palazzo A, i ostali. Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* veljača 2016.;27(2):249–56.
155. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* 15. ožujak 2012.;14(2):R48.

156. Tao Tan L, Liu J, Cheng K, Wang XH, Zhang YZ, Teng X fei, i ostali. Prediction Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer Patients Received the Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-Analysis. *Chemother Open Access*. 2017.;06(04).
157. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Hatano T, i ostali. Prediction of Treatment Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer by Subtype Using Tumor-infiltrating Lymphocytes. *Anticancer Res*. 2018.;38(4):2311–21.
158. Herrero-Vicent C, Guerrero A, Gavilá J, Gozalbo F, Hernández A, Sandiego S, i ostali. Predictive and prognostic impact of tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ecancermedalscience*. 2017.;11:759.
159. Mao Y, Qu Q, Zhang Y, Liu J, Chen X, Shen K. The Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) for Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Beck AH, urednik. PLoS One*. 12. prosinac 2014.;9(12):e115103.
160. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, i ostali. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 12. travanj 2012.;132(3):793–805.
161. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, i ostali. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol. ožujak 2014.*;25(3):611–8.
162. García-Martínez E, Gil GL, Benito AC, González-Billalabeitia E, Conesa MAV, García García T, i ostali. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 29. studeni 2014.;16(6):488.
163. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, i ostali. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*. 10. ožujak 2014.;6(7):5449–64.
164. Kitano A, Ono M, Yoshida M, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, i ostali. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO Open*. 02. svibanj 2017.;2(2):e000150.
165. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 27. studeni 2013.;310(20):2191–4.
166. Ovcaricek T, Frkovic S, Matos E, Mozina B, Borstnar S. Triple negative breast cancer - prognostic factors and survival. *Radiol Oncol*. 01. siječanj 2011.;45(1).
167. Pistelli M, Pagliacci A, Battelli N, Santinelli A, Biscotti T, Ballatore Z, i ostali. Prognostic factors in early-stage triple-negative breast cancer: lessons and limits from clinical practice. *Anticancer Res*. lipanj 2013.;33(6):2737–42.
168. Urru SAM, Gallus S, Bosetti C, Moi T, Medda R, Sollai E, i ostali. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer

- patients. *BMC Cancer*. 08. prosinac 2018.;18(1):56.
169. Gonçalves H, Guerra MR, Duarte Cintra JR, Fayer VA, Brum IV, Bustamante Teixeira MT. Survival Study of Triple-Negative and Non-Triple-Negative Breast Cancer in a Brazilian Cohort. *Clin Med Insights Oncol*. 2018.;12:1179554918790563.
  170. James M, Dixit A, Robinson B, Frampton C, Davey V. Outcomes for Patients with Non-metastatic Triple-negative Breast Cancer in New Zealand. *Clin Oncol. siječanj 2019.*;31(1):17–24.
  171. Chintalapani S, Bala S, Konatam M, Gundeti S, Kuruva S, Hui M. Triple-negative breast cancer: Pattern of recurrence and survival outcomes. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2019.;40(1):67.
  172. Fayaz S, Demian GA, El-Sherify M, Eissa H, Aziz M, Abuzallouf S. Triple Negative Breast Cancer: 10-Year Survival Update of The Applied Treatment Strategy in Kuwait. *Gulf J Oncolog. siječanj 2019.*;1(29):53–9.
  173. Akdeniz A, Yalcin S, Rahatli S, Kucukoztas N, Yagmurdur MC, Dizdar O, i ostali. Clinical and pathological characteristics of triple-negative breast cancer patients: A single-center experience. *J Clin Oncol*. 20. svibanj 2012.;30(15\_suppl):e11515–e11515.
  174. Qiu J, Xue X, Hu C, Xu H, Kou D, Li R, i ostali. Comparison of Clinicopathological Features and Prognosis in Triple-Negative and Non-Triple Negative Breast Cancer. *J Cancer*. 2016.;7(2):167–73.
  175. Chen T, Zhang N, Moran MS, Su P, Haffty BG, Yang Q. Borderline ER-Positive Primary Breast Cancer Gains No Significant Survival Benefit From Endocrine Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Breast Cancer*. veljača 2018.;18(1):1–8.
  176. Plasilova ML, Hayse B, Killelea BK, Horowitz NR, Chagpar AB, Lannin DR. Features of triple-negative breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. kolovoz 2016.;95(35):e4614.
  177. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong Y-N, i ostali. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*. 15. studeni 2012.;118(22):5463–72.
  178. Steward L, Conant L, Gao F, Margenthaler JA. Predictive factors and patterns of recurrence in patients with triple negative breast cancer. *Ann Surg Oncol. srpanj 2014.*;21(7):2165–71.
  179. Moinfar F, Okcu M, Tsybrovskyy O, Regitnig P, Lax SF, Weybora W, i ostali. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas. *Cancer*. 15. kolovoz 2003.;98(4):703–11.
  180. Hall RE, Aspinall JO, Horsfall DJ, Birrell SN, Bentel JM, Sutherland RL, i ostali. Expression of the androgen receptor and an androgen-responsive protein, apolipoprotein D, in human breast cancer. *Br J Cancer*. listopad 1996.;74(8):1175–80.
  181. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Christenson JL, Elias A, Richer JK. Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease. *Horm Cancer*. prosinac 2015.;6(5–6):206–13.

182. Micello D, Marando A, Sahnane N, Riva C, Capella C, Sessa F. Androgen receptor is frequently expressed in HER2-positive, ER/PR-negative breast cancers. *Virchows Arch.* 31. listopada 2010.;457(4):467–76.
183. Masuda H, Masuda N, Kodama Y, Ogawa M, Karita M, Yamamura J, i ostali. Predictive factors for the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in triple-negative breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 01. travanj 2011.;67(4):911–7.
184. Hanley K, Wang J, Bourne P, Yang Q, Gao AC, Lyman G, i ostali. Lack of expression of androgen receptor may play a critical role in transformation from in situ to invasive basal subtype of high-grade ductal carcinoma of the breast. *Hum Pathol.* ožujak 2008.;39(3):386–92.
185. Mrklič I, Pogorelič Z, Čapkun V, Tomić S. Expression of androgen receptors in triple negative breast carcinomas. *Acta Histochem. svibanj 2013.;115(4):344–8.*
186. He XZ. Diabetes care for older patients in America. *Int J Clin Pract.* ožujak 2012.;66(3):299–304.
187. Pristauz G, Petru E, Stacher E, Geigl JB, Schwarzbraun T, Tsybrovskyy O, i ostali. Androgen receptor expression in breast cancer patients tested for BRCA1 and BRCA2 mutations. *Histopathology.* prosinac 2010.;57(6):877–84.
188. Tang D, Xu S, Zhang Q, Zhao W. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer. *Med Oncol.* 26. lipanj 2012.;29(2):526–33.
189. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 01. siječanj 2007.;109(1):25–32.
190. Loibl S, Müller BM, von Minckwitz G, Schwabe M, Roller M, Darb-Esfahani S, i ostali. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 12. studeni 2011.;130(2):477–87.
191. Gucalp A, Traina TA. Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer J.* siječanj 2010.;16(1):62–5.
192. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, i ostali. Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers. *Ann Oncol.* kolovoz 2011.;22(8):1755–62.
193. McGhan LJ, McCullough AE, Protheroe CA, Dueck AC, Lee JJ, Nunez-Nateras R, i ostali. Androgen Receptor-Positive Triple Negative Breast Cancer: A Unique Breast Cancer Subtype. *Ann Surg Oncol.* 18. veljača 2014.;21(2):361–7.
194. Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Jindal S, Butler LM, Leung S, McNeil CM, i ostali. The Magnitude of Androgen Receptor Positivity in Breast Cancer Is Critical for Reliable Prediction of Disease Outcome. *Clin Cancer Res.* 15. svibanj 2018.;24(10):2328–41.
195. Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Palla SL, Carey M, Agarwal R, Meric-Berstam F, i ostali. Androgen Receptor Levels and Association with PIK3CA Mutations and Prognosis in Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 10. ožujak 2009.;15(7):2472–8.

196. Tokunaga E, Hisamatsu Y, Taketani K, Yamashita N, Akiyoshi S, Okada S, i ostali. Differential impact of the expression of the androgen receptor by age in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Med.* prosinac 2013.;2(6):763–73.
197. Bratthauer GL, Lininger RA, Man Y, Tavassoli FA. Androgen and Estrogen Receptor mRNA Status in Apocrine Carcinomas. *Diagnostic Mol Pathol.* lipanj 2002.;11(2):113–8.
198. Tsutsumi Y. Apocrine Carcinoma as Triple-negative Breast Cancer: Novel Definition of Apocrine-type Carcinoma as Estrogen/Progesterone Receptor-negative and Androgen Receptor-positive Invasive Ductal Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 01. svibanj 2012.;42(5):375–86.
199. Choi JE, Kang SH, Lee SJ, Bae YK. Androgen Receptor Expression Predicts Decreased Survival in Early Stage Triple-Negative Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 22. siječanj 2015.;22(1):82–9.
200. Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, i ostali. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene.* 20. lipanj 2006.;25(28):3994–4008.
201. Maeda T, Nakanishi Y, Hirotani Y, Fuchinoue F, Enomoto K, Sakurai K, i ostali. Immunohistochemical co-expression status of cytokeratin 5/6, androgen receptor, and p53 as prognostic factors of adjuvant chemotherapy for triple negative breast cancer. *Med Mol Morphol.* 26. ožujak 2016.;49(1):11–21.
202. Pistelli M, Caramanti M, Biscotti T, Santinelli A, Pagliacci A, De Lisa M, i ostali. Androgen Receptor Expression in Early Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Significance and Prognostic Associations. *Cancers (Basel).* 27. lipanj 2014.;6(3):1351–62.
203. Wang C, Pan B, Zhu H, Zhou Y, Mao F, Lin Y, i ostali. Prognostic value of androgen receptor in triple negative breast cancer: A meta-analysis. *Oncotarget.* 19. srpanj 2016.;7(29):46482–91.
204. Qi J, Yang Y, Zhu H, Wang J, Jia Y, Liu N, i ostali. Expression of the Androgen Receptor and its Correlation with Molecular Subtypes in 980 Chinese Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Basic Clin Res.* 06. siječanj 2012.;6:BCBCR.S8323.
205. Ogawa Y, Hai E, Matsumoto K, Ikeda K, Tokunaga S, Nagahara H, i ostali. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol.* 23. listopad 2008.;13(5):431–5.
206. Thike AA, Yong-Zheng Chong L, Cheok PY, Li HH, Wai-Cheong Yip G, Huat Bay B, i ostali. Loss of androgen receptor expression predicts early recurrence in triple-negative and basal-like breast cancer. *Mod Pathol.* 09. ožujak 2014.;27(3):352–60.
207. Kuenen-Boumeester V, Van der Kwast TH, Claassen CC, Look MP, Liem GS, Klijn JGM, i ostali. The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer.* kolovoz 1996.;32(9):1560–5.
208. Birrell SN, Hall RE, Tilley WD. Role of the androgen receptor in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* siječanj 1998.;3(1):95–103.

209. Cops EJ, Bianco-Miotto T, Moore NL, Clarke CL, Birrell SN, Butler LM, i ostali. Antiproliferative actions of the synthetic androgen, mibolerone, in breast cancer cells are mediated by both androgen and progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* lipanj 2008.;110(3–5):236–43.
210. He J, Peng R, Yuan Z, Wang S, Peng J, Lin G, i ostali. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol.* 25. lipanj 2012.;29(2):406–10.
211. Lehmann-Che J, Hamy A-S, Porcher R, Barritault M, Bouhidel F, Habuelleh H, i ostali. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDPF15. *Breast Cancer Res.* 11. lipanj 2013.;15(3):R37.
212. Bozovic-Spasojevic I, Zardavas D, Brohée S, Ameye L, Fumagalli D, Ades F, i ostali. The Prognostic Role of Androgen Receptor in Patients with Early-Stage Breast Cancer: A Meta-analysis of Clinical and Gene Expression Data. *Clin Cancer Res.* 01. lipanj 2017.;23(11):2702–12.
213. Gerratana L, Basile D, Buono G, De Placido S, Giuliano M, Minichillo S, i ostali. Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype. *Cancer Treat Rev.* srpanj 2018.;68:102–10.
214. Bhattarai S, Klimov S, Mittal K, Krishnamurti U, Li X, Oprea-Ilies G, i ostali. Prognostic Role of Androgen Receptor in Triple Negative Breast Cancer: A Multi-Institutional Study. *Cancers (Basel).* 17. srpanj 2019.;11(7):995.
215. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn B V, Gade S, Kronenwett R, i ostali. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol.* 2015.;33(9):983–91.
216. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, i ostali. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* 2013.;31(7):860–7.
217. Issa-Nummer Y, Darb-Esfahani S, Loibl S, Kunz G, Nekljudova V, Schrader I, i ostali. Prospective Validation of Immunological Infiltrate for Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in HER2-Negative Breast Cancer – A Substudy of the Neoadjuvant GeparQuinto Trial. *Glynn SA, urednik. PLoS One.* 02. prosinac 2013.;8(12):e79775.
218. Denkert C, Wienert S, Poterie A, Loibl S, Budczies J, Badve S, i ostali. Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group. *Mod Pathol.* 01. listopad 2016.;29(10):1155–64.
219. Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, Kim HJ, Jang MH, Lee HE, i ostali. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer.* 15. studeni 2013.;109(10):2705–13.



220. Hornychová H, Melichar B, Tomšová M, Mergancová J, Urminská H, Ryška A. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predict Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Carcinoma. *Cancer Invest.* 11. siječanj 2008.;26(10):1024–31.
221. Oda N, Shimazu K, Naoi Y, Morimoto K, Shimomura A, Shimoda M, i ostali. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 18. studeni 2012.;136(1):107–16.
222. Nabholz JM, Abrial C, Mouret-Reynier MA, Dauplat MM, Weber B, Gligorov J, i ostali. Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol.* kolovoz 2014.;25(8):1570–7.
223. Schalper KA. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology.* 25. lipanj 2014.;3(6):e29288.
224. Lee HJ, Kim JY, Park IA, Song IH, Yu JH, Ahn J-H, i ostali. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and the Tertiary Lymphoid Structures in HER2-Positive Breast Cancer Treated With Adjuvant Trastuzumab. *Am J Clin Pathol.* 01. kolovoz 2015.;144(2):278–88.
225. Vinayak S, Gray RJ, Adams S, Jensen KC, Manola J, Afghahi A, i ostali. Association of increased tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with immunomodulatory (IM) triple-negative breast cancer (TNBC) subtype and response to neoadjuvant platinum-based therapy in PrECOG0105. *J Clin Oncol.* 20. svibanj 2014.;32(15\_suppl):1000–1000.
226. Mani NL, Schalper KA, Hatzis C, Saglam O, Tavassoli F, Butler M, i ostali. Quantitative assessment of the spatial heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 29. prosinac 2016.;18(1):78.
227. Nawaz S, Heindl A, Koelble K, Yuan Y. Beyond immune density: critical role of spatial heterogeneity in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mod Pathol.* 27. lipanj 2015.;28(6):766–77.
228. García-Tejido P, Cabal ML, Fernández IP, Pérez YF. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. *Clin Med Insights Oncol.* 05. siječanj 2016.;10s1:CMO.S34540.
229. Perez EA, Ballman K V., Tenner KS, Thompson EA, Badve SS, Bailey H, i ostali. Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 01. siječanj 2016.;2(1):56.
230. Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, Tse GM, Yamaguchi M, Koura K, i ostali. Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum Pathol.* listopad 2012.;43(10):1688–94.
231. Kotoula V, Chatzopoulos K, Lakis S, Alexopoulou Z, Timotheadou E, Zagouri F, i ostali. Tumors with high-density tumor infiltrating lymphocytes constitute a favorable entity in breast cancer: a pooled analysis of four prospective adjuvant trials. *Oncotarget.* 26. siječanj 2016.;7(4):5074–87.

232. Buisseret L, Garaud S, de Wind A, Van den Eynden G, Boisson A, Solinas C, i ostali. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology*. 02. siječanj 2017.;6(1):e1257452.
233. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, i ostali. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. siječanj 2018.;19(1):40–50.
234. Kurozumi S, Matsumoto H, Kurosumi M, Inoue K, Fujii T, Horiguchi J, i ostali. Prognostic significance of tumour-infiltrating lymphocytes for oestrogen receptor-negative breast cancer without lymph node metastasis. *Oncol Lett*. 16. siječanj 2019.;
235. Park JH, Lee HJ, Lee SB, Ahn J-H, Kim JE, Jung KH, i ostali. Intrinsic Prognostic Impact of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Systemically Untreated Patients With Early-stage Triple-negative Breast Cancer. *Anticancer Res*. 08. lipanj 2019.;39(6):3111–9.
236. Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V, Conte P, Delalogue S, Andre F, i ostali. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol*. kolovoz 2015.;26(8):1698–704.
237. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, i ostali. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Bre. *Semin Cancer Biol*. listopad 2018.;52:16–25.
238. Liu S, Duan X, Xu L, Xin L, Cheng Y, Liu Q, i ostali. Optimal threshold for stromal tumor-infiltrating lymphocytes: its predictive and prognostic value in HER2-positive breast cancer treated with trastuzumab-based neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 26. studeni 2015.;154(2):239–49.
239. Kim ST, Jeong H, Woo OH, Seo JH, Kim A, Lee ES, i ostali. Tumor-infiltrating Lymphocytes, Tumor Characteristics, and Recurrence in Patients With Early Breast Cancer. *Am J Clin Oncol*. lipanj 2013.;36(3):224–31.
240. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn B V, Gade S, Kronenwett R, i ostali. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol*. 20. ožujak 2015.;33(9):983–91.
241. Arlen M, Floress L, Eiguzabal A, Levowltz B. Nodal Response in Medullary Carcinoma of the Breast. *Am J Surg*. 1976.;131:263–6.
242. Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D, Miké V. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer*. listopad 1977.;40(4):1365–85.
243. Ahn SG, Jeong J, Hong S, Jung WH. Current Issues and Clinical Evidence in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer. *J Pathol Transl Med*. 2015.;49(5):355–63.
244. Dushyanthen S, Beavis PA, Savas P, Teo ZL, Zhou C, Mansour M, i ostali. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Med*. 24. prosinac 2015.;13(1):202.

245. Park C, Rosenblat JD, Brietzke E, Pan Z, Lee Y, Cao B, i ostali. Stress, epigenetics and depression: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 18. travanj 2019.;102:139–52.
246. Chen Z, Chen X, Zhou E, Chen G, Qian K, Wu X, i ostali. Intratumoral CD8+ Cytotoxic Lymphocyte Is a Favorable Prognostic Marker in Node-Negative Breast Cancer. *Filleur S, urednik. PLoS One.* 17. travanj 2014.;9(4):e95475.
247. Kreike B, van Kouwenhove M, Hurlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, i ostali. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 02. listopad 2007.;9(5):R65.
248. Loi S, Schmid P, Aktan G, Karantza V, Salgado R. Relationship between tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and response to pembrolizumab (pembro)1chemotherapy (CT) as neoadjuvant treatment (NAT) for triple-negative breast cancer (TNBC): Phase Ib KEYNOTE-173 trial. *Biomarkers, Transl Res Precis Med.* 2019.;30(Supplement 3).
249. Luen SJ, Salgado R, Dieci M V, Vingiani A, Curigliano G, Gould RE, i ostali. Prognostic implications of residual disease tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden in triple-negative breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2019.;30(2):236–42.
250. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H, Takahashi Y, Nakagawa S, i ostali. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res.* 04. prosinac 2015.;17(1):124.
251. Miyoshi Y, Shien T, Ogiya A, Ishida N, Yamazaki K, Horii R, i ostali. Associations in tumor infiltrating lymphocytes between clinicopathological factors and clinical outcomes in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2 negative breast cancer. *Oncol Lett.* 19. prosinac 2018.;
252. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y, i ostali. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *Sapino A, urednik. PLoS One.* 16. lipanj 2016.;11(6):e0157368.
253. Harano K, Wang Y, Lim B, Seitz RS, Morris SW, Bailey DB, i ostali. Rates of immune cell infiltration in patients with triple-negative breast cancer by molecular subtype. *Ahmad A, urednik. PLoS One.* 12. listopad 2018.;13(10):e0204513.
254. Disis ML, Stanton SE. Triple-negative breast cancer: immune modulation as the new treatment paradigm. *Am Soc Clin Oncol Educ book Am Soc Clin Oncol Meet.* 2015.;e25-30.
255. Cimino-Mathews A, Ye X, Meeker A, Argani P, Emens LA. Metastatic triple-negative breast cancers at first relapse have fewer tumor-infiltrating lymphocytes than their matched primary breast tumors: a pilot study. *Hum Pathol.* listopad 2013.;44(10):2055–63.
256. Dieci MV, Tsvetkova V, Orvieto E, Piacentini F, Ficarra G, Griguolo G, i ostali. Immune characterization of breast cancer metastases: prognostic implications. *Breast Cancer Res.* 22. prosinac 2018.;20(1):62.

257. Luen SJ, Salgado R, Fox S, Savas P, Eng-Wong J, Clark E, i ostali. Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and docetaxel: a retrospective analysis of the CLEOPATRA study. *Lancet Oncol.* siječanj 2017.;18(1):52–62.
258. Schmidt-Hansen M, Baldwin DR, Hasler E. What is the most effective follow-up model for lung cancer patients? A systematic review. *J Thorac Oncol.* svibanj 2012.;7(5):821–4.
259. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, i ostali. Quantification of Regulatory T Cells Enables the Identification of High-Risk Breast Cancer Patients and Those at Risk of Late Relapse. *J Clin Oncol.* 01. prosinac 2006.;24(34):5373–80.
260. Shou J, Zhang Z, Lai Y, Chen Z, Huang J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 26. prosinac 2016.;16(1):687.
261. Jiang D, Gao Z, Cai Z, Wang M, He J. Clinicopathological and prognostic significance of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 17. prosinac 2015.;15(1):727.
262. Allard B, Aspeslagh S, Garaud S, Dupont FA, Solinas C, Kok M, i ostali. Immunoncology-101: overview of major concepts and translational perspectives. *Semin Cancer Biol.* listopad 2018.;52:1–11.
263. Ionescu DN, Downes MR, Christofides A, Tsao MS. Harmonization of PD-L1 testing in oncology: a Canadian pathology perspective. *Curr Oncol.* 2018.;25(3):e209–16.
264. Büttner R, Longshore JW, López-Ríos F, Merkelbach-Bruse S, Normanno N, Rouleau E, i ostali. Implementing TMB measurement in clinical practice: considerations on assay requirements. *ESMO Open.* 24. siječanj 2019.;4(1):e000442.
265. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, i ostali. Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Common Cancers and Their Correlation with Molecular Cancer Type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 01. prosinac 2014.;23(12):2965–70.
266. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, i ostali. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 01. travanj 2015.;3(4):326–32.
267. AiErken N, Shi H, Zhou Y, Shao N, Zhang J, Shi Y, i ostali. High PD-L1 Expression Is Closely Associated With Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Leads to Good Clinical Outcomes in Chinese Triple Negative Breast Cancer Patients. *Int J Biol Sci.* 2017.;13(9):1172–9.
268. Pelekanou V, Barlow WE, Nahleh ZA, Wasserman B, Lo Y-C, von Wahlde M-K, i ostali. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression in Pre- and Posttreatment Breast Cancers in the SWOG S0800 Phase II Neoadjuvant Chemotherapy Trial. *Mol Cancer Ther.* lipanj 2018.;17(6):1324–31.
269. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 22. travanj 2012.;12(4):252–64.

270. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, i ostali. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 15. travanj 2016.;13(4):228–41.
271. Ylitalo EB, Thysell E, Jernberg E, Lundholm M, Crnalic S, Egevad L, i ostali. Subgroups of Castration-resistant Prostate Cancer Bone Metastases Defined Through an Inverse Relationship Between Androgen Receptor Activity and Immune Response. *Eur Urol. svibanj 2017.;71(5):776–87.*
272. Tao L, Qiu J, Jiang M, Song W, Yeh S, Yu H, i ostali. Infiltrating T Cells Promote Bladder Cancer Progression via Increasing IL1- $\alpha$ ;Androgen Receptor- $\alpha$ ;HIF1  $\alpha$ ;VEGF $\alpha$  Signals. *Mol Cancer Ther.* 01. kolovoz 2016.;15(8):1943–51.
273. Sánchez-Cousido LF, López-González A, Honrado Franco E, Vallejo Pascual E, Sanz O, Lopez Gonzalez L, i ostali. Relationship between androgen receptor and tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* listopad 2018.;29 Suppl 8:viii80.
274. Ibrahim H, Alorabi M, Helal T, Aref A, Kelany M, Eid Abdallah L, i ostali. Clinico-pathological relationship between androgen receptor (AR) and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in triple negative breast cancer (TNBC). *U: ESMO Breast Cancer 2019.* 2019.
275. Jongen L, Floris G, Wildiers H, Claessens F, De Sutter L, Croes R. The prognostic role of the androgen receptor in patients with triple-negative early breast cancers and primary surgery. *U: ASCO.* 2019.
276. van Rooijen JM, Qiu S-Q, Timmer-Bosscha H, van der Vegt B, Boers JE, Schröder CP, i ostali. Androgen receptor expression inversely correlates with immune cell infiltration in human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer. *Eur J Cancer.* studeni 2018.;103:52–60.
277. Prado-Vázquez G, Gámez-Pozo A, Trilla-Fuertes L, Arevalillo JM, Zapater-Moros A, Ferrer-Gómez M, i ostali. A novel approach to triple-negative breast cancer molecular classification reveals a luminal immune-positive subgroup with good prognoses. *Sci Rep.* 07. prosinac 2019.;9(1):1538.
278. Dieci MV, Tsvetkova V, Griguolo G, Miglietta F, Mantiero M, Tasca G, i ostali. Androgen Receptor Expression and Association With Distant Disease-Free Survival in Triple Negative Breast Cancer: Analysis of 263 Patients Treated With Standard Therapy for Stage I-III Disease. *Front Oncol.* 06. lipanj 2019.;9.
279. Okano M, Oshi M, Butash AL, Asaoka M, Katsuta E, Peng X, i ostali. Estrogen Receptor Positive Breast Cancer with High Expression of Androgen Receptor has Less Cytolytic Activity and Worse Response to Neoadjuvant Chemotherapy but Better Survival. *Int J Mol Sci.* 30. svibanj 2019.;20(11):2655.
280. Mangia A, Saponaro C, Vaghegini A, Opinto G, Centonze M, Vicenti C, i ostali. Should Tumor Infiltrating Lymphocytes, Androgen Receptor, and FOXA1 Expression Predict the Clinical Outcome in Triple Negative Breast Cancer Patients? *Cancers (Basel).* 18. rujanj 2019.;11(9):1393.

## 11. ŽIVOTOPIS

Diplomirala na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Tijekom studija radila kao demonstrator na katedri za histologiju i embriologiju te katedri za patologiju, u programu studija na hrvatskom i engleskom jeziku. Dobitnica Dekanove nagrade za najboljeg studenta šeste godine studija. Od 2014. na specijalističkom usavršavanju iz internističke onkologije za Kliniku za tumore, KBC Sestre milosrdnice. Tijekom specijalističkog usavršavanja aktivno sudjelovala na domaćim i međunarodnim kongresima, simpozijima, stručnim sastancima i radionicama iz onkologije, osobito na temu raka dojke. Koautor poglavlja u udžbenicima i stručnim knjigama, koautor i autor radova u indeksiranim medicinskim časopisima te kongresnih sažetaka. Istraživač u kliničkim studijama i projektima u KBC Sestre milosrdnice i Klinici za tumore. Polaznica više europskih edukacijskih programa iz onkologije solidnih tumora i raka dojke, poput ESO/ESMO *Certificate of Competence in Breast Cancer*. Korisnik ESMO programa kliničkih boravaka u europskim centrima izvrsnosti u liječenju raka dojke. Član Američkog društva za kliničku onkologiju (ASCO), Europskog društva za internističku onkologiju (ESMO) te Hrvatskog društva za internističku onkologiju (HDIO). Predsjednica Sekcije mladih onkologa HDIO te Sekcije mladih onkologa Regije. Suradnik Sekcije za onkološko ljekarništvo Hrvatskog farmaceutskog društva. Član Hrvatskog liječničkog zbora. Suradnik i bivši član Uredničkog odbora Liječničkih novina. Tajnik udruge OnkoPut za promicanje kvalitete života onkoloških bolesnika. Završila poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te poslijediplomski specijalistički studij Internistička onkologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Položila europski ispit iz internističke onkologije (ESMO) 2019. godine. Položila specijalistički ispit iz internističke onkologije 2020. godine.