

# IL-17 u ranom invazivnom raku dojke

---

**Popović, Marina**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*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:105:271798>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Popović**

**IL-17 u ranom invazivnom raku dojke**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2022.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Popović**

**IL-17 u ranom invazivnom raku dojke**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2022.**

Disertacija je izrađena u sklopu znanstvenog projekta pod nazivom „Karcinom dojke – molekularne, genetske i kliničke karakteristike“, na teret sredstava i kratkoročne sveučilišne financijske potpore istraživanju „Genetska sklonost nastanka karcinoma dojke“. Istraživanje je provedeno u Kliničkom bolničkom centru Zagreb uz odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Voditelj istraživanja bila je prof. dr. sc. Natalija Dedić Plavetić.

Mentor: prof. dr. sc. Natalija Dedić Plavetić, komentor: doc. dr. sc. Ana Kulić

Zahvaljujem prof. dr. sc. Damiru Vrbancu, prof. dr. sc. Nataliji Dedić Plavetić i doc. dr. sc. Ani Kulić jer su mi pružili priliku, bili uzor i dali podršku u stručnom usavršavanju. Hvala Ljubi Jurić Bare i sestri Martini Demšer na svesrdnoj pomoći kod prikupljanja uzoraka. Hvala mom suprugu Filipu i djeci Klari i Grguru na strpljivosti i uspješnoj organizaciji vremena koje sam trebala za izradu disertacije. Zahvalna sam svom didi Ljubi jer mi je primjerom pokazao razliku između poziva i posla i dedi Pedi jer mi je njegova srčanost učvrstila vjeru u sebe. Zahvalna sam i svojim bakama Olgi i Ljubici te majci Maji jer su postavile temelj obiteljskim i stručnim vrijednostima na kojima sam odrasla. Ovaj rad posvećujem svom ocu Anti jer mi je bio motiv da započnem i snaga i inat da dovršim disertaciju.

## Sadržaj

<b>1. Uvod i svrha rada .....</b>	<b>1</b>
1.1. TUMORI DOJKE .....	1
1.2. RAK DOJKE.....	1
1.3. EPIDEMIOLOGIJA RAKA DOJKE.....	1
1.4. RIZIČNI ČIMBENICI ZA RAZVOJ RAKA DOJKE.....	2
1.5. NASLJEDNA SKLONOST ZA RAZVOJ RAKA DOJKE .....	2
1.6. RANI PROBIR ZA OTKRIVANJE RAKA DOJKE .....	3
1.7. DIJAGNOSTIKA RAKA DOJKE.....	4
1.8. HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA RAKA DOJKE .....	5
1.9. <i>IN SITU</i> RAK DOJKE .....	5
1.10. INVAZIVNI RAK DOJKE.....	6
1.11. HISTOLOŠKA PODJELA INVAZIVNOG RAKA DOJKE .....	7
1.12. GENSKO PROFILIRANJE I MOLEKULARNA KLASIFIKACIJA RAKA DOJKE .	10
1.13. HISTOLOŠKI STUPANJ DIFERENCIRANOSTI TUMORA.....	13
1.14. IZRAŽENOST HORMONSKIH RECEPTORA, RECEPTORA HER2 I MARKERA PROLIFERACIJE Ki-67.....	14
1.15. ZAHVAĆENOST LIMFNIH ČVOROVA.....	14
1.16. STADIJI RAKA DOJKE .....	15
1.17. DEFINICIJA RANOG RAKA DOJKE .....	19
1.18. LIJEČENJE RANOG INVAZIVNOG RAKA DOJKE.....	19
1.19. PROGNOZA RANOG RAKA DOJKE .....	21
1.20. IMUNOLOŠKI SUSTAV .....	22
1.21. UROĐENA I STEČENA IMUNOST.....	22
1.22. UROĐENE LIMFOIDNE STANICE I NJIHOVA ULOGA U IMUNOLOŠKOM ODGOVORU .....	25
1.23. PODSKUPINE LIMFOCITA CD4+ I NJIHOVA ULOGA U IMUNOLOŠKOM ODGOVORU .....	26

1.24. PODSKUPINE LIMFOCITA CD8+ I NJIHOVA ULOGA U IMUNOLOŠKOM ODGOVORU .....	27
1.25. MEĐUODNOS IMUNOLOŠKOG SUSTAVA I TUMORA .....	28
1.26. IMUNOLOŠKI ODGOVOR NA TUMOR .....	30
1.27. ULOGA IL-17 U FIZIOLOŠKIM UVJETIMA I BOLESTIMA .....	33
1.28. IL-17 U MIKROOKOLIŠU RAKA.....	37
<b>2. Hipoteza.....</b>	<b>40</b>
<b>3. Ciljevi rada.....</b>	<b>41</b>
3.1. OPĆI CILJ .....	41
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI.....	41
<b>4. Materijali i metode .....</b>	<b>42</b>
4.1. STATISTIČKE METODE.....	43
<b>5. Rezultati.....</b>	<b>45</b>
<b>6. Rasprava.....</b>	<b>66</b>
6.1. SERUMSKA RAZINA IL-17 U RANOM RAKU DOJKE .....	67
6.2. SERUMSKA RAZINA IL-17 OVISNO O SUROGATNOM BIOLOŠKOM PODTIPU RANOG RAKA DOJKE.....	68
6.2.1 HORMONSKI OVISAN RANI RAK DOJKE .....	69
6.2.2 TROSTRUKO NEGATIVAN RANI RAK DOJKE.....	70
6.2.3 HER-2 POZITIVAN RAK DOJKE .....	71
6.3. SERUMSKA RAZINA IL-17 OVISNO O PATOHISTOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA RANOG RAKA DOJKE .....	72
6.4. IZRAŽENOST IL-17 U TUMORSKOM TKIVU RANOG RAKA DOJKE.....	74
6.5. ODNOS RAZINE IL-17 U SERUMU I IZRAŽENOSTI IL-17 U TUMORSKOM TKIVU .....	75
<b>7. Zaključci.....</b>	<b>78</b>
<b>8. Sažetak.....</b>	<b>80</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>81</b>

<b>10. Popis literature .....</b>	<b>82</b>
<b>11. Životopis .....</b>	<b>100</b>

## Kratice

**Act1** – aktin 1

**AKT1** – engl. *AKT Serine/Threonine Kinase 1 gene*

**APC** – engl. *Antigen presenting cell*, antigen predočna stanica

**ARID1A** – engl. *AT-Rich Interaction Domain 1A gene*

**ASCO** – engl. *American Society of Clinical Oncology*, Američko društvo za kliničku onkologiju

**ATM** – engl. *Ataxia-Telangiesctasia Mutated gene*

**BARD1** – engl. *BRCA1 Associated RING Domain 1 gen*

**Batf3** – engl. *Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3*

**BCR** – engl. *B cell receptor*, B-stanični receptor

**BL1** – engl. *Basal-like 1*, podskupina trostruko negativnog raka dojke

**BL2** – engl. *Basal-like 2*, podskupina trostruko negativnog raka dojke

**BRCA1** – engl. *Breast Cancer gene 1*

**BRCA2** – engl. *Breast Cancer gene 2*

**BRIP** – engl. *BRCA1 Interacting Protein 1 gen*

**CCL** – engl. *C-C chemokine ligand*

**CCR** – engl. *C-C chemokine receptor*

**CD** – engl. *Cluster of differentiation*, diferencijacijska skupina

**CDH1** – engl. *Cadherin 1 gen*

**CDK 4/6** – engl. *Cyclin-dependent kinase 4/6*, kinaza ovisna o ciklinu 4/6

**CHEK2** – engl. *Checkpoint Kinase 2 gen*

**CIR** – engl. *Compensatory immune resistance*, kompenzatorna imunološka rezistencija

**CLR** – engl. *C-type lectin receptor*

**CNV** – engl. *Copy number variation*, varijacija broja kopija dijelova genoma

**CTL4** – engl. *Choline transporter-like protein 4*

**CXCL** – engl. *C-X-C motif chemokine ligand*

**CXCR** – engl. *C-X-C motif chemokine receptors*

**DAMP** – engl. *Damage-associated molecular pattern*, molekularni obrasci povezani s oštećenjem

**DCIS** – duktalni karcinom *in situ*



**EGFR** – engl. *Epidermal growth factor receptor*, receptor epidermalnog čimbenika rasta

**ER** – estrogen receptor

**ERBB** – engl. *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 gene*

**ESR1** – engl. *Estrogen Receptor 1 gene*

**ETV6-NTRK3** – engl. *ETS Variant Transcription Factor 6 - Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3 fuzijski gen*

**FGFR** – engl. *Fibroblast growth factor receptor*

**FNAC** – engl. *Fine needle aspiration cytology*, citološka punkcija

**FOX** – engl. *Forkhead Box gen*

**GATA3** – engl. *GATA binding protein 3 gene*

**G-CSF** – engl. *Granulocyte colony-stimulating factor*, čimbenik rasta granulocita

**GM-CSF** – engl. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, čimbenik rasta granulocita i makrofaga

**GPLY** – granulizin

**GZM** – granzim

**HER2** – engl. *Human epidermal growth factor receptor 2 gene*

**HER3** – engl. *Human epidermal growth factor receptor 3 gene*

**ICGC** – engl. *International Cancer Genome Consortium*, Međunarodni konzorcij za genom raka

**ICR** – engl. *Immunologic constant of rejection*, imunološka konstanta odbacivanja

**IDH2** – engl. *Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 2 gene*

**IDO** – indolamin 2,3-dioksigenaza

**IFN- $\gamma$**  – engl. *Interferon gamma*

**IL** – interleukin

**IL-17R** – receptor interleukina 17

**INPP4B** – engl. *Inositol polyphosphate 4-phosphatase type II gene*

**IRF** – engl. *Interferon regulatory factor*

**KDM6A** – engl. *Lysine Demethylase 6A gene*

**LAR** – engl. *Luminal androgen receptor*, podskupina trostruko negativnog raka dojke

**LCIS** – lobularni karcinom *in situ*

**LKB1** – engl. *Liver kinase B1*

**LTi** – engl. *Lymphoid T inducer cell*

- M** – engl. *Mesenchymal*, podskupina trostruko negativnog raka dojke
- MAML2** – engl. *Mastermind Like Transcriptional Coactivator 2 gene*
- MAP** – molekularni apokrini tumor
- MAPK** – engl. *Mitogen-activated kinase gene*
- MDSC** – engl. *Myeloid-derived suppressor cells*, mijeloidne supresorske stanice
- MEGF11** – engl. *Multiple epidermal growth factor-like domains 11 gen*
- METABRIC** – engl. *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*, studija
- MHC** – engl. *Major histocompatibility complex*, glavni kompleks histokompatibilnosti
- MMP** – matriks metaloproteaze
- MMR** – engl. *Mismatch repair* geni
- MRN** – engl. *Mre11–Rad50–Nbs1 gene complex*
- mTOR** – engl. *Mammalian target of rapamycin* protein kinaza
- MYBL** – engl. *MYB Proto-Oncogen Like 1 gene*
- MYB-NFIB** – engl. *Myeloblastosis viral oncogen homolog gen-Nuclear factor I/B gen*
- NCCN** – engl. *National Comprehensive Cancer Network*, američki Nacionalni savez medicinskih centara za liječenje raka
- NCR** – engl. *Natural cytotoxicity receptor*
- NF-κB** – engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- NIH** – engl. *National Institutes of Health*, američki Nacionalni instituti za zdravlje
- NLR** – engl. *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*
- NOS** – engl. *Invasive ductal carcinoma not otherwise specified*
- NST** – engl. *Invasive breast carcinoma of no special type*
- PALB** – engl. *Partner and localizer of BRCA2 gene*
- PAM50** – Prosigna prognostički test genske ekspresije
- PAMP** – engl. *Pathogen-associated molecular pattern*, molekularni obrasci patogenih mikroorganizama
- PDCD** – engl. *Programmed cell death protein*
- PDL-1** – engl. *Programmed death-ligand 1*
- PI3K** – fosfoinozimid 3-kinaza
- PIK3CA** – engl. *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha gene*
- PIR** – engl. *Primary immune resistance*, primarna imunološka rezistencija

**PPAR- $\gamma$**  – engl. *Peroxisome proliferator- activated receptor gamma*

**PR** – progesteron receptor

**PRF1** – perforin 1

**PRM** – engl. *Pattern recognition molecule*, molekula za prepoznavanje uzoraka

**PRR** – engl. *Pattern recognition receptor*, stanični receptori za prepoznavanje uzoraka

**PTEN** – engl. *Phosphatase and tensin homolog gene*

**RAD51C** – engl. *RAD51 Paralog C gene*

**RAD51D** – engl. *RAD51 Paralog D gene*

**RB1** – engl. *RB Transcriptional Corepressor 1 gene*

**RLR** – engl. *RIG-I-like receptor*

**ROR $\gamma$ t** – engl. *Retinoic acid-related orphan receptor gamma t*

**RT-PCR** – engl. *Reverse transcription polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom

**SEER** – engl. *Surveillance, Epidemiology, and End Results*, Program za nadzor, epidemiologiju i krajnje rezultate Nacionalnog instituta za rak

**SLNB** – engl. *Sentinel lymph node biopsy*, biopsija limfnog čvora čuvara

**SNP** – engl. *Single nucleotide polymorphism*, polimorfizam jednog nukleotida

**STAT** – engl. *Signal transducer and activator of transcription gene*

**STK11** – engl. *Serine/Threonine Kinase 11 gene*

**TAK1** – engl. *TGF $\beta$ -activated kinase 1*

**TBX21** – engl. *T-Box Transcription Factor 21 protein*

**TBX3** – engl. *T-Box Transcription Factor 3 gene*

**TCGA** – engl. *The Cancer Genome Atlas*, baza podataka genomskih promjena u raku

**TCR** – engl. *T cell receptor*, T-stanični receptor

**TGF- $\beta$**  – engl. *Transforming growth factor beta*, transformirajući čimbenik rasta beta

**Th** – engl. *T-helper cell*, pomagačke T-stanice

**TIL** – limfociti koji se infiltriraju u tumor

**TIS** – engl. *Tumor inflammation signature*, tumorski upalni obrazac

**TLR** – engl. *Toll-like receptor*

**TMB** – engl. *Tumor mutational burden*, mutacijsko opterećenje tumora

**TNF- $\alpha$**  – engl. *Tumor necrosis factor alpha*, čimbenik tumorske nekroze alfa

**TNM** – engl. *Tumor, Node, Metastasis classification*

**TP53** – engl. *Tumor protein 53 gen*

**TRAF6** – engl. *Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 protein*

**UICC/AJCC** – engl. *Union for International Cancer Control / American Joint Committee on Cancer*

**VEGF** – engl. *Vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni čimbenik rasta

**WHO** – engl. *World Health Organisation*, Svjetska zdravstvena organizacija

## Popis tablica

<b>Tablica 1.</b> Opisna statistika kategorijskih varijabli i kliničke karakteristike uključenih žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (N=118) .....	45
<b>Tablica 2.</b> Opisna statistika kategorijskih varijabli i kliničke karakteristike uključenih žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (N=118) – nastavak Tablice 1. ....	46
<b>Tablica 3.</b> Opisna statistika kontinuiranih varijabli i kliničke karakteristike uključenih žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (N=118) .....	47
<b>Tablica 4.</b> Izraženost IL-17 u tumorskom tkivu u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke .....	48
<b>Tablica 5.</b> Usporedba serumske koncentracije IL-17 u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (ispitanice) prije operacije i nakon operacije tijekom adjuvantnog liječenja i zdravih žena (kontrola): Mann-Whitney U test.....	49
<b>Tablica 6.</b> Razlika u koncentraciji IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prije operacije i nakon provedena tri ciklusa adjuvantne kemoterapije ili tri mjeseca hormonske terapije: Wilcoxonov test.....	51
<b>Tablica 7.</b> Razlike u koncentracijama IL-17 u serumu (prije operacije i tijekom adjuvantnog liječenja) s obzirom na status receptora HER2 u tumoru: Mann-Whitney U test.....	52
<b>Tablica 8.</b> Razlike u koncentracijama IL-17 u serumu prije operacije i tijekom adjuvantne terapije s obzirom na status limfnih čvorova: Mann-Whitney U test .....	53
<b>Tablica 9.</b> Razlike u koncentracijama IL-17 u serumu (prije operacije i tijekom adjuvantne terapije) s obzirom na status limfnih čvorova: Kruskal-Wallisov test .....	53
<b>Tablica 10.</b> Razlike u vrijednostima IL-17 u serumu (prije operacije i tijekom adjuvantne terapije) s obzirom na surogatni biološki podtip tumora: Kruskal-Wallisov test s post-hoc Mann-Whitney U testom .....	54
<b>Tablica 11.</b> Korelacijski koeficijenti serumske razine IL-17 i izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu: Spearmanovi koeficijenti korelacije Rho .....	56
<b>Tablica 12.</b> Razlike serumske razine IL-17 i izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu: Mann-Whitney U test .....	57
<b>Tablica 13.</b> Korelacijski koeficijenti između vrijednosti IL-17 s ostalim kliničkim i patohistološkim pokazateljima: Spearmanovi koeficijenti korelacije Rho ili Kendallovi koeficijenti korelacije Tau_b u slučajevima ordinalno – nominalne usporedbe .....	58

<b>Tablica 14.</b> Korelacijski koeficijenti između vrijednosti IL-17 s ostalim kliničkim i patohistološkim pokazateljima: Spearmanovi koeficijenti korelacije Rho ili Kendallovi koeficijenti korelacije Tau_b (u slučajevima ordinalno – nominalne usporedbe) – nastavak Tablice 12.....	59
<b>Tablica 15.</b> Razlike u serumskoj koncentraciji IL-17 s obzirom na histološki tip tumora: Mann-Whitney U test.....	61
<b>Tablica 16.</b> Razlike učestalosti IL-17 IHC kategorija s obzirom na histološki tip tumora: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test.....	61
<b>Tablica 17.</b> Usporedba intratumorske izraženosti IL-17 (invazivna komponenta, <i>in situ</i> komponenta, peritumorska stroma) s normalnim tkivom: Spearmanov koeficijent korelacije.....	62

## Popis slika

<b>Slika 1.</b> 5-godišnje preživljenje, rak dojke prema podtipu i stadiju, SEER 2000 (podaci preuzeti iz SEER (engl. <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i> ) programa) (78) .....	22
<b>Slika 2.</b> Signalni put IL-17 (preuzeto iz Brevi et al. Much More Than IL-17A: Cytokines of the IL-17 Family Between Microbiota and Cancer. <i>Frontiers in Immunology</i> . 2020.) (121) .	35
<b>Slika 3.</b> Dvojaki učinci IL-17 u tumorskom mikrooklišu (preuzeto iz Vitiello et al. Targeting the interleukin-17 immune axis for cancer immunotherapy. <i>J Exp Med</i> . 2020;217(1):1–11.) (126) .....	37
<b>Slika 4.</b> Rezultati imunohistokemijske analize na IL-17 .....	44
<b>Slika 5.</b> Usporedba serumske koncentracije IL-17 u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prije operacije i kontrolne skupine .....	50
<b>Slika 6.</b> Usporedba serumske koncentracije IL-17 u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke nakon operacije tijekom adjuvantnog liječenja i kontrolne skupine .....	50
<b>Slika 7.</b> Razlika u koncentraciji IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke predoperativno i nakon provedena tri ciklusa adjuvantne kemoterapije ili tri mjeseca hormonske terapije .....	52
<b>Slika 8.</b> Razlike u vrijednostima IL-17 u serumu prije operacije s obzirom na biološki podtip tumora.....	55
<b>Slika 9.</b> Razlike u vrijednostima IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije s obzirom na biološki podtip tumora .....	55
<b>Slika 10.</b> Kaplan-Meier krivulja preživljenja s obzirom na medijane vrijednosti IL-17 u serumu prije operacije: log-rank test; P=0,651 .....	62
<b>Slika 11.</b> Kaplan-Meier krivulja preživljenja s obzirom na medijane vrijednosti IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije nakon operacije: log-rank test; P=0,710 .....	65
<b>Slika 12.</b> Kaplan-Meier krivulja preživljenja s obzirom na porast IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije nakon operacije u odnosu na predoperativne vrijednosti: log-rank test; P=0,139 .....	63
<b>Slika 13.</b> Kaplan-Meier krivulja preživljenja nakon recidiva bolesti s obzirom na medijane vrijednosti IL-17 u serumu prije operacije: log-rank test; P=0,768 .....	64
<b>Slika 14.</b> Kaplan-Meier krivulja preživljenja nakon recidiva bolesti s obzirom na medijane vrijednosti IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije: log-rank test; P=0,282 .....	64

**Slika 15.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja nakon recidiva bolesti s obzirom na porast IL-17 u serumu tijekom adjuvantne nakon operacije terapije u odnosu na predoperativne vrijednosti: log-rank test;  $P=0,192$  ..... 65



# 1. Uvod i svrha rada

## 1.1. TUMORI DOJKE

Tumori dojke predstavljaju heterogenu skupinu bolesti s različitim histološkim i molekularnim karakteristikama, različitom kliničkom prezentacijom, odgovorom na liječenje i prognozom ishoda. Prema posljednjem ažuriranom 5. izdanju knjige „Klasifikacija tumora dojke“ Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation Classification of Breast Tumors. Fifth Edition*), u tumore dojke ubrajaju se dobroćudne epitelne proliferacije i prekursori tumora dojke, dobroćudni tumori dojke, *in situ* i invazivni rak dojke, mezenhimalni i hematolimfoidni tumori dojke, rak muške dojke i različiti genetički poremećaji koji uzrokuju tumore dojke (1).

## 1.2. RAK DOJKE

Rak dojke je zloćudni tumor koji nastaje u terminalnoj duktulo-lobularnoj jedinici dojke. Budući da većinom nastaje u epitelnim stanicama dojke, još se naziva *karcinom* dojke.

## 1.3. EPIDEMIOLOGIJA RAKA DOJKE

Prema posljednjim dostupnim podacima Registra za rak Republike Hrvatske Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2017. zabilježeno je 2808 novooboljelih od raka dojke, od čega 2767 žena i 39 muškaraca. Rak dojke je bio najčešće sijelo raka u ženskoj populaciji, svaka četvrta žena s *de novo* dijagnosticiranim zloćudnim tumorom imala je rak dojke. Iste godine u Republici Hrvatskoj od posljedica raka dojke umrle su 853 žene. Većina oboljelih bila je starija od 50 godina, dok je 18 % bolesnika bilo mlađe od 50 godina u trenutku dijagnoze (2).

Veliko međunarodno istraživanje CONCORD-3, koje je uključilo 6 422 553 bolesnica iz 298 registara za rak u 66 zemalja svijeta pokazalo je značajnu razliku između pojedinih zemalja u dobno standardiziranom petogodišnjem preživljenju za bolesnice kojima je rak dojke dijagnosticiran između 2010. i 2014. (3). Među zemljama s najvećim petogodišnjim preživljenjem za navedeno razdoblje bile su SAD (90,2 %) i Australija (89,5 %) te Cipar (92,6 %) i Island (89,1 %) u Europi. Iako se u Hrvatskoj bilježi postupan porast stope preživljenja oboljelih od raka dojke, i dalje je među zemljama s najnižom stopom petogodišnjeg preživljenja od raka dojke u Europi. Dobno standardizirano petogodišnje

preživljenje za bolesnice kojima je rak dojke dijagnosticiran između 2010. i 2014. u Hrvatskoj bilo je 78,6 %.

#### 1.4. RIZIČNI ČIMBENICI ZA RAZVOJ RAKA DOJKE

Čimbenici koji su povezani s povećanim rizikom za razvoj raka dojke mogu se podijeliti u one na koje se ne može utjecati, kao što su starija životna dob, ženski spol, nasljedna predispozicija i veća gustoća žljezdanog tkiva dojki i na promjenjive čimbenike rizika kao što su kombinirana estrogen-progesteronska hormonska terapija, ionizirajuće zračenje, pretilost i alkohol. Starija životna dob i spol su najznačajniji čimbenici rizika za razvoj raka dojke. Žene imaju 100 puta veći cjeloživotni rizik za razvoj raka dojke od muškaraca, dok žena stara 70 godina ima 10 puta veći rizik za razvoj raka dojke od žene stare 30 godina (4).

Prema dosadašnjim podacima oko 20 % slučajeva raka dojke dovodi se u vezu s promjenjivim čimbenicima rizika kao što su konzumacija alkohola, nedostatna fizička aktivnost i pretilost (5).

Čimbenici koji dokazano smanjuju rizik za razvoj raka dojke su rana trudnoća, dojenje i fizička aktivnost. Žena koja rodi prije 20. godine života ima 50 % manji rizik za razvoj raka dojke od žene koja nije rodila ili žene koja je prvi put rodila nakon 35. godine života, a više od četiri sata vježbe tjedno smanjuje relativni rizik za 30 do 40 % (4).

#### 1.5. NASLJEDNA SKLONOST ZA RAZVOJ RAKA DOJKE

Od 5 do 10 % žena oboljelih od raka dojke ima majku ili sestru s rakom dojke, a dvostruko više njih ima rođaka u prvom ili drugom koljenu koji boluje od raka dojke (6).

Genetičkim testiranjem bolesnika u čijim obiteljima je zamijećena veća učestalost raka dojke otkrivene su mnogobrojne varijante gena, od kojih neke uzrokuju nasljednu sklonost za razvoj raka dojke i drugih tumora. Varijante gena koje povećavaju sklonost za bolest nazivaju se patogene i vjerojatno patogene varijante. Postoje i mnogobrojne varijante gena koje su benigne ili nepoznatog značaja. Prema javno dostupnim podacima iz ClinVar arhiva američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (engl. *National Institutes of Health, NIH*) u nosioca mutacije *BRCA1/BRCA2* gotovo je jednak broj varijanti nepoznatog značaja kao i patogenih i vjerojatno patogenih varijanti (7).

Geni koji su povezani s povećanim rizikom za razvoj raka dojke grupirani su prema penetrantnosti u visoko penetrantne gene (*BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, STK11, CDH1*) te

umjereno i nisko penetrantne gene (*PALB2*, *BRIP1*, *ATM*, *CHEK2*, *BARD1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *MRN* kompleks, *MMR*, *NF1*) (8–10).

Prosječan cjeloživotni rizik za razvoj raka dojke u žene koja ima patogenu varijantu *BRCA* mutacije je otprilike 70 %. Rizik za razvoj raka dojke je manji u žena s patogenom varijantom umjereno penetrantnih gena, primjerice za *PALB2* rizik je 35–60 %, dok je za *ATM* i *CHEK2* rizik 25 do 30 %. Sukladno riziku i razini znanstvenih dokaza, razlikuju se preporuke za praćenje, redukciju rizika i ciljano liječenje bolesnika koji su nosioci pojedinih navedenih mutacija. Američki nacionalni savez medicinskih centara za liječenje raka NCCN (engl. *National Comprehensive Cancer Network*) trenutno daje preporuke za nosioce mutacija u genima *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PABL2*, *PTEN*, *STK11* i *TP53* (11).

## 1.6. RANI PROBIR ZA OTKRIVANJE RAKA DOJKE

U razvijenim zemljama svijeta provodi se organizirani mamografski probir radi ranog otkrivanja raka dojke. Studije su pokazale da je mamografskim probirom populacije moguće smanjiti relativnu smrtnost od raka dojke za otprilike 20 % (5,12). U većini slučajeva rak dojke bude otkriven u ranoj fazi bolesti, a u svega 5 do 10 % novodijagnosticiranih slučajeva rak dojke već je metastatska bolest (13).

U okviru Nacionalnog programa Republike Hrvatske za rano otkrivanje raka dojke, žene u dobi od 50 do 69 godina dobivaju poziv za mamografski pregled dojki svake dvije godine.

Procjenjuje se da je u Republici Hrvatskoj, nakon uvođenja programa probira, udio novootkrivenih karcinoma dojke u lokaliziranom stadiju 60 do 70 %, a da je prije probira bio svega 40 % (14).

Uz lažno negativne i lažno pozitivne rezultate, negativna strana mamografskog probira o kojoj se u posljednje vrijeme intenzivno raspravlja odnosi se na „pretjerano dijagnosticiranje“. Riječ je o onom dijelu bolesnica u kojih se rak dojke otkrije i liječi iako se, da nije otkriven probirom, tijekom života bolesnice ne bi klinički očitovao (15). Prema okvirnoj procjeni Nezavisnog odbora Ujedinjenog Kraljevstva za probir raka dojke (engl. *Independent UK Panel on Breast Cancer Screening*) na svakih 10 000 žena starih 50 godina koje bi sudjelovale u mamografskom probiru tijekom narednih 20 godina, za svaku smrt spriječenu probirom bila bi tri pretjerano dijagnosticirana slučaja (16).

Primjenom mamografskog probira prilagođenog prema stratificiranom riziku za razvoj raka dojke mogla bi se poboljšati učinkovitost i isplativost nacionalnih programa za rano otkrivanje raka dojke (15).

Sve je više dokaza koji govore u prilog mamografije s tomosintezom (trodimenzionalne mamografije) kao bolje metode za otkrivanje ranog raka dojke od klasične mamografije te je izgledno da u budućnosti mamografija s tomosintezom postane metoda koja bi se koristila za programe probira ranog otkrivanja raka dojke (5).

## 1.7. DIJAGNOSTIKA RAKA DOJKE

U dijagnostici raka dojke koristi se klinički pregled, slikovne metode i patohistološka analiza uzorka sumnjive promjene. Slikovne metode koje se rutinski koriste su mamografija i ultrazvuk dojki. Magnetska rasonancija (*MRI*) dojki koristi se u slučaju lobularnog raka dojke, sumnje na multifokalni ili multicentrični tumor, u raka dojke koji se dovodi u vezu s *BRCA* mutacijom, prije i nakon neoadjuvantne terapije, kod nejasnog nalaza dobivenog rutinskim slikovnim pretragama (pozitivni pazušni limfni čvorovi bez vidljivog tumora u dojci), kod gustih dojki, značajnog razilaženja u kliničkom nalazu i nalazu rutinskih slikovnih pretraga te eventualno kod postojanja implantata u dojci (17). Među novijim slikovnim metodama sve se više upotrebljava digitalna tomosinteza i u probiru i u dijagnostici raka dojke zbog veće učinkovitosti snimanja, a time i povoljnijeg ishoda bolesti u bolesnika oboljelih od raka dojke (18).

Radiološki otkrivene promjene koje su temeljito sumnjive na rak dojke treba pod kontrolom ultrazvuka biopsirati. Ako biopsija širokom iglom (engl. *Core needle biopsy*) nije izvediva, nužno je prije započinjanja liječenja barem citološkom punkcijom (engl. *Fine needle aspiration cytology, FNAC*) dobiti potvrdu da se radi o invazivnom raku dojke. Ako je planirana predoperativna sistemska terapija, potvrda invazivnog raka dojke mora biti na uzorku dobivenom biopsijom širokom iglom. Kod multicentričnih ili multifokalnih tumora valja pokušati dobiti uzorak svake sumnjive promjene prije odluke o liječenju. Kliničkim pregledom ili radiološki otkrivene sumnjive limfne čvorove trebalo bi punktirati ili biopsirati (17).

Patohistološki nalaz bi morao sadržavati: histološki tip tumora prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation, WHO*), histološki stupanj diferenciranosti tumora prema Elston-Ellis modifikaciji Scarff-Bloom-Richardson sustava, veličinu tumora, broj žarišta tumora, podatak o prisutnosti limfovaskularne invazije,

opis rubova kirurškog reza, podatak o prisutnosti pridruženih lezija (zahvaćenost kože, bradavice ili skeletnih mišića), izraženost hormonskih receptora estrogena i progesterona (ER i PR), receptora HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) i markera proliferacije Ki67, podatak o prisutnosti *in situ* komponente (histološki tip, histološki stupanj diferenciranosti i udio u ukupnom tumoru izražen postotkom), broj izvađenih i zahvaćenih limfnih čvorova i patološki stupanj proširenosti bolesti (pTNM), prema 8. izdanju TNM klasifikacije UICC/AJCC (*Union for International Cancer Control/ American Joint Committee on Cancer*) (5,17).

## 1.8. HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA RAKA DOJKE

Ovisno o tome jesu li tumorske stanice probile bazalnu membranu i invadirale stromu razlikujemo *in situ* rak dojke i invazivni rak dojke.

## 1.9. *IN SITU* RAK DOJKE

U *in situ* rak dojke ubrajaju se dva odvojena entiteta: duktalni karcinom *in situ* (DCIS) i *in situ* Pagetova bolest dojke bez pridruženog invazivnog raka dojke ili DCIS-a. Budući da u većini slučajeva bolesnice kojima je dijagnosticirana *in situ* Pagetova bolest dojke imaju i DCIS ili invazivni rak u zahvaćenoj dojci, bolest se u tom slučaju klasificira prema DCIS odnosno invazivnoj komponenti uz napomenu da postoji pridružena i Pagetova bolest dojke. Lobularni karcinom *in situ* (LCIS), koji je donedavno bio klasificiran kao rak dojke, više se ne smatra zloćudnim tumorom s mogućnošću metastaziranja, već dobroćudnim entitetom koji povećava rizik za kasniji razvoj raka dojke (19).

Nakon invazivnog raka dojke, DCIS je drugi najčešći tumor dojke. Incidencija DCIS-a je u porastu nakon što se počeo provoditi organizirani mamografski probir raka dojke. Od 20 do 25 % svih dijagnosticiranih tumora dojke je DCIS (20). Od svih bolesnika kojima je dijagnosticiran DCIS, bez liječenja će u njih 20 do 53 % bolest napredovati u invazivni rak dojke (21). U istraživanju koje su proveli Worni i suradnici (22), na uzorku od 121 080 bolesnica kojima je dijagnosticiran DCIS, desetogodišnje preživljenje specifično za bolest bilo je 98,9 % za bolesnice kojima je napravljena lumpektomija i provedeno zračenje, 98,5 % za bolesnice kojima je napravljena mastektomija i 98,4 % za bolesnice kojima je napravljena samo lumpektomija. Petogodišnje preživljenje specifično za bolest u bolesnika u kojih je DCIS napredovao u invazivni rak ograničen na dojku u trenutku dijagnoze je 98,5 % (23).

## 1.10. INVAZIVNI RAK DOJKE

Unatoč velikom napretku u razumijevanju biološkog ponašanja pojedinih tipova invazivnog raka dojke, još uvijek ne postoji jedinstvena patohistološka i molekularna klasifikacija kojom bi se obuhvatio takav stupanj raznolikosti i točno predvidio klinički tijek pojedinog tipa invazivnog raka dojke. Stoga se prilikom podjele u podskupine i dalje dominantno oslanja na karakteristike kao što su morfologija tumora, histološki i imunohistokemijski izražaj estrogenskih i progesteronskih hormonskih receptora, HER2 receptora i markera proliferacije Ki67. Korištenjem naprednih tehnika za analizu genoma u posljednjem je desetljeću omogućeno gensko profiliranje tumora koje pruža dodatne informacije značajne za preciznije grupiranje tumora. Istovremeno je omogućeno liječenje ciljanim terapijskim pristupom temeljenom na genetskom profilu tumora čime je ujedno optimizirano liječenje invazivnog raka dojke.

U posljednjoj klasifikaciji WHO-a tradicionalna podjela invazivnog raka dojke prema morfološkim svojstvima je upotpunjena klinički važnim čimbenicima, kao što su molekularne podskupine tumora dojke i surogatni molekularni podtipovi određeni izražajem hormonskih i receptora HER2 i markera proliferacije Ki67. Radi čim točnije i u kliničkoj praksi korisne sistematizacije invazivnog raka dojke, u klasifikaciju su uključeni i drugi dokazano važni prognostički i prediktivni faktori: izražaj androgenskih receptora, odgovor na neodjuvantnu terapiju, limfociti koji se infiltriraju u tumor i PDL1 (engl. *Programmed death-ligand 1*) testiranje, podtipovi trostruko negativnog raka dojke, genske mutacije i tzv. „integrated cluster“ skupine (1).

Prema posljednjoj podjeli WHO-a, invazivni rak dojke obuhvaća devet glavnih histoloških podtipova, uključujući invazivni rak dojke nespecifičnog tipa i osam specifičnih podtipova. Rijetki i tumori tipa žlijezda slinovnica, papilarni te neuroendokrini tumori dojke izdvojeni su u zasebne cjeline (25). U otprilike 80 % slučajeva invazivni rak dojke je nespecifičnog tipa. U 10 do 15 % slučajeva je riječ o invazivnom lobularnom raku dojke koji je ujedno i najčešći specifični podtip raka dojke (5).

## 1.11. HISTOLOŠKA PODJELA INVAZIVNOG RAKA DOJKE

- ◆ **Invazivni karcinom dojke NST**
- ◆ **Mikroinvazivni karcinom**
- ◆ **Invazivni lobularni karcinom**
- ◆ **Tubularni karcinom**
- ◆ **Kribriformni karcinom**
- ◆ **Mucinozni karcinom**
- ◆ **Mucinozni cistadenokarcinom**
- ◆ **Invazivni mikropapilarni karcinom**
- ◆ **Karcinom s apokrinom diferencijacijom**
- ◆ **Metaplastični karcinom**
- ◆ **Rijetki i tumori tipa žlijezda slinovnica**
  - ◇ **karcinom acinarnih stanica**
  - ◇ **adenoid cistični karcinom**
  - ◇ **sekretorni karcinom**
  - ◇ **mukoepidermoidni karcinom**
  - ◇ **polimorfni adenokarcinom**
  - ◇ **karcinom visokih stanica s obrnutom polarnošću**
- ◆ **Neuroendokrini tumori**
- ◆ **Papilarni tumori**

**Invazivni karcinom dojke NST** obuhvaća heterogenu skupinu tumora s mnogo varijanti: tumori s medularnim karakteristikama, s neuroendokrinim karakteristikama, osteoklastima slični stromalni gigantomcelularni tumori, pleomorfni tumori, koriokarcinomatozni tumori, tumori s melanocitnim karakteristikama i ostale rijetke varijante tumora kao što su onkocitni, sebacealni i drugi. U 70 do 80 % slučajeva su ER+, u 10 do 15 % slučajeva HER2+, a u 10 do 15 % slučajeva radi se o trostruko negativnom raku dojke. Genetske promjene su karakteristične za svaku pojedinu molekularnu skupinu tj. intrinzičnu podgrupu, a ishod bolesti ovisi o klasičnim prognostičkim faktorima kao što su dob, stadij, histološki stupanj diferenciranosti tumora, limfovaskularni status i drugi (5,26).

**Mikroinvazivni karcinom** je invazivni rak dojke s invazijom kroz mioepitel i bazalnu membranu  $\leq 1$  mm. Obuhvaća oko 1 % svih invazivnih tumora dojke i najčešće se nalazi u sklopu DCIS, a ponekad i LCIS i Pagetove bolesti dojke. Ima ponešto agresivnije patološke

karakteristike od DCIS i invazivnog NST – u oko 30 % slučajeva je ER-, u oko 35 % slučajeva HER2+ i često ima visok proliferacijski indeks Ki67 (27,28).

Za **invazivni lobularni karcinom (ILC)** je karakterističan gubitak transmembranskog proteina *E*-kadherina koji je kodiran genom *CDH1*. Često je multicentričan, bilateralan i rijetko se nađe u nosilaca *BRCA* mutacija. Postoji nekoliko histoloških varijanti ILC: klasični, pleomorfni, sa stanicama tipa prstena pečatnjaka, alveolarni, solidni, histiocitoidni i tubulolobularni. Većinom se radi o ER+HER2- tipu tumora. U pojedinih histoloških varijanti npr. pleomorfnog lobularnog karcinoma nešto je češći trostruko negativni fenotip uz agresivnije biološko ponašanje i lošiju prognozu bolesti. U oko 50 % slučajeva ILC-a mutiran je neki od gena koji sudjeluju u PI3K-signalnom putu (*PIK3CA*, *PTEN*, *AKT1*), osim toga su nađene i češće mutacije gena *HER2*, *HER3*, *FOXA1* i *ESR1*. U usporedbi s invazivnim rakom dojke NST prognoza bolesti kod klasične varijante ILC je jednaka ili bolja, dok su ostale varijante ILC u pravilu prognostički lošije (29,30).

Udio **tubularnog karcinoma** u invazivnom raku dojke iznosi 1 do 4 %. Tubularni karcinom većinom ima ER+HER2- fenotip i genetske promjene uobičajene za luminalne tumore niskog gradusa (gubitak 16q, dobitak 1q, rijetko gubitak 17q). Rijetko daje udaljene metastaze i prognostički je povoljan. Stopa smrtnosti je kod tubularnog karcinoma niska pa treba odvagnuti korist adjuvantne terapije (31).

Učestalost **kribriformnog karcinoma** je manje od 1 %. Većinom je riječ o slabo proliferativnim, ER+HER2- tumorima niskog gradusa. Prognoza bolesti je jako dobra, osobito za „čisti“ podtip, dok je „mješoviti“ podtip prognostički nešto lošiji (32).

Oko 4 % invazivnih tumora dojke su **mucinozni karcinomi**, od čega je 2 % „čisti“ podtip. Radi se o ER+HER2- tumorima s niskom frekvencijom genskih promjena, ali bez uobičajenih genskih promjena za luminalne tumore niskog gradusa (gubitak 16q, dobitak 1q, *PIK3CA*, *AKT1*). Prognoza bolesti je povoljna (32,33).

**Mucinozni cistadenokarcinom** dojke je vrlo rijedak tumor, najčešće ER-HER2- fenotipa, ali opisano je i nekoliko slučajeva HER2+ tumora. Prema dosadašnjim iskustvima radi se o prognostički povoljnim tumorima, ali potreban je veći broj bolesnika za sigurniju prosudbu (34,35).

**Invazivni mikropapilarni karcinom** se javlja u kombinaciji s invazivnim rakom dojke NST, dok je „čisti“ podtip izrazito rijedak. Učestalost mu je 3 do 6 %, uglavnom se radi o ER+, a u oko 20 % slučajeva i HER2+ tumoru. Ima genske promjene tipične za luminalni B tumore (*PIK3CA*, *TP53*, *GATA3*, *MAPK*). Često se kod dijagnoze nađe pozitivna



limfovaskularna invazija i metastaze u regionalnim limfnim čvorovima. Iako je rizik za povrat bolesti veći, prognoza bolesti je jednaka ili bolja nego u invazivnog raka dojke NST (36–38).

„Čisti“ **karcinom dojke s apokrinom diferencijacijom** obuhvaća manje od 1 % svih invazivnih tumora dojke. Da bi se postavila dijagnoza apokrinog raka dojke više od 90 % tumora morfološki mora odgovarati apokrinom tipu i najmanje 10 % tumora mora biti ER-PR-AR+ fenotipa. U većini slučajeva radi se o trostruko negativnom tipu tumora, a u 1/3 slučajeva se nađe HER2-amplifikacija i pojačana ekspresija. Genske promjene kod HER2+ podtipa apokrinog raka dojke preklapaju se s molekularnim apokrinim tumorima (MAT), a genske promjene kod trostruko negativnog podtipa apokrinog raka dojke s LAR kohortom trostruko negativnog raka dojke (visoka učestalost *PIK3CA/PTEN/AKT* i *TP53* mutacija). Riječ je o biološki agresivnim tumorima s lošom prognozom ishoda bolesti (39,40).

**Metaplastični karcinom** dojke je biološki agresivan tumor koji se javlja s učestalošću od oko 1 % svih invazivnih tumora dojke. Fenotipski je riječ o ER-HER2- tumorima s visokim indeksom proliferacije Ki67. Genski profil sličan je bazalnim trostruko negativnim tumorima s učestalo prisutnom mutacijom gena *TP53* i aktiviranim PI3k/Akt-signalnim putem zbog mutacije gena *PIK3CA*, dok je u bazalnih trostruko negativnih tumora češća mutacija gena *PTEN* i *INPP4B*. U oko 10 % slučajeva nađe se i mutacija *KDM6A*. Histološki predstavlja nezavisni faktor rizika za lošu prognozu ishoda bolesti (41,42).

**Karcinom acinarnih stanica** je vrlo rijedak, većinom se radi ER-HER2- tumoru. Iako ima genske promjene karakteristične za trostruko negativne tumore dojke, prema dosadašnjim iskustvima radi se o prognostički povoljnom raku dojke. Ipak, zbog malog broja bolesnika i mogućeg postojanja agresivne slabo diferencirane komponente unutar tumora potreban je oprez kod procjene ishoda bolesti (43).

Za **adenoid cistični karcinom** karakteristična je fuzija gena *MYB-NFIB* uslijed translokacije t(6;9)(q22–23;p23–24) i promjene u genima *MYB* i *MYBL*. Učestalost mu je oko 1 % svih invazivnih karcinoma dojke. Radi se o gotovo univerzalno trostruko negativnim tumorima, ali s izostankom somatskih mutacija tipičnih za trostruko negativne tumore (*TP53* i *PIK3CA*). To može objasniti i prilično indolentan tijek bolesti s 10-godišnjim preživljenjem oko 90 % (44).

**Sekretorni karcinom** se javlja u manje od 1 % slučajeva invazivnih karcinoma dojke i u više od 90 % slučajeva je prisutna translokacija t(12;15)(p13;q25) s posljedičnom fuzijom gena *ETV6-NTRK3*. Iako je većinom trostruko negativnog fenotipa, ima nizak proliferacijski

indeks Ki67, tijek bolesti je indolentan, a prognoza povoljnija od invazivnog raka dojke NST (45).

**Mukoepidermoidni karcinom** je vrlo rijedak, ER-HER2- tumor za koji su karakteristične genske promjene slične mukoepidermoidnim tumorima žlijezda slinovnica s promjenama gena *MAML2*. Iz dosadašnjeg iskustva prognoza se čini povoljnija od invazivnog raka dojke NST, ali je potreban veći broj slučajeva za sigurniju procjenu (46).

**Polimorfni adenokarcinom** je izrazito rijedak ER-HER2- tumor. Zasad je u literaturi dostupna molekularna analiza samo jednog slučaja, a prema dosadašnjim saznanjima ima indolentan tijek bolesti (47,48).

**Karcinom visokih stanica s obrnutom polarnošću** je vrlo rijedak, ER-HER2- tumor za koji je karakteristična mutacija *IDH2*, a često se nađe i mutacija *PIK3CA*. Prema dosadašnjem iskustvu radi se o indolentnom tumoru s povoljnom prognozom ishoda bolesti (49).

**Neuroendokrini tumori** javljaju se u 1 % slučajeva svih invazivnih tumora dojke. Neuroendokrini tumori su najčešće dobro diferencirani ER+HER2- tumori, s molekularnim karakteristikama luminalnih tumora dojke. Najčešće se nađu mutacije gena *FOXA1*, *TBX3*, *GATA3*, i *ARID1A*, ali rijetko mutacije gena *TP53* i *PIK3CA* i rijedak je istovremeni gubitak 16q i dobitak 1q. Imaju sličnu prognozu kao invazivni rak dojke NST. S druge strane, neuroendokrini karcinomi su slabo diferencirani tumori, ER+ u 30 do 50 % slučajeva, HER2-, s Ki67 često višim od 90 %. Kod sitnostaničnih neuroendokrinih karcinoma često su prisutne istovremene mutacije gena *TP53* i *RBI*, dok kod velikostaničnih neuroendokrinih karcinoma većinom izostaje mutacija gena *RBI*. Prognoza bolesti je lošija nego kod invazivnog raka dojke NST (50).

Učestalost **papilarnih tumora** je  $\leq 1$  %. Većinom se radi o ER+HER2- tumorima niskog gradusa s molekularnim karakteristikama luminalnih tumora. Imaju nisku razinu genomskih aberacija i visoku prevalenciju mutacija *PIK3CA*. Klinički tijek bolesti im je povoljan (51,52).

## 1.12. GENSKO PROFILIRANJE I MOLEKULARNA KLASIFIKACIJA RAKA DOJKE

Prekretnica u razumijevanju biologije raka dojke zbila se 2000. kada su Perou i suradnici mjereći komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) prepoznali

slične obrasce u ekspresiji gena između pojedinih uzoraka raka dojke te su temeljem karakterističnih „molekularnih portreta“ uspjeli identificirati četiri različite skupine: a) ER+ / luminalnu skupinu u kojoj je prevladavala ekspresija gena karakterističnih za luminalnu epitelnu stanicu dojke, b) bazalnu skupinu u kojoj je prevladavala ekspresija gena tipičnih za mioepitelne i bazalne epitelne stanice dojke i u kojoj karakteristično nema ekspresije hormonskih niti receptora HER2, c) HER2 obogaćenu skupinu s visokom ekspresijom *ERBB2* gena i d) skupinu sličnu normalnom tkivu dojke (53). Unutar luminalne skupine su potom definirane najmanje dvije podskupine: luminalni A i luminalni B – s većom ekspresijom gena za mitozu i proliferaciju (54). Određena heterogenost utvrđena je i unutar HER2 obogaćene kao i bazalne skupine (55). Lehmann i suradnici dokazali su postojanje najmanje četiri različite transkripcijske podskupine trostruko negativnog raka dojke: BL1 i BL2 (engl. *basal-like 1*, *basal-like 2*), M (engl. *mesenchymal*), LAR (engl. *luminal androgen receptor*) (56). Prvotno definirana intrinzična skupina slična normalnom tkivu dojke kasnije je dovedena u pitanje zbog mogućnosti da se radi o kontaminaciji uzorka RNA raka dojke s RNA normalnog tkiva (57).

Brojne studije su koristeći različite genske potpise potvrdile postojanje intrinzičnih skupina, uz djelomičnu podudarnost u kategorizaciji tumora ovisno o tipu mikropostrojbi, definiranom pragu za određivanje genske ekspresije i razini heterogenosti unutar tumora. Najveća podudarnost bila je kod kategorizacije bazalnih, a najmanja kod luminalni B i HER2 obogaćenih tumora. Kao standardna metoda za kategorizaciju raka dojke u intrinzične molekularne skupine razvijen je PAM50 test ekspresije gena koji svrstava tumore u luminalni A, luminalni B, HER2 obogaćenu i bazalnu skupinu (58). Naknadno su opisane i nove rijetke skupine: kladin-niska skupina s niskom razinom genetske nestabilnosti, niskim mutacijskim opterećenjem i proliferacijom te visokom razinom infiltracije imunim i stromalnim stanicama i molekularno apokrina skupina karakterizirana ekspresijom androgenskih receptora, nedostatkom estrogenskih receptora i ekspresijom gena karakterističnih za luminalne tumore (40,45,59). Postojanje kladin-niske skupine kao zasebnog entiteta nedavno su doveli u pitanje Fougner i sur. čije istraživanje ukazuje da je smanjeni izražaj kladina fenotipska odlika pojedinih tumora unutar PAM50 određenih skupina, a ne zasebna intrinzična molekularna skupina kako se mislilo ranije (59).

Budući da gensko profiliranje nije bilo dostupno za rutinsku kliničku primjenu, odlučeno je da se radi točnije procjene ishoda bolesti i usmjeravanja odluke o liječenju tumori grupiraju u tzv. surogatne intrinzične skupine definirane rutinskom histologijom i imunohistokemijskim podacima (17,55). Na konferenciji u St. Gallenu 2013. prihvaćena je

podjela u surogatne intrinzične skupine temeljene na imunohistokemijskom bojenju tri proteinska markera: estrogenskog receptora (ER), progesteronskog receptora (PR) i receptora HER2 upotpunjenog *in situ* hibridizacijom. Rak dojke je tako podijeljen u surogatne intrinzične skupine: luminalni A – ER+, PR  $\geq$  20 %, HER2-, Ki67 < 20 %, luminalni B HER2- – ER+, HER2-, PR < 20 % i /ili Ki67 > 20 %, luminalni B HER2+ – ER+, HER2+, HER2+ – HER2+, ER- i PR- i trostruko negativnu – ER-, PR-, HER2- (60). Klasifikacija temeljena na imunohistokemiji i molekularna klasifikacija su pokazale prihvatljivu razinu podudarnosti, iako postoje razlike.

Analizom genomskih profila 3 155 uzoraka raka dojke iz TCGA (engl. *The Cancer Genome Atlas*) baze podataka, METABRIC (engl. *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*) i USO1062 studija utvrđeno je da HER2 amplifikacija postoji u svim PAM50 skupinama i da se u više od polovine slučajeva ne radi o HER2 obogaćenoj skupini. Osim toga, samo je u polovini HER2 obogaćenih tumora bila prisutna HER2 amplifikacija. Tumori koji su transkripcijski pripadali HER2 obogaćenoj skupini mahom su bili pozitivni na androgen receptor (61). Promatrajući učinak anti-HER2 blokade među HER2 pozitivnim tumorima, oni koji su pripadali HER2 obogaćenoj skupini i imali visoku razinu mRNA *ERBB*-gena bili su najosjetljiviji na ciljano liječenje anti-HER2 terapijom i imali su znatno veći postotak patološki kompletnog odgovora na neoadjuvantno liječenje anti-HER2 lijekovima, za razliku od tumora koji su zadovoljili samo jedan kriterij (62).

Promatrajući luminalne tumore, Cejalvo i sur. su napravili pregled 32 studije s 13 091 uzoraka raka dojke te su našli da u 8 % slučajeva ranog raka dojke i 15 % slučajeva metastatskog raka dojke tumori okarakterizirani imunohistokemijom kao HR+HER2- nisu pripadali u luminalnu intrinzičnu skupinu. Klinički su ti tumori bili neovisni o estrogenu, rezistentni na CDK 4/6 inhibiciju, osjetljivi na kemoterapiju i lošijeg ishoda bolesti (63). U ožujku 2020. ASCO je upotpunio smjernice o hormonski pozitivnom raku dojke tako da je formirana nova skupina tumora s niskim izražajem estrogenskih receptora u tumoru (1-10 %) jer genomski profil takvih tumora većinom odgovara genomskom profilu hormonski negativnih tumora što značajno utječe na liječenje (64).

U slučaju različitih rezultata dobivenih molekularnom i imunohistokemijskom analizom, bolesnici trebaju biti zbrinuti prema nalazu imunohistokemije.

Kako se povećavao broj istraživanja koja su osim genske ekspresije i molekularnih karakteristika proučavala genomiku i proteomiku raka dojke, postalo je jasno koliko je „genski krajolik“ raka dojke složen. Molekularna raznolikost između primarnog i pojedinih

metastatskih sijela, a poviše toga i unutar samog tumora postat će glavni izazov u liječenju raka dojke. Najveće molekularne analize uzoraka raka dojke napravljene su u sklopu tri odvojena programa za proučavanje genomike raka: TCGA, ICGC (engl. *International Cancer Genome Consortium*) i METABRIC.

Analizirajući uzorke raka dojke iz METABRIC programa Curtis i sur. su primijetili da zametne varijacije broja kopija gena (engl. *copy number variation, CNV*) i promjene jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism, SNP*) isto kao i stečene aberacije gena (engl. *copy number alteration, CNA*) utječu na promjenu ekspresije gena. Najveća varijabilnost ekspresije primijećena je kod gena u blizini stečenih aberacija – *cis*-CNA. Integracijom aberacija broja kopija i transkripcijskim profiliranjem *cis*-povezanih gena Curtis i sur. su identificirali 10 različitih molekularnih podskupina tumora dojke i nazvali ih integrativni klasteri (engl. *Integrative clusters, IntClusts*) (65).

Razvojem naprednih tehnika genskog sekvenciranja omogućeno je provođenje molekularnih analiza raka dojke visoke rezolucije na višestrukim razinama. To je bio uvod u razumijevanje kliničkih posljedica pojedinih mutacija, za što je trebao znatno veći broj uzoraka i dugoročno kliničko praćenje bolesnika. Imperativ je bio identificirati tzv. pokretačke ili pogonske mutacije (engl. *driver mutation*), što je iznimno zahtjevno. Ponavljanje iste mutacije u uzorcima raka dobivenim od različitih bolesnika i dalje je jedan od najpouzdanijih pokazatelja da se radi o pogonskoj mutaciji (66). Kako tumor napreduje nakuplja se sve veći broj mutacija koje ne moraju biti jednake u svim stanicama tumora, tzv. subklonalne mutacije. One doprinose heterogenosti tumora i otežavaju liječenje. Jedan od glavnih izazova precizne onkologije je razlučiti koje su pogonske mutacije rani klonski događaji, a koje kasniji subklonski događaji, kako bi se povećala učinkovitost ciljane terapije.

### 1.13. HISTOLOŠKI STUPANJ DIFERENCIRANOSTI TUMORA

Histološki stupanj diferenciranosti tumora procjenjuje se prema Elston-Ellis modifikaciji Scarff-Bloom-Richardson sustava (67,68). Procjenjuju se i boduju s 1 do 3 boda tri karakteristike tumora: tubularna formacija, broj mitozu i pleomorfizam jezgara. Ovisno o zbroju bodova, tumori se svrstavaju u tri stupnja: stupanj I – 3 do 5 bodova, dobro diferencirani, stupanj II – 6 do 7 bodova, srednje diferencirani, stupanj III – 8 do 9 bodova, slabo diferencirani. Histološki stupanj diferenciranosti nezavisan je pokazatelj specifičnog preživljenja od raka dojke i preživljenja bez znakova bolesti zbog čega je uvršten kao jedan

od čimbenika potrebnih za određivanje prognostičkog stadija bolesti u posljednjoj TNM klasifikaciji raka dojke (69,70).

#### 1.14. IZRAŽENOST HORMONSKIH RECEPTORA, RECEPTORA HER2 I MARKERA PROLIFERACIJE Ki-67

Imunohistokemijsko određivanje izraženosti estrogenskih i progesteronskih te receptora HER2 obavezno je za sve novodijagnosticirane slučajeve raka dojke. Rutinski se radi na uzorku tkiva dobivenom biopsijom koje je fiksirano u formalinu i uklopljeno u parafin. Može se napraviti i na tkivu dobivenom nakon kirurškog zahvata, ali je fiksacija uzoraka dobivenih biopsijom bolja zbog čega je veća vjerojatnost očuvanja antigena u tkivu. Ako su na uzorku dobivenom biopsijom ER, PR i HER2 negativni, trebalo bi ponoviti ispitivanje na tkivu dobivenom nakon kirurškog zahvata (17).

Ako je zabilježeno bojenje jezgara u 1 % ili više invazivnih stanica, radi se o hormon-receptor pozitivnom raku dojke (71). HER2 pozitivan rak dojke karakteriziran je jakim i potpunim imunohistokemijskim bojenjem membrane ili amplifikacijom gena *ERBB2* dokazanom postupkom fluorescentne ili kromogene *in situ* hibridizacije u više od 10 % invazivnih stanica. Indeks proliferacije Ki67 može pružiti dodatne informacije za usmjeravanje terapijskog pristupa, osobito u ER+ HER2- raku dojke. Vrijednost koja je prihvaćena kao prag proliferacijske aktivnosti je bojenje jezgara u 20 % invazivnih stanica (5).

#### 1.15. ZAHVAĆENOST LIMFNIH ČVOROVA

Zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova u ranom raku dojke najznačajniji je čimbenik za prognozu ishoda bolesti i o njemu ovisi odluka o adjuvantnom sistemskom liječenju i zračenju. Kod postojanja kliničke ili radiološke sumnje na zahvaćenost pazušnih limfnih čvorove, potrebno je napraviti biopsiju. Ako ne postoji sumnja na zahvaćenost limfnih čvorova, a radi se o T1-T2 cN0 stadiju bolesti, moguće je napraviti biopsiju čvorova čuvara (engl. *sentinel lymph node biopsy, SLNB*). Intraoperativno odstranjene sentinel limfne čvorove treba detaljno pregledati. Ako su pozitivna 1 do 2 sentinel limfna čvora, nije nužno raditi disekciju limfnih čvorova ako je bolesniku u sklopu adjuvantnog liječenja predviđena radioterapija. Bolesnicima koji su liječeni neoadjuvantnom terapijom, a prije započinjanja liječenja su imali negativne pazušne limfne čvorove ili su inicijalno imali zahvaćene čvorove koji su nakon neoadjuvantnog liječenja postali negativni preporuča se napraviti SLNB.

Zahvaćene limfne čvorove je potrebno prije neoadjuvantnog liječenja markirati i odstraniti zajedno sa sentinel limfnim čvorovima. Ako markiranje zahvaćenih čvorova nije moguće treba koristiti dva obilježivača prilikom SLNB (17,72).

## 1.16. STADIJI RAKA DOJKE

Točna procjena stupnja proširenosti raka dojke neophodna je za donošenje pravilne odluke o načinu liječenja i predviđanje tijeka bolesti. Nakon dijagnostičke obrade stadij raka dojke se određuje prema TNM-klasifikaciji, objavljenoj u ažuriranom 8. izdanju UICC/AJCC (73). U odnosu na prethodna izdanja, u posljednjem ažuriranom izdanju TNM klasifikacije određivanje stadija podijeljeno je u tri različite grupe: 1. anatomski stadij – određen isključivo anatomskom proširenošću bolesti pomoću T, N i M kategorija, 2. kliničko prognostički stadij – obuhvaća klinički pregled, radiološku obradu i rezultate istraživanja na uzorcima dobivenim biopsijom, a određen je T, N i M kategorijama, stupnjem diferencijacije tumora te stupnjem izraženosti ER, PR i receptora HER2; 3. patološki prognostički stadij – primjenjuje se u bolesnika kojima je napravljen operativni zahvat bez prethodnog sistemskog ili radioterapijskog liječenja, a određen je svim kliničkim informacijama, biomarkerima te podacima o kirurškom zahvatu i nalazu reseciranog tkiva.

**TNM KLASIFIKACIJA (73)****T kategorija – veličina primarnog tumora i zahvaćenost kože ili torakalne stijenke**

- ◆ **TX** – primarni tumor nije moguće procijeniti
- ◆ **T0** – primarni tumor nije nađen
- ◆ **Tis** – in situ tumor (DCIS, in situ Pagetova bolest)
- ◆ **T1** – tumor veličine do 2 cm
  - ◇ **T1mi** – tumor veličine do 1mm
  - ◇ **T1a** – tumor veći od 1 mm, ali ne veći od 5 mm
  - ◇ **T1b** – tumor veći od 5 mm, ali ne veći od 10 mm
  - ◇ **T1c** – tumor veći od 10 mm, ali ne veći od 20 mm
- ◆ **T2** – tumor veći od 2 cm, ali ne veći od 5 cm
- ◆ **T3** – tumor veći od 5 cm
- ◆ **T4** – tumorom zahvaćena koža i/ili stijenka prsišta neovisno o veličini tumora, uključujući upalni rak dojke; invazija samo dermisa se ne ubraja u T4 tumore
  - ◇ **T4a** – tumorom zahvaćena stijenka prsišta; zahvaćenost samo pektoralnog mišića se ne ubraja u T4 tumore
  - ◇ **T4b** – ulceracija kože i/ili makroskopski satelitski čvorići u koži i/ili koža poput narančine kore koja ne zadovoljava kriterije za upalni rak dojke
  - ◇ **T4c** – istovremeno prisutni T4a i T4b
  - ◇ **T4d** – upalni rak dojke

**N kategorija – zahvaćenost područnih limfnih čvorova****cN (klinička kategorija)**

- ◆ **cNX** – ne može se odrediti zahvaćenost područnih limfnih čvorova
- ◆ **cN0** – područni limfni čvorovi nisu zahvaćeni tumorom
- ◆ **cN1** – metastaze u pomičnim istostranim pazušnim limfnim čvorovima razine I, II
  - ◇ **cN1m** – prisutne mikrometastaze na području većem od 0,2 mm, ali manjem od 2 mm (koristi se samo ako je biopsija sentinel limfnog čvora napravljena predoperativno, u slučaju neoadjuvantnog liječenja)



- ◆ **cN2** – metastaze u istostranim pazušnim limfnim čvorovima razine I, II koji su fiksirani za okolne strukture ili međusobno; ili metastaze u unutarnjim limfnim čvorovima dojke bez zahvaćanja pazušnih limfnih čvorova
  - ◇ **cN2a** – metastaze u istostranim pazušnim limfnim čvorovima razine I, II koji su fiksirani za okolne strukture ili međusobno
  - ◇ **cN2b** – metastaze u unutarnjim limfnim čvorovima dojke bez zahvaćanja pazušnih limfnih čvorova
- ◆ **cN3** – metastaze u pazušnim limfnim čvorovima razine III (ispod ključne kosti); ili metastaze u istostranim pazušnim limfnim čvorovima razine I, II i u unutarnjim limfnim čvorovima dojke; ili metastaze u limfnim čvorovima iznad ključne kosti
  - ◇ **cN3a** – metastaze u pazušnim limfnim čvorovima razine III (ispod ključne kosti)
  - ◇ **cN3b** – metastaze u istostranim pazušnim limfnim čvorovima razine I, II i u unutarnjim limfnim čvorovima dojke
  - ◇ **cN3c** – metastaze u limfnim čvorovima iznad ključne kosti

#### **pN (patološka N kategorija)**

- ◆ **pNX** – ne može se odrediti zahvaćenost područnih limfnih čvorova
- ◆ **pN0** – područni limfni čvorovi nisu zahvaćeni tumorom ili su prisutne izolirane tumorske stanice
  - ◇ **pN0(i+)** – prisutne izolirane tumorske stanice u čvoru (manje od 200 stanica i do 0,2 mm u promjeru)
  - ◇ **pN0(mol+)** – tragovi tumorskih stanica nađeni molekularnim testiranjem (RT-PCR)
- ◆ **pN1** – tumorom su zahvaćena 1 do 3 pazušna limfna čvora i/ili je tumor nađen u klinički negativnom unutarnjem limfnom čvoru dojke
  - ◇ **pN1mi** – prisutne mikrometastaze u pazušnim limfnim čvorovima na području većem od 0,2 mm, ali manjem od 2 mm
  - ◇ **pN1a** – zahvaćena 1 do 3 pazušna limfna čvora, najmanje jedno područje veće od 2 mm
  - ◇ **pN1b** – nađene metastaze u unutarnjem limfnom čvoru dojke prilikom biopsije sentinel limfnog čvora; ne uključuje izolirane tumorske stanice
  - ◇ **pN1c** – istovremeno prisutni N1a i N1b

- ◆ **pN2** – tumorom je zahvaćeno 4 do 9 pazušnih limfnih čvorova ili su kliničkim pregledom nađeni uvećani unutarnji limfni čvorovi dojke bez zahvaćanja pazušnih limfnih čvorova
  - ◇ **pN2a** – zahvaćeno 4 do 9 pazušnih limfnih čvorova, najmanje jedno područje veće od 2 mm
  - ◇ **pN2b** – kliničkim pregledom nađeni uvećani unutarnji limfni čvorovi dojke, neovisno o mikroskopskom nalazu, bez zahvaćanja pazušnih limfnih čvorova
- ◆ **pN3** – bilo koje od navedenog:
  - ◇ **pN3a** – zahvaćeno 10 ili više pazušnih limfnih čvorova s najmanje jednim područjem većim od 2 mm ili zahvaćeni limfni čvorovi ispod ključne kosti
  - ◇ **pN3b** – zahvaćen najmanje jedan pazušni limfni čvor i kliničkim pregledom nađeni uvećani unutarnji limfni čvorovi dojke ili zahvaćena 4 ili više pazušna limfna čvorova, najmanje jedno područje veće od 2 mm i nađene tumorske stanice u unutarnjem limfnom čvoru dojke prilikom biopsije sentinel limfnog čvora
  - ◇ **pN3c** – zahvaćeni limfni čvorovi iznad ključne kosti

### **M kategorija – zahvaćenost udaljenih organa**

- ◆ **MX** – ne može se odrediti zahvaćenost udaljenih organa
- ◆ **M0** – kliničkim pregledom i radiološkom dijagnostikom nisu nađene metastaze u udaljenim organima
  - ◇ **cM0(i+)** – mali broj tumorskih stanica nađeno je u krvi ili koštanoj srži ili su nađena tumorom zahvaćena područja manja od 0,2 mm u udaljenim limfnim čvorovima
- ◆ **M1** – tumor se proširio na udaljene organe

**AJCC ANATOMSKI STADIJI (73)**

<b>Stadij raka dojke</b>	<b>T kategorija</b>	<b>N kategorija</b>	<b>M kategorija</b>
Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij IA	T1	N0	M0
Stadij IB	T0	N1mi	M0
Stadij IIA	T0	N1	M0
Stadij IIB	T2	N1	M0
Stadij IIIA	T0	N2	M0
Stadij IIIB	T4	N0	M0
Stadij IIIC	bilo koji T	N3	M0
Stadij IV	bilo koji T	bilo koji N	M1

**1.17. DEFINICIJA RANOG RAKA DOJKE**

Rani rak dojke je rak dojke koji se nije proširio dalje od dojke i pazušnih limfnih čvorova, uključujući DCIS te stadij I, IIA, IIB i IIIA raka dojke (74).

**1.18. LIJEČENJE RANOG INVAZIVNOG RAKA DOJKE**

U liječenju ranog invazivnog raka dojke osim kirurških zahvata koriste se kemoterapija, biološka (anti-HER2) terapija, hormonska terapija i zračenje. Odluka o načinu liječenja donosi se temeljem kliničkog i radiološkog nalaza i histološke analize tumorskog tkiva dobivenog biopsijom, a u skladu sa željom bolesnika. Bolesnicima kojima je genetičkim testiranjem nađena vjerojatno patogena ili patogena varijanta u nekom od gena koji su povezani s povećanim rizikom za rak dojke preporučuje se mastektomija neovisno o veličini tumora. U bolesnica kojima je rak dojke otkriven u ranoj fazi, a nisu kandidati za neoadjuvantno liječenje, indicirana je operacija. Prednost se daje poštudnom kirurškom zahvatu nakon kojeg je potrebno provesti adjuvantno zračenje. Mastektomija je indicirana u bolesnica s nepovoljnim omjerom veličine tkiva dojke i tumora, multicentričnih tumora, nemogućnosti postizanja negativnog kirurškog ruba, kada nije moguće provesti adjuvantno zračenje, kada nije moguće postići zadovoljavajući estetski rezultat ili kada se za takav zahvat opredijeli bolesnica (17). Bolesnicima u kojih je primarni tumor T2 ili veći, imaju zahvaćene pazušne limfne čvorove ili su histološke karakteristike tumora nepovoljne (HER2 tumori, trostruko negativni tumori) predlaže neoadjuvantno liječenje, a potom operativni zahvat. Ako se u bolesnika koji su pri dijagnozi imali zahvaćene pazušne limfne čvorove (cN1) po završetku neoadjuvantnog liječenja utvrdi cN0 bolest, moguće je umjesto disekcije pazušnih limfnih čvorova učiniti biopsiju sentinel limfnog čvora. Bolesnicima kojima je biopsijom

potvrđeno postojanje metastaza u sentinel čvorovima treba napraviti disekciju pazušnih limfnih čvorova i nakon toga provesti adjuvantno zračenje (72,75).

Adjuvantno sustavno liječenje indicirano je u bolesnika koji su pod povećanim rizikom za povrat bolesti temeljem kirurškog nalaza i/ili histoloških karakteristika tumora. U sklopu adjuvantnog liječenja primjenjuje se kemoterapija, biološka terapija kod HER2 pozitivnih tumora, hormonska terapija kod hormonski ovisnih tumora i zračenje. Zračenje je indicirano nakon poštodne operacije, kod T3 i T4 primarnih tumora, pozitivnih pazušnih limfnih čvorova ili neadekvatnog kirurškog ruba (17).

Izbor sustavne terapije ovisi o izražaju hormonskih receptora, receptora HER2 i proliferacijskog indeksa Ki 67, te drugim prognostičkim čimbenicima kao što su zahvaćenost limfnih čvorova, veličina tumora, histološki tip tumora, gradus tumora, limfovaskularna invazija i ostatna bolest u slučaju provedenog neoadjuvantnog liječenja. Kod hormon ovisnih HER2 negativnih tumora s metastazama u do 3 pazušna limfna čvora, radi dobivanja dodatnih prognostičkih informacija i pomoći kod odluke o kemoterapijskom adjuvantnom liječenju mogu se koristiti genomski prognostički testovi kao što su EndoPredict, MammaPrint, Oncotype DX i Prosigna (17,76).

U luminalnom A ranom invazivnom raku dojke kemoterapija je indicirana samo u slučaju nepovoljnih karakteristika bolesti kao što su agresivniji histološki podtipovi, zahvaćenost 4 ili više pazušna limfna čvora, primarni tumor T3 ili veći.

Luminalne B tumore manje od 2 cm i bez zahvaćanja limfnih čvorova opravdano je najprije kirurški odstraniti te potom liječiti adjuvantnom kemoterapijom pa adjuvantnom hormonskom terapijom i ako je indicirano zračenjem. Luminal B tumore koji su veći od 2 cm ili imaju druge nepovoljne karakteristike treba liječiti neoadjuvantnom kemoterapijom, a nakon toga kirurški, adjuvantnom hormonskom terapijom i ako je indicirano zračenjem.

U luminalnom B HER2 pozitivnom ranom invazivnom raku dojke preporuka je liječenje započeti neoadjuvantnom kemoterapijom, a nakon toga pristupiti kirurškom zahvatu. Postoperativno, ovisno o tome je li u kirurški odstranjenom tkivu dojke nađeno ostatnog tumora, liječenje se nastavlja istom ili novom linijom anti-HER2 terapije uz hormonsku terapiju i zračenje ako je indicirano.

U HER2 pozitivnom ranom invazivnom raku dojke liječenje se većinom započinje kemoterapijom, nakon čega slijedi kirurški zahvat. Izbor adjuvantne biološke terapije ovisi o konačnom patohistološkom nalazu uz zračenje ako je indicirano.

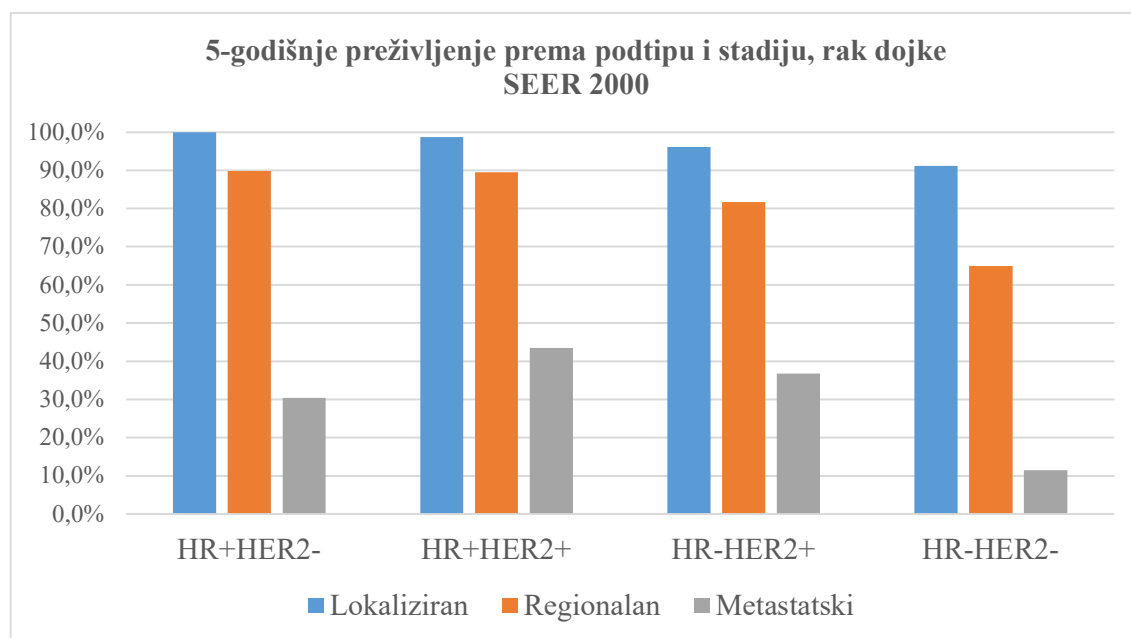
Liječenje trostruko negativnog ranog invazivnog raka dojke u pravilu se sastoji od neoadjuvantne kemoterapije nakon čega slijedi kirurški zahvat. Kod ostatne bolesti u kirurški odstranjenom tkivu dojke preporučuje se adjuvantni kapecitabin te ako je indicirano i adjuvantno zračenje.

### 1.19. PROGNOZA RANOG RAKA DOJKE

Za procjenu ishoda bolesti i usmjeravanje terapijskih odluka koriste se klasični klinički i patološki parametri kao što su histološki tip tumora, veličina tumora, stupanj diferencijacije tumora, zahvaćenost limfnih i vaskularnih struktura, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova te izraženost estrogenskih, progesteronskih i receptora HER2.

Povrat bolesti nakon preboljelog ranog invazivnog raka dojke može se dogoditi lokalno – ostatno tkivo dojke, koža ili stijenka prsišta, regionalno – područni limfni čvorovi ili udaljeno – najčešće kosti, pluća i jetra. Od 20 do 30 % bolesnika kojima je dijagnosticiran rani rak dojke doživjet će udaljeni povrat bolesti (13).

Među rizične faktore za povrat bolesti ubrajaju se veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, uzak ili pozitivan kirurški rub, izostanak adjuvantnog zračenja nakon poštene operacije dojke, prisutnost DCIS za kontralateralnu dojku, mlađa životna dob, izostanak adjuvantne hormonske terapije kod hormon ovisnih tumora, trostruko negativan podtip tumora, upalni rak dojke i prekomjerna tjelesna težina (77).



**Slika 1.** 5-godišnje preživljenje prema podtipu i stadiju, rak dojke SEER 2000 (podaci preuzeti iz SEER (engl. *Surveillance, Epidemiology, and End Results*) programa) (78)

## 1.20. IMUNOLOŠKI SUSTAV

Imunološki sustav je kompleksan sustav stanica i organa koji putem sofisticirane mreže signala može razlikovati potencijalno štetne tvari u organizmu od normalnih stanica domaćina te ih pomoću uspostavljenih obrambenih mehanizama ukloniti.

Ugrubo, imunološki sustav se dijeli na urođenu imunost i stečenu imunost koje se međusobno razlikuju brzinom i specifičnošću reakcije. Urođena i stečena imunost su međusobno ovisne i djeluju interaktivno, a njihova regulacija ovisi o brojnim različitim citokinima čija je svrha održavanje imunološke homeostaze, koordinacija urođenih i stečenih imunoloških odgovora i promicanje imunološke memorije (79).

## 1.21. UROĐENA I STEČENA IMUNOST

Urođeni imunološki sustav najstarija je komponenta ljudskog imunološkog sustava. Obuhvaća anatomske i fiziološke barijere (epitel kože, gastrointestinalnog, respiratornog i genitourinarnog trakta), antimikrobne peptide i proteine, humoralne komponente (komplement i opsonine) i stanične komponente (neutrofile, monocite, makrofage, dendritične stanice i urođene limfoidne stanice). U urođene limfoidne stanice ubrajaju se NK-stanice (engl. *natural killer cell*), LTi stanice (engl. *lymphoid T inducer cell*) i urođene pomagačke

stanice ILC1/ILC2/ILC3 (*engl. helper-like ILC*) (80). Urođeni imunološki mehanizmi sprečavaju ulazak patogena i uspostavljanje infekcije, uklanjaju ostatke mrtvih ili oštećenih stanica domaćina i mikroba i stimuliraju stečeni imunološki odgovor.

Aktivacija urođenog imunološkog odgovora oslanja se na prepoznavanje molekularnih uzoraka patogena pomoću specifičnih molekula za prepoznavanje obrazaca ili PRM (*engl. pattern recognition molecule*). U PRM se ubrajaju stanični receptori za prepoznavanje obrazaca ili PRR (*engl. pattern recognition receptor*) i izvanstanični topljivi PRM. Brojni specijalizirani receptori za prepoznavanje obrazaca se nalaze na stanicama urođenog imunološkog sustava kao što su dendritičke stanice i makrofazi, ali mogu se naći i na drugim stanicama. Postoji više razreda PRR, uključujući TLR (*engl. toll-like receptor*), CLR (*engl. c-type lectin receptor*), NLR (*engl. nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*) i RLR (*engl. RIG-1-like receptor*). PRR mogu biti aktivirani molekularnim obrascima patogenih mikororganizama tzv. PAMP (*engl. pathogen-associated molecular pattern*) ili molekularnim obrascima povezanim s oštećenjem tzv. DAMP (*engl. damage-associated molecular pattern*) odnosno sastavnicama jezgre ili citosola koji se u normalnim okolnostima nalaze unutar stanice, a jednom kada stanica bude oštećena bivaju otpušteni u izvanstanični matriks (81). Izvanstanični PRM imaju ključnu ulogu u humoralnom dijelu urođenog imuniteta. Sposobni su prepoznati različite patogene i eliminirati ih zajedničkim mehanizmima kao što su aktivacija komplementa, opsonizacija, aglutinacija, neutralizacija i regulacija upale (82). Stanice urođenog imunološkog odgovora oslobađaju različite citokine koji su presudni u aktivaciji i diferencijaciji limfocita, a utječu i na opseg i na vrstu stečenog imunološkog odgovora na patogen.

Stečena imunost posredovana je limfocitima T i B. Tri obilježja razlikuju stečenu imunost od urođene: specifičnost – sposobnost T-stanica stečene imunosti da prepoznaju diskretne razlike između patogena; imunološko pamćenje – sposobnost T-stanica stečene imunosti da zapamte prethodni susret s patogenom i kod ponovnog izlaganja istom patogenu brže i intenzivnije reagiraju i imunološka tolerancija – sposobnost razlikovanja stranih molekula od vlastitih i izostanak reakcije na vlastite stanice i tkiva (83). Aktivacija stečenog imunološkog sustava dešava se prvenstveno putem antigen-predočnih stanica ili APC (*engl. antigen presenting cell*). U klasične APC ubrajamo dendritičke stanice, makrofage, Langerhansove stanice i limfocite B (84). Nakon što budu aktivirane, APC počinju lučiti citokine i kemokine te preradom i predočavanjem antigena limfocitima posreduju u aktivaciji stečenog imunološkog odgovora. Proces prerade i predočavanja antigena zbiva se u organiziranom slijedu događaja. O načinu na koji je antigen prepoznat i prerađen ovisi hoće li

imunostimulacijski peptidi biti prezentirani u sklopu MHC I ili MHC II kompleksa (85,86). Istodobno se povećava izraženost kostimulacijskih molekula na površini stanične membrane APC potrebnih za odgovarajuću aktivaciju T-stanica. Ovisno izražavaju li CD4 ili CD8 molekulu na površini, naivne T-stanice dijele se na limfocite CD4+ ili CD8+. Antigen uklopljen u MHC na površini APC veže se za T-stanični receptor ili TCR (*engl. T cell receptor*) na limfocitima CD4+ ili CD8+. O površinskim molekulama CD4 ili CD8 ovisi hoće li se TCR vezati na antigen predočen u strukturi MHC II ili MHC I kompleksa. Naivne CD4+ stanice vežu se na antigen ugrađen u MHC II na površini APC te postaju pomagački limfociti CD4+ – stanice koje se ovisno o mikrookolišu mogu dalje diferencirati u efektorske podskupine Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, Tfh ili regulatorne Treg stanice (87,88). Suprotno tome, naivne CD8+ stanice vežu se na antigene ugrađene u MHC I na površini APC te postaju citotoksični limfociti CD8+. Do sada je identificirano nekoliko podskupina citotoksičnih CD8+ limfocita T – Tc1, Tc2, Tc9, Tc17 i Tc22 (89). Kako bi došlo do aktivacije limfocita T potrebna je dodatna sekundarna signalizacija. Kod limfocita CD4+ dolazi do vezanja kostimulacijske molekule CD28 za B7.1 (CD80) ili B7.2 (CD86) molekulu na APC čime se pokreće kompleksni biokemijski signal u limfocitima CD4+ i konačno proliferacija specifičnog klona za prepoznati antigen. Kako imunološki odgovor ne bi bio pretjeran, stimulacija CD28 molekule potiče i produkciju CTLA-4 (CD152) molekule koja se kompetitivno veže za B7 molekulu na APC i zaustavlja pokrenuti imunološki odgovor. Limfociti CD8+ za aktivaciju ovise o vezanju kostimulacijskih molekula CD70 i 41-BB (CD134). Da bi došlo do odgovarajuće proliferacije specifičnog klona na podražaj antigenom limfociti T moraju dobiti dodatni signal za preživljavanje od ICOS, 4-1BB i OX40 molekula koje za razliku od CD28 nisu konstitutivni elementi T-stanice. Njihovi ligandi na APC isto tako nisu konstitutivni elementi stanice već bivaju izraženi tek nakon prepoznavanja antigena. Time se osigurava da limfocite T mogu aktivirati samo APC koje su bile u doticaju s antigenom (90,91).

Osim T-stanica, stečeni imunološki sustav uključuje i limfocite B. Stečena imunost posredovana limfocitima B naziva se još i humoralna imunost ili imunost posredovana protutijelima. Aktivacija humoralnog imunološkog odgovora događa se nakon kontakta antigen reaktivnog limfocita B s antigenom. Limfociti B mogu prepoznati gotovo neograničen broj antigenskih epitopa u formi netaknutih proteina. Specijalizirani makrofazi i ne fagocitarne folikularne dendritičke stanice predočuju limfocitima B opsonizirane netaknute antigene izložene na staničnoj površini ili limfociti B dolaze izravno u kontakt s netaknutim topivim antigenima iz okoliša. Jednom kada se antigen veže na B-stanični receptor ili BCR



(*engl. B cell receptor*) dolazi do aktivacije limfocita B što rezultira povećanim izražajem kostimulacijskih (CD86, CD80) i adhezijskih (ICAM1) molekula, receptora za migraciju, molekula odgovornih za preživljavanje te gena za regulaciju staničnog ciklusa. BCR naivnih limfocita B je građen od dva dijela: membranskog imunoglobulina IgM i IgD i heterodimera Ig $\alpha$  i Ig $\beta$  lanca. Aktivacija BCR potiče endocitozu BCR-antigen spoja te u konačnici imunostimulacijski antigenski peptidi nastali preradom antigena u lizosomu bivaju izloženi u sklopu MCH II kompleksa na površini B-stanice i predloženi limfocitima T. Za napredovanje B-staničnog odgovora mora doći do diferencijacije i klonske proliferacije B limfocita koja može biti potaknuta na tri načina: izravnom aktivacijom BCR polivalentnim antigenom, sekundarnim signalima od kostimulacijskih molekula ili putem pomagačkih T-staničnih signala kod nisko valentnih antigena (među ostalim i vezanjem liganda CD40L na limfocitu T s CD40 na limfocitu B). Jednom aktivirane naivne B-stanice koje na površini izražavaju IgM i IgD izoforme mogu procesom rekombinacije promijeniti imunoglobulinsku klasu tj. izoformu BCR u IgG, IgA ili IgE što omogućuje različitu efektorsku funkciju protutijela – citotoksičnost uzrokovanu protutijelima, opsonizaciju antigena i imunomodulatornu ulogu. Diferencijacijom limfocita B u plazma stanice visoko specifični BCR se zatim izlučuje kao protutijelo. Protutijela ostvaruju svoju funkciju vezanjem na Fc receptore različitih stanica – fagocita, NK stanica, mastocita, eozinofila i T-stanica (92).

## 1.22. UROĐENE LIMFOIDNE STANICE I NJIHOVA ULOGA U IMUNOLOŠKOM ODGOVORU

Urođene limfoidne stanice su limfociti koji za razliku od limfocita B i T ne izražavaju specifične antigenske receptore. Ovisno o transkripcijskom uzorku i citokinskom profilu grupirane su podskupine urođenih stanica: NK-stanice i pomagačke ILC1 stanice ovise o transkripcijskom čimbeniku T-bet (NK-stanice i o transkripcijskom čimbeniku Eomes)(93) i luče IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , pomagačke ILC2 stanice ovise o transkripcijskom čimbeniku GATA3 i luče IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 i amfiregulin, dok pomagačke ILC3 stanice ovise o transkripcijskom čimbeniku ROR $\gamma$ t te luče IL-17, IL-22 i GM-CSF. Dvije su skupine ILC3 stanica koje se razlikuju ovisno o tome izražavaju li na staničnoj površini NCR (*engl. natural cytotoxicity receptor*) – NCR+ ILC3 koje luče IL-22 i NCR-ILC3 koje luče IL-17 (94). Funkcijski urođene limfoidne stanice predstavljaju pandan T-stanicama stečene imunosti: NK-stanice preslikavajući funkciju citotoksičnih limfocita CD8+, a pomagačke ILC – ILC1, ILC2 i ILC3 preslikavajući funkciju pomagačkih limfocita CD4+ – Th1, Th2 i Th17 (94,95). Populacija LTi stanica je isprva smatrana kao podskupina ILC obitelji zbog slične imunološke

funkcije kao NCR+ILC3 stanice. Danas je poznato da je razvoj L<sub>T</sub>i stanične loze različit od razvoja ostalih ILC podskupina te da L<sub>T</sub>i stanice imaju ulogu u funkcioniranju stečenog imunološkog sustava i sekundarnoj limfoidnoj organogenezi (95).

### 1.23. PODSKUPINE LIMFOCITA CD4+ I NJIHOVA ULOGA U IMUNOLOŠKOM ODGOVORU

Naivni antigen-specifični pomagački limfociti CD4+ (Th0), nakon što u susretu s kompleksom antigen-MHC izloženom na staničnoj površini APC budu aktivirani, započinju daljnju diferencijaciju. Ovisno o tipu APC i citokinskom okruženju aktivirani pomagački limfociti CD4+ mogu se diferencirati u jednu od podskupina: Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, Treg i T<sub>fh</sub> (88). Neovisno o tipu Th populacije stanice zadržavaju specifičnost za predočeni antigen – TCR specifičnost, ali se razlikuju ovisno o profilu citokina koji luče i koji potom potiču različite efektorske funkcije.

Th1-stanice luče IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF i TNF- $\beta$  koji potiču staničnu imunost aktivirajući mononuklearne fagocite, NK-stanice i citotoksične limfocite CD8+, a diferencijacija Th0 u Th1 populaciju stanica zbiva se pod utjecajem transkripcijskog čimbenika T-bet, IL-12 i IFN- $\gamma$ , dok je inhibiraju IL-4, IL-10 i TGF- $\beta$  (85,88,96).

Th2-stanice luče IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 i IL-13 koji potiču imunost posredovanu protutijelima, ali i različite segmente reakcija preosjetljivosti. Diferencijacija Th0 u Th2 populaciju stanica zbiva se pod utjecajem transkripcijskog čimbenika GATA3 te IL-4 (85,88,96).

Th17-stanice luče IL-17, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-21, IL-22 i IL-26 koji promiču upalni odgovor potičući proizvodnju upalnih citokina IL-6 i TNF, privlače granulocite i uzrokuju oštećenje tkiva, a diferencijacija Th0 u Th17 populaciju stanica zbiva se pod utjecajem transkripcijskih čimbenika ROR $\gamma$ t i STAT3 te IL-6 i TGF- $\beta$  (85,88,96).

Th9-stanice luče IL-9 i IL-21, djeluju potičući upalu u autoimunim i alergijskim bolestima, potiču antitumorsku imunost posredovanu citotoksičnim limfocitima CD8+ (97), a diferencijacija Th0 u Th9 populaciju stanica zbiva se pod utjecajem transkripcijskog čimbenika PU.1, te IL-4 i TGF- $\beta$  (85,88,96).

Th22-stanice luče IL-22, TNF- $\alpha$  i IL-13, reguliraju urođene obrambene mehanizme, inhibiraju diferencijaciju keratinocita i epitelnih stanica u probavnom i dišnom sustavu i

inhibiraju remodeliranje tkiva (88). Diferencijacija Th0 u Th22 populaciju stanica zbiva se pod utjecajem transkripcijskih čimbenika ROR $\gamma$ t i vjerojatno AhR te IL-6 i TNF- $\alpha$  (85,88,96).

Treg-stanice luče dominantno IL-10 i TGF- $\beta$  koji suprimiraju imunološki odgovor radi održavanja tolerancije ili stvaranja uvjeta za cijeljenje tkiva nakon upalne reakcije, a diferencijacija Th0 u Treg populaciju stanica zbiva se pod utjecajem transkripcijskog čimbenika FoxP3, IL-2 i TGF- $\beta$  (85,88,96).

Transkripcijski čimbenik BCL6 ključan je za diferencijaciju i funkciju Tfh-stanica. Diferencijacija Th0 u Tfh populaciju stanica potaknuta je signalizacijom putem ICOS, OX-40 te prisutnošću IL-6, IL-12 i IL-21. Kroz uzastopne interakcije s B-stanicama, Tfh-stanice potiču preživljavanje, proliferaciju, promjenu Ig klase, sazrijevanje i diferencijaciju B-stanica u memorijske B-stanice i plazma stanice (88).

#### 1.24. PODSKUPINE LIMFOCITA CD8+ I NJIHOVA ULOGA U IMUNOLOŠKOM ODGOVORU

Prema dosadašnjim spoznajama unutar citotoksičnih limfocita CD8+ razlikuje se nekoliko populacija stanica koje imaju različitu funkciju: Tc1, Tc2, Tc9, Tc17 i Tc22 stanice.

Tc1-stanice su klasične citotoksične stanice karakterizirane visokom razinom perforina, granzima B, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Nastanak Tc1-stanica induciran je s IL-12 koji luče aktivirane APC (89).

Za Tc2-stanice je svojstveno lučenje IL-4, IL-5 i IL-13 i niska razina IFN- $\gamma$ . Tc2-stanice sadrže visoke razine granzima B i posjeduju jednaka citotoksična svojstva kao Tc1. Nastanak Tc2 stanica induciran je s IL-4. Tc2-stanice potiču produkciju IgE protutijela, privlače eozinofile i djeluju kao posrednici u alergijskim reakcijama (89).

Tc9-stanice luče IL-9 i niske razine IFN- $\gamma$ . Imaju oskudna citotoksična svojstva, dijelom zbog niskih razina granzima B. Nastanak Tc9-stanica induciran je s IL-4 i TGF- $\beta$ . Točna funkcija ovih stanica još nije razjašnjena (89).

Tc17-stanice luče IL-17A, IL-17F i IL-22 te niske razine IFN- $\gamma$ . Kao i Tc9-stanice, Tc17-stanice imaju oskudna citotoksična svojstva, dijelom zbog niskih razina granzima B. Nastanak Tc17-stanica induciran je s IL-6 i TGF- $\beta$  te dodatno potaknut s IL-1 $\beta$ , IL-21, i/ili IL-23. Stanice Tc17 pronađene su u tumorskom mikrookolišu, imaju ulogu u obrani od gljivičnih infekcija, posreduju u autoimunim poremećajima i „graft versus host“ reakciji. Imaju sposobnost diferenciranja u dugovječnije memorijske stanice (89).

Tc22-stanice luče IL-22 i u manjoj mjeri IL-17. Nastanak Tc22-stanica induciran je s IL-6 i TNF- $\alpha$ . Stanice Tc22 sadrže visoke razine granzima B i posjeduju jaka citotoksična svojstva. Iako biološki značaj Tc22 stanica još uvijek nije razjašnjen, istraživanja pokazuju da Tc22-stanice pokazuju iznimnu antitumorsku aktivnost (89).

## 1.25. MEĐUODNOS IMUNOLOŠKOG SUSTAVA I TUMORA

Tumorske stanice uslijed višestrukih genskih mutacija imaju sposobnost aktivirati brojne stanične mehanizme koji im omogućuju razvoj i proliferaciju. Tijekom nastanka i napredovanja, tumorske stanice susreću se s visoko konzerviranim obrambenim mehanizmima urođene i stečene imunosti. Postoje dva načina kako tumorske stanice ipak nastavljaju rasti – sekvencijski aktivirajući samo gene koji su im potrebni za preživljavanje, imitirajući genetske promjene koje se dešavaju prilikom diferencijacije zametnih stanica i ubrzanom gomilanjem nasumičnih mutacija koje stimuliraju dinamične procese u okolnim tkivima, pobuđujući jak upalni odgovor uz konačno postizanje ravnoteže nakon aktivacije imunoloških mehanizama zaslužnih za supresiju imunološkog odgovora (98). Što je veći broj mutacija u tumoru veća je i genetska raznolikost tumorskih stanica čime se pospješuje onkogeneza. Ipak, s većim brojem mutacija tumorska stanica se sve više razlikuje od normalne stanice te je imunološke stanice mogu lakše prepoznati kao štetni događaj (99). Tumori se prema mutacijskom opterećenju (TMB, *engl. tumor mutational burden*) dijele na one s velikim mutacijskim opterećenjem i one s malim mutacijskim opterećenjem. Mnoga su istraživanja potvrdila da što je veće mutacijsko opterećenje u tumoru to je izgledniji bolji odgovor na liječenje imunoterapijom. Treba napomenuti da imunoterapija (npr. antitijela protiv PD-1/PD-L1) obično dovodi do ponovnog aktiviranja postojećih protutumorskih T-stanica, ali ne potiče njihovo stvaranje. Ovaj tip klasifikacije tumora može se koristiti u određenoj mjeri za razlikovanje tumora s većom i manjom vjerojatnošću odgovora na imunoterapiju, ali ne nudi jednoznačnu selekciju bolesnika koji će povoljno odgovoriti na imunomodulatorne lijekove i one koji neće (100).

Osim klasifikacije tumora temeljene na broju somatskih mutacija u tumorskom genomu tumori se mogu podijeliti i prema imunološkom fenotipu temeljenom na izraženosti T-staničnih markera i IFN profilu, neovisno o mutacijskom opterećenju. Prema imunološkom fenotipu razlikujemo: a) imunološki aktivne tumore s visokom stopom infiltracije upalnim stanicama, karakterizirane visokom razinom IFN $\gamma$ , ekspresijom PD-L1, B-staničnom infiltracijom, visokom razinom limfocita infiltriranih u tumor i intaktnom prezentacijom antigena, b) „imunološki isključene“ tumore kod kojih T-stanice okružuju, ali se ne infiltriraju

u „otočiće“ tumorskih stanica, karakterizirane visokom razinom TGF- $\beta$ , reaktivnom stromom, MDSC-stanicama, izraženom angiogenezom i niskom razinom MCH I te c) „imunološki puste“ tumore, karakterizirane pojačanim metabolizmom masnih kiselina, neuroendokrinim značajkama ili visokim proliferacijskim indeksom, aktiviranom Wnt/b-katenin signalizacijom i niskom razinom MCH I (101,102). Ključno je razumjeti da iako tumorski genotip može oblikovati njegovo mikrokruženje, veće mutacijsko opterećenje ne odgovara nužno većoj stopi imunološke infiltracije. Dakle, tumori s velikim mutacijskim opterećenjem nemaju uvijek imunološki aktivni fenotip niti tumori s malim mutacijskim opterećenjem odgovaraju uvijek „imunološki pustom“ fenotipu (100). Mutacijsko opterećenje, iako većinom dobro korelira s odgovorom na imunoterapiju, u nekim tumorima pokazuje odstupanje. Moguće objašnjenje je u tome da osim mutacijskih neoantigena imunološki sustav može biti aktiviran i drugim tumorskim antigenima koji ne nastaju kao posljedica genskih mutacija u tumoru, npr. proteinima onkogenih virusa, aberantno ili pretjerano izraženim nemutiranim proteinima. Osim toga, „pravo opterećenje“ imunostimulativnim neoantigenima definirano brojem mutacija koje su cilj T-staničnog odgovora ne odražava uvijek mutacijsko opterećenje. Treba uzeti u obzir i da je trenutna upotreba mutacijskog opterećenja tumora zapravo „statičan marker“, a odnos tumora i imunološkog sustava nadasve dinamičan proces. Tome u prilog govori i činjenica da inicijalni tumorski odgovor na imunoterapiju ne rezultira uvijek i boljim preživljenjem (103).

Tumori u kojih upalne stanice dominantno okružuju tumor bez infiltracije na transkripcijskoj razini odgovaraju imunološki aktivnim tumorima. Postoje definirani transkripcijski uzorci prema kojima se razlikuju imunološki aktivni tumori od „imunološki pustih“ tumora (98).

Turan i suradnici su predložili naziv kompenzatorna imunološka rezistencija ili CIR (*engl. compensatory immune resistance*) za mehanizam koji omogućuje tumorima da opstanu u imunološki aktivnom okolišu, a temelji se na pretpostavci da bi bez CIR tumor bio uništen imunološkim odgovorom domaćina. Mehanizam koji omogućuje tumoru da opstane u imunološki pustom okruženju nazvali su primarna imunološka rezistencija ili PIR (*engl. primary immune resistance*) (101). Svojestven transkripcijski obrazac u pozadini aktivnih efektorskih mehanizama urođene i stečene imunosti kojima dolazi do destrukcije tkiva ranije je nazvan imunološka konstanta odbacivanja ili ICR (*engl. immunologic constant of rejection*) (104). Obrazac obuhvaća četiri funkcionalne kategorije: CXCR3/CCR5 kemokine – uključujući CXCL9, CXCL10, CCL5, Th1 signalizaciju – IFNG, IL12B, TBX21, CD8A, STAT1, IRF1, CD8B, efektorske mehanizme – GNLV, PRF1, GZMA, GZMB, GZMH i

imunoregulatorne mehanizme – CD274, CTLA4, FOXP3, IDO1, PDCD1. Sličan T-stanično posredovani upalni genski uzorak našli su i Ayers i suradnici i nazvali ga tumorski upalni obrazac ili TIS (*engl. tumor inflammation signature*) (105). Proučavajući uzorke raka dojke iz TCGA baze podataka Turan i suradnici su primijetili da su u imunološki aktivnim tumorima istovremeno prisutni transkripcijski obrasci imunološke aktivnosti i imunološke supresije – aktivacija imunogene stanične smrti, IL23/Th17, „checkpoint“ klasteri, mijeloidne supresorske stanice, regulatorne T-stanice, IDO te da je njihova uravnoteženost u pozadini CIR. S druge strane, „imunološki pusti“ tumori obogaćeni su specifičnim obrascima koji odražavaju aktivaciju STAT3 i PI3K $\gamma$ /SFK/ pGSK3/ $\beta$ -katenin osi ( $\beta$ -katenin, MAPK aktivacija) uz odsustvo imunoregulacijskih mehanizama što govori u prilog primarne imunološke rezistencije (101). Upotreba imunoterapije – terapija citokonima IL2 i IFN- $\alpha$ , unos aktiviranih limfocita T, „checkpoint“ inhibitori koji ciljaju CTL4, PD-1 i PD-L1 molekule je u posljednjih 20 godina donijela značajan napredak u liječenju solidnih tumora, a temelji se na principu pojačavanja aktiviranog imunološkog odgovora na tumor ili smanjenja inhibicije imunoloških stanica u okolišu tumora (94). Istraživanja koja su uključila različite tumore su pokazala da odgovor na liječenje „checkpoint“ inhibitorima ovisi o razini PD-L1 ekspresije, profilu genske ekspresije tumor infiltrirajućih stanica, mutacijskom opterećenju u tumoru te prisustvu mikrosatelitske nestabilnosti (106). Kombinirana upotreba postojećih i otkriće novih preciznijih prediktivnih biomarkera preduvjet su za precizniju selekciju bolesnika i temelj uspješnosti imunoterapije u bolesnika oboljelih od raka (100).

## 1.26. IMUNOLOŠKI ODGOVOR NA TUMOR

Imunološki odgovor na tumor slijedi iste principe imunološke reakcije kao na bilo koji drugi patogen. Proces imunološkog odgovora uključuje postizanje ravnoteže između promicanja upalnog odgovora koji štiti domaćina od patogena i osiguravanja mehanizama kontrole upale radi sprečavanja ozljeda domaćina nastalih pretjeranim upalnim odgovorom na podražaj. Kontrola se postiže napredovanjem upalnih stanica kroz različite faze ili kontrolne točke imunološkog odgovora što uključuje aktivaciju, uvećanje klona, migraciju, diferencijaciju i prestanak odgovora (88).

Malignom transformacijom mijenja se sastav i izražaj molekula na staničnoj površini, dolazi do odstupanja od uobičajenog načina signalizacije između stanice i njezine mikrookoline te posljedično do aktivacije imunološkog sustava. Jednom pobuđene stanice prirodene imunosti mogu neposrednim mehanizmima uništiti tumorske stanice, a ujedno kao antigen prezentirajuće stanice aktivirati stečenu imunost. Stanice urođene imunosti, kao što su

dendritičke stanice prepoznaju neoantigene koji nastaju u procesu onkogeneze genskim ili epigenetskim izmjenama u tumorskim stanicama, fagocitiraju ih i predočuju na svojoj površini kao imunostimulacijske peptide uklopljene u MHC kompleks. T-stanice putem TCR prepoznaju neoantigen-MHC sklop i tako započinje kaskada kondicioniranja, aktivacije i diferencijacije limfocita T s različitim omjerom T-efektorskih i T-regulatornih stanica. Usporedo s napredovanjem imunološke reakcije tumori se pod pritiskom imunološkog odgovora mijenjaju i razvijaju stanične mehanizme koji im pomažu da izmaknu imunološkom nadzoru u procesu koji se naziva imunološko uređivanje (*engl. immunoediting*) (107). Imunološko uređivanje dovodi do aktivacije različitih onkogenih puteva koji utječu na promjenu organizacije tumorskog mikrookoliša pa on postaje nepovoljan za protutumorski imunološki odgovor i u konačnici može biti kvalitativno preusmjeren u onaj koji u stvari podržava i pospešuje rast tumora. Dva su ključna procesa u podlozi uspješne onkogeneze – indukcija imunološke tolerancije i imunološko izbjegavanje (108).

Kako bi se uistinu razumio odnos između tumora i imunološkog sustava potrebno je rasvijetliti sofisticirano stanično međudjelovanje na razini mikrookoliša tumora. Naime, sistemska tolerancija na antigene tumora započinje upravo događajima u tumorskom mikrookolišu (108).

Među neke od onkogenih puteva koji dovode do nedostatne T-stanične infiltracije i aktivacije u tumorskom mikrookolišu (primarno imunološko izbjegavanje) ubrajaju se aktivacija WNT/ $\beta$ -katenin puta, aktivacija PI3K-puta uslijed gubitka funkcije gena *PTEN*, aktivacija *c-Myc*-signalizacije, gubitak LKB1-signalizacije, aktivacija STAT3-puta te vjerojatno aktivacija p53, PPAR- $\gamma$  i FGFR-signalizacije (109).

Aktivacija signalnog puta WNT/ $\beta$ -katenin dovodi do smanjene izraženosti kemokina CCL4 u tumorskim stanicama, što uzrokuje pad broja *Batf3*, CD103+ dendritičkih stanica u tumorskom okolišu i time izostanak kondicioniranja tumor-specifičnih T-stanica u regionalnim limfnim čvorovima. *Batf3*-dendritičke stanice ključne su u prezentiranju tumorskih antigena citotoksičnim limfocitima CD8+ (109).

Izmjene signalnog puta PI3K/Akt/mTOR pronađene su u praktički svim tumorima, uključujući rak dojke u kojem je signalni put PI3K/Akt/mTOR hiperaktivan u oko 60 % svih slučajeva. *PTEN* (*engl. Phosphatase and tensin homolog*) fosfataza, najvažniji je negativni regulator ovog puta i jedan od supresora tumora. Gubitak funkcije gena *PTEN* česta je genetska promjena u tumorima s izrazito malim brojem T-stanica u mikrookolišu. Kod tumora koji imaju gubitak broja kopija gena *PTEN* inhibirani su geni povezani s autofagijom

*LC3I* i *LC3II* koji pridonose aktivaciji APC (109). Pojačana aktivnost ovog signalnog puta može nastati i mutacijom gena *PIK3CA*. Mutacije u genu *PIK3CA* nalaze u oko 45 % svih luminalnih tumora dojke, a u manjoj mjeri i u trostruko negativnim tumorima dojke (110) i predstavljaju uvjet za liječenje alpelisibom, oralnim selektivnim inhibitorom fosfoinozitol-3-kinaze.

Aktivacija *C-Myc* dovodi do pojačane ekspresije CD47 i PD-L1 molekula na tumorskim stanicama koje imaju imunosupresivan učinak. CD47 protein je prekomjerno izražen na površini stanica mnogih tumora. CD47 tvori signalni kompleks s proteinom SIRP $\alpha$  te tako pokreće inhibicijski signalni put koji omogućuje tumorskim stanicama da izbjegnju fagocitozu posredovanu makrofagima. U fiziološkim uvjetima CD47 signalizacija omogućava održavanje imunotolerancije prema stanicama domaćina (111). PD-L1 je ligand koji se veže na PD-1 protein na staničnoj površini T-stanica i uzrokuje supresiju T-staničnog upalnog odgovora. PD-1/PD-L1 put kontrolira indukciju i održavanje imunološke tolerancije u tumorskom mikrookolišu. U fiziološkim uvjetima PD-L1 obično izražavaju makrofagi, neke aktivirane T-stanice i B-stanice, dendritičke stanice i neke epitelne stanice u uvjetima upale te predstavlja jedan od mehanizama kontrole upale (112).

*LKB1/STK11* je tumor-supresorski gen, često mutiran u nesitnostaničnom raku pluća. Gubitak funkcije gena *LKB1* dovodi do promjena u tumorskom staničnom metabolizmu i diferencijaciji te do remodeliranja vanstaničnog matriksa radi promicanja onkogeneze (113). Tumorske stanice s gubitkom funkcije *LKB1/STK11* pojačano luče upalne citokine kao što su IL-6 i G-CSF, IL-33 i CXCL7 koji privlače neutrofile u tumorski okoliš i inhibiraju funkciju T-stanica. Kako su Koyama i suradnici pokazali, eliminacijom neutrofila iz okoliša tumora došlo je do značajnog porasta broja T-stanica (109,113).

Konstitutivna aktivacija signalnog puta STAT3 najčešće nije posljedica mutacije, već je posljedica toga što mnoge onkogene receptor tirozin kinaze, kao što su EGFR (*engl. epidermal growth factor receptor*), HER2 i cMet koriste signalni put STAT3. Aktivacija STAT3 u tumorima dovodi do smanjene produkcije upalnih citokina kao što su tip I interferoni i TNF. Osim toga STAT3 signalizacija uzrokuje oslobađanje čimbenika kao što su IL-10, VEGF, IL-6 i IL-23 koji inhibiraju aktivnost dendritičkih stanica, NK stanica i granulocita u tumorskom mikrookolišu. STAT3 odmiče T-stanični odgovor od Th1-diferencijacije i usmjerava ga prema Th17 populaciji stanica. Otkrivena je uloga STAT3 puta u kemotaksiji i poticanju diferencijacije nezrelih mijeloidnih stanica u MDSC umjesto u APC (108). MDSC su karakterizirane izrazito smanjenim metabolizmom uslijed akumulacije



dikarbonil radikala metilglioksala i uzrokuju narušeno metaboličko stanje u CD8<sup>+</sup> limfocitima T paralizirajući pritom njihove efektorske funkcije (114).

I gubitak p53 te aktivacija signalnih puteva PPAR- $\gamma$  i FGFR su dovedeni u vezu s niskim razinama T upalnog odgovora na tumor. Povrh toga, pokazalo se da aktivacija gena odgovornih za stvaranje hipoksičnih uvjeta tipičnih u tumorskom mikrookolišu inhibira indukciju protutumorskog odgovora na lokalnoj razini (109).

Nakon što imunološki sustav bude aktiviran tumorskim antigenima i uspostavi se aktivna upala u mikrookolišu tumora da se izbjegne imunološki nadzor, tumor više ne stvara nove, već patološki pojačava postojeće mehanizme regulacije imunološkog odgovora koji u fiziološkim uvjetima kontroliraju samotoleranciju, homeostazu mijeloidnih stanica, cijeljenje rana i odgovor na staničnu smrt. Aktivacija T-stanica bez odgovarajuće kostimulacije, gubitak antigena ili smanjena ekspresija MHC-molekula, pojačana ekspresija imunomodulatornih molekula CTL4 i PD-L1, pojačana aktivnost indoleamin 2,3-dioksigenaze (IDO), prisutnost tumoru pridruženih makrofaga, MDSC, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg i CD1d-ograničenih T-stanica koje suprimiraju antitumorsku aktivnost, prisutnost imunosupresivnih citokina koje luči tumor kao što su TGF- $\beta$ , VEGF, IL-10, GM-CSF i IL-6 neki su od imunosupresivnih mehanizama koji omogućuju tumoru da preživi u imunokompetentnom domaćinu (115).

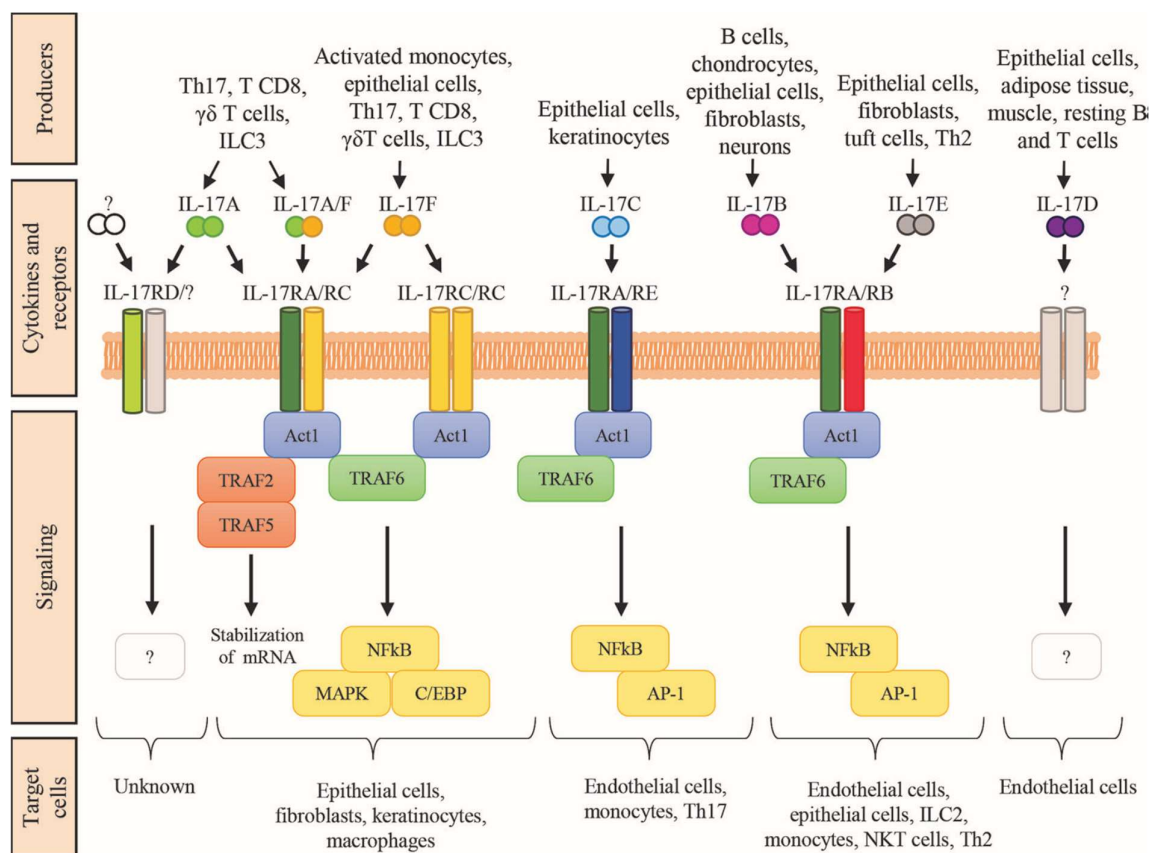
## 1.27. ULOGA IL-17 U FIZIOLOŠKIM UVJETIMA I BOLESTIMA

Interleukin 17 obitelj obuhvaća šest strukturno srodnih citokina: IL-17A (IL-17, originalno nazvan CTLA8), IL-17B, IL-17C, IL17D, IL-17 E (IL-25) i IL-17F. Sukladno tome, obitelj IL-17 receptora (IL-17R) obuhvaća pet receptorskih podjedinica: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD i IL-17RE. Dosad najviše proučavani citokini ove obitelji su IL-17 i IL-17F. IL-17 i IL-17F postoje ili kao kovalentni homodimeri ili formiraju IL17-IL17F heterodimer. Sva tri liganda aktiviraju kvalitativno sličan signal, ali su različito potentni (IL-17A > IL-A/F > IL-17F). Vežu se na obvezni dimerni kompleks receptora IL-17RA i IL-17RC. IL-17RA receptor se nalazi na mnogim stanicama tako da je IL-17 signalizacija ograničena izražajem IL-17RC koji se nalazi većinom na nehematopoetskim epitelnim i mezenhimalnim stanicama.

Više vrsta imunoloških stanica proizvodi IL-17A i IL-17F, dok IL-17B, IL-17C i IL-17D proizvode uglavnom epitelne stanice (119).

IL-17R pripada transmembranskim receptorima, a definira ga „SEF/IL-17R (SEFIR)“ citoplazmatska domena. Signalizacija IL-17 započinje vezanjem Act1 unutarstaničnog

proteina za IL-17R. Act je multifunkcionalni citosolni protein adapter i izuzev IL-17R jedini poznati protein sa SEFIR domenom. Nakon vezanja Act1 za IL-17 receptorski kompleks dolazi do vezanja TRAF6 (*engl. Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6*) za Act1. Poliubikvitiran TRAF6 potom aktivira TAK1 (*engl. TGF $\beta$ -activated kinase 1*) što dovodi do aktivacije transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B (*engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). TAK1 pridonosi i IL-17 induciranoj aktivaciji MAPK (*engl. mitogen-activated protein kinase*) puteva za aktivaciju AP-1 transkripcijskog čimbenika (118). IL-17 aktivira još dva transkripcijska čimbenika, I $\kappa$ B $\zeta$  i C-EBP koji, kao i NF- $\kappa$ B i AP-1, sudjeluju u IL-17 induciranoj transkripciji mnogih tkivno specifičnih gena (119). IL-17 pojačava ekspresiju gena koji sudjeluju u upalnom odgovoru na dva načina – inducirajući transkripciju gena *de novo* ili postranskripcijski stabilizirajući postojeće ciljane mRNA transkripte (117). Među ostalim, IL-17 potiče stvaranje upalnih citokina TNF, IL-6, IL1 $\beta$ , G-CSF i GM-CSF, kemokina IL8, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CCL2, CCL7 i CCL20, matriks metaloproteinaza MMP1, MMP3, MMP9, MMP12 i MMP13 te različitih humoralnih medijatora upale kao što su defenzini, katelicidini, klaudini i mucini (119,120).



**Slika 2.** Signalni put IL-17 (preuzeto iz Brevi et al. Much More Than IL-17A: Cytokines of the IL-17 Family Between Microbiota and Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2020.) (121)

IL-17 privlači i aktivira neutrofile i u manjoj mjeri monocite, što je jedan od centralnih događaja u odgovoru urođenog imunološkog sustava na bakterijske i gljivične infekcije. Uloga IL-17 u obrani od patogena je najizraženija u sluznicama i koži gdje IL-17 potiče produkciju različitih citokina i peptida koji pridonose održavanju integriteta epitela i sluznica, formiranju akutnog upalnog odgovora na patogen i aktivaciji B-staničnog odgovora, čime se ostvaruje spona između urođenog i stečenog imunološkog sustava (119).

Th17-stanice stečene imunosti prve su prepoznate kao izvor IL-17, a tek je kasnije otkriveno da i druge imunološke stanice mogu lučiti IL-17. Th17-stanice nastaju polarizacijom Th0 naivnih limfocita CD4<sup>+</sup> pod utjecajem IL-6, TGF- $\beta$  i IL-23, koji aktivirajući signalizaciju STAT3 i Smads pojačavaju aktivnost ROR $\gamma$ t, glavnog transkripcijskog čimbenika u Th17-diferencijaciji. IL-23 pripada IL-12 citokinskoj obitelji i pretežito ga luče aktivirani magrofagi i dendritičke stanice u perifernim tkivima (122). Osim populacije Th17 limfocita CD4<sup>+</sup> u kojoj je IL-17 glavni citokin i obilježje populacije i druge stanice imunološkog sustava kao što su Tc17 limfociti CD8<sup>+</sup> te stanice urođenog

imunološkog sustava kao što su ILC3, NK, NKT i  $T\gamma\delta$  proizvode IL-17. Stanice urođenog imunološkog sustava luče IL-17 neovisno o MCH kompleksu (119,120).

IL-17 se pokazao kao snažan promotor upale baš zbog svoje sposobnosti da djeluje u sprezi s drugim medijatorima upale. Dobar primjer za to je transaktivacija EGFR posredovane Act1–TRAF4–ERK5 kaskade koja može biti inducirana IL-17, neovisno o EGFR ligandima. To objašnjava snažan fiziološki učinak IL-17 *in vivo* u usporedbi s ne tako potentnim učinkom u eksperimentalnim uvjetima. Istraživanja upućuju na to da je aktivnost IL-17 uvelike uvjetovana staničnim kontekstom u kojem djeluje. Privremena i kontrolirana aktivnost IL-17 dio je fiziološkog imunološkog odgovora i cijeljena tkiva dok kronična IL-17 aktivnost inducira patološke odgovore koji promiču autoimunost i onkogenezu (118).

Otkriće da osovina IL-23-IL-17 ima ključnu ulogu u upalnim zbivanjima u podlozi autoimunih bolesti bilo je početak mnogih istraživanja o obrascima funkcioniranja IL-17 u patološkim uvjetima. Impresivan uspjeh u liječenju psorijaze koji je postignut u kliničkim studijama koje su ispitivale učinkovitost protutijela koja blokiraju IL-17 secukinumaba i iksekizumaba – inhibitora IL-17A i IL-17A/IL-17F te brodalumaba – inhibitora IL-17RA, ilustrira koliko je presudna funkcija IL-17 u kroničnim upalnim stanjima (120).

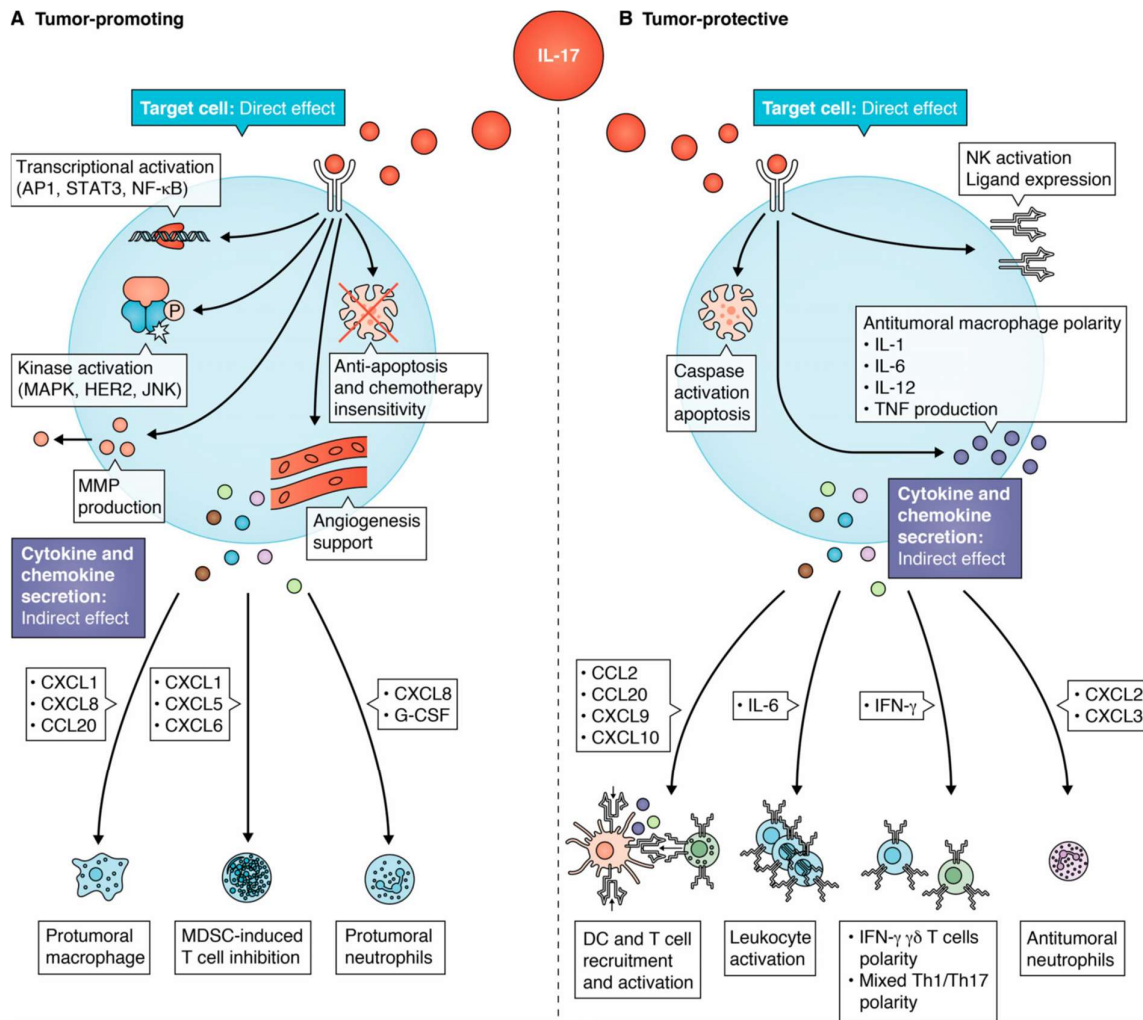
Postoji dihotomija protektivnih i štetnih učinaka IL-17 koja je zamijećena u upalnim bolestima crijeva i bolestima usne šupljine. Uloga IL-17 u očuvanju integriteta epitela i sluznica te cijeljenju tkiva nakon ozljeda iznimno je bitna i moguće prevladava štetne učinke IL-17 u kroničnoj upali zbog čega blokada funkcije IL-17 protutijelima može dovesti do egzacerbacije bolesti kao što je bio slučaj u Crohnoj bolesti (118).

Svojevrsna imunološka tolerancija mora postojati na antigene različitih mikroorganizama u sluznicama i epitelu koji žive u simbiozi s ljudskim tijelom – mikrobiota, a sadrže deseterostruko veći broj gena negoli ljudski genom. To se po svemu sudeći postiže pažljivom ravnotežom između regulatornih T-stanica i efektorskih Th stanica. IL-17 je glavni regulator međudjelovanja domaćin-mikrobiota. Promjena ili disfunkcija mikrobiote obilježje je mnogih bolesti uključujući autoimmune bolesti i tumore. Pretpostavlja se da mikrobiota crijeva može biti neovisni prediktivni faktor djelovanja „checkpoint“ inhibitora što je predmet brojnih prospektivnih istraživanja (121).

Kako IL-17 može djelovati sinergistički s brojnim medijatorima, kao što su  $TNF\alpha$ , LPS, IL-1 $\beta$ , limfotoksin,  $IFN\gamma$ , IL-13,  $TGF\beta$  i FGF2, koji aktiviraju razne signalne putove, ispituje se terapijska učinkovitost kombinacije IL-17 i drugih protutijela, tzv. bispecifičnih protutijela (123–125).

## 1.28. IL-17 U MIKROOKOLIŠU RAKA

Povišene vrijednosti IL-17 su nađene u mnogim tumorima. Djelovanje IL-17 u fiziološkim uvjetima pa tako i u tumorskom mikrookolišu može biti dvojako, a ovisi o utjecaju različitih faktora iz okoliša u kojem se IL-17 nalazi.



**Slika 3.** Dvojaki učinci IL-17 u tumorskom mikrookolišu (preuzeto iz Vitiello et al. Targeting the interleukin-17 immune axis for cancer immunotherapy. *J Exp Med.* 2020;217(1):1–11.)

(126)

Da bi se bolje razumjela uloga IL-17 u mikrookolišu tumora treba najprije razjasniti značaj različitih stanica koje luče IL-17 u pojedinim tumorima i što potiče njihovu diferencijaciju na lokalnoj razini. O koliko se kompleksnom i slojevitom međudjelovanju različitih faktora radi predočava i otkriće da jedne od glavnih stanica koje luče IL-17 u tumorskom mikrookolišu – pomagački limfociti Th17 CD4+, posjeduju svojstvo

transdiferencijacije i hibridne ekspresije više od jednog transkripcijskog čimbenika (119,126,127).

Od stanica koje luče IL-17 u tumorskom mikrokolišu prevladavaju limfociti Th17 CD4+ i  $\gamma\delta$ T-stanice. Potaknute imunostimulacijskim tumorskim peptidima izloženim u MHC kompleksu na APC i usmjerene citokinima koje APC luči, Th0 stanice započinju polarizaciju u jednu od Th-subpopulacija. Ovisno o medijatorima u imunološkoj sinapsi i prisutnim tkivnim čimbenicima (promjene pH, narušena mikrobiota, prehrana) dolazi do pojačane ekspresije jednog od populacijski specifičnih transkripcijskih čimbenika – Tbet za Th1, Gata3 za Th2, Bcl6 za TFH, ROR- $\gamma$ T za Th17, Fox3 za Treg, Arh za TR1 i posljedično pojačanog prepisivanja gena specifičnih za pojedinu Th populaciju stanica. Potencirano promjenama u citokinskom miljeu i tkivnim čimbenicima u nekim slučajevima može doći do pojačane ekspresije više od jednog transkripcijskog čimbenika te posljedično do istovremene produkcije različitih populaciji svojstvenih citokina. Tako primjerice Th17, u kojima je pojačan izražaj ROR- $\gamma$ T i luče IL-17, mogu simultano pojačano izražavati Tbet i lučiti IFN- $\gamma$  – Th17/Th1 hibridne stanice ili pojačano izražavati Fox3 i lučiti IL-10 – Th17/Treg hibridne stanice (119,127). Za razliku od Th1 i Th2 populacije koje vjerojatno po diferencijaciji predstavljaju konačne i međusobno isključive populacije stanica, Th17 i Treg populacije stanica predstavljaju donekle prijelazne oblike i u različitim uvjetima diktiranim izražajem citokina i tkivnim čimbenicima imaju sposobnost mijenjanja polarnosti odnosno transdiferencijacije (127). Th17-stanice dobivene iz populacije TIL *in vitro* nakon aktivacije TCR spontano su se transdiferencirale u Treg-stanice koje su potom izgubile svojstvo plastičnosti i nisu više mogle biti konvertirane u Th17-stanice bez obzira na prisutnost Th17-polarizirajućih citokina (128). Nije poznato događaju li se i *in vivo* slične promjene. Za razliku od Th17-stanica,  $\gamma\delta$ T-stanice su MHC-neovisne stanice koje imaju svojstva urođene imunosti slična NK-stanicama i stečene imunosti – varijabilan  $\gamma\delta$ TCR.  $\gamma\delta$  T-stanice prepoznaju širok spektar tumorskih antigena, luče TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-17, djeluju kao antigen predočne stanice za T-staničnu imunost i potiču diferencijaciju limfocita B (129). Hoće li  $\gamma\delta$  T-stanice ispoljiti protumorske karakteristike slične Treg-stanicama ili IFN- $\gamma$  posredovane protutumorske karakteristike ovisi o svojstvima okoliša u kojem se nalaze. Postoje dokazi da se produkcija IL-17 u  $\gamma\delta$  T-stanicama zbiva neovisno o aktivaciji TCR, dok se lučenje IFN- $\gamma$  pojačava nakon izlaganja antigenu pa tako postoje dva fenotipa  $\gamma\delta$  T-stanica: “urođeni” IL-17  $\gamma\delta$  T i “stečeni” IFN- $\gamma$ +  $\gamma\delta$  T (130).

Uloga IL-17 u različitim vrstama tumora dosad je većinom ispitivana na *in vitro* staničnim modelima i ljudskim ksenograftima (118). Znajući koliki utjecaj tkivni uvjeti i

različiti okolišni medijatori mogu imati na izražaj i funkciju IL-17, čime se i objašnjava dihotomija koja je primijećena u heterogenim eksperimentalnim tumorskim modelima, nedostatak podataka o ponašanju IL-17 *in vivo* predstavlja nepremostivu prepreku u terapijskom moduliranju IL-17 posredovanih imunoloških reakcija radi liječenja bolesnika oboljelih od raka.

## 2. Hipoteza

Koncentracija IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prije početka liječenja značajno je veća od koncentracije IL-17 u serumu zdravih žena i pozitivno korelira s ekspresijom IL-17 u tumorskom tkivu. Nakon kirurškog zahvata, tijekom adjuvantnog liječenja žena oboljelih od ranog raka dojke, dolazi do značajnog pada serumske koncentracije IL-17 u odnosu na predoperativne vrijednosti.



### 3. Ciljevi rada

#### 3.1. OPĆI CILJ

1. Odrediti i usporediti koncentraciju IL-17 u serumu žena koje boluju od ranog invazivnog raka dojke prije operacije i tijekom adjuvantnog liječenja s koncentracijom IL-17 u serumu kontrolne skupine zdravih žena.
2. Odrediti postoji li povezanost između koncentracije IL-17 u serumu i izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke.

#### 3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

1. Utvrditi ima li promjene u koncentraciji IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog raka dojke prije ikakve terapijske intervencije i nakon operacije i započinjanja hormonskog odnosno kemoterapijskog adjuvantnog liječenja.
2. Analizirati odnos koncentracije IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog raka dojke prije i nakon liječenja sa surogatnim biološkim podtipovima raka dojke te ispitati korelaciju s ostalim kliničkim i patohistološkim karakteristikama kao što su dob, menopauzalni status, histološki tip tumora, histološki i nuklearni gradus tumora, limfovaskularna invazija, zahvaćenost i status limfnih čvorova, liječenje kemoterapijom, hormonskom terapijom i zračenjem, pojava recidiva i smrtni ishod.
3. Analizirati razinu izraženosti IL-17 u različitim komponentama intraoperativno dobivenog uzorka tumorskog tkiva uključenih bolesnica, uključujući invazivnu i *in situ* komponentu, peritumorsku stromu i normalno tkivo dojke.
4. Utvrditi postoji li razlika u razini izraženosti IL-17 u intratumorskom tkivu i zdravom tkivu dojke.
5. Ispitati korelaciju razine IL-17 u serumu bolesnica oboljelih od ranog raka dojke prije i nakon liječenja s izraženošću IL-17 u intratumorskom tkivu, peritumorskoj stromi te zdravom tkivu dojke.
6. Ispitati korelaciju izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu s ostalim kliničkim i patohistološkim karakteristikama ispitanica.

## 4. Materijali i metode

Istraživanje je provedeno u sklopu znanstvenog projekta pod nazivom „Karcinom dojke – molekularne, genetske i kliničke karakteristike“, na teret sredstava i kratkoročne sveučilišne financijske potpore istraživanju „Genetska sklonost nastanka karcinoma dojke“. Istraživanje je provedeno u Kliničkom bolničkom centru Zagreb uz odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i uključilo je 118 žena koje su operirane zbog ranog raka dojke od srpnja 2015. do ožujka 2018. i 63 zdrave žene koje su predstavljale dobno podudarajuću kontrolnu skupinu. Sve ispitanice uključene u istraživanje potpisale su informativni pristanak za sudjelovanje u istraživanju. U istraživanje su bile uključene samo žene oboljele od ranog raka dojke koje prethodno nisu bolovale od zloćudne bolesti, nisu liječene kemoterapijom niti radioterapijom, nisu bolovale od autoimunih bolesti niti su primale imunosupresivne lijekove. Bolesnice koje su prije operacije primale neoadjuvantnu kemoterapiju, biološku ili hormonsku terapiju nisu bile uključene u istraživanje. Iz istraživanja su isključene bolesnice kojima je potvrđen lokalno uznapredovali ili metastatski rak dojke i one u kojih nije bilo moguće ostvariti primjereno praćenje nakon operacije odnosno vađenje drugog uzorka krvi nakon započinjanja adjuvantnog liječenja. Karakteristike žena oboljelih od ranog raka dojke uključenih u istraživanje prikazane su u Tablici 1. Podaci o tumorima kao što su histološki tip, histološki i nuklearni gradus, limfovaskularna invazija, zahvaćenost limfnih čvorova, surogatni intrinzični podtip tumora preuzeti su iz patohistoloških nalaza dostupnih u bolničkom informacijskom sustavu. Estrogenski i progesteronski receptori, HER2 i Ki67 određeni su imunohistokemijskim bojenjem pomoću komercijalno dostupnih protutijela (*Ventana, Tucson, AZ, USA*). Estrogenski i progesteronski receptori izraženi su kao postotak, a pozitivnom se smatrala ekspresija jednaka ili veća od 1 %. HER2 pozitivan rak dojke definiran je jakim i potpunim imunohistokemijskim bojenjem membrane više od 10 % stanica (3+), a u slučaju nejasnog nalaza (2+) dodatno je rađena *in situ* hibridizacija. Surogatni intrinzični podtipovi određeni su sukladno podjeli koja je prihvaćena u St. Gallenu 2013. (60), a temelji se na izražaju hormonskih i HER-2 receptora te markera proliferacije Ki-67. Bolesnicama koje su uključene u istraživanje uzeta su dva uzorka krvi u dva odvojena vađenja, prvo prije operativnog zahvata, a drugo nakon provedena 3 ciklusa kemoterapije ili 3 mjeseca hormonske terapije. Zdravim ženama, koje su sudjelovale u istraživanju kao kontrolna skupina, uzet je jedan uzorak krvi. Za uključivanje u kontrolnu skupinu vrijedili su isti kriteriji kao za žene oboljele od ranog raka dojke. U Kliničkoj jedinici za patofiziologiju i eksperimentalnu onkologiju Klinike za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, centrifugiranjem je izdvojen serum iz uzoraka pune venske krvi ispitanica i

pohranjen na -80 °C. U uzorcima seruma ispitanica određivana je serumska koncentracija IL-17 imunoenzimskim testiranjem „sandwich“ ELISA koristeći humano IL-17 protutijelo (*Human IL-17A Platinum ELISA, eBioscience San Diego, CA, USA*). Postupak je proveden u skladu s uputama proizvođača.

U Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb su pregledani hemalaun-eozinom obojeni tkivni prerezi debljine 4 µm dobiveni iz operacijskog materijala od 118 uključenih bolesnica. Tkivni prerezi od 97 bolesnica koji su imali primjerene tumorske stanice i peritumorsku stromu su imunohistokemijski analizirani. Imunohistokemijsko bojenje učinjeno je sukladno uputi proizvođača koristeći zečje poliklonsko protutijelo na IL-17 (*Rabbit polyclonal anti-IL17 antibody, ab 79056, 1:200, Abcam, Cambridge, MA, USA*) na Dako Autostainer Link 48, automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje prema vizualizacijskom protokolu Dako EnVisionFlex TM K8000 uz diaminobenzidin (DAB) kao vizualizacijski sistem. Kao pozitivna kontrola korišteno je tkivo tonzile. Rezultati imunohistokemijske analize na IL-17 izraženi su semikvantitativno i to kao: 0 za odsutnost reakcije, 1 za slabo izraženu reakciju, 2 za umjereno izraženu reakciju i 3 za snažno izraženu reakciju (Slika 1.). Prilikom statističke obrade podataka dobivenih imunohistokemijskom analizom 0 se smatrala negativnim rezultatom dok su se 1, 2 i 3 smatrali pozitivnim. Reakcija je analizirana intratumorski u invazivnoj komponenti i ako je bila prisutna u *in situ* komponenti te u peritumorskoj stromi i okolnom zdravom tkivu dojke, ako je bilo prisutno.

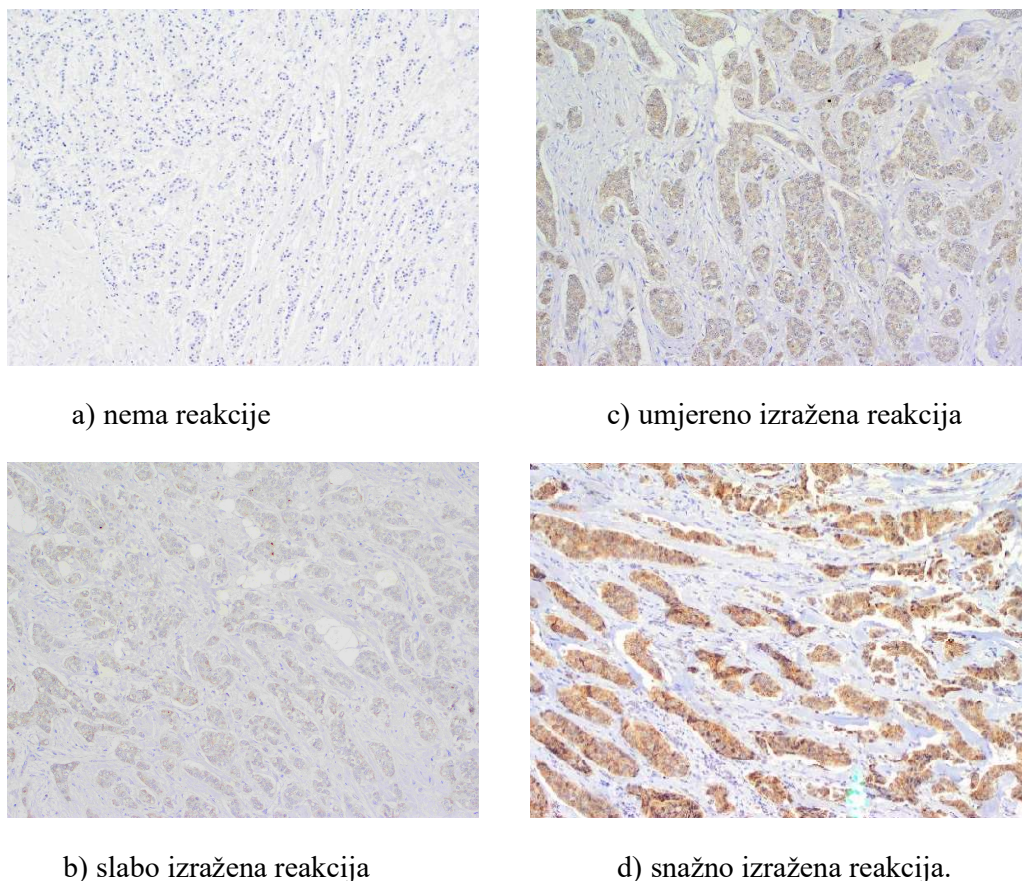
Dobivene koncentracije IL-17 u serumu i izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu su analizirane i uspoređene s kliničkim i patohistološkim karakteristikama kao što su dob bolesnica, veličina tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova, histološki stadij tumora, status estrogenskih i progesteronskih receptora, HER2 status te proliferacijski indeks Ki-67.

#### 4.1. STATISTIČKE METODE

Podaci su prikazani tablično i grafički. Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone. Razlike između nezavisnih skupina su analizirane Kruskal-Wallisovim i Mann-Whitney U testom te su prikazane Box i

Whiskerovim plotom unutar kojeg su prikazane vrijednosti medijana, interkvartilnih raspona, minimalnih i maksimalnih vrijednosti te ekstremnih vrijednosti koje se od medijana razlikuju za više od 1,5 interkvartilnih raspona. Razlike u koncentraciji IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prije operacije i nakon provedena tri ciklusa adjuvantne kemoterapije ili tri mjeseca hormonske terapije analizirane su Wilcoxonovim testom.

Izračunati su korelacijski koeficijenti između vrijednosti IL-17 s ostalim kliničkim parametrima: Spearmanovi koeficijenti korelacije Rho za međusobne korelacije ordinalnih ili skalarnih vrijednosti ili Kendallovi koeficijenti korelacije Tau\_b u slučajevima ordinalno – nominalnih korelacija. P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila licencirana programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>).



**Slika 4.** Rezultati imunohistokemijske analize na IL-17

## 5. Rezultati

**Tablica 1.** Opisna statistika kategorijskih varijabli i kliničke karakteristike uključenih žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (N=118)

		<b>N</b>	<b>%</b>
Vrsta operacije	Poštedni operativni zahvat	73	61,90 %
	Mastektomija	43	36,40 %
	Ostalo (biopsija)	2	1,70 %
Menopauza	Ne	39	33,10 %
	Da	79	66,90 %
Kastracija	Ne	106	89,80 %
	Da	12	10,20 %
Histološki tip	NST	93	78,80 %
	Lobularni invazivni	15	12,70 %
	Miješani	6	5,10 %
	Ostali	4	3,40 %
Histološki gradus	1	9	8,20 %
	2	67	60,90 %
	3	34	30,90 %
Nuklearni gradus	1	3	2,60 %
	2	69	59,50 %
	3	44	37,90 %
Limfovaskularna invazija (intra i ekstratumorska)	Ne	96	84,20 %
	Da	18	15,80 %
HER-2	Negativan (0,1+,2+)	101	85,60 %
	Pozitivan (3+ ili 2+, ISH +)	17	14,40 %
Biološki podtip tumora	Luminal A	45	38,10 %
	Luminal B HER2 negativan	46	39,00 %
	Luminal B HER2 pozitivan	9	7,60 %
	HER2 pozitivan	8	6,80 %
	Trostruko negativan	10	8,50 %
N skupine	N0	79	66,90 %
	N1	29	24,60 %
	N2	10	8,50 %
Limfni čvorovi	Negativni	79	66,90 %
	Pozitivni	39	33,10 %
ER+	Ne	18	15,3 %
	Da	100	84,7 %
PR+	Ne	30	25,4 %
	Da	88	74,6 %

**Tablica 2.** Opisna statistika kategorijskih varijabli i kliničke karakteristike uključenih žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (N=118) – nastavak Tablice 1.

		N	%
Smrtni ishod	Ne	112	94,9 %
	Da	6	5,1 %
Recidiv	Ne	107	90,7 %
	Da	11	9,3 %
Kemoterapija	Ne	39	33,1 %
	Da	79	66,9 %
Vrsta kemoterapije	Antraciklini	23	29,5 %
	Antraciklini → taksani	45	57,7 %
	Taksani	4	5,1 %
	Ostalo	6	7,7 %
Anti-HER2 terapija	Ne	101	85,6 %
	Da	17	14,4 %
Hormonska terapija	Ne	22	18,6 %
	Da	96	81,4 %
Vrsta hormonske terapije	Tamoksifen	29	29,9 %
	Inhibitori aromataze	64	66,0 %
	Tamoksifen i inhibitori aromataze	4	4,1 %
Radioterapija	Ne	32	27,1 %
	Da	86	72,9 %

Opisna statistika kategorijskih varijabli i kliničke karakteristike uključenih žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (N=118) prikazana je u Tablicama 1. i 2. Većina ispitanica, njih 73 (61,9 %) je pošteno operirana. U trenutku dijagnoze 79 (66,9 %) ispitanica je bilo postmenopauzalno. Od premenopauzalnih ispitanica kod njih 12 (10,2 %) je napravljena kemijska ili kirurška kastracija. Prema histološkom tipu najzastupljeniji je bio invazivni rak dojke NST koji je imalo 93 (78,8 %) ispitanica. Većina tumora bila je srednjeg stupnja diferencijacije – 67 (60,9 %) tumora je bilo histološkog gradusa 2, a 69 (59,5 %) tumora nuklearnog gradusa 2. Kod manjeg broja ispitanica, njih 18 (15,8 %) nađena je pozitivna limfovaskularna invazija. Pozitivne limfne čvorove imalo je 39 (33,1 %) ispitanica od kojih je 10 (8,5 %) bilo u skupini N2. Od bioloških podtipova tumora skoro podjednako su bili zastupljeni Luminal A i Luminal B HER-2 negativan podtip s 38,1 %, odnosno 39,0 % zastupljenosti. HER-2 pozitivan tumor imalo je 17 (14,4 %) ispitanica. U promatranom periodu recidiv je imalo 11 bolesnica (9,3 %), a smrtni ishod zabilježen je kod šest bolesnica (5,1 %). Kemoterapiju je primilo 79 (66,9 %) ispitanica, a hormonsku terapiju 96 (81,4 %) ispitanica. Adjuvantno zračenje je provedeno kod 86 (72,9 %) ispitanica.

**Tablica 3.** Opisna statistika kontinuiranih varijabli i kliničke karakteristike uključenih žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (N=118)

	Min	Max	Centile		
			25.	Medijan	75.
Dob u trenutku dijagnoze (godine)	32,00	82,00	46,75	57,00	65,00
Veličina tumora (cm)	0,50	4,50	1,08	1,55	2,20
ER (%)	0,00	100,00	40,00	90,00	100,00
PR (%)	0,00	100,00	0,00	70,00	90,00
Ki-67 (%)	3,00	90,00	12,05	22,40	34,75
Vrijeme praćenja do smrti (godine)	2,09	9,39	4,90	5,45	5,90
Vrijeme praćenja do recidiva (godine)	0,75	9,39	4,73	5,37	5,87
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	0,43	224,20	1,15	1,82	4,72
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	0,32	44,15	1,00	1,25	2,05

Opisna statistika kontinuiranih varijabli i kliničke karakteristike uključenih žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prikazana je u Tablici 3. Medijan (interkvartilni – IQR raspon) dobi iznosio je 57,0 (46,8-65,0) godina. Medijan veličine tumora bio 1,55 (1,08-2,20) cm.

Medijan (IQR) ekspresije estrogenskih receptora bio je 90,0 % (40,0 %-100,0 %), progesteronskih receptora 70,0 % (0,0 %-90,0 %), a Ki-67 22,4 % (12,1 %-34,8 %).

Medijan vremena praćenja do smrti bio je 5,45 godine, a medijan vremena praćenja do recidiva bio je 5,37 godina.

Medijan koncentracije IL-17 u serumu prije operacije iznosio je 1,82 pg/ml (1,15-4,72) , a tijekom adjuvantne terapije 1,25 pg/ml (1,00-2,05).

**Tablica 4.** Izraženost IL-17 u tumorskom tkivu u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke

		N	%
IL-17 IHC invazivna komponenta	Kategorija 0	7	7,4 %
	Kategorija 1	31	32,6 %
	Kategorija 2	36	37,9 %
	Kategorija 3	21	22,1 %
IL-17 IHC <i>in situ</i> komponenta	Kategorija 0	5	8,6 %
	Kategorija 1	19	32,8 %
	Kategorija 2	22	37,9 %
	Kategorija 3	12	20,7 %
IL-17 IHC peritumorska stroma	Kategorija 0	75	78,1 %
	Kategorija 1	20	20,8 %
	Kategorija 2	1	1,0 %
	Kategorija 3	0	0,0 %
IL-17 IHC normalno tkivo	Kategorija 0	41	56,2 %
	Kategorija 1	31	42,5 %
	Kategorija 2	1	1,4 %
	Kategorija 3	0	0,0 %

Izraženost IL-17 u tumorskom tkivu u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prikazana je u Tablici 4. Intratumorski, u invazivnoj komponenti kao i u *in situ* komponenti, najmanje je bila zastupljena izraženost kategorije 0 (<10 %), dok je u peritumorskoj stromi, kao i u normalnom tkivu dojke kategorija 0 bila najzastupljenija (78,1 %, odnosno 56,2 %).



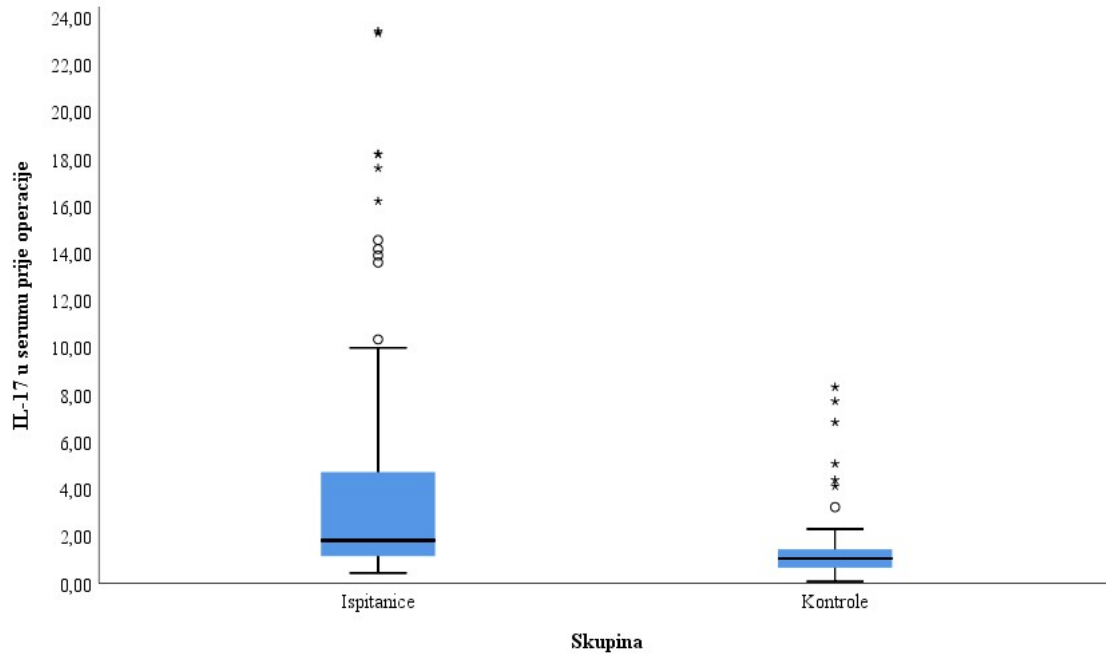
**Tablica 5.** Usporedba serumske koncentracije IL-17 u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (ispitanice) prije operacije i nakon operacije tijekom adjuvantnog liječenja i zdravih žena (kontrola): Mann-Whitney U test

Skupina		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	Ispitanice	118	0,43	224,20	1,15	1,82	4,72
	Kontrola	63	0,08	8,32	0,65	1,05	1,48
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	Ispitanice	118	0,32	44,15	1,00	1,25	2,05
	Kontrola	63	0,08	8,32	0,65	1,05	1,48

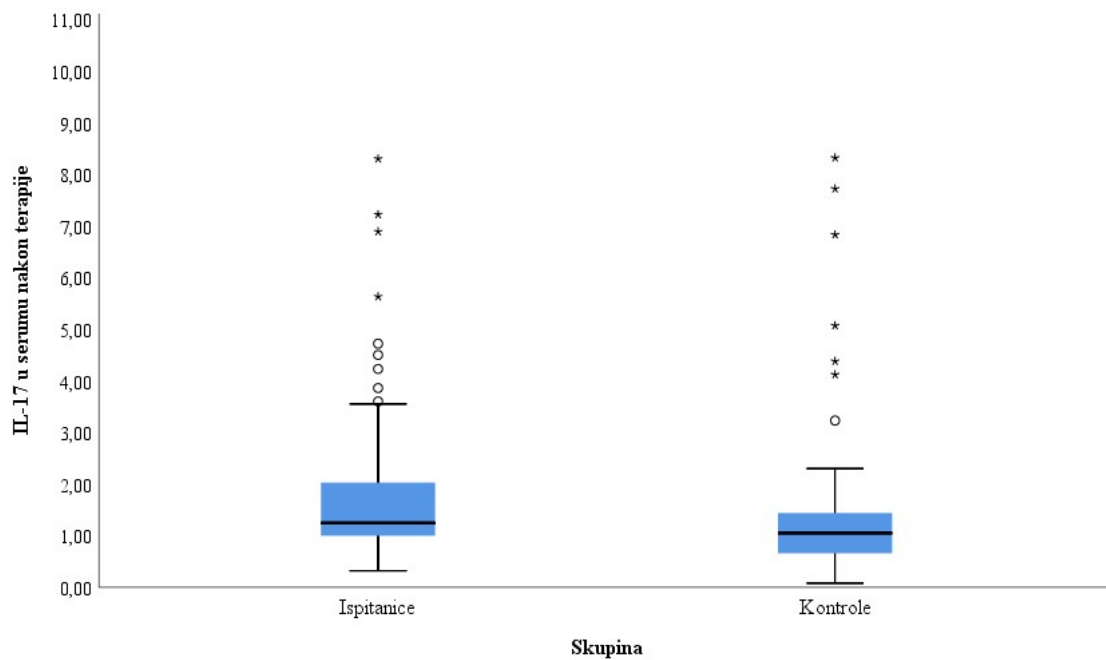
	Mann-Whitney U	Z	P
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	1902,00	-5,41	<0,001
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	2551,00	-3,47	0,001

Usporedba vrijednosti IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (ispitanice) prije operacije i nakon operacije tijekom adjuvantnog liječenja i zdravih žena (kontrola) prikazana je u Tablici 5. i odgovara na postavljeni opći cilj.

U odnosu na kontrolnu skupinu, u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke (ispitanice) utvrđene su značajno povećane serumske vrijednosti IL-17 i prije operacije ( $P < 0,001$ ) i tijekom adjuvantne terapije nakon operacije ( $P = 0,001$ ), Slika 5. i Slika 6.



**Slika 5.** Usporedba serumske koncentracije IL-17 u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prije operacije i kontrolne skupine



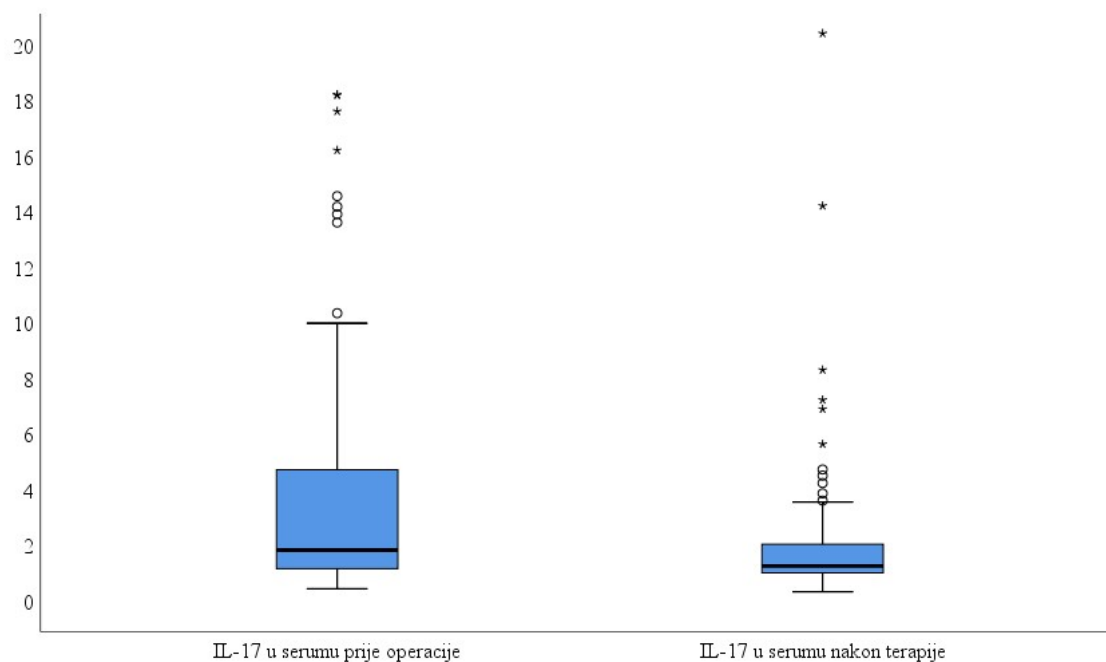
**Slika 6.** Usporedba serumske koncentracije IL-17 u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke nakon operacije tijekom adjuvantnog liječenja i kontrolne skupine

**Tablica 6.** Razlika u koncentraciji IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prije operacije i nakon provedena tri ciklusa adjuvantne kemoterapije ili tri mjeseca hormonske terapije: Wilcoxonov test

	N	Min	Max	Centile		
				25.	Medijan	75.
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	118	0,43	24,20	1,15	1,82	4,72
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	118	0,32	4,15	1,00	1,25	2,05

	Z	P
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml) / IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	-6,547	<0,001

Razlika u koncentraciji IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke predoperativno i nakon provedena 3 ciklusa adjuvantne kemoterapije ili 3 mjeseca hormonske terapije prikazana je u Tablici 6. i na Slici 7. te odgovara na jedan od specifičnih ciljeva. Tijekom adjuvantne terapije nakon operacije je zabilježen značajan pad serumske razine IL-17 ( $P < 0,001$ ) u odnosu na predoperativne vrijednosti.



**Slika 7.** Razlika u koncentraciji IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke predoperativno i nakon provedena tri ciklusa adjuvantne kemoterapije ili tri mjeseca hormonske terapije

**Tablica 7.** Razlike u koncentracijama IL-17 u serumu (prije operacije i tijekom adjuvantnog liječenja) s obzirom na status receptora HER2 u tumoru: Mann-Whitney U test

HER-2		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	Negativan (0,1+,2+)	101	0,43	224,20	1,16	1,82	4,02
	Pozitivan (3+ ili 2+ ISH+)	17	0,64	34,20	1,01	1,53	11,97
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	Negativan (0,1+,2+)	101	0,32	44,15	0,99	1,23	2,01
	Pozitivan (3+ ili 2+ ISH+)	17	0,96	20,40	1,01	1,64	3,93

	Mann-Whitney U	Z	P
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	837,500	-0,161	0,872
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)e	704,000	-1,184	0,236

**Tablica 8.** Razlike u koncentracijama IL-17 u serumu prije operacije i tijekom adjuvantne terapije s obzirom na status limfnih čvorova: Mann-Whitney U test

N status		N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	Negativan (N0)	79	0,63	224,20	1,15	1,72	3,98	0,188
	Pozitivan (N1, N2)	39	0,43	89,14	1,23	2,23	7,89	
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	Negativan (N0)	79	0,68	27,50	0,98	1,23	1,98	0,047
	Pozitivan (N1, N2)	39	0,32	44,15	1,12	1,58	2,98	

**Tablica 9.** Razlike u koncentracijama IL-17 u serumu prije operacije i tijekom adjuvantne terapije s obzirom na status limfnih čvorova: Kruskal-Wallisov test

N skupine		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	N0	79	0,63	24,20	1,15	1,72	3,98
	N1	29	0,43	89,14	1,47	2,38	8,60
	N2	10	0,64	16,20	1,04	1,40	5,44
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	N0	79	0,68	27,50	0,98	1,23	1,98
	N1	29	0,32	44,15	1,16	1,63	2,67
	N2	10	0,86	4,72	1,06	1,24	4,02

	Kruskal-Wallis H	df	P
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	4,098	2	0,129
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	4,149	2	0,126

Razlike u vrijednostima IL-17 u serumu prije operacije i tijekom adjuvantne terapije s obzirom na status HER-2 receptora i limfnih čvorova prikazane su u Tablicama 7., 8. i 9. Nije bilo značajne razlike u koncentraciji IL-17 prije operacije niti tijekom adjuvantne terapije s obzirom na status HER-2 receptora. Zabilježena je značajna razlika razine IL-17 u serumu oboljelih tijekom adjuvantne terapije sa zahvaćenošću pazušnih limfnih čvorova neovisno o broju zahvaćenih čvorova odnosno N skupini.

Tablica 10. prikazuje razlike u vrijednostima IL-17 u serumu (prije operacije i tijekom adjuvantne terapije) s obzirom na surogatni biološki podtip tumora te odgovara na jedan od specifičnih ciljeva. U trostruko negativnom podtipu bile su predoperativno značajno veće vrijednosti serumskog IL-17 nego u luminalni A ( $P=0,001$ ), luminalni B HER2 negativnom

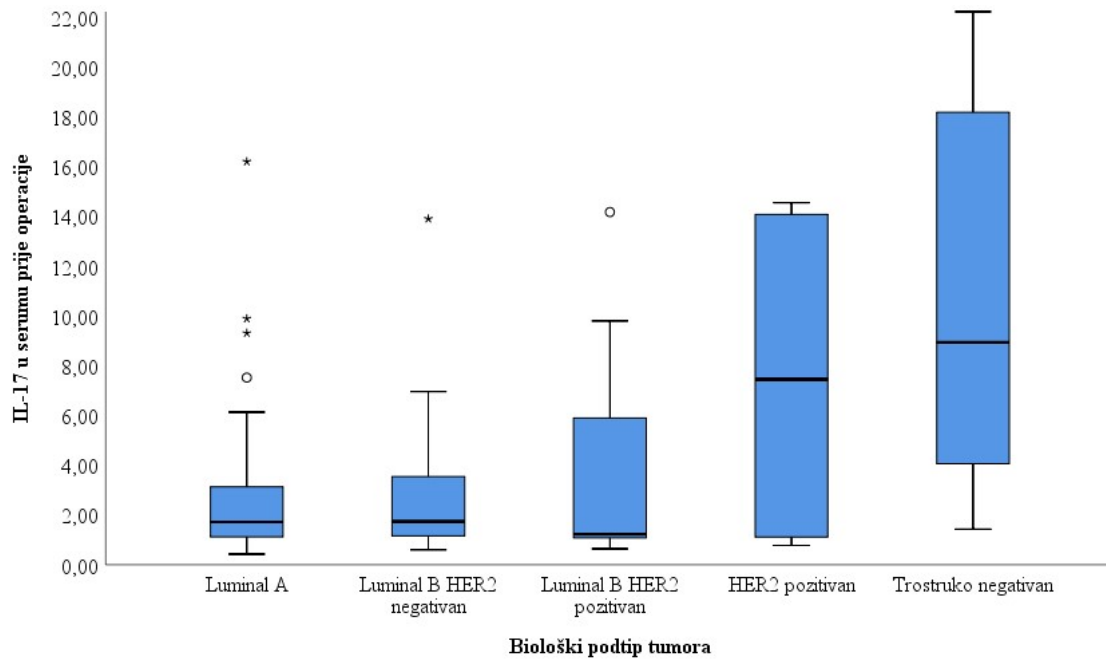
( $P=0,003$ ) te luminalni B HER2 pozitivnom ( $P=0,018$ ) podtipu. Tijekom adjuvantne terapije bile su veće vrijednosti IL-17 u serumu u trostruko negativnom podtipu nego u luminalni A ( $P<0,001$ ) i luminalni B HER2 negativnom ( $P=0,001$ ) podtipu.

**Tablica 10.** Razlike u vrijednostima IL-17 u serumu (prije operacije i tijekom adjuvantne terapije) s obzirom na surogatni biološki podtip tumora: Kruskal-Wallisov test s post-hoc Mann-Whitney U testom

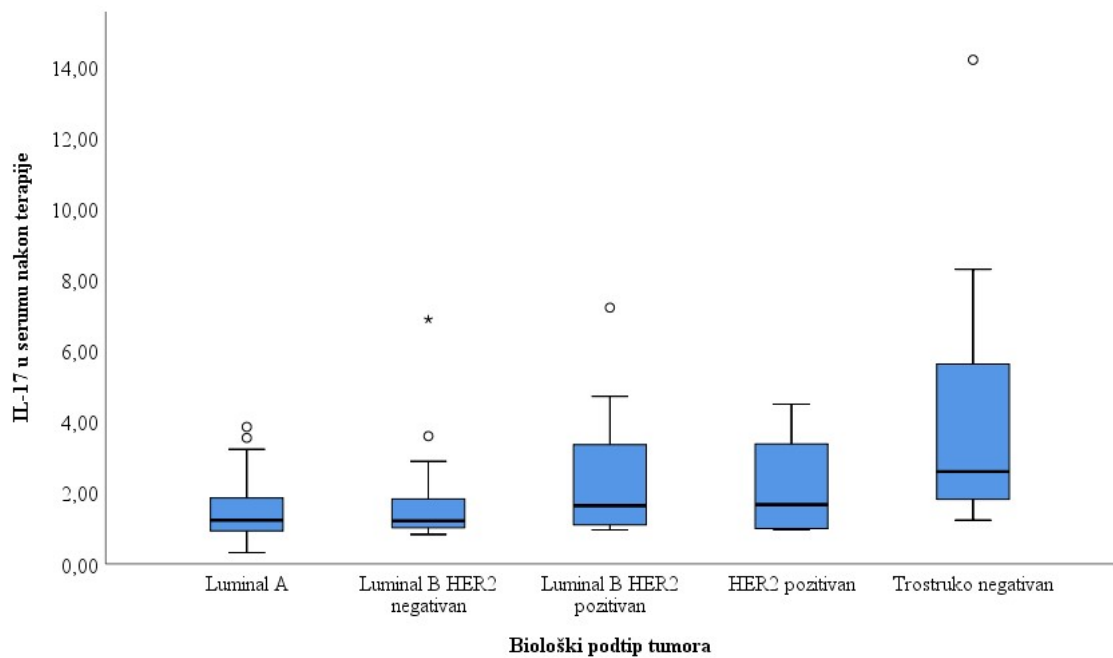
Biološki podtip tumora		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	Luminal A	45	0,43	87,58	1,08	1,72	3,13
	Luminal B HER2 negativan	46	0,60	224,20	1,16	1,74	3,55
	Luminal B HER2 pozitivan	9	0,64	14,17	1,01	1,23	7,85
	HER2 pozitivan	8	0,78	34,20	1,00	7,45	14,31
	Trostruko negativan	10	1,43	23,40	3,48	8,94	18,19
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	Luminal A	45	0,32	3,86	0,92	1,23	1,92
	Luminal B HER2 negativan	46	0,83	44,15	1,01	1,22	1,87
	Luminal B HER2 pozitivan	9	0,96	7,22	1,05	1,64	4,04
	HER2 pozitivan	8	0,97	20,40	0,99	1,67	3,94
	Trostruko negativan	10	1,23	14,20	1,81	2,60	6,30

	Kruskal-Wallis H	df	P
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	12,631	4	0,013
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	14,737	4	0,005

Surogatni biološki podtip	Post-hoc analiza Mann-Whitney U test vrijednost	
	IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)
Luminal A vs. luminalni B HER2 negativan	0,446	0,378
Luminal A vs. luminalni B HER2 pozitivan	0,807	0,131
Luminal A vs. HER2 pozitivan	0,149	0,176
Luminal A vs. trostruko negativan	0,001	<0,001
Luminal B HER2 negativan vs. luminalni B HER2 pozitivan	0,474	0,363
Luminal B HER2 negativan vs. HER2 pozitivan	0,306	0,450
Luminal B HER2 negativan vs. trostruko negativan	0,003	0,001
Luminal B HER2 pozitivan vs. HER2 pozitivan	0,290	0,923
Luminal B HER2 pozitivan vs. trostruko negativan	0,018	0,102
HER2 pozitivan vs. trostruko negativan	0,477	0,155



**Slika 8.** Razlike u vrijednostima IL-17 u serumu prije operacije s obzirom na bioški podtip tumora



**Slika 9.** Razlike u vrijednostima IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije s obzirom na bioški podtip tumora

**Tablica 11.** Korelacijski koeficijenti serumske razine IL-17 i izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu: Spearmanovi koeficijenti korelacije Rho

		IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)
IL-17 IHC invazivna i <i>in situ</i> komponenta	Rho	-0,024	0,036
	P	0,816	0,726
	N	95	95
IL-17 IHC peritumorska stroma	Rho	0,054	0,111
	P	0,603	0,282
	N	96	96
IL-17 IHC normalno tkivo	Rho	-0,030	-0,072
	P	0,799	0,543
	N	73	73

Korelacijski koeficijenti serumske razine IL-17 i izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu prikazani su u Tablici 11. i odgovaraju na jedan od specifičnih ciljeva kao i na hipotezu. Nije bilo statistički značajnih korelacija.



**Tablica 12.** Razlike serumske razine IL-17 i izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu:  
Mann-Whitney U test

	<b>IL-17 IHC invazivni + <i>in situ</i></b>	<b>N</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>25. centila</b>	<b>Medijan</b>	<b>75. centila</b>	<b>P</b>
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	Negativno (kategorija 0)	7	1,96	18,20	2,04	3,57	9,98	0,068
	Pozitivno (kategorija 1,2,3)	9	0,43	224,20	1,15	1,80	4,71	
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	Negativno (kategorija 0)	7	0,86	5,63	1,36	2,02	2,60	0,228
	Pozitivno (kategorija 1,2,3)	9	0,32	44,15	1,02	1,28	2,11	

	<b>IL-17 IHC peritumorska stroma</b>	<b>N</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>25.centila</b>	<b>Medijan</b>	<b>75. centila</b>	<b>P</b>
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	Negativno (kategorija 0)	75	0,60	224,20	1,15	1,82	4,56	0,626
	Pozitivno (kategorija 1,2,3)	21	0,43	89,14	1,28	2,10	6,96	
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	Negativno (kategorija 0)	75	0,63	27,50	1,03	1,28	2,00	0,285
	Pozitivno (kategorija 1,2,3)	21	0,32	44,15	1,02	1,82	2,89	

	<b>IL-17 IHC normalno tkivo</b>	<b>N</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>25. centila</b>	<b>Medijan</b>	<b>75. centila</b>	<b>P</b>
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	Negativno (kategorija 0)	1	0,60	224,20	1,16	2,00	4,71	0,824
	Pozitivno (kategorija 1,2,3)	2	0,43	89,14	1,22	1,81	3,71	
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	Negativno (kategorija 0)	1	0,63	27,50	1,03	1,28	2,03	0,519
	Pozitivno (kategorija 1,2,3)	2	0,32	44,15	1,00	1,26	1,85	

Nije bilo statistički značajnih razlika.

**Tablica 13.** Korelacijski koeficijenti između vrijednosti IL-17 s ostalim kliničkim i patohistološkim pokazateljima: Spearmanovi koeficijenti korelacije Rho ili Kendallovi koeficijenti korelacije Tau\_b u slučajevima ordinalno – nominalne usporedbe

		IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	IL-17 IHC invazivna i <i>in situ</i> komponenta	IL-17 IHC peritumorska stroma	IL-17 IHC normalno tkivo
Dob u trenutku dijagnoze (godine)	Rho	-0,179	-0,113	-0,109	-0,342	-0,275
	P	0,052	0,224	0,291	0,001	0,019
	N	118	118	96	96	73
Menopauza	Tau_b	-0,139	-0,066	-0,123	-0,206	-0,134
	P	0,067	0,383	0,234	0,044	0,254
	N	118	118	96	96	73
Kastracija	Tau_b	-0,024	-0,026	0,73	0,044	0,038
	P	0,755	0,735	0,479	0,665	0,744
	N	118	118	96	96	73
Histološki gradus	Rho	0,112	0,232	0,72	0,123	0,006
	P	0,243	0,015	0,504	0,249	0,959
	N	110	110	89	90	67
Nuklearni gradus	Rho	0,029	0,189	0,141	0,256	0,195
	P	0,760	0,042	0,175	0,013	0,101
	N	116	116	94	94	72
Limfovaskularna invazija (intra i ekstratumorska)	Tau_b	0,144	0,103	0,183	0,036	0,116
	P	0,062	0,184	0,079	0,732	0,324
	N	114	114	93	93	72
Veličina tumora (cm)	Rho	0,167	0,224	0,018	0,149	0,101
	P	0,071	0,015	0,838	0,148	0,397
	N	118	118	96	96	73
N status	Rho	0,095	0,174	0,169	0,168	-0,072
	P	0,306	0,060	0,100	0,102	0,543
	N	118	118	96	96	73
Pozitivni čvorovi	Tau_b	0,100	0,151	-0,119	0,167	-0,056
	P	0,188	0,047	0,484	0,102	0,634
	N	118	118	37	96	73

**Tablica 14.** Korelacijski koeficijenti između vrijednosti IL-17 s ostalim kliničkim i patohistološkim pokazateljima: Spearmanovi koeficijenti korelacije Rho ili Kendallovi koeficijenti korelacije Tau\_b (u slučajevima ordinalno – nominalne usporedbe) – nastavak

Tablice 12.

		IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	IL-17 u serumu nakon terapije (pg/ml)	IL-17 IHC invazivna i <i>in situ</i> komponenta	IL-17 IHC peritumorska stroma	IL-17 IHC normalno tkivo
ER (%)	Rho	-0,215	-0,275	0,185	-0,073	0,135
	P	0,019	0,003	0,071	0,477	0,256
	N	118	118	96	96	73
PR (%)	Rho	-0,034	-0,114	0,087	-0,150	0,007
	P	0,711	0,220	0,399	0,144	0,956
	N	118	118	96	73	73
HER-2	Rho	0,015	0,109	0,082	0,101	0,000
	P	0,873	0,238	0,427	0,325	1,000
	N	118	118	96	96	73
Ki-67 (%)	Rho	0,120	0,147	0,084	0,249	0,148
	P	0,201	0,115	0,423	0,015	0,213
	N	116	116	94	95	73
Smrti ishod	Tau_b	0,001	-0,027	-0,028	-0,124	0,026
	P	0,995	0,775	0,787	0,229	0,824
	N	118	118	96	96	73
Recidiv	Tau_b	0,027	-0,104	0,055	-0,099	0,026
	P	0,775	0,262	0,595	0,339	0,824
	N	118	118	96	96	73
Kemoterapija	Tau_b	0,151	0,176	0,205	0,319	0,062
	P	0,046	0,021	0,045	0,002	0,594
	N	118	118	96	96	73
Anti-HER terapija	Tau_b	0,012	0,090	0,082	0,101	0,000
	P	0,872	0,236	0,427	0,323	1,000
	N	118	118	96	96	73
Hormonska terapija	Tau_b	-0,244	-0,230	0,202	0,048-0,063	0,055
	P	0,001	0,003	0,058	0,534	0,640
	N	118	118	96	96	73
Radioterapija	Tau_b	0,011	0,133	-0,033	-0,002	-0,157
	P	0,884	0,081	0,751	0,986	0,181
	N	118	118	96	96	73

Tablice 13. i 14. prikazuju korelacijske koeficijente između serumskih i tkivnih vrijednosti IL-17 s ostalim kliničkim i patohistološkim pokazateljima:

- ◆ IL-17 u serumu prije operacije značajno negativno korelira s izraženošću estrogenih receptora i primjenom hormonske terapije dok pozitivno korelira s primjenom kemoterapije
- ◆ IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije značajno pozitivno korelira s histološkim gradusom, nuklearnim gradusom, veličinom tumora, zahvaćenošću limfnih čvorova i primjenom kemoterapije, a negativno korelira s estrogenim receptorima i primjenom hormonske terapije
- ◆ intratumorska izraženost IL-17 značajno pozitivno korelira samo s primjenom kemoterapije
- ◆ peristromalna izraženost IL-17 značajno pozitivno korelira s nuklearnim gradusom, proliferacijskim indeksom Ki-67 i primjenom kemoterapije dok negativno korelira s dobi i menopauzom
- ◆ izraženost IL-17 u normalnom tkivu značajno negativno korelira s dobi

**Tablica 15.** Razlike u serumskoj koncentraciji IL-17 s obzirom na histološki tip tumora:  
Mann-Whitney U test

Histološki tip	N	Min	Max	Centile			P	
				25.	Medijan	75.		
IL-17 u serumu prije operacije (pg/ml)	NST	93	0,60	224,20	1,16	1,75	4,34	0,870
	Lobularni invazivni	15	0,43	41,60	1,00	2,23	4,71	
	Miješani	6	0,89	9,98	0,95	2,34	7,72	
	Ostali	4	0,96	17,60	1,24	7,99	16,68	
IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije (pg/ml)	NST	93	0,63	44,15	1,04	1,28	2,02	0,542
	Lobularni invazivni	15	0,32	23,40	0,90	1,10	2,12	
	Miješani	6	0,98	5,63	0,99	1,03	2,56	
	Ostali	4	1,00	2,60	1,14	1,90	2,51	

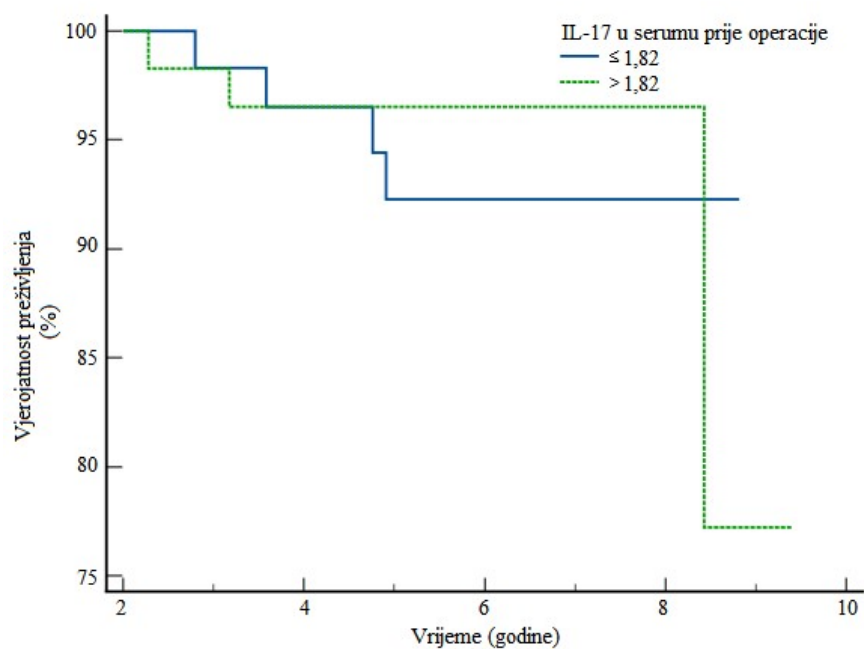
**Tablica 16.** Razlike učestalosti IL-17 IHC kategorija s obzirom na histološki tip tumora:  
Fisher-Freeman-Haltonov egzaktan test

		Histološki tip								P
		NST		Lobularni invazivni		Miješani		Ostali		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
IL-17 IHC invazivna i <i>in situ</i> komponenta	Kategorija 0	3	3,95%	3	3,08%	1	5,00%	0	0,00%	0,071
	Kategorija 1	20	26,32%	5	38,46%	0	0,00%	2	66,67%	
	Kategorija 2	35	46,05%	4	30,77%	1	25,00%	0	0,00%	
	Kategorija 3	18	23,68%	1	7,69%	2	50,00%	1	33,33%	
IL-17 IHC peritumorska stroma	Kategorija 0	61	80,30%	10	76,90%	3	75,00%	1	33,30%	0,347
	Kategorija 1	14	18,40%	3	23,10%	1	25,00%	2	66,70%	
	Kategorija 2	1	1,30%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	
	Kategorija 3	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	
IL-17 IHC normalno tkivo	Kategorija 0	33	55,90%	5	62,50%	1	33,30%	2	66,70%	0,92
	Kategorija 1	25	42,40%	3	37,50%	2	66,70%	1	33,30%	
	Kategorija 2	1	1,70%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	
	Kategorija 3	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	

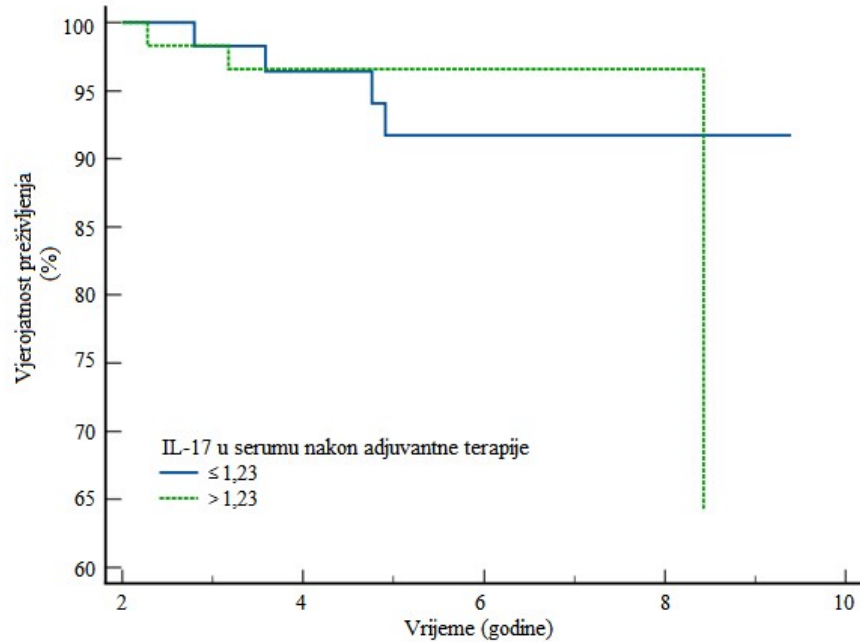
Nije bilo značajnih razlika u koncentraciji IL-17 u serumu s obzirom na histološki tip tumora – Tablica 15., kao ni u učestalosti IL-17 IHC kategorija u invazivnoj i *in situ* komponenti, peritumorskoj stromi i normalnom tkivu – Tablica 16.

**Tablica 17.** Usporedba intratumorske izraženosti IL-17 (invazivna komponenta, *in situ* komponenta, peritumorska stroma) s normalnim tkivom: Spearmanov koeficijent korelacije

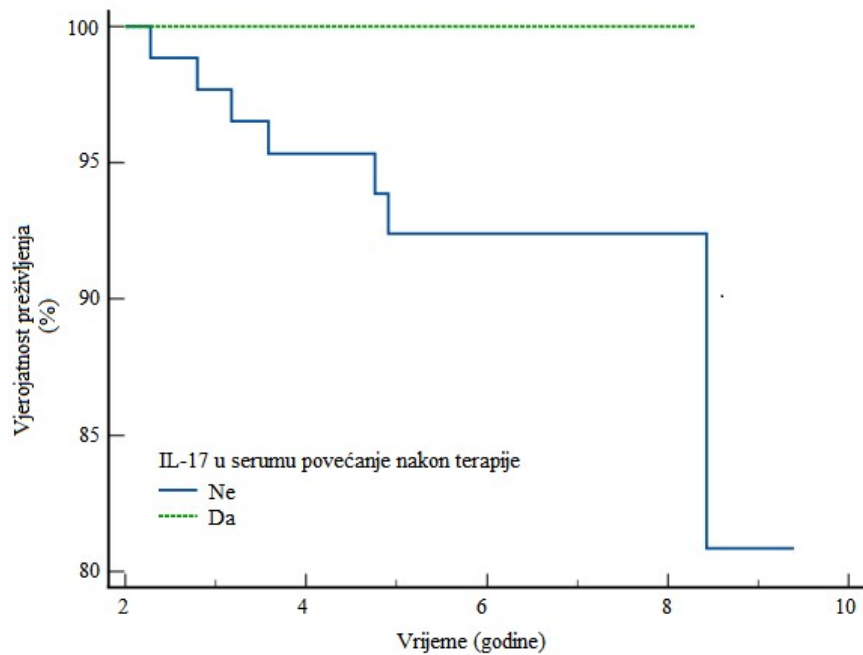
	IL-17 IHC normalno tkivo	
IL-17 IHC invazivna i <i>in situ</i> komponenta	Korelacijski koeficijent	0,441
	P	<0,001
	N	71
IL-17 IHC peritumorska stroma	Korelacijski koeficijent	0,426
	P	<0,001
	N	72



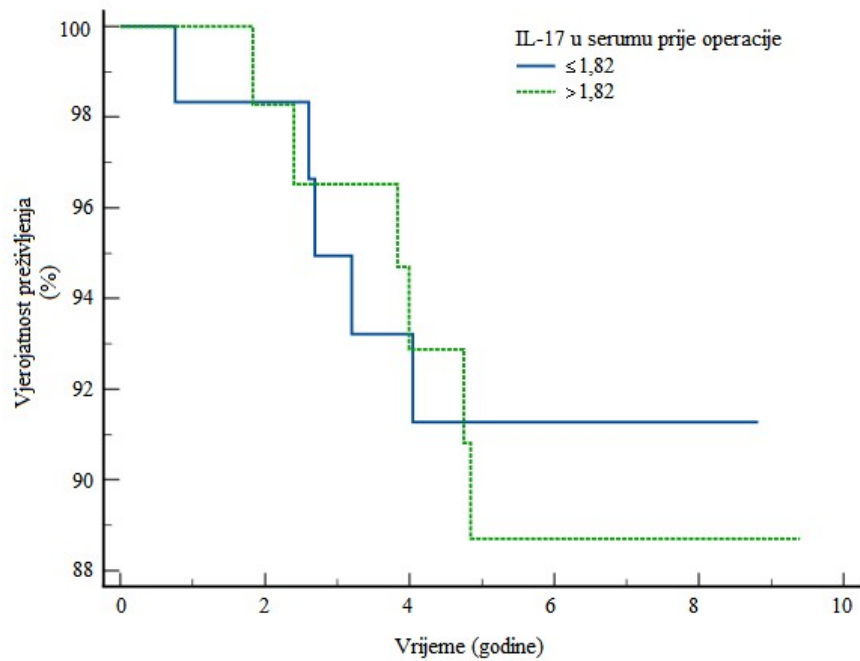
**Slika 10.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja s obzirom na medijane vrijednosti IL-17 u serumu prije operacije: log-rank test; P=0,651



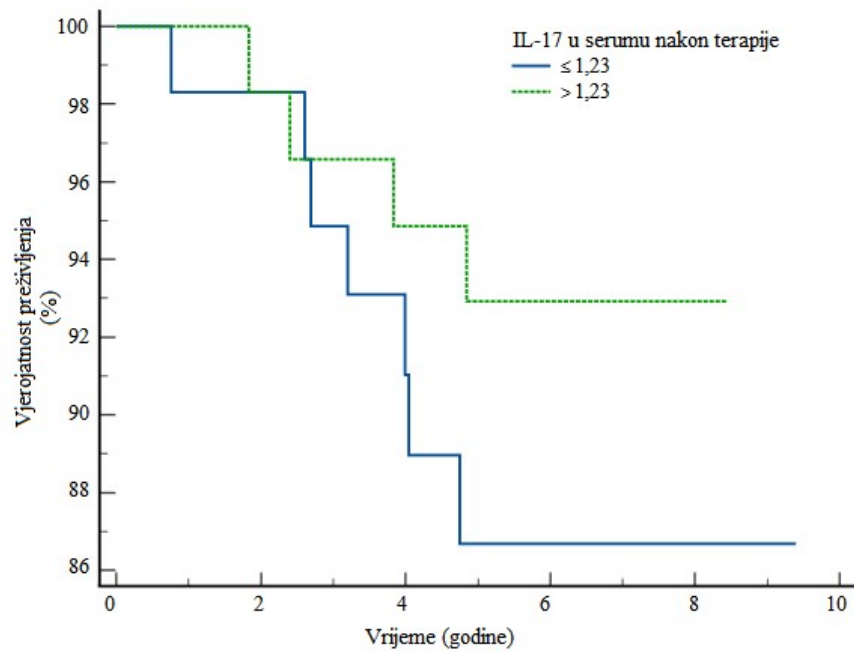
**Slika 11.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja s obzirom na medijane vrijednosti IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije nakon operacije: log-rank test;  $P=0,710$



**Slika 12.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja s obzirom na porast IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije nakon operacije u odnosu na predoperativne vrijednosti: log-rank test;  $P=0,139$

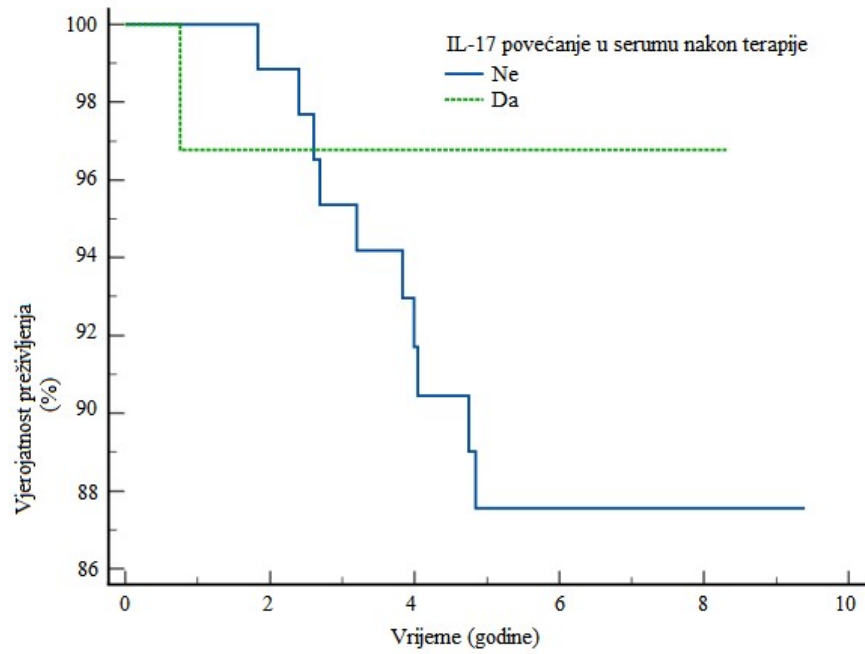


**Slika 13.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja nakon recidiva bolesti s obzirom na medijane vrijednosti IL-17 u serumu prije operacije: log-rank test;  $P=0,768$



**Slika 14.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja nakon recidiva bolesti s obzirom na medijane vrijednosti IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije: log-rank test;  $P=0,282$





**Slika 15.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja nakon recidiva bolesti s obzirom na porast IL-17 u serumu tijekom adjuvantne terapije nakon operacije u odnosu na predoperativne vrijednosti: log-rank test;  $P=0,192$

## 6. Rasprava

Dugo se vremena smatralo da je rak dojke imunološki inertan jer je naspram imunološki aktivnih tumora kao što su rak pluća, melanom ili rak bubrega u manjoj mjeri infiltriran imunološkim stanicama, ima manje mutacijsko opterećenje i slabije odgovara na dostupnu imunoterapiju. Odmak od takve pretpostavke donijelo je istraživanje koje su proveli Thorsson i suradnici u kojemu su koristeći podatke genoma i transkriptoma 10 000 različitih tumora iz TCGA baze, među kojima i rak dojke, definirali 6 različitih imunoloških podtipova tumorskog mikrokoliša: C1 – cijeljenja rane, C2 – IFN- $\gamma$  dominantan, C3 – upalni, C4 – osiromašen limfocitima, C5 – imunološki utišan i C6 – TGF- $\beta$  dominantan. Među 944 analizirana uzorka raka dojke niti jedan nije odgovarao imunološki utišanoj skupini (131). Postalo je jasno da u raku dojke postoji niz događaja koji prethode kliničkom zapažanju o raku dojke kao o slabo imunološki aktivnom tumoru te da se u raku dojke ne radi o „*a priori*“ izostanku imunološkog odgovora. Mnoga su istraživanja pokušala razjasniti slojevit i dinamičan međuodnos imunološkog sustava i raka dojke u različitim stadijima napredovanja bolesti, od ranog raka dojke do diseminirane bolesti. Većina istraživanja provedena je u eksperimentalnim uvjetima u kojima je samo do određene mjere bilo moguće replicirati *in vivo* uvjete. I u *in vivo* istraživanjima plastičnost imunološkog odgovora, heterogenost tumora te sposobnost tumorskih stanica da aktivacijom različitih signalnih puteva usmjeravaju imunost u skladu s vlastitim potrebama doveli su do ponešto oprečnih opažanja. Imunološki odgovor u raku dojke je kompleksan sustav u kojemu se broj interakcija između komponenata brzo i dramatično povećava napredovanjem bolesti. Čak i ako bi se uspjelo zacrtati sve njegove dijelove, pitanje je hoće li se ikad moći precizno predviđati događaje unutar tog sustava ili će najbolja mogućnost biti pravovremeno ih usmjeravati.

Prošlo je mnogo godina otkako je prepoznata uloga upale u nastanku i napredovanju tumora, uključujući i rak dojke (132–135). Štoviše, rezultati eksperimentalnih i kliničkih studija ukazuju da imunološki sustav može djelovati dvojako, u određenim okolnostima promovirati, a u drugim inhibirati rast i razvoj tumora (136). Upala nije nužan korak samo u diseminaciji maligne bolesti, već je neophodan proces i u eliminaciji maligne bolesti. Točni stanični mehanizmi u podlozi o kojima ovisi hoće li upalno zbivanje dovesti do eliminacije tumora ili će pospješiti rast i širenje tumora još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Nakon otkrića koja su identificirala IL-17 kao središnji medijator upale duboko upleten u sve faze upalnih zbivanja raste i broj dokaza o višestrukoj ulozi IL-17 u nastanku, napredovanju i rezistenciji na terapiju tumora različitih sijela (137). Učinci IL-17 očituju se na svim tipovima

stanica uključujući epitelne, mezenhimalne i stanice mijeloidne loze. U ranoj fazi upale IL-17 dovodi do akumulacije neutrofila u krvi i tkivu dok u kasnijim fazama upale igra važnu ulogu u destrukciji tkiva posredovanj matriks metaloproteazama (MMP) (138). Protutijela koja ciljaju IL-17 uspješno se upotrebljavaju u liječenju autoimunih upalnih bolesti kao što su multipla skleroza, psorijaza, reumatoidni artritis i ankilozantni spondilitis (139–141). Razina IL-17 visoka je tijekom ranih faza upale dok je u kasnijim fazama upale manji broj stanica koje proizvode IL-17. Znajući da je kronična upala višestupanjski proces, za naslutiti je da uloga IL-17 nije jednaka u ranim i kasnim fazama bolesti (138,142). U serumu onkoloških bolesnika zabilježena je povišena koncentracija IL-17 i u većini studija bila je povezana s lošijom prognozom (143). Ipak, u pojedinim je istraživanjima primijećeno da povećana razina Th17 stanica u tumorskom tkivu dojke pozitivno korelira s ekspresijom IL-17 i da je povezana s povoljnijom prognozom (144). Očekivati je stoga da ovisno o čimbenicima iz okoliša i mikrookoline tumora, uvjetovano među ostalim i stadijem bolesti, IL-17 može poticati protumorsku aktivnost upalnog odgovora ili naprotiv imati protutumorsko djelovanje. Čimbenike koji mogu tako dvojako djelovati potrebno je proučiti da bi se razumjelo kako umanjiti njihovu protumorsku i pospješiti njihovu protutumorsku aktivnost (145).

## 6.1. SERUMSKA RAZINA IL-17 U RANOM RAKU DOJKE

Malo je istraživanja koja su analizirala serumsku razinu IL-17 u raku dojke, posebice u ranoj fazi bolesti. Pretpostavka od koje je krenulo ovo istraživanje bila je da je u serumu žena oboljelih od ranog raka dojke koncentracija IL-17 značajno viša no u serumu zdravih žena i da pozitivno korelira s izraženošću IL-17 u tumorskom tkivu. Osim toga, cilj je bio mjerenjem serumске koncentracije IL-17 u žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke predoperativno i nakon operacije tijekom adjuvantnog liječenja provjeriti postoji li značajan pad serumске razine IL-17 tijekom adjuvantnog liječenja u odnosu na predoperativne vrijednosti što u dosad objavljenim istraživanjima još nikada nije ispitano.

Analizom dobivenih podataka utvrđena je značajno viša serumska koncentracija IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog raka dojke prije početka liječenja ( $P < 0,001$ ), ali i nakon kirurškog odstranjenja tumora tijekom adjuvantnog liječenja u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P = 0,001$ ). Zabilježen je statistički značajan pad razine IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog raka dojke tijekom adjuvantnog liječenja nakon operacije u odnosu na vrijednosti prije operacije ( $P < 0,001$ ).

Da je serumska razina IL-17 značajno viša u bolesnika oboljelih od raka dojke nego u bolesnika oboljelih od dobroćudnih tumora dojke ( $P < 0,017$ ) primijetili su Borj i sur. proučavajući koncentraciju IL-17, IL-4 i IFN- $\gamma$  u serumu i tumorskom tkivu bolesnica oboljelih od zloćudnog raka dojke ( $N=50$ ) i dobroćudnih tumora dojke ( $N=65$ ) (146). Zhuangwei i sur. analizirali su serumsku razinu IL-10, IL-17 i TNF- $\beta$  u 378 bolesnica s tumorom dojke od kojih je 110 imalo invazivan rak stadij I-III te su našli statistički značajno višu razinu IL-17 u serumu oboljelih u odnosu na zdrave žene, ali samo u stadiju III bolesti ( $P < 0,01$ ) koji je imalo 30 % bolesnica u istraživanju. Primijetili su da je razina IL-17 bila viša u bolesnica oboljelih od ER- tumora nego u bolesnica oboljelih od ER+ tumora ( $P < 0,0001$ ) (147). Treba napomenuti da je u ovom istraživanju bio velik broj ER- tumora (50 %) i HER2+ tumora (40 %) uzevši u obzir prosječnu distribuciju surogatnih bioloških podtipova raka dojke (148). Slično se dogodilo i u studiji koju su proveli Kaur i sur. koji su analizirali serum 150 ispitanica s rakom dojke i usporedili vrijednosti IL-17, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-4 i IL-2 s vrijednostima u serumu zdravih kontrola. Od ispitivanih citokina jedino su razine IL-17 i IL-6 bile značajno veće u oboljelih. Opet valja napomenuti da je svega 37,6 % tumora bilo HR+ dok je udio trostruko negativnog raka dojke bio nešto viši od prosjeka (17,5 %) (149). Iako malobrojna, istraživanja u kojima je mjerena serumska razina IL-17 u žena oboljelih od raka dojke opetovano ukazuju na to da postoji značajna razlika u odnosu na razinu IL-17 u serumu zdravih žena, čak i u lokalno ograničenom raku dojke.

Prema podacima u dosad objavljenoj literaturi, ovo je prvo istraživanje u kojemu je mjerena razina IL-17 prije i nakon odstranjenja tumora u ranom raku dojke te je utvrđen značajan pad serumske razine IL-17 nakon odstranjenja tumora. Dobiveni rezultati govore u prilog tome da je imunološki odgovor u ranom raku dojke među ostalim posredovan i stanicama koje luče IL-17 te da po odstranjenju tumora dolazi do smirivanja upalne reakcije posredovane IL-17. Također je prvi put zabilježeno da se u žena oboljelih od ranog raka dojke serumska razina IL-17 nakon odstranjenja tumora tijekom adjuvantnog liječenja ne vraća na normalne vrijednosti, već ostaje povišenom u odnosu na vrijednosti u zdravoj populaciji.

## 6.2. SERUMSKA RAZINA IL-17 OVISNO O SUROGATNOM BIOLOŠKOM PODTIPU RANOG RAKA DOJKE

U istraživanju je nadalje analizirana međuovisnost serumske razine IL-17 i prethodno definiranih surogatnih bioloških podskupina raka dojke. Budući da gensko i molekularno profiliranje još uvijek nisu u rutinskoj upotrebi, pristup liječenju i procjena prognoze bolesti

određeni su dominantno surogatnim biološkim podtipom raka dojke definiranim imunohistokemijskom analizom tumorskog tkiva.

### 6.2.1 HORMONSKI OVISAN RANI RAK DOJKE

Ranije provedena istraživanja upućuju na to da je razina IL-17 značajno povećana u tkivu ER- odnosno trostruko negativnog raka dojke u odnosu na druge biološke podtipove raka dojke. Pojačana ekspresija IL-17 receptorskih lanaca na tumorskim stanicama omogućuje citokinu IL-17 izravan učinak na tumorske stanice (150). Temeljem prethodnih istraživanja u kojima je primijećena pojačana ekspresija IL-17 i PD-L1 u ER- raku dojke Yun-Feng Ma i sur. su analizirajući 122 uzorka tkiva raka dojke i seruma bolesnica oboljelih od raka dojke stadija I, II i III pokušali razjasniti stanični mehanizam regulacije PD-L1 putem IL-17. Otkrili su da je razina PD-L1 mRNA značajno povišena u tkivu raka dojke s jačim izražajem IL-17 i obrnuto, da je razina IL-17 mRNA značajno povišena u tumorima s jačom ekspresijom PD-L1. Mjereći serumsku razinu IL-17 u bolesnika oboljelih od ER- raka dojke s niskom i visokom ekspresijom PD-L1 utvrdili su da je serumska razina IL-17 bila značajno viša u ER- raku dojke s visokom ekspresijom PD-L1 (151). Nastavno na njihovo istraživanje učinjena je analiza podataka iz TCGA baze koja je pokazala da visoka ekspresija ER smanjuje razinu IL-17A, IL-17C i IL-17F, a povećava razinu IL-17 E koji suprimira signalizaciju posredovanu s IL-17. Ekspresija ER bila je negativno povezana s razinom ekspresije gena koji sudjeluju u IL-17 signalnim putevima. Povećana ekspresija PD-L1 bila je povezana s ER- statusom i povećanom ekspresijom gena koji sudjeluju u IL-17 signalizaciji (152).

U skladu s dosad provedenim ispitivanjima, rezultati ovog istraživanja pokazali su da razina IL-17 u serumu bolesnica oboljelih od ranog raka dojke značajno negativno korelira s izražajem ER u tumoru i prije operacije ( $P=0,019$ ), ali i tijekom adjuvantnog liječenja ( $P=0,003$ ). Očekivano, serumska razina IL-17 negativno je korelirala s hormonskim liječenjem, a pozitivno s kemoterapijskim liječenjem. Zabilježen je trend niže serumske razine IL-17 prije operacije u bolesnica starije životne dobi ( $P=0,052$ ) i u bolesnica u menopauzi ( $P=0,067$ ). To je moguće stoga što je u tim skupinama bolesnica veća incidencija hormonski ovisnog raka dojke (153), ali i zbog slabljenja imunosti prirodnim procesom starenja.

Zabilježene su značajno više predoperativne vrijednosti serumske razine IL-17 u žena oboljelih od trostruko negativnog raka dojke u odnosu na hormonski ovisan rak dojke – luminalni A ( $P=0,001$ ), luminalni B HER2 negativan ( $P=0,003$ ) i luminalni B HER2 pozitivan ( $P=0,018$ ).

### 6.2.2 TROSTRUKO NEGATIVAN RANI RAK DOJKE

Trostruko negativni rak dojke je biološki najagresivniji podtip raka dojke. Povezan je s jačom upalom tkiva i jedini je podtip u kojemu je dokazana korist od imunoterapije. Temeljem ohrabrujućih podataka kliničke studije faze III KEYNOTE-522 odobrena je primjena imunoterapije i u liječenju ranog trostruko negativnog raka dojke, neovisno o PD-L1 statusu (154).

Nedavno su objavljeni podaci koji potvrđuju povezanost IL-17 s genom *MEGF11* (engl. *multiple epidermal growth factor-like domains 11*) čija je ekspresija značajno veća u tumorskom tkivu bolesnika oboljelih od trostruko negativnog raka dojke koji su doživjeli povrat bolesti u odnosu na bolesnike u kojih nije zabilježen povrat bolesti. Inaktivacija gena *MEGF11* značajno je inhibirao AKT, mTOR i NF- $\kappa$ B signalne putove. U tumorskom tkivu trostruko negativnog raka dojke s inaktiviranim genom *MEGF11* potvrđena je smanjena razina transkripata IL-17. I obrnuto, dodatkom IL-17 u kulturu stanica s funkcionalnim genom *MEGF11* zabilježen je porast razine proteina MEGF11 i povećano stvaranje upalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  i COX2 u tumorskim stanicama (155). Temeljem navedenog uslijedilo je istraživanje u kojemu su Tsai Y-F i sur. pokušali razjasniti ulogu IL-17 u povratu bolesti kod trostruko negativnog raka dojke uključujući utjecaj IL-17 na rast tumora, tumorski mikrokoliš i razinu cirkulirajućih tumorskih stanica u krvi za što je ranije dokazano da pridonosi lošijem ishodu bolesti u raku dojke. Pokazalo se da u trostruko negativnom raku dojke IL-17 potiče migratornu aktivnost tumorskih stanica i usmjerava imunološki krajolik stvarajući uvjete u mikrokolišu koji pogoduju metastaziranju. Nađena je značajna korelacija između razine IL-17 i broja cirkulirajućih tumorskih stanica u krvi. Autori su zaključili da blokada IL-17 može pružiti dodatnu mogućnost liječenja kod sprečavanja povrata odnosno diseminacije trostruko negativnog raka dojke (156).

U trostruko negativnom raku dojke bila je značajno veća serumska razina IL-17 i tijekom adjuvantnog liječenja nakon operacije u odnosu na luminalni A rak dojke ( $P < 0,001$ ). Budući da je u trostruko negativnom ranom raku dojke izuzev kod vrlo malih tumora ( $\leq 0,5$  cm) gotovo uvijek indicirano liječenje kemoterapijom, kod razmatranja uzroka povišenih vrijednosti IL-17 tijekom adjuvantnog liječenja treba imati na umu među ostalim i da kemoterapija uzrokuje ozljedu tkiva koja je praćena upalom (157). Je li stoga ovakav rezultat dijelom posljedica i učinka liječenja ili je posrijedi ipak drugi uzrok valja tek istražiti. Od pomoći bi bilo napraviti kontrolno mjerenje po završetku liječenja adjuvantnom kemoterapijom ili možda bolje serijski mjeriti razinu IL-17 prije i nakon neoadjuvantnog

liječenja i operativnog zahvata što danas i jest standardan pristup liječenju trostruko negativnog ranog raka dojke, ali to izlazi iz okvira provedenog istraživanja.

U ovom istraživanju je bio relativno malen broj bolesnica oboljelih od ranog trostruko negativnog raka dojke. Bit će potreban veći broj bolesnica i duže praćenje da se provjeri mogući utjecaj serumske razine IL-17 predoperativno ili tijekom liječenja na eventualni povrat bolesti u ranom trostruko negativnom raku dojke.

### 6.2.3 HER-2 POZITIVAN RAK DOJKE

S obzirom na izražaj receptora HER2, nije nađena razlika u serumskoj koncentraciji oboljelih žena prije operacije i tijekom adjuvantnog liječenja. Nije nađena niti razlika u serumskoj koncentraciji IL-17 u HER2 pozitivnom raku dojke u odnosu na ostale surogatne biološke podtipove raka dojke. Iako je među bolesnicama oboljelim od upalnog raka dojke nađena veća učestalost HER2 pozitivnih tumora (152) te se HER2+ rak dojke kao i trostruko negativni rak dojke dovodi u svezu s lokalno izraženom upalom, niti u ranijim istraživanjima nije nađena povezanost razine IL-17 u tumorskom tkivu i serumu bolesnica oboljelih od raka dojke s HER2 statusom (151,158). S druge strane Horlock i sur. su pokazali, doduše na malom uzorku HER2+ bolesnika s metastatskom bolesti, da je u osoba oboljelih od HER2+ raka dojke u odnosu na zdravu populaciju značajno niža razina cirkulirajućih Th17 stanica nauštrb Treg stanica. Razina cirkulirajućih Th17 stanica bila je značajno viša u oboljelih od HER2+ raka dojke i u odnosu na oboljele od HER2- raka dojke, ali nije bilo razlike u razini Treg stanica između ove dvije skupine bolesnika. Zanimljivo, u metastatskoj bolesti terapija trastuzumabom mijenjala je omjer Treg:Th17 u korist Th17 stanica dok u ranom HER2+ raku dojke nije zamijećen takav efekt u sklopu adjuvantnog liječenja (159).

Kod tumačenja rezultata različitih istraživanja treba imati na umu da razina IL-17 i limfocita CD4+Th17 nisu uvijek međusobno ekvivalentne. Moguće je da su pojedini kontradiktorni rezultati dosadašnjih istraživanja barem dijelom proizašli iz takve pogrešne pretpostavke. Dobar primjer je istraživanje koje su proveli Coffelt i sur. Autori su pokazali da deplecija neutrofila u mišjem modelu raka dojke smanjuje brojnost metastaza u ranoj fazi bolesti. U proučavanom modelu neutrofilni su pospješili metastaziranje suprimirajući CD8+ limfocite T djelujući kao subpopulacija MDSC. U tumorskom modelu serumska razina IL-17 i G-CSF je bila povišena, a ekspanzija i fenotip neutrofila izravno su ovisili o IL-17-G-CSF signalnoj kaskadi. Budući da su u primarnom tumoru nađene i CD4+ limfociti T i  $\gamma\delta$  limfociti T, ali u premalom broju da bi se odredila ekspresija IL-17, autori su nakon deplecije obje populacije stanica utvrdili da upravo deplecija  $\gamma\delta$  limfocita T dovodi do značajnog pada IL-17

i G-CSF te posljedično i cirkulirajućih neutrofila, dok deplecija CD4+ limfocita T nije imala značajan učinak na razinu IL-17, G-CSF i neutrofila (160).

Otkrića da osim Th17 stanica i druge imunološke stanice mogu lučiti znatne količine IL-17, da Th17 stanice posjeduju svojstvo transdiferencijacije te da postoje hibridne stanice koje istovremeno izražavaju više populacijski specifičnih transkripcijskih čimbenika i citokina kao što su Th17/Treg ili Th17/Th1 stanice upućuju na to koliko je modularan učinak IL-17 u mikrokolišu tumora. Treba uzeti u obzir i da biološka aktivnost IL-17 nije nužno jednaka razini mRNA IL-17 niti broju stanica koje luče IL-17 jer biološka aktivnost IL-17 može biti stimulirana ili inhibirana različitim medijatorima. Tako primjerice TNF- $\alpha$ , IL-1, GM-CSF i IFN- $\gamma$  pojačavaju funkciju IL-17, dok je IL-25 (IL-17E), anti-IL-17 autoprotutijela i solubilni IL-17R umanjuju (139,161).

### 6.3. SERUMSKA RAZINA IL-17 OVISNO O PATOHISTOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA RANOG RAKA DOJKE

Promatrajući serumsku razinu IL-17 u bolesnica oboljelih od ranog raka dojke prije operacije nije nađena značajna korelacija s karakteristikama tumora kao što su histološki tip tumora, histološki i nuklearni gradus, pozitivna limfovaskularna invazija, proliferacijski indeks, veličina tumora, zahvaćenost i status limfnih čvorova.

Sličan rezultat dobili su i Chen i sur. promatrajući imunohistokemijski izražaj IL-17 u tumorskom tkivu 207 bolesnica oboljelih od raka dojke. Izražaj IL-17 u tumorskom tkivu pozitivno je korelirao s negativnim ER/PR statusom i trostruko negativnim podtipom te histološkim gradusom dok nije nađena korelacija sa stadijem bolesti, veličinom tumora, statusom limfnih čvorova i histološkim tipom tumora (158). Da ključnu ulogu u formiranju imunološkog odgovora u ranom raku dojke imaju biološke karakteristike tumora, a ne volumen bolesti, daju naslutiti i istraživanja o TIL u ranom raku dojke kao surogatnom markeru stečene imunosti. Analizirajući 897 uzoraka trostruko negativnog raka dojke Pruneri i sur. nisu našli značajne povezanosti razine TIL-a s kliničko-patološkim karakteristikama kao što su veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova ili limfovaskularna invazija (162).

Znajući da je rani rak dojke bitno homogenija bolest no diseminirani rak dojke i modulacija imunološkog odgovora bi u tom kontekstu mogla biti jednostavnija i dugoročno učinkovitija. U proširenom raku dojke imunološki sustav uzrokuje lokalnu imunološku reakciju u svakom metastatskom sijelu. Osim toga, imunološke stanice aktivirane u jednom



metastatskom sijelu moduliraju protutumorski imunološki odgovor na sustavnoj razini i mogu mijenjati zbivanje u udaljenom metastatskom sijelu. Dobar primjer je tzv. apskopalni učinak radioterapije u kojem zračenje pojedinog tumorskog sijela ima učinak na udaljena tumorska sijela izazivajući lokalnu reakciju koja aktivira sustavni imunološki odgovor na tumor (163).

Nedavno je objavljeno retrospektivno istraživanje o neoadjuvantnom učinku radioterapije u ranom raku dojke u kojemu su istraživači utvrdili da radioterapija primijenjena prije kirurškog odstranjenja ranog raka dojke u odnosu na adjuvantnu radioterapiju smanjuje rizik za nastanak novog primarnog tumora, bez razlike u ukupnom preživljenju. Smanjenje rizika bilo je najizraženije kod hormonski ovisnih tumora neovisno je li rađena poštedna operacija (HR 0,64) ili mastektomija (HR 0,48). Autori su zaključili da je uočena korist od neoadjuvantnog zračenja u skladu s dotadašnjim spoznajama da se zračenjem tumora može izazvati snažniji imunološki odgovor uključujući djelovanje na cirkulirajuće tumorske stanice ili mikrometastatske rezervoare izvan polja zračenja (164).

Rezultati studija koje ispituju učinak neoadjuvantno primijenjene imunoterapije u kombinaciji s kemoterapijom pokazuju da uz imunoterapiju veći postotak bolesnika postiže patološki kompletan odgovor što ima izravan utjecaj na dugoročan ishod bolesti (165). Ostaje vidjeti i hoće li imunoterapija u ranom raku dojke u konačnici doista imati učinak i na smanjenje rizika za povrat bolesti i bolje preživljenje. U usporedbi s metastatskim rakom dojke, u primarnom raku dojke je jači izražaj PD-L1 i ima više TIL (166) što se u studijama pokazalo kao prediktivan faktor boljeg odgovora na imunoterapiju u metastatskoj bolesti (167,168). Usprkos tome, u ranom raku dojke korist imunoterapije je zabilježena neovisno o PD-L1 statusu (165).

Razvidno je da nemaju svi bolesnici korist od imunoterapije dok dio bolesnika doživljava i ozbiljne nuspojave liječenja. U raku debelog crijeva i melanomu je zapaženo da je veći izražaj IL-17 bio povezan s rezistencijom na anti-PD-1 terapiju (169,170). Nagaoka i sur. su koristeći pretklinički model raka želuca dubokim fenotipiziranjem identificirali slijed događaja unutar osi: CCL20 → CD4<sup>+</sup> T-stanice i  $\gamma\delta$  T-stanice → IL-17-neutrofil-angiogeneza → supresija antigen specifičnih CD8<sup>+</sup> T-stanica → izostanak odbacivanja tumora. Koristeći kombiniranu PD-1 i IL-17 blokadu uspješno su eradicirali tumor (171). Da istodobna aktivacija Th17 stanica umanjuje protutumorski učinak Th1 stanica kroz mehanizam koji uključuje neutrofile utvrdili su Dadaglio i sur. zaključujući da IL-17 može snažno utjecati na učinkovitost imunoterapije inhibicijom citotoksičnog T-staničnog odgovora (172).

Promatrajući serumsku razinu IL-17 tijekom adjuvantnog liječenja nakon operativnog zahvata utvrđena je značajna pozitivna korelacija s histološkim gradusom ( $P=0,015$ ) i nuklearnim gradusom ( $P=0,042$ ), veličinom tumora ( $P=0,015$ ) i zahvaćenošću limfnih čvorova ( $P=0,047$ ). Zabilježena je tendencija pozitivne korelacije i s brojem zahvaćenih limfnih čvorova, no nije dosegla statističku značajnost ( $P=0,060$ ). Ovakav rezultat intuitivno ne iznenađuje uzevši u obzir da su veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i stupanj diferencijacije tumora tri najznačajnije prognostičke varijable koje se koriste u kliničkoj procjeni rizika za povratak bolesti i specifičnog preživljenja kod operabilnog raka dojke (69). Kod tumačenja ovih rezultata treba nanovo uzeti u obzir činjenicu da što je tumor veći i višeg gradusa, a osobito ako su zahvaćeni regionalni limfni čvorovi, postoji veća vjerojatnost da je u sklopu liječenja primijenjena adjuvantna kemoterapija s mogućim izravnim utjecajem na vrijednosti IL-17.

Mogućnost da je u bolesnika sa znakovima kroničnog upalnog zbivanja koji su preživjeli rak povećan rizik od povrata bolesti zbog prisustva malignih stanica koje potiču upalu ili novog primarnog tumora zbog kronične upale predmet je istraživanja već duže vrijeme (173). Studija "The Women's Healthy Eating and Living Study" u kojoj je 2919 bolesnica koje su preživjele rani rak dojke praćeno 7 godina pokazala je da je rizik za povratak bolesti i smrtni ishod bio značajno veći u žena koje su imale više koncentracije C reaktivnog proteina ( $CRP \geq 10$  mg/L) mjerene 2 godine nakon izlječenja u odnosu na žene koje su imale niže razine ( $CRP < 1$  mg/L) (174). U *in vitro* istraživanjima je pak dokazan sinergistički učinak IL-17 i TNF na hepatocite koji potom pojačano luče IL-6, glavni regulator reaktanata akutne faze upale (139).

#### 6.4. IZRAŽENOST IL-17 U TUMORSKOM TKIVU RANOG RAKA DOJKE

Intratumorska izraženost IL-17, kojom je obuhvaćena invazivna komponenta tumora, *in situ* komponenta kad je bila prisutna i peritumorska stroma, bila je značajno veća nego izraženost IL-17 u zdravom tkivu dojke u uzorcima gdje je bilo okolnog zdravog tkiva. Rezultat je u skladu s ishodom istraživanja koje su proveli Mombelli i sur. koji su, proučavajući signalne putove koje aktiviraju IL-17A i IL-17E u stanicama raka dojke, metodom reverzne transkripcije spregnute s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR) utvrdili da je u tumorskom tkivu dojke znatno veći izražaj receptora IL-17RA/RC i IL-17RA/RB nego u normalnom tkivu dojke što govori u prilog aktivnoj IL-17A i IL-17E signalizaciji u stanicama raka dojke (175).

U preparatima u kojima je nađena *in situ* komponenta većinom je intenzitet bojenja bio jednak intenzitetu bojenja u pridruženoj invazivnoj komponenti. Razlika je nađena u 17 preparata u kojima je većinom jače bojenje bilo zabilježeno u invazivnoj komponenti dok je u samo četiri slučaja jače bojenje zamijećeno u *in situ* komponenti tumora.

Od sedam tumora u kojima nije nađen izražaj IL-17 u invazivnoj komponenti izražaj IL-17 nije nađen niti u *in situ* komponenti niti u peritumorskoj stromi ili okolnom zdravom tkivu dojke. Prema surogatnom biološkom podtipu, od tumora u kojima nije nađen izražaj IL-17 četiri su bila luminalni A fenotipa (3 NST, 1 lobularni), dva luminalni B fenotipa (oba lobularni) i jedan trostruko negativnog fenotipa (NST s medularnim karakteristikama). Od skupine lobularnih tumora čije je tumorsko tkivo bilo dostupno za analizu (N=13), njih 61 % je imalo slab izražaj IL-17 (kategorija 0 ili 1) i u invazivnoj i u *in situ* komponenti, dok se u tim uzorcima i peritumorska stroma i zdravo tkivo nisu bojali (kategorija 0). Da kod lobularnih tumora postoji slabija infiltracija tumorskog tkiva upalnim stanicama primijetili su i Droeler i sur. na velikom broju uzoraka ranog raka dojke (894 duktalna i 164 lobularna). Autori su rabili imunohistokemijsko bojenje na CD4, FOXP3 i IL-17. Među tumor infiltrirajućim limfocitima bilo je više limfocita CD4+ i FOXP3+, dok je IL-17+ stanica bilo značajno manje. Primijetili su da je u uzorcima s lobularnim rakom dojke bila značajno manja infiltracija CD4 + i FOXP3 + stanicama nego u uzorcima s duktalnim rakom dojke i nije bila u korelaciji sa gradusom tumora, izražajem hormonskih receptora i prognozom, dok je u duktalnih tumora zabilježena pozitivna korelacija s većim gradusom tumora i gubitkom hormonskih receptora (176). U istraživanju koje su proveli Desmedt i sur. pokazalo se da u invazivnom lobularnom raku dojke postoji tumorski limfocitni infiltrat, ali je u prosjeku za 21 % manji u odnosu na tumorski limfocitni infiltrat u invazivnom duktalnom raku dojke ( $p < 0.001$ ) (177). S druge strane, postoje i dokazi da je u usporedbi s invazivnim duktalnim rakom dojke, u invazivnom lobularnom raku dojke veća aktivnost gotovo svih tipova imunoloških stanica (178).

## 6.5. ODNOS RAZINE IL-17 U SERUMU I IZRAŽENOSTI IL-17 U TUMORSKOM TKIVU

Analizirajući serumsku razinu IL-17 prije operacije i tijekom adjuvantnog liječenja u odnosu na tkivni izražaj IL-17, nije nađeno statistički značajnih korelacija, niti s tumorskim tkivom i peritumorskom stromom niti sa zdravim tkivom dojke. Da u mikrookolišu raka dojke postoji neujednačena distribucija imunoloških stanica primijetili su Azizi i sur. koji su

koristeći m-RNA tehnike profilirali fenotip 45 000 imunoloških stanica iz 8 uzoraka raka dojke i odgovarajućih uzoraka zdravog tkiva dojke, limfnih čvorova i periferne krvi, stvarajući svojevrstan „imunološki atlas“ mikrookoliša raka dojke. Primijetili su značajne razlike u fenotipu imunoloških stanica ovisno o promatranim tkivnim odjeljcima, tako da su slični klasteri imunoloških stanica nađeni u tumorskom tkivu i okolnom normalnom tkivu dojke, a razlikovali su se od onih u limfnim čvorovima i perifernoj krvi. Ovakav nalaz implicira da biomarkeri koji se temelje na imunološkim stanicama u perifernoj krvi ne moraju nužno odražavati sastav imunoloških stanica u tumorskom mikrookolišu. Azizi i suradnici su tako nagovijestili da unutar tumora, čak i više no u normalnom tkivu dojke, postoji kontinuum prijelaznih stanja unutar određene populacije stanica tzv. fenotipski volumen s različitim omjerima polariziranih stanica različitih imunoloških fenotipova iste stanične loze. Velik broj stanica u različitom stupnju diferencijacije (prvenstveno limfocita T) opovrgava tezu da jednom aktivirane T-stanice prolaze razmjerno brzo kroz nekoliko prijelaznih stanja prema manjem broju diskretnih, konačnih staničnih linija kao što su efektorske ili regulatorne T-stanice (179). Istu fenotipsku raznolikost mijeloidnih i T-staničnih populacija u tumorskom tkivu potvrdili su i Wagner i suradnici analizirajući metodom masene spektrometrije proteomiku 144 uzoraka raka dojke (180).

Za zamijetiti je da u provedenom istraživanju pozitivna limfovaskularna invazija nije značajno korelirala niti sa serumskim razinama niti s tkivnim izražajem IL-17.

Analizirajući izraženost IL-17 u invazivnoj i *in situ* komponenti tumora zamijećena je značajna pozitivna korelacija samo s primjenom kemoterapije. Za razliku od ranije spomenutog istraživanja koje su proveli Chen i sur. (158) nije nađena negativna korelacija intratumorske izraženosti IL-17 s pozitivnošću estrogenskih receptora što bi neizravno upućivalo na povezanost s trostruko negativnim fenotipom kakva je nađena u slučaju mjerenih serumskih vrijednosti IL-17. Izraženost IL-17 u peritumorskoj stromi je negativno korelirala s dobi u trenutku dijagnoze i menopauzom dok je utvrđena pozitivna korelacija s nuklearnim gradusom, indeksom proliferacije Ki-67 i primjenom kemoterapije. U normalnom tkivu dojke je također nađena značajna negativna korelacija između dobi u trenutku dijagnoze i izraženosti IL-17. Kao i u slučaju zabilježene niže predoperativne serumске koncentracije IL-17 u bolesnica starije životne dobi, za zaključiti je da je ovakav rezultat posljedica slabljenja cjelokupnog imunološkog odgovora tijekom prirodnog procesa starenja.

Tijekom ovog istraživanja 11 (9,1 %) bolesnica je imalo povrat bolesti, dok je kod njih šest (5,1 %) zabilježen smrtni ishod. Medijan praćenja bolesnica do recidiva ili smrti bio je

otprilike jednak i iznosio je malo više od pet godina. Brojke odgovaraju procjenama Programa za nadzor, epidemiologiju i krajnje rezultate američkog Nacionalnog instituta za rak prema kojima je petogodišnje preživljenje za rani rak dojke lokaliziran isključivo u dojci 99 %, a kod zahvaćanja okolnih struktura ili limfnih čvorova 86 % (181). Za promatrani period nije nađena značajna povezanost serumske razine IL-17 prije operacije ni tijekom adjuvantnog liječenja s rizikom od povrata bolesti niti od smrtnog ishoda. Iako nije doseglo statističku značajnost, za napomenuti je da u žena koje su nakon operacije za vrijeme adjuvantnog liječenja imale porast serumske koncentracije IL-17 u odnosu na predoperativne vrijednosti nije zabilježen niti jedan smrtni slučaj.

Zaključno, u žena oboljelih od ranog raka dojke značajno je povišena serumska razina IL-17 prije početka liječenja u odnosu na zdravu populaciju i ovisi dominantno o surogatnom podtipu bolesti, a ne o histološkom podtipu tumora ili regionalnoj proširenosti bolesti. Tijekom adjuvantnog liječenja nakon kirurškog odstranjenja tumora dolazi do značajnog pada serumske razine IL-17 koji ipak ostaje povišen u odnosu na zdravu populaciju. Imunohistokemijski utvrđena izraženost IL-17 u tumorskom tkivu dojke i peritumorskoj stromi je značajno veća no u zdravom tkivu dojke, ali ne korelira sa serumskim vrijednostima IL-17 niti prije operacije niti tijekom adjuvantnog liječenja.

## 7. Zaključci

1. U žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke značajno su povišene serumske vrijednosti IL-17 u odnosu na populaciju zdravih žena.
2. U žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke nakon operacije dolazi do značajnog pada serumske razine IL-17 u odnosu na vrijednosti prije operacije.
3. U žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke serumska razina IL-17 nakon operacije tijekom adjuvantnog liječenja značajno je veća od serumske vrijednosti IL-17 u zdravoj populaciji.
4. Imunohistokemijska izraženost IL-17 značajno je veća u tumorskom tkivu ranog invazivnog raka dojke i peritumorskoj stromi nego u okolnom normalnom tkivu dojke.
5. Nema značajne korelacije između izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu, peritumorskoj stromi i normalnom tkivu dojke sa serumskom razinom IL-17 oboljelih od ranog raka dojke predoperativno niti nakon operacije tijekom adjuvantnog liječenja.
6. Razina IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke predoperativno i poslije operacije tijekom adjuvantnog liječenja ovisi o surogatnom biološkom fenotipu raka dojke i značajno je veća u trostruko negativnom raku dojke nego u luminalnom raku dojke.
7. Serumska razina IL-17 prije operacije i tijekom adjuvantnog liječenja oboljelih od ranog invazivnog raka dojke značajno negativno korelira s izražajem estrogenskih receptora.
8. U žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke ne postoji značajna razlika u serumskoj razini IL-17 prije operacije niti poslije operacije tijekom adjuvantnog liječenja s obzirom na status HER-2 receptora.
9. Serumska razina IL-17 u oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prije operacije ne korelira značajno s histološkim tipom tumora, histološkim i nuklearnim gradusom, limfovaskularnom invazijom, proliferacijskim indeksom, veličinom tumora, zahvaćenošću i statusom limfnih čvorova.
10. U žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke serumska razina IL-17 tijekom adjuvantne terapije značajno pozitivno korelira s histološkim gradusom, nuklearnim gradusom i veličinom tumora.

11. Postoji značajna razlika serumske razine IL-17 u žena oboljelih od ranog raka dojke tijekom adjuvantnog liječenja sa pozitivnošću regionalnih limfnih čvorova, neovisno o broju zahvaćenih limfnih čvorova tj. N skupini.
12. Izraženost IL-17 u peritumorskoj stromi ranog invazivnog raka dojke značajno pozitivno korelira s nuklearnim gradusom i proliferacijskim indeksom Ki-67.
13. Izraženost IL-17 u peritumorskoj stromi ranog invazivnog raka dojke i okolnom normalnom tkivu značajno negativno korelira s dobi. Postoji i trend niže predoperativne serumske razine IL-17 u oboljelih od ranog invazivnog raka dojke starije životne dobi.
14. U žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke nema značajnih razlika u serumskoj razini IL-17 niti u izraženosti IL-17 u tumorskom tkivu, peritumorskoj stromi i normalnom tkivu dojke između pojedinih histoloških podtipova raka dojke.
15. U promatranom periodu s medijanom praćenja od pet godina nije uočena značajna povezanost serumske razine IL-17 prije operacije i tijekom adjuvantnog liječenja s povećanim rizikom od povrata bolesti i smrtnog ishoda.

## 8. Sažetak

Interleukin 17 (IL-17) je središnji medijator upale s višestrukom ulogom u nastanku, napredovanju i rezistenciji na terapiju tumora različitih sijela. Pojedine studije govore u prilog antitumorske aktivnosti IL-17 dok je prema drugima nađeno da povećana izraženost IL-17 u tumorskom tkivu dojke doprinosi agresivnosti tumora i lošijoj prognozi. Uloga IL-17 dosad je većinom ispitivana na *in vitro* staničnim modelima i ljudskim ksenograftima. Nedostatak podataka o učincima IL-17 *in vivo* predstavlja nepremostivu prepreku u terapijskom moduliranju IL-17 posredovanih imunoloških reakcija radi uspješnijeg liječenja bolesnika oboljelih od raka. U ovom istraživanju analizirana je koncentracija IL-17 u serumu 118 žena oboljelih od ranog invazivnog raka dojke prije operacije i tijekom adjuvantnog liječenja i uspoređena s koncentracijom IL-17 u serumu kontrolne skupine zdravih žena. Analizirana je razina izraženosti IL-17 u različitim komponentama pridruženih intraoperativnih uzoraka bolesnica uključujući invazivnu i *in situ* komponentu, peritumorsku stromu i normalno tkivo dojke. Utvrđena je značajno viša serumska koncentracija IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog raka dojke prije početka liječenja ( $P < 0,001$ ), ali i nakon kirurškog odstranjenja tumora tijekom adjuvantnog liječenja u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P = 0,001$ ) koja nije značajno korelirala s izražajem IL-17 u tumorskom tkivu. Nađen je statistički značajan pad razine IL-17 u serumu žena oboljelih od ranog raka dojke tijekom adjuvantnog liječenja nakon operacije u odnosu na vrijednosti prije operacije ( $P < 0,001$ ). Razina IL-17 u serumu bolesnica oboljelih od ranog raka dojke značajno je negativno korelirala s izražajem estrogenskih receptora u tumoru. Rezultati govore u prilog tome da je imunološki odgovor u ranom raku dojke, među ostalim, posredovan i stanicama koje luče IL-17, osobito u trostruko negativnom raku dojke. Utvrđeno je da po odstranjenju tumora dolazi do smirivanja upalne reakcije posredovane IL-17, ali se razina IL-17 nakon odstranjenja tumora tijekom adjuvantnog liječenja ne vraća na normalne vrijednosti već ostaje povišena u odnosu na vrijednosti u zdravoj populaciji.



## 9. Summary

### IL-17 in early invasive breast cancer

*Marina Popović, 2022.*

Interleukin 17 (IL-17) has a key role in inflammatory responses. Increased levels of IL-17 have been reported in the serum of cancer patients. Some studies suggest antitumor activity of IL-17 and others speak in favor of its association with poorer prognosis. The lack of data on IL-17 behavior *in vivo* precludes the usage of IL-17 antibodies in cancer patients. This study included 118 patients with early invasive breast cancer. The serum concentration of IL-17 was measured before surgery and during adjuvant treatment and compared with healthy controls. The level of IL-17 expression in the corresponding tumor tissue samples was analyzed. Significantly higher serum concentrations of IL-17 were found in the serum of women with early breast cancer before treatment and during adjuvant treatment without correlation to tumor tissue IL-17 expression. There was a significant decrease in serum IL-17 levels in women with early breast cancer after surgery compared to preoperative values. Serum IL-17 levels were significantly negatively correlated with tumor estrogen receptor expression. The results suggest that the immune response in early breast cancer is mediated also by IL-17, particularly in triple-negative breast cancer. IL-17-mediated inflammatory response subsided after tumor removal, but IL-17 levels remained elevated compared to healthy controls.

## 10. Popis literature

1. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S i sur. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020;77(2):181–5.
2. Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Veltruski J, Glibo M, Stavinoha M i sur. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. Hrv zavod za javno Zdr. 2020;Bilten 42(42).
3. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M i sur. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*. 2018;391(10125):1023–75.
4. Breast Cancer Prevention (PDQ®), Health Professional Version [Internet]. Published online: April 29, 2020.tle. [citirano 08. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65884/>
5. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P i sur. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2019;5(1):66.
6. Genetics of Breast and Gynecologic Cancers (PDQ®) Health Professional Version [Internet]. Published online: March 6, 2020. [citirano 02. rujan 2020.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65767/>
7. National Center for Biotechnology Information. ClinVar. [Internet]. [citirano 03. rujan 2020.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>
8. Angeli D, Salvi S, Tedaldi G. Genetic predisposition to breast and ovarian cancers: How many and which genes to test? *Int J Mol Sci*. 2020;21(3).
9. Tung NM, Boughey JC, Pierce LJ, Robson ME, Bedrosian I, Dietz JR i sur. Management of Hereditary Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology, American Society for Radiation Oncology, and Society of Surgical Oncology Guideline. *J Clin Oncol*. 2020;JCO.20.00299.
10. Samadder NJ, Giridhar K V., Baffy N, Riegert-Johnson D, Couch FJ. Hereditary Cancer Syndromes—A Primer on Diagnosis and Management. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(6):1084–98.

11. NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Genetic/Familial High Risk Assessment: Breast, Ovarian and Pancreatic. Version 1.2022—August 11, 2021 [Internet]. [citirano 01. listopada 2020.]. Dostupno na: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_bop.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf)
12. Armaroli P, Riggi E, Basu P, Anttila A, Ponti A, Carvalho AL i sur. Performance indicators in breast cancer screening in the European Union: A comparison across countries of screen positivity and detection rates. *Int J Cancer*. 2020.;147(7):1855–63.
13. Cardoso F, Spence D, Mertz S, Corneliussen-James D, Sabelko K, Gralow J i sur. Global analysis of advanced/metastatic breast cancer: Decade report (2005–2015). *Breast*. 2018;39:131–8.
14. HZJZ-Nacionalni program za rano otkrivanje raka dojke [Internet]. [citirano 09. rujana 2020.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/nacionalni-program-ranog-otkrivanja-raka-dojke/>
15. Pashayan N, Morris S, Gilbert FJ, Pharoah PDP. Cost-effectiveness and Benefit-to-Harm Ratio of Risk-Stratified Screening for Breast Cancer A Life-Table Model. *JAMA Oncol*. 2018;4(11):1504–10.
16. Marmot M, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *Lancet*. 2012;380(9855):1778–86.
17. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT i sur. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194–220.
18. Chong A, Weinstein SP, McDonald ES, Conant EF. Digital breast tomosynthesis: Concepts and clinical practice. *Radiology*. 2019;292(1):1–14.
19. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ i sur. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(4):290–303.
20. van Seijen M, Lips EH, Thompson AM, Nik-Zainal S, Futreal A, Hwang ES i sur. Ductal carcinoma in situ: to treat or not to treat, that is the question. *Br J Cancer*. 2019;121(4):285–92.

21. Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020, American Cancer Society [Internet]. [citirano 09. rujan 2020.]. Dostupno na:  
<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf>
22. Worni M, Akushevich I, Greenup R, Sarma D, Ryser MD, Myers ER i sur. Trends in Treatment Patterns and Outcomes for Ductal Carcinoma In Situ. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(12):djv263.
23. Ryser MD, Worni M, Turner EL, Marks JR, Durrett R, Hwang ES. Outcomes of Active Surveillance for Ductal Carcinoma in Situ: A Computational Risk Analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(5):1–8.
24. Sinn HP, Kreipe H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care.* 2013;8(2):149–54.
25. Rakha E. Breast Pathology News, WHO Update [Internet]. [citirano 08. rujan 2020.]. Dostupno na:  
<https://www.sgh.com.sg/patient-care/specialties-services/Pathology/Documents/Breast-Course/2019 BPC/Lectures/1. WHO update update Emads talk.pdf>
26. New breast cancer classification: traditional pathology and molecular subtypes [Internet]. 2020 [citirano 08. lipanj 2020.]. Dostupno na:  
<https://oncologypro.esmo.org/content/download/281956/5572021/1>
27. Wang W, Zhu W, Du F, Luo Y, Xu B. The Demographic Features, Clinicopathological Characteristics and Cancer-specific Outcomes for Patients with Microinvasive Breast Cancer: A SEER Database Analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):42045.
28. Orzalesi L, Casella D, Criscenti V, Gjondedaj U, Bianchi S, Vezzosi V i sur. Microinvasive breast cancer: pathological parameters, cancer subtypes distribution, and correlation with axillary lymph nodes invasion. Results of a large single-institution series. *Breast Cancer.* 2016;23(4):640–8.
29. Thomas M, Kelly ED, Abraham J, Kruse M. Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. *Semin Oncol.* 2019;46(2):121–32.

30. Desmedt C, Zoppoli G, Gundem G, Pruneri G, Larsimont D, Fornili M i sur. Genomic Characterization of Primary Invasive Lobular Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(16):1872–80.
31. Rakha EA, Lee AHS, Evans AJ, Menon S, Assad NY, Hodi Z i sur. Tubular carcinoma of the breast: Further evidence to support its excellent prognosis. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):99–104.
32. Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. *Oncologist.* 2014;19(8):805–13.
33. Marrazzo E, Frusone F, Milana F, Sagona A, Gatzemeier W, Barbieri E i sur. Mucinous breast cancer: A narrative review of the literature and a retrospective tertiary single-centre analysis. *The Breast.* 2020;49:87–92.
34. Kong J, Wang H, Zhang Q, Lin Z, Guan H. Primary mucinous cystadenocarcinoma of the breast coexisting with invasive ductal carcinoma: A case report and review of the literature. *Int J Clin Exp Med.* 2017;10(4):7256–60.
35. Koufopoulos N, Goudeli C, Syrios J, Filopoulos E, Khaldi L. Mucinous cystadenocarcinoma of the breast: The challenge of diagnosing a rare entity. *Rare Tumors.* 2017;9(3):98–100.
36. Natrajan R, Wilkerson PM, Marchiò C, Piscuoglio S, Ng CKY, Wai P i sur. Characterization of the genomic features and expressed fusion genes in micropapillary carcinomas of the breast. *J Pathol.* 2014;232(5):553–65.
37. Lewis GD, Xing Y, Haque W, Patel T, Schwartz MR, Chen AC i sur. The impact of molecular status on survival outcomes for invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Breast J.* 2019;25(6):1171–6.
38. Ye F, Yu P, Li N, Yang A, Xie X, Tang H i sur. Prognosis of invasive micropapillary carcinoma compared with invasive ductal carcinoma in breast: A meta-analysis of PSM studies. *Breast.* 2020;51:11–20.
39. D’Arcy C, Quinn CM. Apocrine lesions of the breast: Part 2 of a two-part review. Invasive apocrine carcinoma, the molecular apocrine signature and utility of immunohistochemistry in the diagnosis of apocrine lesions of the breast. *J Clin Pathol.* 2019;72(1):7–11.

40. Bonnefoi H, MacGrogan G, Poncet C, Iggo R, Pommeret F, Grellety T i sur. Molecular apocrine tumours in EORTC 10994/BIG 1-00 phase III study: pathological response after neoadjuvant chemotherapy and clinical outcomes. *Br J Cancer*. 2019;120(9):913–21.
41. Budzik MP, Patera J, Sobol M, Czerw AI, Deptała A, Badowska-Kozakiewicz AM. Clinicopathological characteristics of metaplastic breast cancer – analysis of the basic immunohistochemical profile and comparison with other invasive breast cancer types. *Breast*. 2019;43:135–41.
42. Dieci MV, Smutná V, Scott V, Yin G, Xu R, Vielh P i sur. Whole exome sequencing of rare aggressive breast cancer histologies. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;156(1):21–32.
43. Conlon N, Sadri N, Corben AD, Tan LK. Acinic cell carcinoma of breast: morphologic and immunohistochemical review of a rare breast cancer subtype. *Hum Pathol*. 2016;51:16–24.
44. Fusco N, Geyer FC, De Filippo MR, Martelotto LG, Ng CKY, Piscuoglio S i sur. Genetic events in the progression of adenoid cystic carcinoma of the breast to high-grade triple-negative breast cancer. *Mod Pathol*. 2016;29(11):1292–305.
45. Ng CKY, Schultheis AM, Bidard FC, Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast cancer genomics from microarrays to massively parallel sequencing: Paradigms and new insights. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(5):5–8.
46. Yan M, Gilmore H, Harbhajanka A. Mucoepidermoid Carcinoma of the Breast With MAML2 Rearrangement: A Case Report and Literature Review. *Int J Surg Pathol*. 2020;28(7):787–92.
47. Reyes C, Jorda M, Gomez-ferna C. Salivary Gland – like Tumors of the Breast Express. 2013;21(4):283–6.
48. Trihia HJ, Valavanis C, Novkovic N, Koutsodontis G, Petraki M, Efstathiou E. Polymorphous adenocarcinoma of the breast – an exceptionally rare entity: Clinicopathological description of a case and brief review. *Breast J*. 2020;26(2):261–4.
49. Haefliger S, Muenst S, Went P, Bihl M, Dellas S, Weber WP i sur. Tall cell carcinoma of the breast with reversed polarity (TCCRP) with mutations in the IDH2 and PIK3CA genes: a case report. *Mol Biol Rep*. 2020;47(6):4917–21.

50. Pareja F, D'Alfonso TM. Neuroendocrine neoplasms of the breast: A review focused on the updated World Health Organization (WHO) 5th Edition morphologic classification. *Breast J.* 07. 2020;26(6):1160–7.
51. Piscuoglio S, Ng CKY, Martelotto LG, Eberle CA, Cowell CF, Natrajan R i sur. Integrative genomic and transcriptomic characterization of papillary carcinomas of the breast. *Mol Oncol.* 2014;8(8):1588–602.
52. Rakha EA, Ellis IO. Diagnostic challenges in papillary lesions of the breast. *Pathology.* 2018;50(1):100–10.
53. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA i sur. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747–52.
54. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H i sur. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(19):10869–74.
55. Rakha EA, Pareja FG. New Advances in Molecular Breast Cancer Pathology. *Semin Cancer Biol.* 2021;72(December 2019):102–13.
56. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y i sur. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. Sapino A, urednik. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157368.
57. Sweeney C, Bernard PS, Factor RE, Kwan ML, Habel LA, Quesenberry CP i sur. Intrinsic Subtypes from PAM50 Gene Expression Assay in a Population-Based Breast Cancer Cohort: Differences by Age, Race, and Tumor Characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(5):714–24.
58. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(1):27–35.
59. Fougner C, Bergholtz H, Norum JH, Sørlie T. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun.* 2020;11(1):1787.
60. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B i sur. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206–23.

61. Daemen A, Manning G. HER2 is not a cancer subtype but rather a pan-cancer event and is highly enriched in AR-driven breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2018;20(1):8.
62. Prat A, Pascual T, De Angelis C, Gutierrez C, Llombart-Cussac A, Wang T i sur. HER2-Enriched Subtype and ERBB2 Expression in HER2-Positive Breast Cancer Treated with Dual HER2 Blockade. *J Natl Cancer Inst.* 2020;112(1):46–54.
63. Cejalvo JM, Pascual T, Fernández-Martínez A, Brasó-Maristany F, Gomis RR, Perou CM i sur. Clinical implications of the non-luminalni intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2018;67:63–70.
64. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL i sur. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2020;38(12):1346–66.
65. Srihari S, Kalimutho M, Lal S, Singla J, Patel D, Simpson PT i sur. Understanding the functional impact of copy number alterations in breast cancer using a network modeling approach. *Mol Biosyst.* 2016;12(3):963–72.
66. Brown A-L, Li M, Goncarenco A, Panchenko AR. Finding driver mutations in cancer: Elucidating the role of background mutational processes. Nussinov R, urednik. *PLOS Comput Biol.* 2019;15(4):e1006981.
67. ELSTON CW, ELLIS IO. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403–10.
68. Bloom HJG, Richardson WW. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer. *Br J Cancer.* 1957;11(3):359–77.
69. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z i sur. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3153–8.
70. Breast Cancer Staging System: AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition [Internet]. [citirano 09. kolovoz 2020.]. Dostupno na: [https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC Breast Cancer Staging System.pdf](https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%20Breast%20Cancer%20Staging%20System.pdf)



71. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S i sur. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(7).
72. Brackstone M, Baldassarre FG, Perera FE, Cil T, Chavez Mac Gregor M, Dayes IS i sur. Management of the Axilla in Early-Stage Breast Cancer: Ontario Health (Cancer Care Ontario) and ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 2021;39(27):3056–82.
73. AJCC Cancer Staging Manual, Eight Edition, Breast [Internet]. [citirano 09. lipanj 2020.]. Dostupno na:  
[https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC Breast Cancer Staging System.pdf](https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%20Breast%20Cancer%20Staging%20System.pdf)
74. National Cancer Institution. The website of the National Cancer Institute [Internet]. 2015 [citirano 12. listopad 2020.]. Dostupno na: <http://www.cancer.gov>
75. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P i sur. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol.* 2019;30(10):1541–57.
76. Breast Cancer, Version 8.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [Internet]. Dostupno na:  
[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf)
77. Recurrent breast cancer, Mayo Clinic [Internet]. [citirano 10. rujanj 2020.]. Dostupno na:  
<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/recurrent-breast-cancer/symptoms-causes/syc-20377135>
78. The website of the National Cancer Institute (<https://www.cancer.gov>) [Internet]. [citirano 10. rujanj 2020.]. Dostupno na:  
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html>
79. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001;357(9270):1777–89.

80. McDonald DR, Levy O. Innate Immunity. U: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, urednici. *Clinical Immunology* [Internet]. Fifth Edit. London: Elsevier; 2019 str. 39-53.e1. Dostupno na:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978070206896600003X>
81. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805–20.
82. Zhang P, Liu X, Cao X. Extracellular pattern recognition molecules in health and diseases. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(3):255–7.
83. Moticka EJ. Hallmarks of the Adaptive Immune Responses. U: Moticka EJ, urednik. *A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology*. Amsterdam: Elsevier; 2016 str. 9–19.
84. Nature Research [Internet]. [citirano 10. kolovoz 2020.]. Dostupno na:  
<https://www.nature.com/subjects/antigen-presenting-cells>
85. Evavold CL, Kagan JC. How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. *J Mol Biol*. 2018;430(2):217–37.
86. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol*. 2013;31(1):443–73.
87. Nurieva RI, Chung Y. Understanding the development and function of T follicular helper cells. *Cell Mol Immunol*. 2010;7(3):190–7.
88. Eagar TN, Miller SD. Helper T-Cell Subsets and Control of the Inflammatory Response. U: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, urednici. *Clinical Immunology*. Fifth Edit. London: Elsevier; 2019 str. 235-245.e1.
89. St. Paul M, Ohashi PS. The Roles of CD8+ T Cell Subsets in Antitumor Immunity. *Trends Cell Biol*. 2020;30(9):695–704.
90. British Society for Immunology- T-cell activation [Internet]. [citirano 03. listopad 2020.]. Dostupno na:  
<https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/t-cell-activation>

91. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(4):227–42.
92. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell.* 2019;177(3):524–40.
93. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC i sur. The Transcription Factors T-bet and Eomes Control Key Checkpoints of Natural Killer Cell Maturation. *Immunity.* 2012;36(1):55–67.
94. Crinier A, Vivier E, Bléry M. Helper-like innate lymphoid cells and cancer immunotherapy. *Semin Immunol.* 2019;41(April):101274.
95. Zhong C, Zheng M, Zhu J. Lymphoid tissue inducer—A divergent member of the ILC family. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;42:5–12.
96. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010.;125(2):S33–40.
97. Lu Y, Wang Q, Xue G, Bi E, Ma X, Wang A i sur. Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell.* 2018;33(6):1048-1060.e7.
98. Siemann DW. Tumor Microenvironment [Internet]. Volume 180. Lee PP, Marincola FM, urednici. *Tumor Microenvironment.* Cham: Springer International Publishing; 2020 (Cancer Treatment and Research; sv. 180). Dostupno na: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-38862-1>
99. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. *Nature.* 2017;541(7637):321–30.
100. Maleki Vareki S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):157.
101. Turan T, Kannan D, Patel M, Matthew Barnes J, Tanlimco SG, Lu R i sur. Immune oncology, immune responsiveness and the theory of everything. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):50.
102. Hegde PS, Chen DS. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity.* 2020;52(1):17–35.

103. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(3):133–50.
104. Wang E, Worschech A, Marincola FM. The immunologic constant of rejection. *Trends Immunol*. 2008;29(6):256–62.
105. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR i sur. IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017;127(8):2930–40.
106. Karn T, Denkert C, Weber KE, Holtrich U, Hanusch C, Sinn BV i sur. Tumor mutational burden and immune infiltration as independent predictors of response to neoadjuvant immune checkpoint inhibition in early TNBC in GeparNuevo. *Ann Oncol*. 2020;31(9):1216–22.
107. Chang RB, Beatty GL. The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *J Leukoc Biol*. 2020;108(1):363–76.
108. Pardoll D. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Semin Oncol*. 2015;42(4):523–38.
109. Spranger S, Gajewski TF. Mechanisms of Tumor Cell–Intrinsic Immune Evasion. *Annu Rev Cancer Biol*. 2018;2(1):213–28.
110. Ortega MA, Fraile-Martínez O, Asúnsolo Á, Buján J, García-Honduvilla N, Coca S. Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. *J Oncol*. 2020;2020:1–11.
111. Zhang W, Huang Q, Xiao W, Zhao Y, Pi J, Xu H i sur. Advances in Anti-Tumor Treatments Targeting the CD47/SIRP $\alpha$  Axis. *Front Immunol*. 2020.;11(January):1–15.
112. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727–42.
113. Facchinetti F, Bluthgen MV, Tergemina-Clain G, Faivre L, Pignon J-P, Planchard D i sur. LKB1/STK11 mutations in non-small cell lung cancer patients: Descriptive analysis and prognostic value. *Lung Cancer*. 2017;112:62–8.

114. Baumann T, Dunkel A, Schmid C, Schmitt S, Hiltensperger M, Lohr K i sur. Regulatory myeloid cells paralyze T cells through cell–cell transfer of the metabolite methylglyoxal. *Nat Immunol.* 2020;21(5):555–66.
115. Munn DH, Bronte V. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2016;39:1–6.
116. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):556–67.
117. Amatya N, Garg A V., Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 2017;38(5):310–22.
118. Li X, Bechara R, Zhao J, McGeachy MJ, Gaffen SL. IL-17 receptor–based signaling and implications for disease. *Nat Immunol.* 2019;20(12):1594–602.
119. Ruiz de Morales JMG, Puig L, Daudén E, Cañete JD, Pablos JL, Martín AO i sur. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmun Rev.* 2020;19(1):102429.
120. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity.* 2019;50(4):892–906.
121. Brevi A, Cogrossi LL, Grazia G, Masciovecchio D, Impellizzieri D, Lacanfora L i sur. Much More Than IL-17A: Cytokines of the IL-17 Family Between Microbiota and Cancer. *Front Immunol.* 2020;11.
122. Tang C, Chen S, Qian H, Huang W. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology.* 2012;135(2):112–24.
123. Reis J, Vender R, Torres T. Bimekizumab: The First Dual Inhibitor of Interleukin (IL)-17A and IL-17F for the Treatment of Psoriatic Disease and Ankylosing Spondylitis. *BioDrugs.* 2019;33(4):391–9.
124. Benschop RJ, Chow C-K, Tian Y, Nelson J, Barmettler B, Atwell S i sur. Development of tibatuzumab, a tetravalent bispecific antibody targeting BAFF and IL-17A for the treatment of autoimmune disease. *MAbs.* 2019;11(6):1175–90.
125. Lyman M, Lieu V, Richardson R, Timmer A, Stewart C, Granger S i sur. A bispecific antibody that targets IL-6 receptor and IL-17A for the potential therapy of patients with autoimmune and inflammatory diseases. *J Biol Chem.* 2018;293(24):9326–34.

126. Vitiello GA, Miller G. Targeting the interleukin-17 immune axis for cancer immunotherapy. *J Exp Med.* 2020;217(1):1–11.
127. Guéry L, Hugues S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–11.
128. Ye J, Su X, Hsueh EC, Zhang Y, Koenig JM, Hoft DF i sur. Human tumor-infiltrating Th17 cells have the capacity to differentiate into IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> T cells with potent suppressive function. *Eur J Immunol.* 2011;41(4):936–51.
129. Yazdanifar M, Barbarito G, Bertaina A, Airoidi I.  $\gamma\delta$  T Cells: The Ideal Tool for Cancer Immunotherapy. *Cells.* 2020;9(5):1305.
130. Paul S, Singh AK, Shilpi, Lal G. Phenotypic and functional plasticity of gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells in inflammation and tolerance. *Int Rev Immunol.* 2014;33(6):537-58.
131. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang T-H i sur. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity.* 2018;48(4):812-830.e14.
132. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860–7.
133. Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, Baumgartner RN, Neuhaus ML, Wener MH i sur. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009;27(21):3437–44.
134. Kinoshita T, Goto T. Links between Inflammation and Postoperative Cancer Recurrence. *J Clin Med.* 2021;10(2):228.
135. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2007;9(4):212.
136. Chimal-Ramírez GK, Espinoza-Sánchez NA, Fuentes-Pananá EM. Protumor Activities of the Immune Response: Insights in the Mechanisms of Immunological Shift, Oncotraining, and Oncopromotion. Vincenzi B, urednik. *J Oncol.* 2013;2013:1–16.
137. Zhao J, Chen X, Herjan T, Li X. The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *J Exp Med.* 2020;217(1).
138. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(10):763–76.

139. Beringer A, Miossec P. Systemic effects of IL-17 in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(8):491–501.
140. Havrdová E, Belova A, Goloborodko A, Tisserant A, Wright A, Wallstroem E i sur. Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J Neurol.* 2016;263(7):1287–95.
141. Lai Y, Dong C. Therapeutic antibodies that target inflammatory cytokines in autoimmune diseases. *Int Immunol.* 2016;28(4):181–8.
142. Taams LS. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: Trials and tribulations. *J Exp Med.* 2020;217(3).
143. Punt S, Langenhoff JM, Putter H, Fleuren GJ, Gorter A, Jordanova ES. The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review. *Oncoimmunology.* 2015;4(2):e984547.
144. Yang L, Qi Y, Hu J, Tang L, Zhao S, Shan B. Expression of Th17 Cells in Breast Cancer Tissue and Its Association with Clinical Parameters. *Cell Biochem Biophys.* 2012;62(1):153–9.
145. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. *J Immunol.* 2009;183(7):4169–75.
146. Borj M, Andalib A, Mohammadi A, Hoseiniharouni S, Pourghadamyari H, Azizi H i sur. Evaluation of IL-4, IL-17, and IFN- $\gamma$  Levels in Patients With Breast Cancer. *Int J Basic Sci Med.* 2017;2:20–4.
147. Lv Z, Liu M, Shen J, Xiang D, Ma Y, Ji Y. Association of serum interleukin-10, interleukin-17A and transforming growth factor- $\alpha$  levels with human benign and malignant breast diseases. *Exp Ther Med [Internet].* 30. travanj 2018.; Dostupno na: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.6109>
148. Giannakeas V. Single Hormone Receptor–Positive Breast Cancer—Signal or Noise? *JAMA Netw Open [Internet].* 03. siječanj 2020.;3(1):e1918176–e1918176. Dostupno na: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.18176>
149. Kaur RP, Vasudeva K, Singla H, Benipal RPS, Khetarpal P, Munshi A. Analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine gene variants and serum cytokine levels as prognostic markers in breast cancer. *J Cell Physiol.* 2018;233(12):9716–23.

150. Welte T, Zhang XHF. Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:1–6.
151. Ma Y-F, Chen C, Li D, Liu M, Lv Z-W, Ji Y i sur. Targeting of interleukin (IL)-17A inhibits PDL1 expression in tumor cells and induces anticancer immunity in an estrogen receptor-negative murine model of breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8(5):7614–24.
152. Shuai C, Yang X, Pan H, Han W. Estrogen Receptor Downregulates Expression of PD-1/PD-L1 and Infiltration of CD8(+) T Cells by Inhibiting IL-17 Signaling Transduction in Breast Cancer. *Front Oncol.* 2020;10:582863.
153. Tevaarwerk AJ, Wisinski KB, O'Regan RM. Endocrine therapy in premenopausal hormone receptor-positive breast cancer. *J Oncol Pract.* 2016;12(11):1148–56.
154. FDA approves pembrolizumab for high-risk early-stage triple-negative breast cancer [Internet]. [citirano 09. siječanj 2022.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-pembrolizumab-high-risk-early-stage-triple-negative-breast-cancer>
155. Chiu J-H, Tseng L-M, Huang T-T, Liu C-Y, Wang J-Y, Huang C-P i sur. MEGF11 is related to tumour recurrence in triple negative breast cancer via chemokine upregulation. *Sci Rep.* 2020;10(1):8060.
156. Tsai Y-F, Huang C-C, Lin Y-S, Hsu C-Y, Huang C-P, Liu C-Y i sur. Interleukin 17A promotes cell migration, enhances anoikis resistance, and creates a microenvironment suitable for triple negative breast cancer tumor metastasis. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70(8):2339–51.
157. Vyas D, Laput G, Vyas AK. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *Onco Targets Ther.* 2014;7:1015–23.
158. Chen W-C, Lai Y-H, Chen H-Y, Guo H-R, Su I-J, Chen HHW. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology.* 2013;63(2):225–33.
159. Horlock C, Stott B, Dyson PJ, Morishita M, Coombes RC, Savage P i sur. The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2009;100(7):1061–7.



160. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau C-S i sur. IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015;522(7556):345–8.
161. Karin N. Autoantibodies to Chemokines and Cytokines Participate in the Regulation of Cancer and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2018;9.
162. Pruneri G, Vingiani A, Bagnardi V, Rotmensz N, De Rose A, Palazzo A i sur. Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(2):249–56.
163. Walker R, Poleszczuk J, Pilon-Thomas S, Kim S, Anderson AARA, Czerniecki BJ i sur. Immune interconnectivity of anatomically distant tumors as a potential mediator of systemic responses to local therapy. *Sci Rep*. 2018;8(1):9474.
164. Poleszczuk J, Luddy K, Chen L, Lee JK, Harrison LB, Czerniecki BJ i sur. Neoadjuvant radiotherapy of early-stage breast cancer and long-term disease-free survival. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):75.
165. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J i sur. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(9):810–21.
166. Rozenblit M, Huang R, Danziger N, Hegde P, Alexander B, Ramkissoon S i sur. Comparison of PD-L1 protein expression between primary tumors and metastatic lesions in triple negative breast cancers. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):1–5.
167. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H i sur. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(22):2108–21.
168. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM i sur. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet*. 2020;396(10265):1817–28.
169. Llosa NJ, Lubber B, Tam AJ, Smith KN, Siegel N, Awan AH i sur. Intratumoral Adaptive Immunosuppression and Type 17 Immunity in Mismatch Repair Proficient Colorectal Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019;25(17):5250–9.

170. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets T V. i sur. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* (80- ). 2018;359(6371):97–103.
171. Nagaoka K, Shirai M, Taniguchi K, Hosoi A, Sun C, Kobayashi Y i sur. Deep immunophenotyping at the single-cell level identifies a combination of anti-IL-17 and checkpoint blockade as an effective treatment in a preclinical model of data-guided personalized immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):e001358.
172. Dadaglio G, Fayolle C, Oberkamp M, Tang A, Rudilla F, Couillin I i sur. IL-17 suppresses the therapeutic activity of cancer vaccines through the inhibition of CD8 + T-cell responses. *Oncoimmunology*. 2020;9(1).
173. Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(11):887–99.
174. Villaseñor A, Flatt SW, Marinac C, Natarajan L, Pierce JP, Patterson RE. Postdiagnosis C-Reactive Protein and Breast Cancer Survivorship: Findings from the WHEL Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(1):189–99.
175. Mombelli S, Cochaud S, Merrouche Y, Garbar C, Antonicelli F, Laprevotte E i sur. IL-17A and its homologs IL-25/IL-17E recruit the c-RAF/S6 kinase pathway and the generation of pro-oncogenic LMW-E in breast cancer cells. *Sci Rep*. 2015;5(1):11874.
176. Drosier R, Zlobec I, Kilic E, Güth U, Heberer M, Spagnoli G i sur. Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers. *BMC Cancer*. 2012;12(1):134.
177. Desmedt C, Salgado R, Fornili M, Pruneri G, Van den Eynden G, Zoppoli G i sur. Immune Infiltration in Invasive Lobular Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2018;110(7):768–76.
178. Du T, Zhu L, Levine KM, Tasdemir N, Lee A V., Vignali DAA i sur. Invasive lobular and ductal breast carcinoma differ in immune response, protein translation efficiency and metabolism. *Sci Rep*. 2018;8(1):7205.
179. Azizi E, Carr AJ, Plitas G, Cornish AE, Konopacki C, Prabhakaran S i sur. Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell*. 2018;174(5):1293-1308.e36.

180. Wagner J, Rapsomaniki MA, Chevrier S, Anzeneder T, Langwieder C, Dykgers A i sur. A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer. *Cell*. 2019.177(5):1330-1345.e18.
181. American Cancer Society. Survival Rates for Breast Cancer [Internet]. [citirano 01. ožujak 2022.]. Dostupno na:  
<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>

## 11. Životopis

Rođena sam 4. studenog 1983. u Zagrebu gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Nakon položene mature u VII. gimnaziji 2002., upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem sam diplomirala 2008. Obavezni pripravnički staž sam odradila u Psihijatrijskoj bolnici Vrapče 2009. i iste godine položila državni ispit. Tijekom 2010. i 2011. sam radila kao liječnik hitne medicine u Ustanovi za hitnu medicinsku pomoć Zagreb. Od 2011. do 2013. sam bila zaposlena kao liječnik u Poliklinici Maja i Krešimir Čavka za radiologiju i internu medicinu. Istovremeno sam započela specijalizaciju iz opće interne medicine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb za potrebe poliklinike. Od srpnja 2013. sam zaposlena kao liječnik u Kliničkom bolničkom centru Zagreb gdje sam započela specijalizaciju iz internističke onkologije. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2013. sam upisala znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“. Specijalistički ispit iz internističke onkologije sam položila 2019. Članica sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za internističku onkologiju i Europskog društva za internističku onkologiju (ESMO, engl. *European Society for Medical Oncology*).