

Izraženost i prognostičko značenje PD-L1 u HER2 pozitivnim karcinomima dojke

Perić Balja, Melita

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:228555>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Melita Perić Balja

**Izraženost i prognostičko značenje
PD-L1 u HER2 pozitivnim karcinomima
dojke**

DISERTACIJA



Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Melita Perić Balja

**Izraženost i prognostičko značenje
PD-L1 u HER2 pozitivnim karcinomima
dojke**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena na Odjelu za onkološku patologiju i kliničku citologiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice

Voditelj rada: izv. prof. dr.sc. Davor Tomas, dr. med., spec. patološke anatomije

Zahvaljujem mentoru na poticaju, strpljenju i podršci tijekom izrade i pisanja ove disertacije.

Zahvaljujem predstojniku Zavoda prof.dr.sc. Boži Krušlinu što nije gubio vjeru u mene, čak i kad je sama nisam imala.

Zahvaljujem djelatnicima Odjela za onkološku patologiju na pomoći oko tehničke izvedbe, a posebno dragoj prijateljici dr.sc. Snježani Ramić na savjetima i pomoći oko statističke obrade podataka.

Najviše zahvaljujem svome suprugu i djeci na razumijevanju, podršci i strpljenju tijekom pisanja ove disertacije.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Anatomija dojke.....	1
1.2. Tumori dojke.....	3
1.2.1. Karcinomi dojke	4
1.3. Imunološki odgovor na tumore.....	45
1.3.1. PD-1/PD-L1 mehanizam	49
2. HIPOTEZA	53
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	54
4. MATERIJALI I METODE	55
4.1. Bolesnice.....	55
4.2. Metode	56
4.2.1. Imunohistokemijsko bojenje.....	56
4.2.2. Analiza imunohistokemijske reakcije.....	57
4.3. Statistička analiza	58
5. REZULTATI.....	59
5.1. Karakteristike karcinoma dojke uključenih u istraživanje.....	59
5.2. Karakteristike karcinoma dojke prema imunofenotipu	62
5.3. Karakteristike karcinoma dojke prema statusu PD-L1	66
5.3.1. Imunohistokemijska izraženost PD-L1	66

5.3.1. Kliničko-patološke razlike prema izraženosti PD-L1	68
5.4. Progresija bolesti.....	74
6. RASPRAVA	83
7. ZAKLJUČCI.....	95
8. KRATKI SADRŽAJ	96
9. SUMMARY	97
10. LITERATURA	98
11. ŽIVOTOPIS.....	117

POPIS KRATICA

AJCC	američka združena komisija za rak (engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
AKT1	serin-treonin specifična protein kinaza B (engl. <i>Akt1 serine/threonine kinase</i>)
BRCA 1 i 2	tumor supresor geni koji sudjeluju u popravku DNA homolognom rekombinacijom (engl. <i>Breast cancer gen 1 i 2</i>)
CDH 1	gen za E-kadherin, proteini odgovoran za povezivanje stanica (engl. <i>Cadherin</i>)
CT	računalna tomografija (engl. <i>computerized tomography</i>), slikovna radiološka metoda koja omogućava slojevit prikaz tijela
DCIS	karcinom ograničen unutar kanalića dojke (lat. <i>in situ</i>), intraduktalni karcinom (ductal carcinoma <i>in situ</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EMA	Europska agencija za lijekove (engl. <i>European medicines Agency</i>)
ER	receptor za estrogen
ERBB2	gen koji nosi sekvencu za tirozin-kinazni receptor 2 za epidermalne čimbenike rasta (engl. <i>Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2</i>)
FDA	agencija za promicanje i zaštitu zdravlja u SAD (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
HER2	transmembranski receptor 2 za humani epidermalni čimbenik rasta (engl. <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HR, RR	mjere omjera izgleda i relativnog rizika korišteni u statistici (engl. <i>hazard risk, relative risk</i>)
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo

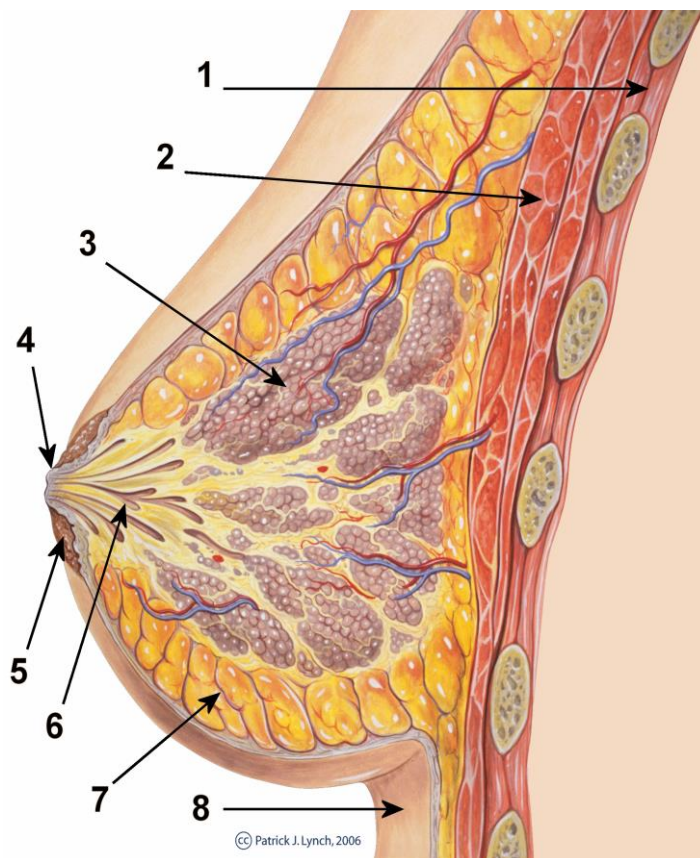
IARC	međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IHC	metoda imunohistokemijskog bojenja (engl. <i>immunohistochemistry</i>)
Ki67	nehistonski protein aktivan u staničnom ciklusu, biljeg proliferacije
LCIS	rak dojke ograničen unutar lobula dojke (lat. <i>in situ</i>), intralobularni karcinom (lat. <i>lobular carcinoma in situ</i>)
LČ	limfni čvor (ovi)
MMG	mamografija
MAPK/ERK	protein-kinaza aktivirana mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>) znana i kao ERK (engl. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>) čiji signalni put MAPK/ERK/Akt sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa
MR	metoda dijagnostike upotrebom magnetske rezonance
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSI	mikrosatelitne nestabilnosti (engl. <i>microsatellite instability</i>)
mTOR	protein inhibiran rapamicinom (engl. <i>mammalian/mechanistic Target Of Rapamycin</i>)
NAT	neoadjuvantna kemoterapija, liječenje onkološke bolesti koje se provodi prije operativnog zahvata,
NCCN	neprofitno udruženje stručnjaka SAD-a koji utvrđuju preporuke u kliničkoj onkološkoj praksi (engl. <i>National Comprehensive Cancer Network</i>)
NST	najčešći histološki tip invazivnog karcinoma dojke, nespecificirani karcinom dojke (engl. <i>no specific type</i>), prije zvan duktalni invazivni karcinom
pCR	kompletan patološki odgovor (engl. <i>pathologic complete response</i>)
PET/CT	pozitronska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija, slikovna metoda koja uz pomoć obilježenog kontrasta detektira područja u organizmu koja su metabolički jako aktivna (uglavnom maligne bolesti)
PI3K	fosfatidilinozitol-3 kinaze, obitelj ATP enzima (engl. <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>); PI3KCA - gen za katalitičku podjedinicu PI3K enzima (protoonkogen); PIK3/Akt/mTOR signalni put koji aktivira

	rast i proliferaciju stanica, aktiviran receptorima za epidermalne čimbenike rasta
PR	receptor za progesteron
RAS	skupina protoonkogeni RAS (engl. <i>rat sarcoma</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SEER	program Američkog nacionalnog instituta za rak (engl. <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>)
siRNA	mala interferirajuća RNA je dvolančana RNA koja vezanjem na komplementarni gen dovodi do njegovog utišavanja (engl. <i>small (short) interfering RNA</i>)
TIL	limfociti infiltrirani u područje tumora (engl. <i>tumor-infiltrating lymphocytes</i>)
TGFβ	transformirajući čimbenik rasta β (engl. <i>transforming growth factor β</i>)
TMB	tumorsko opterećenje mutacijama, smatra se slučaj u više od 10 mutacija po stanici nakon analize velikog broja gena metodom NGS (eng. <i>Tumor mutation burden</i>)
TNBC	trostruko negativni rak dojke koji nema izražene receptore za estrogen (ER), progesteron (PR) ni HER2
TNM	sistem stupnjevanja raka prema značajkama veličine primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorskim stanicama (N) te prisutnosti udaljenih metastaza (M)
UZV	ultrazvuk
vs.	suprotno, u odnosu na, protiv (lat. <i>versus</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organisation</i>)
χ²	Hi-kvadrat test

1. UVOD

1.1. Anatomija dojke

Dojka ili mliječna žlijezda (lat. *mamma*) najveća je kožna žlijezda, koja je zapravo modificirana žlijezda znojnice (Slika 1) (1, 2). Dojke su simetrični parni organ, smještene na prednjoj strani prsnog koša s funkcijom proizvodnje i izlučivanja mlijeka. U muškaraca dojka ostaje rudimentarni organ. Građena je od kože s potkožnim masnim tkivom, žlijezda i vezivno masne ovojnice. Žljezdani parenhim dojke sastoji se od 15-25 režnjeva (lobulusa), dok je svaki režanj građen od granajućeg sustava duktusa (od laktifernog duktusa preko segmentalnih i subsegmentalnih kanalića do terminalne duktulo-lobularne jedinice). Terminalna duktulo-lobularna jedinica građena je od ekstralobularnog duktusa i lobula koji je građen od acinusa, intralobularne strome i intralobularnih duktusa. Kolagenska vezivna interlobularna stroma te masno tkivo nalaze se između lobula. Režnjevi i njihovi izvodni kanali poredani su zrakasto oko bradavice pa otuda pravilo da svaki kirurški rez dojke ide radijalno prema bradavici. Bradavica i završni dio laktifernog sinusa prekriveni su višeslojnim pločastim epitelom dok dvoredni kubični epitel oblaže kanaliće dojke, a čine ga sekrecijske luminalne stanice te vanjski mioepitelni sloj stanica (1, 2).



Slika 1. Građa dojke, sagitalni presjek: 1 – prsni koš; 2 – veliki prsni mišić; 3 – mliječne žlijezde; 4 – bradavica; 5 – areola; 6 – mliječni kanali; 7 - masno tkivo; 8 – koža
Preuzeto i modificirano iz: Lynch PJ, medicinski ilustrator (2)

Normalnu veličinu dojka doseže tijekom puberteta kada pod utjecajem estrogena i progesterona iz jajnika kod djevojaka dolazi do produljivanja i grananja postojećih kanala uz istodobno nakupljanje masnog tkiva. Tijekom menstrualnog ciklusa dojka prolazi kroz cikličke promjene. Prilikom trudnoće i laktacije na krajevima terminalnih kanalića formiraju se alveole, nakupine žljezdanih stanica koje izlučuju mlijeko. Nakon prestanka dojenja većina alveola propada apoptozom, a u starosti nastupa involucija (3).

1.2. Tumori dojke

Bolesti dojke možemo podijeliti na netumorske i tumorske. Netumorske bolesti obuhvaćaju poremećaje u razvoju dojki (amastija, mikromastija, makromastija, politelija), poremećaje u funkciji dojki (galaktoreja, secenirajuća dojka, mastodinija), regresivne promjene (atrofija, distrofija) i upalne promjene (mastitis, apsces, karbunkul).

Tumori dojke mogu nastati od bilo kojeg građevnog dijela dojke: žljezdanog, vezivnog, masnog, krvožilnog i živčanog tkiva. Epitelni su tumori učestaliji od stromalnih tumora. Rijetko mogu nastati i limfomi, melanomi te metastaze tumora drugih lokalizacija. Tumori dojke mogu biti benigni i maligni.

Maligni tumori imaju sposobnost invadiranja i razaranja tkiva kao i metastaziranja. Obzirom na odnos malignih stanica prema bazalnoj membrani tumori dojke se dijele na neinvazivne (ne probijaju bazalnu membranu) i invazivne. Kod neinvazivnih ili *in situ* karcinoma tumorske stanice su ograničene na duktuse ili lobule. Intraduktalni karcinom *in situ* (DCIS) najčešći je oblik preinvazivnog karcinoma dojke (80%), a u oko 20% promjene su bilateralne (4). Najčešće se nalazi u žena između 50 i 59 godina. Iako se može prezentirati kao tumorska masa, iscjedak iz bradavice ili Pagetova bolest bradavice u većine slučajeva otkrije se mamografskim pregledom (kao nakupine kalcifikata). Arhitekturno se dijele na mikropapilarni, papilarni, kribriformni, solidni i komedo tip, a prema izgledu i polimorfizmu jezgara stupnjuju se u tri gradusa. Desetogodišnje preživljenje je veće od 98%. Rizik za nastanak karcinoma dojke povećan je za 8-11 puta te se u oko 50% slučajeva DCIS-a razvije invazivni karcinom dojke.

Lobularni karcinom *in situ* (LCIS) najčešće se dijagnosticira prilikom mikroskopskog pregleda tkiva dojke dobivenog iz nekog drugog razloga. Postoji klasični, floridni i

pleomorfni oblik LCIS-a. *CDH1* (gen za protein E-cadherin) inaktivacija koja dovodi do oslabljene funkcije E-cadherina rani je događaj u razvoju LCIS-a. Postoji niski rizik progresije LCIS-a u invazivni karcinom pa se prema 8. izdanju TNM klasifikacije (AJCC) LCIS ne svrstava u pTis (5–8). Invazivne epitelne tumore dojke prema WHO klasifikaciji dijelimo u više histoloških podtipova (4).

1.2.1. Karcinomi dojke

Veliku većinu karcinoma dojke klasificiramo kao invazivni karcinom NST, prije zvan duktalni invazivni karcinom. U slučaju da karcinom pokazuje specifičan histološki obrazac rasta u više od 90% tumorske mase, klasificiramo ga u jedan od specijalnih histoloških podtipova poput lobularnog, tubularnog, kribriformnog ili mucinoznog karcinoma. Duktalni karcinom nastaje iz epitela kanalića u području terminalne duktulo-lobularne jedinice i najčešći je tip raka dojke, s gotovo 80% svih karcinoma dojke (4). Lobularni karcinom čini od 5% do 15% svih slučajeva raka dojke.

Određivanje histološkog tipa karcinoma dojke ima prognostički i prediktivni značaj npr. tubularni karcinomi su uglavnom niskog gradusa i pokazuju dobru prognozu (petogodišnje preživljenje 88%) dok su neke podvrste metaplastičnog karcinoma visokog gradusa, trostruko negativnog imunofenotipa, lošijeg odgovora na standardnu kemoterapiju u odnosu na druge podtipove trostruko negativnog imunofenotipa te samim time lošije prognoze (petogodišnje preživljenje oko 66%) (4).

1.2.1.1. Etiologija karcinoma dojke

Iako su karcinomi dojke već desetljećima predmet brojnih istraživanja još uvijek postoje brojne etiološke nepoznanice. Da na razvoj karcinoma dojke utječe način života s visokim kalorijskim unosom, unosom hrane bogate proteinima i životinjskim mastima, povećanim unosom alkohola, manjkom tjelesne aktivnosti govore epidemiološki podaci o povezanosti incidencije karcinoma dojke s višim socioekonomskim statusom i većom pojavnosti karcinoma dojke u razvijenim zemljama (9). Podaci o povećanju incidencije unatoč unaprjeđenju liječenja vjerojatno potvrđuju ovu pretpostavku. Glavni rizični čimbenici koji se povezuju s karcinomom dojke su genski i hormonski. Bolest se češće javlja kod žena s ranom dobi prve menstruacije, manjim brojem djece, kasnijom dobi prvog poroda te kraćim trajanjem dojenja. Unos egzogenih spolnih steroida poput hormonske nadomjesne terapije i oralnih kontraceptiva ako se uzimaju duži niz godina ima ulogu u razvoju karcinoma dojke (10). Mehanizam pro-karcinogenog učinka estrogena povezan je s njegovom indukcijom proliferacije, čime se povećanjem broja staničnih dioba mogu nakupiti mutacije kao začetnici karcinogeneze. Estrogen djeluje i kao kemijski karcinogen, zbog načina metaboličke inaktivacije i popratne produkcije reaktivnih kisikovih spojeva. Stoga će trudnoća u kojoj stanice dojke doživljavaju potpuno sazrijevanje i diferencijaciju, kao i dojenje kada stanice dojke dobivaju apoptotične signale, djelovati zaštitno te će višestruke trudnoće i duže dojenje imati preventivni učinak na razvoj karcinoma dojke (11). Debljina u postmenopauzalnih žena povećava rizik zbog djelovanja estrogena koji se stvaraju u masnom tkivu (1).

Preko 70% žena s dijagnosticiranim karcinom dojke nema poznate rizične čimbenike pa se može pretpostaviti da su sve žene pod rizikom za nastanak raka dojke (12). Utjecaj nekog čimbenika na mogućnost obolijevanja izražavamo relativnim rizikom (RR). Svrstavamo ih u visoko rizične (RR iznad 4), umjereno rizične (RR 2-4) i nisko rizične (RR ispod 2), a u

upotrebi je nekoliko modela procjene RR (13–16). Prihvaćeno je stajalište da je nastanak karcinoma dojke uzrokovan djelovanjem brojnih egzogenih i endogenih čimbenika.

Opći čimbenici su u 90% slučajeva odgovorni za razvoj karcinoma dojke:

- Dob >65 (RR: 4 puta veći)
- Proliferativne lezije s atipijom (RR: 4 puta veći)
- Duljina životne izloženosti estrogenima (RR: 2- 4 puta veći): nadomjesna hormonska terapija u menopauzi, gustoća dojki
- Izloženost fizikalnim i kemijskim karcinogenima (RR: 2-4 puta veći)
- RR: veći 1-2 puta - rana menarhe, kasna menopauza, kasna prva trudnoća, ne dojenje, nulipara, visoko-kalorijska prehrana, alkohol, smanjena tjelesna aktivnost (pretilost)

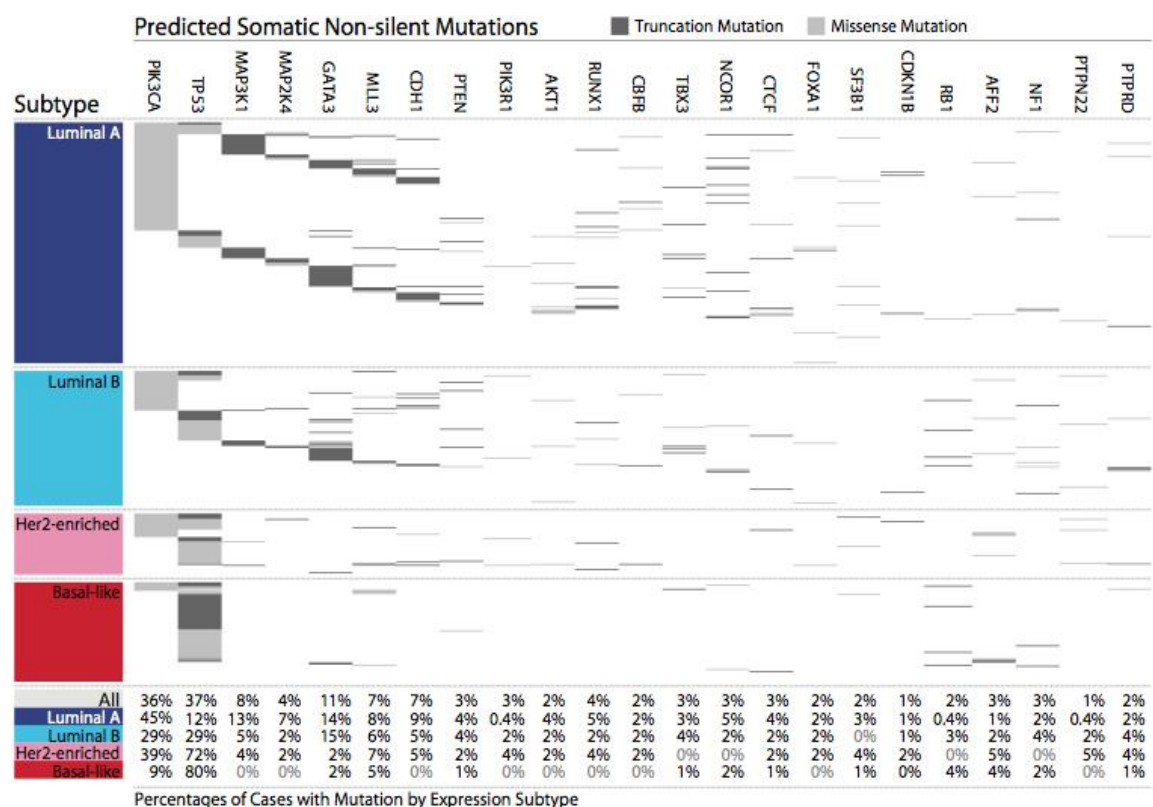
Genetički čimbenici su u 10% slučajeva odgovorni za razvoj karcinoma dojke, a taj je rizik za 2-4 puta veći u slučaju obiteljske anamneze te prisutnih genskih polimorfizama i nasljednih mutacija visokorizičnih gena (BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53, MLH1, MSH2, ATM, CHEK2, PALB).

Standardni čimbenici visokog rizika su starija životna dob, spol, rasa, nacija (Ashkenazi židovi) i obiteljska anamneza. Obiteljski rak dojke podrazumijeva nastanak bolesti unutar obitelji s većom učestalošću nego u općoj populaciji. Žene s obiteljskom anamnezom karcinoma dojke imaju veću vjerojatnost obolijevanja, koja korelira s brojem oboljelih članova obitelji, stupnjem srodnosti i dobi obolijevanja. Oboljeli srodnik unutar uže obitelji povećava rizik čak 2 do 3 puta (12). Nasljedan rak dojke nosi mutaciju gena koja se obiteljski nasljeđuje, najčešće u sklopu sindroma poput Li Fraumeni, Cowden, Peutz-Jeghers (17). Nasljedne mutacije čine manje od 10% ukupnog uzroka za nastanak raka dojke. Ipak, osobe koje imaju mutaciju na jednom alelu imaju dvostruko veći rizik za nastanak karcinoma od

osoba bez mutacija. Najčešće su mutacije na genima BRCA1 i BRCA2 (eng. *Breast Cancer 1 and 2 genes*) čiji nositelji imaju više od 45-85% vjerojatnost za nastanak karcinoma dojke i 11–62% vjerojatnost za nastanak raka jajnika do 70. godine života i uzrok su 1/3 ukupnih nasljednih karcinoma dojke (17). Nasljedne BRCA1 mutacije vezane su s nastankom trostruko negativnih karcinoma dojke dok se nasljedne mutacije BRCA2 gena vežu s nastankom hormon receptor pozitivnih tumora. Muškarci s mutacijom u tim genima imaju rizik 5-10% za razvoj karcinoma dojke, uz povećan rizik za razvoj raka prostate u mlađoj životnoj dobi (17). BRCA1 je ključni protein u održavanju genomske stabilnosti, popravku DNA, kontroli staničnog ciklusa, modeliranju kromatina te regulaciji transkripcije i translacije. Kao odgovor na oštećenje DNA, sudjeluje u popravku dvolančane DNA mehanizmom homologne rekombinacije kao i popravkom krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair pathway*, MMR) (17). Oba gena sudjeluju u mehanizmu popravka DNA te njihove inaktivacijske mutacije (delecije i insercije, „*non-sense*“ mutacije) uzrokuju onkogeni efekt u visokoproliferativnim stanicama dojke i jajnika.

U Hrvatskoj su 2017. godine uvedene smjernice za genetičko savjetovanje i testiranje za nasljedni rak dojke i jajnika kod bolesnica koje prema anamnestičkim podacima imaju visok rizik od nastanka raka dojke (18). Oštećenja gena koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, poput gubitka funkcije tumor supresorskih gena, gubitka regulacije apoptoze (kontrolirane „smrti“ stanica koje se ne mogu popraviti) ili aktivacijske mutacije nekog od ključnih onkogenata imaju za posljedice nekontroliranu diobu i rast stanica te neposredno uzrokuju nastanak raka.

Postoji više tumor-supresorskih gena čija nasljedna mutacija na jednom alelu doprinosi visokom riziku razvoja karcinoma dojke: PTEN (engl. *Phosphatase and tensin homolog*), TP53 (engl. *Tumor protein p53*) i CDH1 (engl. *Cadherin 1*) (19–23).



Slika 2. Karakteristične mutacije u genomu karcinoma dojke po intrinzičnim skupinama. Preuzeto i modificirano iz: Koboldt i sur., 2012. (23)

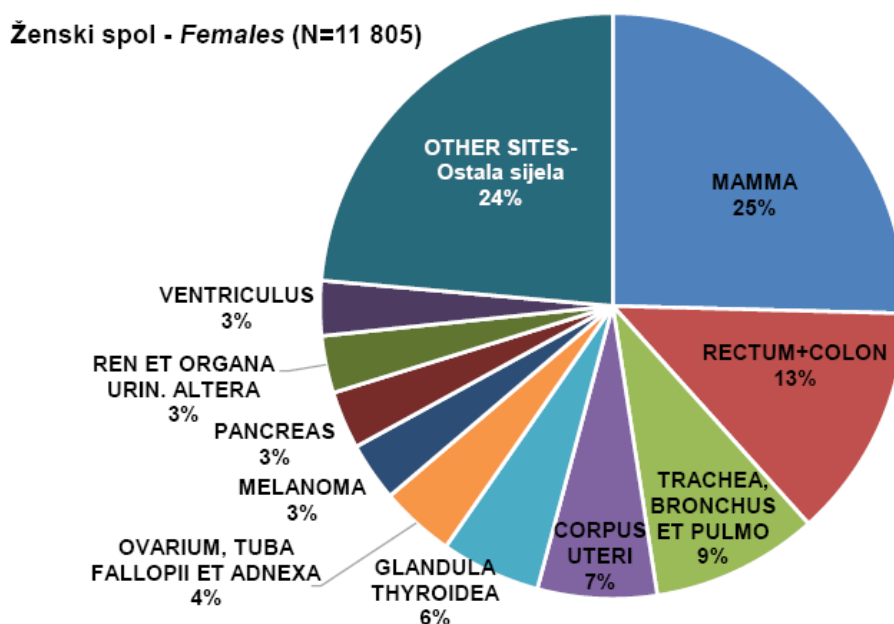
1.2.1.2. Epidemiologija karcinoma dojke

Karcinom dojke najčešće je sijelo karcinoma kod žena, najčešći je maligni uzrok smrti žena u više od 90% zemalja na svijetu i jedan od najčešćih uzroka smrti u žena uopće. Visoka učestalost i visoka smrtnost smješta karcinom dojke u svjetski, zdravstveni i sociološki problem.

Najnovije procjene svjetske agencije za istraživanje raka (IARC) pokazuju da je u 2020. godini od karcinoma dojke oboljelo 2 260 000 žena, što čini 11,7% svih karcinoma dok je njih 685 000 umrlo, što ga stavlja na peto mjesto vodećih uzroka smrti od raka u svijetu (9). Postoje velike razlike u incidenciji između razvijenih i nerazvijenih dijelova svijeta što odražava razliku u načinu života (manje poroda, kraće trajanje dojenja, uzimanje oralnih

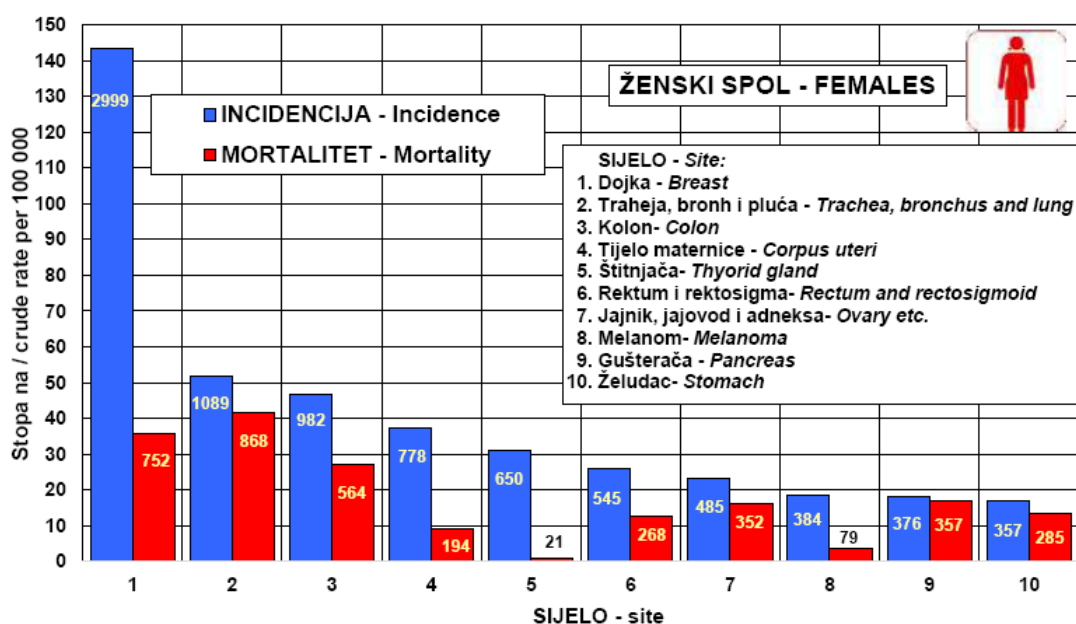
kontraceptiva, uzimanje hormonske nadomjesne terapije, starija dob menopauze) kao i učestalije organizirane programe ranog otkrivanja raka u razvijenim dijelovima svijeta. U Europi su najveće stope incidencije u zapadnijim, razvijenijim zemljama kao što su Belgija, Danska i Nizozemska (stope 112/105/99 na 100 000 stanovnika) dok su najniže u BiH (37,4/100 000) i Ukrajini (41,3/100 000) (17). Moguće je da su razlike u incidenciji dijelom rezultat razlika u kvaliteti prikupljenih podataka u niže razvijenim zemljama. Prema podacima Eurostat-a za 2016. godinu u zemljama EU od karcinoma dojke umrlo je 84 300 žena, što čini 16% svih smrti žena od karcinoma, prema čemu je karcinom dojke na prvom mjestu, dok su na drugom karcinom pluća i karcinom kolorektuma s 15% i 12% .

Prema podacima godišnjeg izvještaja Hrvatskog registra za rak za 2019. godinu karcinom dojke čini 25% svih karcinoma kod žena (Slika 3) (24, 25). Stopa incidencije raka dojke kod žena u RH je 143,2/100 000, a kod muškaraca 1,5/100 000. U 2019. godini rak dojke je otkriven kod 2999 žena dok je njih 752 umrlo od raka dojke (Slika 4).



Slika 3. Vodeća sjela karcinoma kod žena svih dobi u RH. Preuzeto iz: HZJZ Bilten 44, 2021. (24)

Oko 45% slučajeva otkriveno je u lokaliziranom stadiju, oko 25% u stadiju regionalnih metastaza, u oko 5% slučajeva u stadiju udaljenih metastaza dok za ostatak stadij nije bio poznat. Najviša je incidencija zabilježena u Gradu Zagrebu, a najniža u Ličko-Senjskoj i Požeško-Slavonskoj županiji. Analiza dobno-specifičnih stopa incidencije pokazuje da je većina slučajeva, njih oko 80% u žena starijih od 50 godina.



Slika 4. Najčešća sijela raka u žena u RH 2019. godine. Preuzeto iz: HZJZ Bilten 44, 2021. (24)

Prema podacima Državnog zavoda za statistiku u 2019. godini od karcinoma dojke su umrle 752 žene, što karcinom dojke stavlja na 9. mjesto po smrtnosti dok su vodeći uzroci smrti kod žena ishemična bolest srca, cerebrovaskularne bolesti, hipertenzivna bolest srca i dijabetes. Usporedimo li broj oboljelih žena od karcinoma dojke u Hrvatskoj za razdoblje od 2014. do 2019. godinu možemo zaključiti da je on u blagom porastu (2642 do 2999) kroz godine. Na sreću, usporedimo li broj umrlih žena od karcinoma dojke u Hrvatskoj u

razdoblju od 2015. do 2019. godine primjećujemo smanjenje broja umrlih (1038 do 752) (24,26,27). Dobno specifične analize mortalitetnih trendova u Hrvatskoj ukazuju na smanjenje mortaliteta u mlađim dobnim skupinama kao i u skupini žena u dobi 50 do 69 godina koja se poziva na organizirani probir dok je u skupini žena starijih od 70 godina zabilježen porast mortaliteta (17).

Karcinom dojke je sijelo s relativno dobrim preživljenjem koje je znatno poboljšano unatrag nekoliko desetljeća. Petogodišnje preživljenje od raka dojke za razdoblje od 2010.-2014. godine u Hrvatskoj je bilo između 70% i 79% (28). Rezultati velikog međunarodnog istraživanja EURO CARE-5 za razdoblje 2000.-2007. godine pokazali su da je petogodišnje preživljenje žena s rakom dojke u RH iznosilo 76,3% što je još uvijek nešto niže od europskog prosjeka. Prema rezultatima CONCORD-3 analize petogodišnje preživljenje je više od 85% u 16 europskih zemalja dok je u zemljama istočne Europe niže nego u drugim dijelovima kontinenta (28). U svijetu je petogodišnje preživljenje najniže u Indiji (65%) a najviše u Sjevernoj Americi i Oceaniji (90%) (9).

Prema standardiziranim stopama smrti od karcinoma s 334/100 000 stanovnika Hrvatska je na drugom mjestu u EU (nakon Mađarske koja ima 345/100 000 stanovnika).

Nacionalni program ranog otkrivanja raka dojke započeo je 2006.godine. Ciljna skupina su žene u dobi od 50 do 69 godina. Da bi program polučio zadovoljavajuće rezultate odaziv žena pozvanih na mamografiju trebao bi biti najmanje 70% prema preporuci iz europskih smjernica za osiguravanje kvalitete probira. Iako je u prva četiri ciklusa otkriveno više od 5400 karcinoma dojke, prosječni odaziv na probir je oko 60%. Ciljevi programa su smanjiti mortalitet od raka dojke za 15-25%, otkriti rak dojke u početnom stadiju u što većem postotku bolesnica te poboljšati kvalitetu života bolesnica s rakom dojke. Više od 90% bolesnica može se izliječiti ako se dijagnoza postavi u početnom stadiju bolesti. Uz ispravno

liječenje petogodišnje preživljenje je i do 96%. Uvođenjem mamografskog probira vidi se povećanje udjela slučajeva raka dojke koji su otkriveni u ranom stadiju te smanjenje onih otkrivenih u stadiju regionalnih i udaljenih metastaza. Postotak karcinoma dojke otkrivenih u lokaliziranom stadiju porastao je s 45% u 2006. godini (prije uvođenja probira) na više od 65% u 2014. godini u dobnoj skupini 50-69 godina. Uz sve bolju dijagnostiku i nove oblike liječenja karcinoma dojke i to je svakako jedan od razloga pada mortaliteta od karcinoma dojke u RH (17, 29, 30). Uvođenjem probira povećao se broj otkrivenih neinvazivnih karcinoma te danas duktalni *in situ* karcinom obuhvaća 13% svih dijagnosticiranih karcinoma dojke u odnosu na 6% prije 2006. godine (31).

U Klinici za tumore, KBC Sestre milosrdnice dijagnosticira se, operira i liječi oko trećina svih novootkrivenih karcinoma dojke godišnje (u prosjeku 800 do 900 godišnje). Retrospektivno smo prikupili podatke o patohistološkim karakteristikama raka dojke bolesnica oboljelih na početku mamografskog probira (2005-2007; N=1833) i podatke o novooboljelima iz razdoblja više od deset godina nakon uvedenog probira (2017-2019; N=2676). Naši rezultati nisu pokazali statistički značajne razlike u veličini tumora, histološkom gradusu ili pozitivnom status limfnih čvorova u podpazušnoj jami u skupini novodijagnosticiranih bolesnica s karcinomom dojke u usporedbi s onima iz razdoblja prije mamografskog probira. Prosječna dob obolijevanja je 61 godina s prosječnom veličinom tumora od 22 mm (medijan 18 mm), u oba razdoblja. Oko 45% bolesnica je dijagnosticirano s pT1N0, u oba razdoblja. U razdoblju nakon uvođenja probira u našoj ustanovi smo zbrinuli 32% više oboljelih od raka dojke (32).

Broj slučajeva karcinoma dojke se kontinuirano povećava od 1988. godine, a pretpostavka je da su povećanje prevalencije rizičnih faktora povezanih uz životne navike kao i bolja dijagnostika odgovorni za taj epidemiološki podatak (33).

1.2.1.3. Dijagnostika karcinoma dojke

Dijagnostika i liječenje karcinoma dojke su posljednjih dvadeset godina vrlo brzo napredovali. Karcinom dojke otkriven u ranoj fazi izlječiv je u 98% slučajeva dok je 5-godišnje preživljenje kod uznapredovalog stadija bolesti od 35-65% (9). U svrhu ranog otkrivanja raka dojke primjenjuju se brojne dijagnostičke metode što je i najvažniji korak u liječenju. U ranoj fazi rak dojke nema kliničkih simptoma pa se bolest obično dijagnosticira slučajnim nalazom uslijed probira klinički asimptomatskih pacijentica. Redovitim mjesečnim samopregledom dojke mogu se detektirati promjene na dojkama koje će zahtijevati daljnju kliničku obradu. Kliničkim pregledom utvrđuje se postojanje simptoma, poput palpabilnih čvorića na dojkama, bolnih dojki, promjena na koži dojke i bradavicama. Također se vrši palpacija regionalnih limfnih čvorova te utvrđuje opće stanje organizma (34). Uzimanje osobne i obiteljske anamneze podrazumijeva pregled svih endogenih rizičnih čimbenika kao i mogućnost povezanosti s BRCA mutacijama i potrebu za dodatnim testiranjem. Laboratorijskom dijagnostikom određuje se diferencijalna krvna slika, jetrene probe i status tumorskih biljega u serumu CA 15-3, CA 27-29 (eng. *Cancer Antigen*), CEA (karcinoembrionalni antigen). Tumorski biljezi nisu specifični, kod malih tumora najčešće nisu povećani, njihovo povećanje u krvi može biti povezano i s drugim tumorima, bolestima i benignim promjenama. Često se koriste pri praćenju bolesnica tijekom terapije pa je važno znati njihovu primarnu vrijednost (34).

U dijagnostici se uglavnom primjenjuju mamografija i ultrazvuk (UZV), a za složenije suspektne lezije koriste se magnetska rezonanca (MR) i pozitronska emisijska kompjutorska tomografija (PET/CT). Mamografija je radiološka metoda oslikavanja kojom se vrši probir i rana detekcija zloćudnih promjena dojki praćenjem promjena u radiografskoj gustoći dojke te je pogodna za probir kod starije populacije, kada je žljezdani parenhim dojki zamijenjen masnim tkivom. Prvu mamografiju se preporuča učiniti između 38. i 40. godine života, a

obavezno do 50. godine (30). Većina invazivnih karcinoma ima prisutne mikrokalcifikate (50%) koji se mamografski lako uočavaju. Mamografija ima ograničenu specifičnost za male, nepalpabilne karcinome a njena točnost je osobito niska u vrlo gustim dojka kakve su češće kod mlađih žena te onih koje dulje uzimaju hormonsku nadomjesnu terapiju (17). Sustav kategorizacije mamografskog nalaza naziva se Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS). Otkrivene promjene procjenjuju se ocjenom od 0-6, gdje BI-RADS 6 predstavlja dijagnosticiran rak dojke. Treba napomenuti da preko 20% tumora nije mamografski uočljivo pa se stoga kombinira mamografski i UZV pregled (17).

Ultrazvučna metoda pregleda je od neprocjenjive vrijednosti u raščlanjivanju solidnih i cističnih promjena kao i za razlikovanje radi li se o dobroćudnoj ili zloćudnoj promjeni. UZV je neškodljiva, jeftina i pristupačna radiološka metoda koja oslikava tkivo na osnovi razlike u građi tkiva i primjerenija je mlađim ženama i trudnicama. Može detektirati karcinome manje od 1 cm koji nisu vidljivi mamografijom, no teško može detektirati sijela s mikrokalcifikatima (34). Pod kontrolom UZV-a mogu se raditi aspiracijske punkcije te biopsije širokom iglom, tumor se može markirati žicom prije operacije, a također se može postaviti titanska/metalna klipsa u leziju prije liječenja.

Magnetska rezonanca (MR) danas je rezervirana kao dopunska metoda pregleda u žena s visokim rizikom obolijevanja od raka dojke, kod pacijentica sa silikonskim implantatima, kod pacijentica s metastazama u aksilarne limfne čvorove nepoznatog primarnog sijela te kod žena s dijagnosticiranim karcinomom dojke preoperacijski radi procijene proširenosti tumora i utvrđivanja multifokalnosti/bilateralosti tumora. Također se treba upotrijebiti u prije operacijskoj procjeni svih lobularnih karcinoma (17).

Slikovne dijagnostičke metode se koriste i za kliničku, preoperativnu, procjenu proširenosti bolesti. Sve suspektne lezije dojke potrebno je potvrditi direktnom analizom uzorka tkiva, citološki ili patohistološki. Punkcija tankom iglom (engl. *fine needle aspiration cytology*,

FNAC) pokazala se u dijagnosticiranju bolesti dojke kao jeftina, pouzdana i točna dijagnostička metoda. U RH se aspiracijska citologija rabi kao prva dijagnostička metoda kod palpabilnih tvorbi u dojci, tvorbi u dojci kod pacijentica koje su operirale karcinom dojke ili imaju leziju suspektu za lokalni recidiv te kod radiološki detektiranih, visokosuspektnih palpabilnih tvorbi. FNAC ima svoju ulogu i kod preoperacijskog određivanja stadija odnosno procjene zahvaćanja aksilarnih limfnih čvorova (17).

Iglena biopsija (biopsija širokom iglom) je preciznija metoda jer je u uzorku vidljiva histološka građa tumora pa je patohistološka analiza točnija od citološke. Uzorak se uzima pod nadzorom UZV, eventualno MR-a (17). U pravilu se rabe igle od 14 G, a ovisno o veličini lezije uzima se 2-6 cilindara tkiva na kojima patolog nakon procesuiranja i obrade tkiva postavlja dijagnozu. Zbog kratkog vremena hladne ishemije, dobre fiksacije uzoraka iglene biopsije te mogućnosti određivanja prognostičnih i prediktivnih čimbenika patohistološka dijagnoza postavljena na biopsiji širokom iglom je ključna za multidisciplinarni tim pri donošenju odluke o načinu liječenja bolesnice te primjeni neoadjuvantne terapije.

Patohistološka dijagnostika karcinoma dojke uključuje makroskopski pregled tkiva i mikroskopski pregled preuzetih uzoraka, određivanje histološkog tipa tumora prema klasifikaciji SZO, određivanje histološkog gradusa, patološkog TNM-a kao i određivanje ostalih prognostičkih i prediktivnih čimbenika u cilju individualizacije prognoze i terapije (4). Najvažniji prognostički čimbenici karcinoma dojke su dob bolesnice, veličina primarnog tumora, histološki tip i gradus tumora, proliferacijski mitotski indeks, prisutnost limfovaskularne invazije, karakteristike upalnog infiltrata u tumoru i njegovoj periferiji, broj, mjesto i veličina pozitivnih limfnih čvorova, postojanje udaljenih presadnica i njihova lokacija te izraženost receptora za estrogen, progesteron, HER2 kao i izraženost biljega proliferacije Ki-67 (MIB-1) (4, 17). U dijagnostici karcinoma dojke patolog na analizu dobiva

uzorke tumora dobivene biopsijom širokom iglom te operativni materijal (tumorektomija, segmentektomija, subkutana mastektomija s poštedom kože i bradavice, mastektomija, biopsije sentinel limfnih čvorova, disekcije pazušnih limfnih čvorova).

Dobivene uzorke potrebno je makroskopski pregledati, izmjeriti veličinu uzoraka, opisati vidljive promjene, izmjeriti veličinu tumorske tvorbe te udaljenost tvorbe od resekcijskih rubova. U slučaju multiplih promjena svaku je potrebno opisati, izmjeriti, odrediti međusobnu udaljenost te udaljenost od rubova ekscizije. Kod uzoraka koji su prekriveni kožom potrebno je uočiti postoji li ulceracija, promjene na bradavici ili satelitski čvor jer to utječe na određivanje stadija bolesti.

Makroskopski, invazivni karcinomi dojke su najčešće neoštro ograničeni, infiltrativno rastu u okolni parenhim dojke dok rjeđe rastu nodularno. Obično su čvršće konzistencije zbog dezmoplastične strome, a mogu sadržavati i mikrokalcifikate što omogućava da se rano otkriju mamografijom (4, 17).



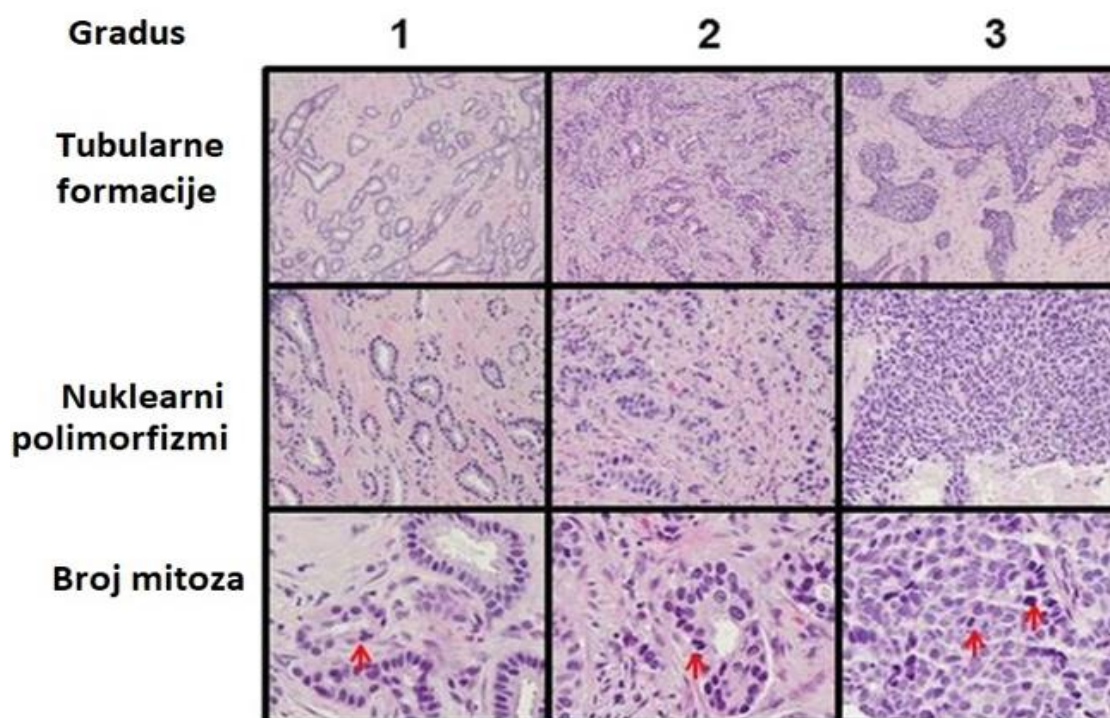
Slika 5. Makroskopski izgled svježeg tkiva dojke s centralno smještenim karcinomom. Fotografiran prilikom preuzimanja materijala (M. Perić Balja)

Preuzete uzorke potrebno je fiksirati u 10% puferiranom formalinu, ovisno o veličini uzorka od 6 do 72 sata nakon čega slijedi postupak obrade tkiva u histokinetima, uklapanje u parafinske blokove, rezanje te izrada hemalaun-eozinskih preparata.

Mikroskopskim pregledom tumorskog tkiva uočavaju se promjene u veličini i izgledu tumorskih stanica u odnosu na normalno tkivo dojke na osnovu čega se određuje stupanj diferenciranosti jezgre. Tumorsko tkivo može činiti tubularne formacije, rasti u obliku nakupina, tračaka ili pojedinačnih stanica. Za utvrđivanje histološkog gradusa potrebno je uz stupanj diferenciranosti jezgre i postotka tubularnih formacija izbrojiti prosječan broj mitozna na mm² odnosno na 10 vidnih polja velikog povećanja (Slika 6). U Tablici 1 prikazano je određivanje histološkog gradusa prema Nottingham sustavu (4). Prema preporukama WHO (4) mitotski indeks treba prilagoditi veličini promjera vidnog polja pojedinog mikroskopa, mitoze je potrebno brojiti na periferiji tumora i u području s najviše mitozna (tzv. hot spot).

Tablica 1. Određivanje histološkog gradusa karcinoma dojke prema Nottingham sustavu (4)

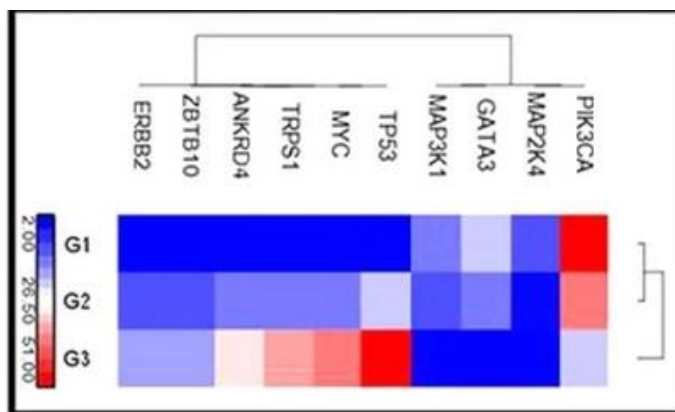
Bod	Tubularne formacije	Nuklearni polimorfizmi	Broj mitozna (u 10/HPF)
1	>75%	minimalne varijacije	0-9
2	10-75%	srednje varijacije	10-19
3	<10%	jako izražene varijacije	>20



Slika 6. Invazivni karcinom dojke prema Nottingham sustavu. Preuzeto i modificirano iz: Ping i sur., 2016. (35)

Na osnovu gore navedenog sustava tumori dojke su dobro diferencirani (gradus I) ako im je zbroj 3-5, srednje dobro diferencirani (gradus II) kod zbroja 6-7 te slabo diferencirani tumori (gradus III) ako je zbroj 8-9 (Slika 6). Histološki gradus je značajan neovisan prognostički čimbenik, a njegova prognostička vrijednost raste u kombinaciji s drugim prognostičkim čimbenicima poput veličine tumora i stanja regionalnih limfnih čvorova. Određivanje gradusa ima i prediktivni značaj jer slabo diferencirani tumori zahtijevaju agresivniji terapijski pristup. Tumori višeg gradusa bolje reagiraju na kemoterapiju zbog pojačane proliferacije, ali karcinomi gradusa III imaju 9 puta veći rizik od povrata bolesti unutar pet godina nego oni gradusa II (36, 37).

Gradus tumora uključen je u određivanje patološkog prognostičkog stadija bolesti (AJCC Cancer Staging Manual 8. izdanje) (8, 38). Mutacije nekih gena češće su povezane s određenim gradusom tumora što se vidi na Slici 7.



Slika 7. Povezanost 10 ključnih gena u razvoju karcinoma dojke („driver geni“) prema histološkom gradusu. Preuzeto iz: Ping i sur., 2016. (35)

Mikroskopskim pregledom tumorskog tkiva dojke potrebno je odrediti histološki tip tumora koji također upućuje na biološko ponašanje tumora. Određeni histološki podtipovi poput tubularnog, kribriformnog ili mucinoznog karcinoma imaju bolju prognozu nego NST (4).

Peritumorska limfovaskularna invazija pokazatelj je rizika za lokalnu i udaljenu pojavu bolesti i neposredno je povezana sa zahvaćanjem lokoregionalnih limfnih čvorova. Limfovaskularna invazija u dermisu osobito je loš prognostički pokazatelj vrlo često povezan s lokalnim recidivom i udaljenim metastazama (39). Na pojavu lokalnih recidiva utječe i status resekcijskih rubova, pozitivnim rubom smatra se tumor na bojom označenom rubu dok je za DCIS potreban minimalan rub od 2 mm (4). Regionalni limfni čvorovi pazuha primarno su mjesto metastaziranja karcinoma dojke. U trenutku postavljanja dijagnoze zahvaćeni su u oko 40-50% bolesnica (40). Predstavljaju važan prognostički čimbenik, pri čemu je desetogodišnje preživljenje bolesnica s negativnim limfnim čvorovima 75% za

razliku od 30% kod bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima (41). Rizik od pojave recidiva kao i ukupno preživljenje ovise ne samo o broju zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova, već i njihovoj lokalizaciji te veličini tumorskih depozita u njima što je uključeno u pTNM klasifikaciju (4, 38, 42).

Obzirom na poslijeoperacijske komplikacije disekcije pazušnih limfnih čvorova u određenog broja bolesnica u vidu edema ruke i poremećene limfne cirkulacije, u praksu je uvedena biopsija limfnog čvora stražara (sentinel limfnog čvora). To je jedan ili više čvorova koji primaju najviše limfne drenaže iz primarnog karcinoma, a otkrivaju se najintenzivnijom aktivnošću radioizotopa ili bojom nakon ubrizgavanja u područje tumora. U slučaju negativnog sentinela ili mikrometastaze (manje od 2 mm) disekcija aksilarnih limfnih čvorova nije potrebna (4) dok kod makrometastaza u sentinel limfnom čvoru naknadna disekcija aksile ili aksilarna radioterapija pružaju jednako učinkovitu zaštitu (43). Patolog u nalazu navodi veličinu i broj izoliranih limfnih čvorova, broj tumorom zahvaćenih limfnih čvorova, veličinu najvećeg tumorskog depozita kao i prisutnost/odsutnost proboja tumorskog tkiva kroz čahuru limfnog čvora.

Za prognozu i liječenje raka dojke, potrebno je odrediti i stupanj proširenosti tumora (4). U tu svrhu upotrebljava se TNM sustav stupnjevanja raka dojke prema parametrima veličine primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorskim stanicama (N) te prisutnosti udaljenih metastaza (M) na sljedeći način:

pTx Primarni tumor se ne može procijeniti

pT0 Bez dokaza primarnog tumora

pTis Preinvazivni rak (DCIS)

pT1 Tumor s najvećim promjerom do 2 cm

pT1mi mikroinvazija 0,1 cm ili manje u najvećem promjeru

- pT1a** Tumor s najvećim promjerom do 0,5 cm
- pT1b** Tumor s najvećim promjerom između 0,5 i 1 cm
- pT1c** Tumor s najvećim promjerom između 1 i 2 cm
- pT2** Tumor s najvećim promjerom između 2 i 5 cm
- pT3** Tumor s najvećim promjerom većim od 5 cm
- pT4** Tumor bilo koje veličine s direktnim širenjem na zid prsnog koša ili kožu
 - pT4a** Zahvaćen zid prsnog koša
 - pT4b** Edem ili ulceracija kože dojke ili satelitski kožni čvor
 - pT4c** Obuhvaća T4a i T4b
 - pT4d** Upalni karcinom
- pNx** Regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti
- pN0** Regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni
- pN1** Mikrometastaze ili metastaze u 1-3 pazušna ipsilateralna limfna čvora, i/ili unutarnji mamarni čvorovi koji su detektirani biopsijom sentinel LČ (metastaze nisu klinički detektabilne)
 - pN1mi** Mikrometastaze, promjera manjeg od 0,2 cm
 - pN1a** Metastaze u 1-3 limfnih čvorova, barem jedna veća od 0,2 cm
 - pN1b** Metastaza u unutarnji mamarni LČ (klinički nedetektabilna)
 - pN1c** Metastaze u 1-3 pazušna limfna čvora i unutarnji mamarni LČ (klinički nedetektabilna)
- pN2** Metastaze u 4-9 ipsilateralnih pazušnih limfnih čvorova ili samo u klinički otkrivenom unutarnjem mamarnom limfnom čvoru
 - pN2a** Metastaze u 4-9 pazušnih LČ, barem jedna veća od 0,2 cm

pN2b Metastaza u klinički otkrivenom unutarjem mamarnom LČ u odsutnosti metastaza u pazušne LČ

pN3

pN3a Metastaze u 10 ili više ipsilateralnih pazušnih LČ ili metastaze u infraklavikularne limfne čvorove

pN3b Metastaza u 1 ili više klinički otkrivenih unutarnjih mamarnih LČ uz prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima, ili metastaze u više od 3 pazušna LČ i u unutarjem mamarnom LČ koja je otkrivena SLNB ali nije klinički otkrivena

pN3c Metastaza u ipsilateralni supraklavikularni limfni čvor /čvorove

pM Udaljene metastaze

pM1 Mikroskopski potvrđena udaljena metastaza

Veličina tumora određuje se prilikom patohistološke obrade materijala, makroskopskim pregledom i mjerenjem tumora u nativnom stanju, dok kod malih tumora izmjerenu veličinu treba potvrditi mikroskopskim pregledom i mjerenjem na staklu. Veličina tumora u pozitivnoj je korelaciji s pojavom metastaza u regionalne limfne čvorove što ukazuje na lošiju prognozu, manju stopu preživljenja i veću vjerojatnost povrata bolesti (4). U bolesnica s tumorima dojke veličine do 5 mm rizik od pojave metastaza je 10% dok kod tumora do 20 mm on iznosi 30% (44). Petogodišnja stopa preživljenja bolesnica s tumorom stadija pT1cN0 je 96%, dok je u onih s promjerom većim od 50 mm (pT3) i zahvaćenim limfnim čvorovima samo 43%. Promjer tumora i broj zahvaćenih limfnih čvorova neovisni su prognostički čimbenici. Samo 19% pT1 tumora javlja se uz lokoregionalne metastaze a svega 1% njih ima udaljene metastaze za razliku od tumora većih od 50 mm koji u 40% slučajeva imaju lokoregionalne, a u 10% udaljene metastaze (4). Osim limfnim putem karcinomi dojke mogu metastazirati hematogeno. Najčešće metastaziraju u pluća, jetru,

kosti, mozak i nadbubrežnu žlijezdu. Lobularni karcinom dojke može metastazirati u oko, leptomeningealno, unutar gastrointestinalnog trakta, u jajnike i peritoneum (45–47). U stadiju I dijagnosticira se 48 % bolesnica, njih 34 % u stadiju II te 13 % i 5 % u stadiju III i IV (4).

1.2.1.4. Molekularni prognostički čimbenici

Morfološki prognostički čimbenici, od kojih su najvažniji histološki tip tumora, stupanj diferenciranosti tumora (gradus), veličina tumora, te prisutnost malignih stanica u regionalnim limfnim čvorovima određuju se na osnovi histološke slike.

Molekularni biljezi, od kojih su najvažniji, izraženost receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR), izraženost receptora humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (eng. *Human Epidermal growth factor Receptor 2*, HER2) i izraženost proliferacijskog biljega Ki-67 određuju se imunohistokemijskim metodama (48–50). Određivanje navedenih molekularnih biljega omogućuje procjenu osjetljivosti tumora na određeni terapijski agens što omogućava optimizaciju terapije, koja će poboljšati individualni ishod bolesti te produžiti preživljenje i smanjiti rizik od povrata bolesti. Kod određenih podtipova karcinoma dojke potrebno je odrediti i izraženost androgenih receptora, receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR) te izraženost PD-L1 u tumorskoj stromi.

Hormonski receptori za estrogen i progesteron

Jajnici luče spolne hormone estrogen i progesteron koji potiču rast tkiva dojke u pubertetu i trudnoći te kontroliraju promjene tijekom mjesečnih ciklusa. Receptori za estrogen i progesteron su složene građe i pripadaju obitelji steroidnih receptora koji imaju DNA veznu

domenu i funkciju transkripcijskih faktora. Hormonski receptori mogu kontrolirati izraženost oko 100-tinjak gena putem specifičnih obrasca genskih aktivacija i inaktivacija što za posljedicu ima proliferaciju stanica (51). Postoje dva tipa estrogenskih receptora (ER-alfa i ER-beta), dok se progesteronski receptor (PR) sastoji od A i B podjedinice (heterodimer). U tkivu hormonski aktivne dojke ER alfa je dominantan. Aktivacija estrogenskih receptora rezultira proliferativnim učinkom, dok progesteron ima učinak diferencijacije i kontrole proliferacije u zdravim stanicama. Sinteza PR pozitivno je regulirana ligand ovisnom aktivacijom estrogenskih receptora (51, 52). Tumori bogati PR-A podjedinicama češće razvijaju povrat bolesti uz terapiju tamoksifenom, agresivnijeg su ponašanja i češći su kod zdravih žena s BRCA1/2 mutacijama (53–55). Ovisno o populaciji, 50-85% karcinoma dojke izražava hormonske receptore. Njihova učestalost povećava se s višim dobnim skupinama bolesnica (52, 56). Izraženost ovih receptora ima prediktivni značaj omogućavajući individualizaciju terapije. Izraženost ER i PR receptora određuje se imunohistokemijskom metodom bojenja, a očitava se kao postotak obojenja tumorskih jezgara. Potrebno je odrediti i intenzitet obojenja jezgara koji može biti slab, umjereno jak i jak. Tumore koji imaju manje od 1% ER pozitivnih tumorskih stanica smatramo ER negativnim tumorima. Tumori dojke čija je imunohistokemijska izraženost ER između 1% i 10% smatraju se ER-nisko pozitivnim tumorima čiji je genski ekspresijski profil sličniji ER negativnim tumorima, a podaci o učinkovitosti antihormonske terapije su limitirani što patolog treba navesti u svome nalazu (4, 57). Oni čine 2-3% ER pozitivnih tumora dojke.

U podskupini ER pozitivnih tumora postotak i intenzitet bojenja PR receptora ima prognostičko značenje jer su oni s nižom izraženošću povezani s lošijom prognozom (4, 58, 59). ER-/PR+ karcinomi dojke su rijetka podgrupa s agresivnijim ponašanjem, morfološki i histološki sličnija trostruko negativnim karcinomima dojke, češća kod mlađih žena uz visok proliferacijski indeks Ki-67 (60, 61).

Tumori koji izražavaju ER i PR su bolje diferencirani što ukazuje na manje agresivan fenotip. Istovremena izraženost oba hormonska receptora pokazuje pozitivnu korelaciju s učinkovitim odgovorom na hormonsku terapiju. Izraženost estrogenskih receptora u korelaciji je s nižim histološkim gradusom, manjom veličinom tumora, nižim proliferacijskim indeksom i manjim brojem zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova (56). Oko 50-60% bolesnica s hormonski pozitivnim tumorima povoljno će reagirati na anti-estrogensku terapiju (62) dok će kod dijela bolesnica doći do progresije bolesti.

Ukoliko je rezultat ER i PR bojenja negativan u uzorku dobivenom biopsijom iglom, testiranje treba ponoviti na velikom uzorku dobivenom nakon kirurškog zahvata (17).

Tumori povezani s nasljednim BRCA2 mutacijama su češće ER pozitivni dok su BRCA1 mutacije češće kod trostruko negativnih karcinoma dojke. Kod hormonski pozitivnih tumora češće su mutacije u signalnom putu PI3K/AKT (17). Mutacije PI3KCA i GATA3 gena češće su kod tumora niskog gradusa i stadija dok su amplifikacije tih gena vezane za progresiju i tumore višeg gradusa i stadija (35). Tako su hormonski negativni karcinomi dojke agresivnijeg fenotipa i često sadrže amplifikaciju HER2, c-Myc i Int2 onkogeni i mutacije p53 tumor supresorskog gena.

Proliferacijski biljeg Ki-67

Proliferacijski biljezi su molekule prisutne u stanicama isključivo u aktivnim fazama staničnog ciklusa (G1, S, G2 i M). Ki-67 je proliferacijski biljeg koji se koristi rutinski u dijagnostici karcinoma dojke. Ki-67 je nehistonski protein koji se nalazi u jezgrama stanica u svim fazama staničnog ciklusa osim G0. Zdravo tkivo dojke izražava Ki-67 u manje od 3% stanica dok kod karcinoma on može biti izražen u visokom postotku (čak do 100%) (4, 63). Proliferacijski biljeg Ki-67 određuje se imunohistokemijskim obojenjem jezgara

tumorskih stanica te se izražava u postotku. Kriteriji za očitavanje mijenjali su se više puta tijekom zadnjih 15 godina. Prema smjernicama iz St. Gallena iz 2013. godine „cut-off“ vrijednost je 20% i koristi se u klasificiranju ER+ tumora dojke u luminalni A/luminalni B podskupine (64). Visoka proliferacija pozitivno korelira s histološkim gradusom tumora, brojem pozitivnih regionalnih limfnih čvorova, limfovaskularnom invazijom i mutacijama p53 gena. Ki-67 je u negativnoj korelaciji s hormonskim receptorima dok s veličinom tumora nužno ne pokazuje povezanost (65). Biljezi proliferacije nemaju značajnu ulogu kao nezavisni prognostički čimbenici, ali imaju primjenu tijekom praćenja uspješnosti terapije (63, 65, 66). Visoka proliferacijska aktivnost prediktor je boljeg odgovora na kemoterapiju dok visoki pozitivitet u ostatnom tumoru ukazuje na slab odgovor na terapiju i veliku vjerojatnost povrata bolesti (63, 67). Noviji radovi pokazuju da samo Ki-67 iznad 30% pozitivnih stanica ima utjecaj na lošije preživljenje bolesnica s karcinomom dojke (68, 69) dok se kod ranog raka dojke s vrijednosti Ki-67 do 5% ne primjenjuje kemoterapija. Na imunohistokemijsku izraženost Ki-67 utječu vrijeme hladne ishemije i dužina fiksacije tkiva pa se točniji rezultati dobivaju na iglenim biopsijama (67, 69).

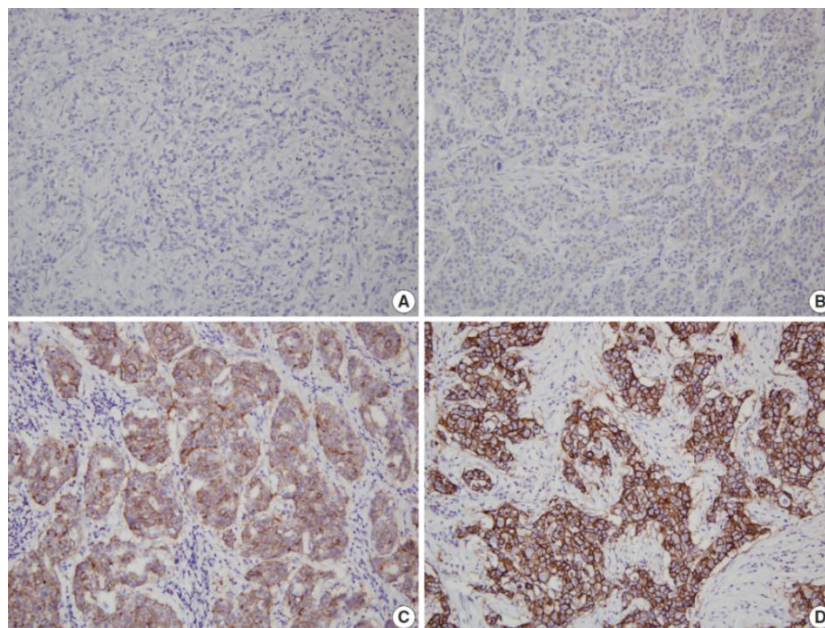
Receptor HER2

Proliferacija epitelnih stanica dojke aktivira se i preko receptora humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (eng. *human epidermal growth factor receptor*, HER2). HER2 pripada obitelji receptora za epidermalni čimbenik rasta koju čine EGFR (HER1), HER2, HER3 i HER4. Gen za receptor HER2 je protoonkogen smješten na kromosomu 17q12 (70).

Epitelne stanice kanalića dojke ne izražavaju HER2 receptor na svojoj membrani u količini dovoljnoj da bude vidljiva imunohistokemijskom analizom te se smatraju negativnim. Receptor HER2 je prekomjerno izražen u 15-20% invazivnih karcinoma dojke te u oko 50%

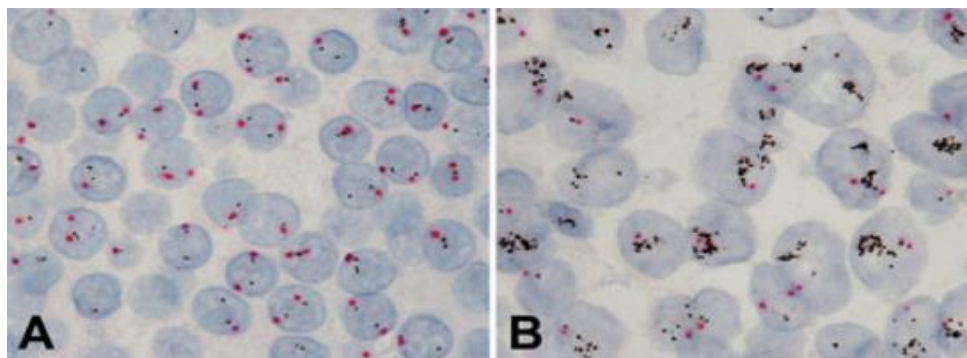
duktalnih karcinoma *in situ* visokog gradusa, a vidljiv je i kod Pagetove bolesti dojke (71, 72). Prekomjerna izraženost receptora HER2 na membrani ima ulogu u karcinogenezi jer dovodi do stanične proliferacije, pojačava se neosjetljivost na čimbenike rasta, stanica dobiva antiapoptotska, angiogenezna i metastatska obilježja (pojačana migracija i invazivnost). Izraženost HER2 se rutinski određuje imunohistokemijski (IHC), i/ili nekom od metoda hibridizacije *in situ* (eng. „*in situ*“ hybridization, ISH). Metode hibridizacije *in situ* su osjetljivije i pouzdanije, ali skuplje, od IHC. Uglavnom se koriste u slučaju dvojbenog rezultata IHC analize čija točnost rezultata ovisi o adekvatnom vremenu hladne ishemije i fiksacije u 10% formalinu, a kako je metoda semikvantitativna potrebno je iskustvo patologa. Tijekom godina smjernice za očitavanje HER2 su se mijenjale (73). Prema ASCO-CAP smjernicama iz 2018. godine (74) rezultat imunohistokemijske reakcije HER2 može biti (Slika 8) :

- 0** (negativan) - tumorske stanice pokazuju odsutnost obojenja ili manje od 10% tumorskih stanica pokazuje slabo, jedva vidljivo, nepotpuno membransko obojenje
- 1+** (negativan) - slabo, nepotpuno membransko obojenje u više od 10% tumorskih stanica
- 2+** (nejasan) - slabo do umjereno kompletno membransko obojenje vidljivo u više od 10% tumorskih stanica ili jako, kontinuirano membransko obojenje u manje od 10% tumorskih stanica. IHC 2+ rezultat traži dodatnu provjeru metodama hibridizacije *in situ*
- 3+** (pozitivan) - kontinuirano, jako obojenje vidljivo u više od 10% tumorskih stanica (3+), što je ekvivalentno više od 100 puta povećanom broju receptora u odnosu na normalnu stanicu.

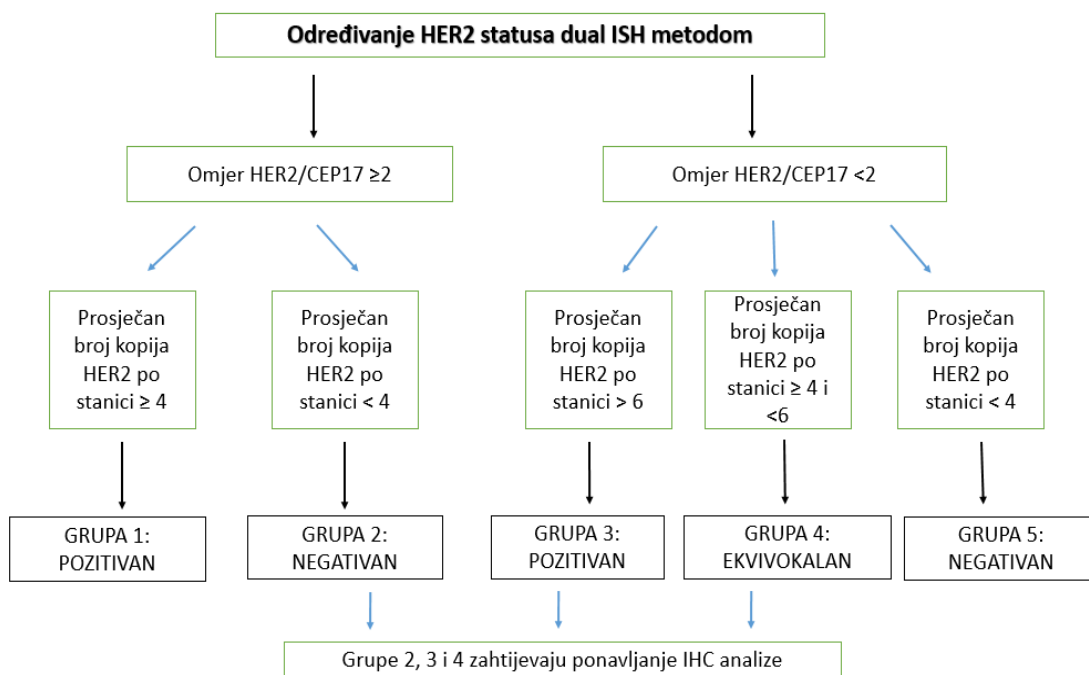


Slika 8. Imunohistokemijska izraženost HER2 receptora na membrani tumorskih stanica A, HER2 0; B, HER2 1+; C, HER2 2+; D, HER2 3+. Preuzeto iz: Ahn i sur., 2020. (73)

Metode hibridizacije *in situ* detektiraju povećani broj kopija HER2 gena (amplifikacija). Osnovni princip metode koristi kratki segment DNA sondu/probu komplementarnu odsječku HER2 gena, koja se metodom hibridizacije veže na HER2 gen u stanici te se kao rezultati hibridizacije vide intranuklearni signali (Slika 9). Sada se češće koristi modifikacija metode, istovremenim korištenjem dvije probe (dual ISH), specifična za HER2 gen i regiju centromere kromosoma 17 (CEP17) (Slika 9). U normalnim stanicama bez amplifikacije gena HER2, pokazuju se po jedan do dva intranuklearna signala za gen i centromeru (Slika 9a). Za izračun statusa amplifikacije bojenjem dual ISH metodom koristi se algoritam omjera dvaju signala u jezgri (HER2/CEP17) tumorske stanice (Slika 10) dok dvojben/ekvivokalan nalaz zahtjeva dodatno brojanje signala ili ponavljanje analize.



Slika 9. HER2 hibridizacija *in situ* upotrebom dvostruke probe – dual ISH. Crveni signali prikazuju CEP17, a crni HER2 gen. Na slici A, bez amplifikacije; B, s amplifikacijom (Povećanje 400x)



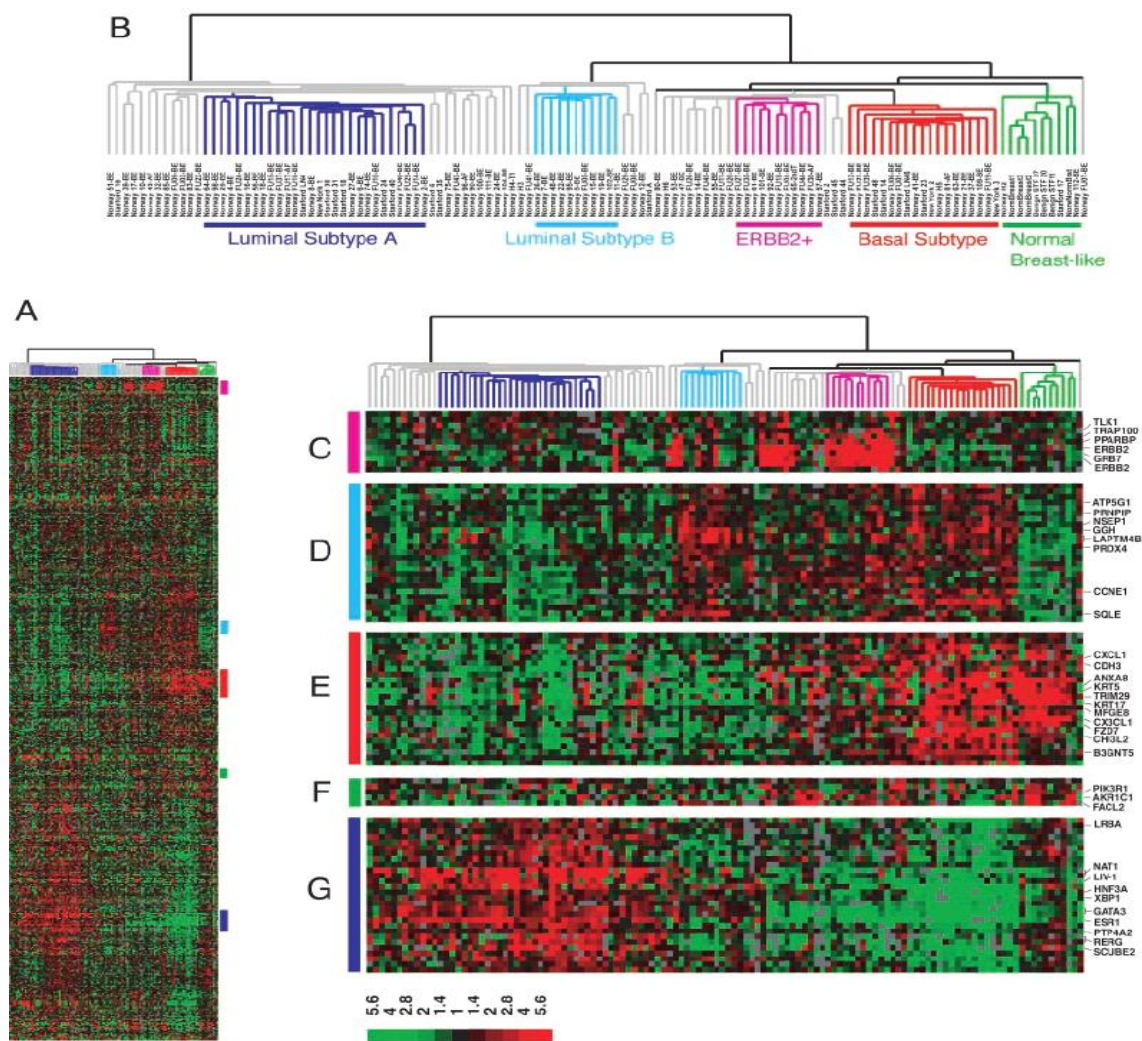
Slika 10. Algoritam određivanja HER2 statusa metodom hibridizacije *in situ* upotrebom dvostrukog bojenja HER2 gena i centromere kromosoma 17 (CEP 17).

Precizno određivanje izraženosti receptora HER2 ima prediktivni značaj jer određuje bolesnice koje će primati lijekove koji djeluju na taj receptor. HER2 pozitivni karcinomi dojke češći su kod premenopauzalnih žena, češće su višeg histološkog gradusa i lošije prognoze s kraćim preživljenjem. Bolesnice s HER2 pozitivnim karcinomima dojke primaju terapiju trastuzumabom ili nekim drugim HER2 inhibitorom. Lijek ima dobru podnošljivost, primjenjuje se supkutano, a glavna nuspojava lijeka je kardiotsičnost pa je prije, za vrijeme i nakon provođenja terapije trastuzumabom potrebno učiniti UZV srca.

1.2.1.5. Molekularna subklasifikacija tumora dojke

Na molekularnom nivou karcinom dojke je heterogena bolest s različitim obrascima genske ekspresije koji dovode do razlika u prognozi. Nastanku raka pridonose promjene koje dovode do pojačane proliferacije, promjene na razini čimbenika rasta i njihovih receptora, promjene u regulaciji staničnog ciklusa, apoptotskih puteva, angiogeneze i popravka DNA (17).

Osim raznolikosti u genetičkim promjenama razvoju raka doprinosi i heterogenost epigenetičkih promjena. U zadnjih 20-ak godina znatni se naponi ulažu u molekularnu klasifikaciju na osnovu koje bi se tumori dojke uspješno liječili. Na osnovu rezultata genske izraženosti pojedinih gena koji su aktivni ili potisnuti u odnosu na zdravo tkivo dojke definirano je pet molekularnih podskupina (Slika 11) (75).



Slika 11. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke na osnovi rezultata genske izraženosti
Preuzeto iz: Sørlie i sur., 2001. (75)

Na osnovu imunofenotipa karcinome dojke svrstavamo u osnovne (intrinzične) podtipove koji većinom odgovaraju molekularnoj klasifikaciji prikazani u Tablici 2 (4, 17, 75, 76).

Tablica 2. Kriteriji za klasificiranje karcinoma dojke u intrinzične imunofenotipove na osnovi imunohistokemijske izraženosti receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR), receptora 2 za epidermalne čimbenike rasta (HER2) i biljega proliferacije Ki-67

	Intrinzični imunofenotip	Izraženost ER	Izraženost PR	Izraženost HER2	Izraženost Ki-67
LUMINALNI	luminalni A	pozitivan	pozitivan $\geq$ 20%	negativan	$\leq$ 20%
	luminalni B	pozitivan	< 20% ili negativan	negativan	>20%
	HER2 pozitivan	pozitivan	bilo koji	pozitivan	bilo koji %
NELUMINALNI	HER2 tip (neluminalni)	negativan	negativan	pozitivan	bilo koji %
	Trostruko negativan	negativan	negativan	negativan	bilo koji %

Luminalni A podtip karcinoma je najčešći i javlja se u oko 40% do 50% slučajeva (76). Kod LumA podtipa karcinomi dojke imaju izražene hormonske receptore (ER/PR pozitivni), HER2 je negativan, najčešće su niskog gradusa s niskim proliferacijskim indeksom (Tablica 3). Dobro reagiraju na endokrinu terapiju koja je uz kirurški zahvat glavni modalitet liječenja. Ponekad onkolozi odluku o primjeni kemoterapije kod ovih bolesnica donose temeljem MammaPrint ili Oncotype DX testa ako bolesnice pokazuju visoki rizik od povrata bolesti. Kod LumA tumora zabilježena je visoka prevalencija PI3KCA mutacija od 49% (4).

Luminalni B podtip karcinoma javlja se u oko 25% slučajeva. Prema kriterijima navedenim u Tablici 3, dijelimo ih u dvije podskupine:

- a) Luminalni B/HER2 negativni karcinomi koji imaju izražene hormonske receptore, a nemaju prekomjerno izražen receptor HER2 što ih čini kandidatima za endokrinu terapiju, ali zbog visokog proliferacijskog biljega najčešće u kombinaciji s citotoksičnom terapijom. Višeg su gradusa nego luminalni A tumori te u odnosu na njih imaju lošiju prognozu (76).
- b) Luminalni B/HER2 pozitivni karcinomi uz izražene steroidne receptore pokazuju izraženost HER2 receptora. Čine oko 30% luminalne B podskupine. Liječe se kombinacijom kemoterapije, anti-HER2 i endokrine terapije.

HER2/neu tip karcinoma dojke izražava samo receptor HER2, čine oko 15% karcinoma dojke i agresivnijeg su kliničkog tijeka. Uvođenjem anti-HER2 terapije prognoza ovih bolesnica se poboljšala. Neka istraživanja na osnovi molekularne analize izraženosti gena utvrdila su da dio HER2+ karcinoma pripada „basal like“ skupini a dio skupini koja izražava luminalne biljege.

Trostruko negativni karcinom dojke (eng. *triple negative breast cancer*, TNBC) pripada „basal-like“ tipu karcinoma koji ne izražava molekularne biljege ER/PR ni HER2, a čini oko 15% svih karcinoma. Češće se javljaju kod mlađih žena, agresivnijeg su tijeka, visokog gradusa s izraženom proliferacijskom aktivnošću što ih čini osjetljivima na kemoterapiju. Dio tih tumora izražava bazalne mioepitelne citokeratine (CK5/6, CK14, CK17), laminine, p-kadherin, fascin, kaveoline 1 i 2 i receptore za faktore rasta 1 (EGFR) . Vrlo često imaju i mutacije tumor proteina p53, a i većina karcinoma s BRCA1 mutacijom pripada ovoj podskupini. Na temelju molekularnih analiza TNBC se mogu podijeliti u više podskupina npr. mezenhimalni, luminalni AR (s pozitivnim androgenim receptorima), basal-like imunosuprimiran i basal-like imunoaktiviran. Upotrebom NGS (eng. *next generation sequencing*) analiza može se izračunati ukupno tumorsko mutacijsko opterećenje (eng.

Tumor mutation burden) koje je najveće kod TNBC, posebno kod luminalne AR podskupine, a povezano je s odgovorom na imunoterapiju (59).

1.2.1.6. Neoadjuvantna terapija karcinoma dojke

Neoadjuvantna terapija (NAT) primjenjuje se kod karcinoma dojke većih od 2 cm te kod lokalno uznapredovale bolesti s pozitivnim limfnim čvorovima neovisno o veličini bolesti. Iako se može primijeniti kod bilo kojeg imunofenotipa najbolje odgovore daje kod trostruko negativnih i HER2 pozitivnih tumora dojke te kod hormonski pozitivnih tumora koji imaju visok proliferacijski indeks (17, 77). Iako nije dokazana dobit u preživljenju primjenom NAT može se procijeniti učinak primjenjivanog kemoterapeutika, smanjenjem većih tumora može se primijeniti konzervativniji kirurški zahvat te tako poboljšati kvaliteta života bolesnice. Stupanj odgovora na NAT važan je prognostički faktor, kod lošijih odgovora veći je stupanj lokalnog recidiva.

Odluke o načinu liječenja bolesnica s dijagnosticiranim karcinomom dojke donosi multidisciplinarni tim. Patolog ima ključnu ulogu u timu jer osim što postavlja dijagnozu na uzorcima iglene biopsije, određuje prognostičke i prediktivne čimbenike o kojima ovisi odluka o načinu liječenja. Kod iglene biopsije potrebno je odrediti histološki tip, imunohistokemijski odrediti izraženost ER, PR, HER2 i Ki-67 te odrediti stupanj diferenciranosti jezgre obzirom da je uzorak dobivenog tkiva premalen za određivanje stupnja diferenciranosti tumora (17).

Kao što se u radiološkom nalazu koriste dijagnostičke kategorije u sklopu BI-RADS sustava tako se i u patohistološkom nalazu biopsije širokom iglom koriste B-kategorije (B1-normalno tkivo dojke, B2-benigne lezije, B3-lezije neizvjesnog malignog potencijala, B4-

lezije sumnjive na malignitet, B5-maligna lezija) pri čemu je B5a oznaka za *in situ* karcinom a B5b oznaka za invazivni karcinom dojke (17).

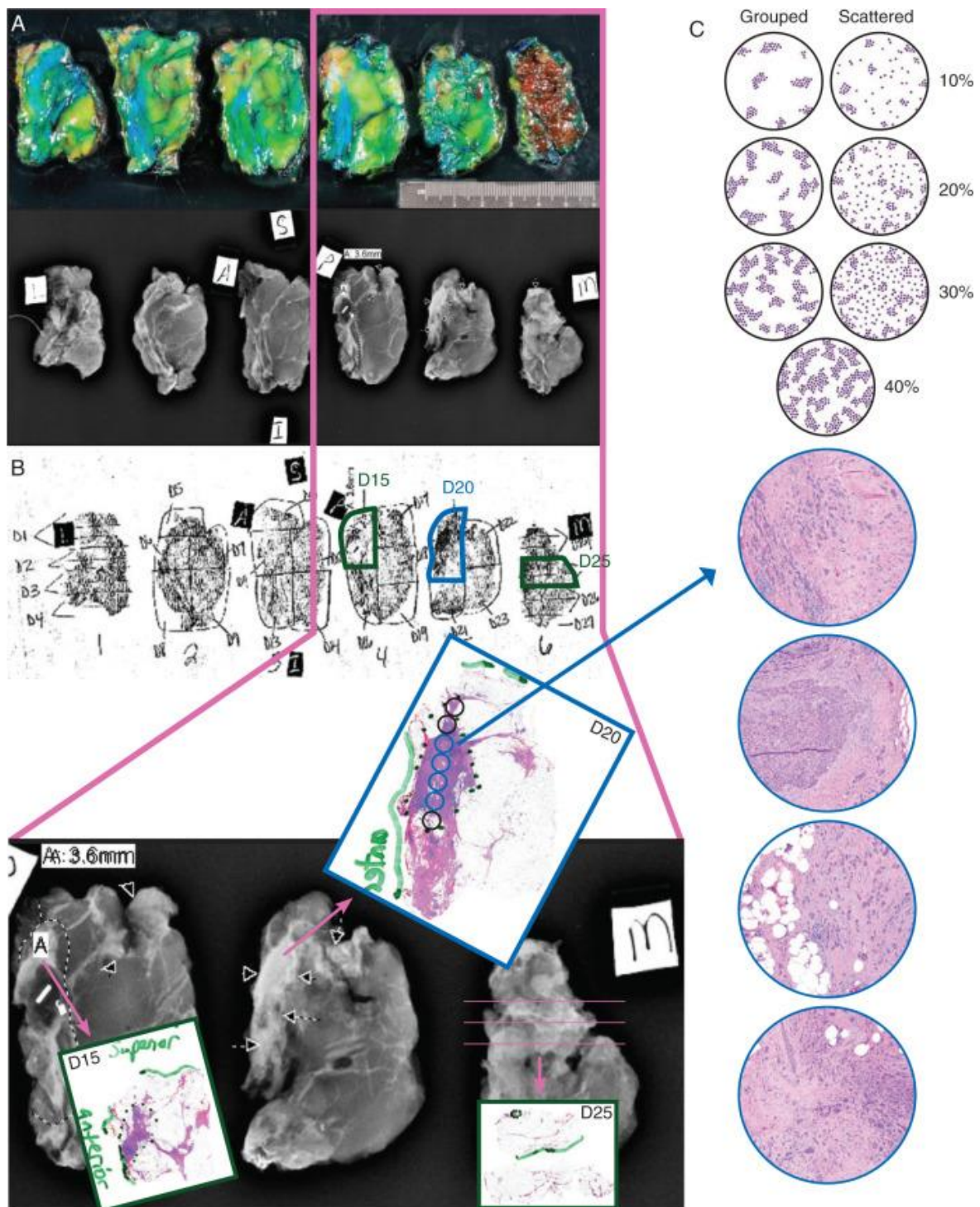
Uvođenje neoadjuvantne terapije u liječenje bolesnica s karcinomom dojke stavlja pred patologa važnu ulogu u procjeni učinka terapije. Kako bi se patolog što bolje snašao pri pregledu resekcijskog materijala potrebno je već kod uzimanja uzoraka iglene biopsije tumor obilježiti metalnim markerom/klipsom.

Postavljanje markera unutar tumora omogućuje i bolje praćenje regresivne dinamike tumora radiološkim metodama. U slučaju MR-om procijenjenog potpunog radiološkog odgovora, tumorsko se ležište može neposredno prije operativnog zahvata dodatno obilježiti markacijskom žicom pomoću UZV. Također se kod pošteđenih zahvata može odstranjeno tkivo snimiti RTG-om kako bi se dokazalo postojanje titanijskog markera.

Nakon provedene NAT ovisno o veličini i smještaju tumora, a djelomično i željama bolesnice, kirurg odstranjuje segment dojke s tumorom, radi subkutanu mastektomiju s poštedom kože i bradavice ili ablaciju dojke a ovisno o prethodnoj zahvaćenosti limfnih čvorova radi disekciju aksile ili biopsiju sentinel limfnih čvorova. Resecirani se materijal šalje na patologiju svjež, bez uranjanja u 10% puferirani formalin, uz popratnu uputnicu s podacima o provedenoj NAT, imunofenotipu prije NAT, smještaju tumorske lože, MR-om procijenjenom odgovoru na terapiju te podacima o zahvaćenosti limfnih čvorova (78). Dobiveni podatci će omogućiti bolji pristup makroskopskoj i mikroskopskoj evaluaciji ostatnog tumorskog tkiva. Tretirani tumor je obično mekši od netretiranog, teže se makroskopski uočava, a u slučajevima dobrog ili potpunog odgovora uočavaju se rahle fibrozne i edematozne promjene tumorske lože unutar kojih je potrebno naći metalnu klipsu (79). Nakon što se makroskopski utvrdi tumorska se loža treba izmjeriti i odrediti udaljenost od rubova resekcije. Uzorke tumorske lože potrebno je mapirati kako bi lakše odredili

mikroskopsku veličinu tumorske lože u dvije dimenzije kao i veličinu ostatnog tumora (80). Stupanj uzorkovanja ovisi o veličini tumorskog tkiva prije NAT kao i o makroskopski vidljivoj ostatnoj bolesti. Manja tumorska ležišta najbolje je preuzeti u cijelosti dok se kod velikih preporuča preuzeti po 5 reprezentativnih blokova poprečnog presjeka na svakih 1-2 cm do ukupno 25 parafinskih blokova tkiva (Slika 12) (80, 81). Američki FDA preporuča uzeti minimalno 1 blok po svakom cm veličine tumora prije terapije do maksimuma od 10 blokova. Opseg uzimanja uzoraka ovisiti će o procjeni patologa od slučaja do slučaja.

Neoadjuvantna terapija može uzrokovati promjene tumorskih stanica u vidu povećanja ili smanjenja jezgre, vakuolizacije jezgre, kariorekse, kariolize i piknoze. U stromi tumora može dovesti do fibroze, elastoze, kolagenizacije, neovaskularizacije, mikrokalcifikata kao i do hijalinizacije krvnih žila. Može doći do fibrinoidne nekroze kao i mucinozne promjene tumorske strome. U stromi tumora mogu se vidjeti umnožene plazma stanice, nakupine histiocita kao i multinuklearnih stanica. Također možemo vidjeti atrofiju okolnog parenhima i kancerizaciju duktusa (17, 79, 82).



Slika 12. Primjer mapiranja segmenta dojke s tumorom nakon provedene NAT. A, uzorak je serijski narezan i snimljen radiološki. B, dijagram omogućuje patologu usporedbu mikroskopskog, makroskopskog i radiološkog nalaza te rekonstrukciju veličine tumorske lože. C, celularnost tumora je određena na prerezu s najviše mikroskopski vidljive rezidualne bolesti te uspoređena s kompjuterski određenim standardom zbog bolje reproducibilnosti. Preuzeto iz: Bossuyt i sur., 2015. (78)

U slučaju ostatnog tumora potrebno je odrediti histološki podtip i stupanj diferenciranosti tumora imajući u vidu da se pod utjecajem NAT mogao promijeniti stupanj diferenciranosti jezgre kao i da NAT snižava mitotski indeks. Niski mitotski indeks nakon NAT povezan je s boljim DFS-om i smanjenim rizikom od metastaza (80). Prisutnost limfovaskularne invazije važan je prognostički čimbenik, te se u slučaju odsutnosti invazivnih tumorskih fokusa ili metastaza u limfnim čvorovima, a njene prisutnosti, ne smatra kompletan patološki odgovor (pCR). Zbog mogućnosti tek mikroskopski vidljivih tumorskih fokusa potrebno je u nalazu definirati udaljenost tumora od ruba resekcije. Patolog treba odrediti veličinu ostatnog tumora unutar tumorskog ležišta te odrediti ypTN stadij (80, 81). NAT može smanjiti veličinu tumora i/ili dovesti do smanjenja celularnosti tumora. Celularnost tumora može se smanjiti heterogeno pa se mikroskopski unutar tumorske lože vide manja žarišta invazivnog tumora međusobno odvojena fibroznom stromom. Kod određivanja ypT uzima se veličina najvećeg kontinuiranog tumorskog žarišta, u slučaju više tumorskih fokusa uzima se veličina najvećeg i dodaje se oznaka m (multipli tumori) (4, 5).

1.2.1.7. Ostatno tumorsko opterećenje

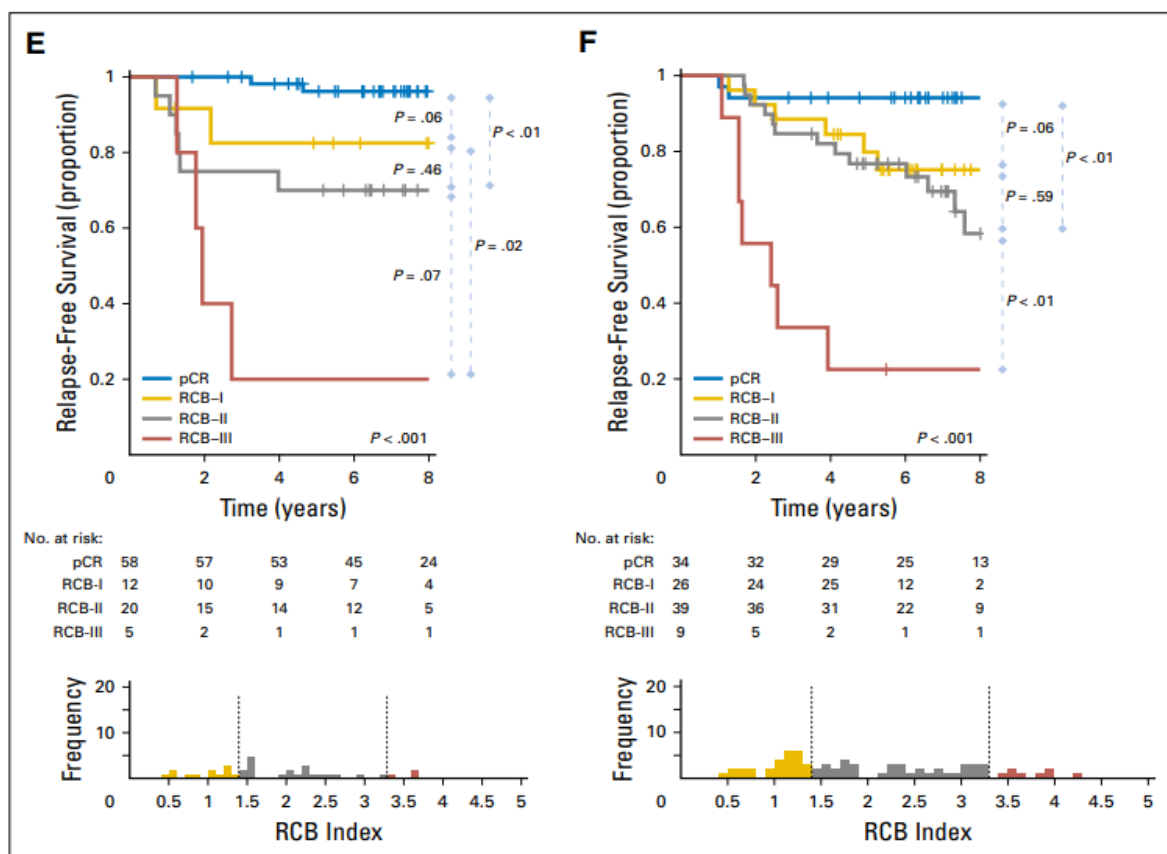
Pri procjeni odgovora tumora na NAT koristimo se McAndersenovim kriterijima za određivanje RCB score /grupa (eng. *Residual cancer burden*, ostatno tumorsko opterećenje (83). Pri određivanju RCB-a mjeri se veličina ostatnog tumora u dvije dimenzije uključujući fibrozu između tumorskih fokusa, celularnost tumora u postotku, postotak prisutnosti neinvazivne komponente, broj pozitivnih limfnih čvorova te promjer najveće metastaze u limfni čvor. Izračun se provodi vrlo kompliciranom formulom dostupnom online na stranici <http://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert3> (83). Unosom traženih podataka dobije se vrijednost RCB scorea te procjena RCB grupe. RCB ima 4 grupe

pri čemu RCB-0 obuhvaća bolesnice s potpunim patološkim odgovorom, RCB-I bolesnice s minimalnom ostatnom bolešću i minimalnim rizikom od povrata bolesti (score do 1,36), RCB-II bolesnice s umjerenim rizikom od povrata bolesti dok RCB-III (score iznad 3,28) ima proširenu ostatnu bolest, slab odgovor na NAT i veliki rizik od povrata bolesti. Patološki potpun odgovor se definira kao odsutnost invazivnog tumora, odsutnost limfovaskularne invazije i odsutnost metastaza u limfnim čvorovima. Dozvoljena je prisutnost *in situ* komponente tako da pCR obuhvaća ypTisypN0 i ypT0ypN0 stadij.

Kod analize limfnih čvorova potrebno je u nalazu navesti broj i veličinu izoliranih limfnih čvorova, odrediti veličinu najvećeg metastatskog depozita te definirati postoji li proboj tumorskih stanica kroz kapsulu limfnog čvora. Također se preporuča navesti postoji li fibroza i u koliko limfnih čvorova. Kako se unutar fibroze mogu nalaziti histioci ti pojedinačne raspršene ostatne tumorske stanice iste možemo dokazati imunohistokemijskim bojenjem s citokeratinom. U slučaju nalaza bilo kojeg oblika rezidualne bolesti u limfnim čvorovima, izolirane tumorske stanice, mikro ili makrometastaze, ne klasificira se pCR. Čak i u bolesnica s nodalnim pCR lokalne stope recidiva su veće nego kod bolesnica koje nisu imale zahvaćene limfne čvorove. Promjene o zahvaćenosti limfnih čvorova pružaju važne prognostičke informacije pa je preporuka Internacionalne grupe da se broj limfnih čvorova s efektom terapije uključi u patološki nalaz. Ukoliko limfni čvorovi nisu odstranjeni nakon provedene NAT nije moguće odrediti RCB. Ne preporuča se kirurško odstranjenje sentinel limfnog čvora prije provođenja NAT, jer se slučaju da se radi o metastatskom čvoru ne može procijeniti ni odgovor na terapiju niti procijeniti ypN (78, 80).

RCB je jednostavan, reproducibilan i klinički validiran sustav s podacima o dugotrajnom praćenju (80). RCB indeks i grupe prognostičke su za sve imunofenotipove s najvećom važnošću za HER2+ i TNBC. Te dvije kategorije postižu najviše stope pCR-a (50-85% slučajeva) (84) s dužim vremenom do povrata bolesti kao i boljim preživljenjem (Slika 13).

RCB je manje informativan za HR+ tumore jer oni češće kasnije rekuriraju za razliku od HER2+ i TNBC koji imaju najveći rizik povrata bolesti u prvih 3-5 godina od operacije (85). Retrospektivne studije pokazale su da HER2 IHC 3+ tumori postižu češće pCR od HER2 2+/HER2 amplificiranih (86), a niži stupanj pCR imaju i HR+/HER2+ tumori, pri čemu status PR nije imao utjecaj na pCR. Veći stupanj postizanja pCR je bio kod HER2 IHC 3+ tumora koji su liječeni kemoterapijom u kombinaciji s dualnom anti-HER2 blokadom (59%) nego kod onih koje su primale kemoterapiju u kombinaciji s jednim anti-HER2 agansom (50%) (86).



Slika 13. Kaplan-Meierove krivulje RFS-a prema RCB kategorijama. E, za skupinu HR+/HER2+ te F, za HR+/HER2- skupinu. Preuzeto iz: Symmans i sur., 2017. (87)

Nema konsenzusa treba li ponavljati imunohistokemijsku analizu ER, PR, HER2 i Ki-67 nakon NAT na rezidualnom tumoru. Preporuke Sekcije za dojku Hrvatskog društva patologa su da se ponovi ono što je na iglenoj biopsiji bilo negativno, odnosno da se u slučaju umjerenog ili lošeg odgovora (RCB II i III) ponovi sve. Rezultati više retrospektivnih i prospektivnih studija pokazuju da nakon NAT može doći do promjena u izraženosti ER, PR i HER2 u 10-35%. Češće se HER2 kao i ER i PR status mijenjaju iz pozitivnog u negativan, puno rjeđe obrnuto (81, 84). Kako promjene u izraženosti ER i HER2 nakon NAT mogu dovesti do promjena u načinu liječenja te do promjena u prognozi više autora preporučuje ponavljanje imunohistokemijske analize. Razlozi promjene mogu biti heterogenost tumora, promjena kao mehanizam rezistencije tumora, selekcija klonova rezistentnih na primljenu NAT ili negativna regulacija ekspresije hormonskih receptora zbog ovarijske supresije indicirane kemoterapijom (84, 86, 88).

1.2.1.8. Terapija karcinoma dojke

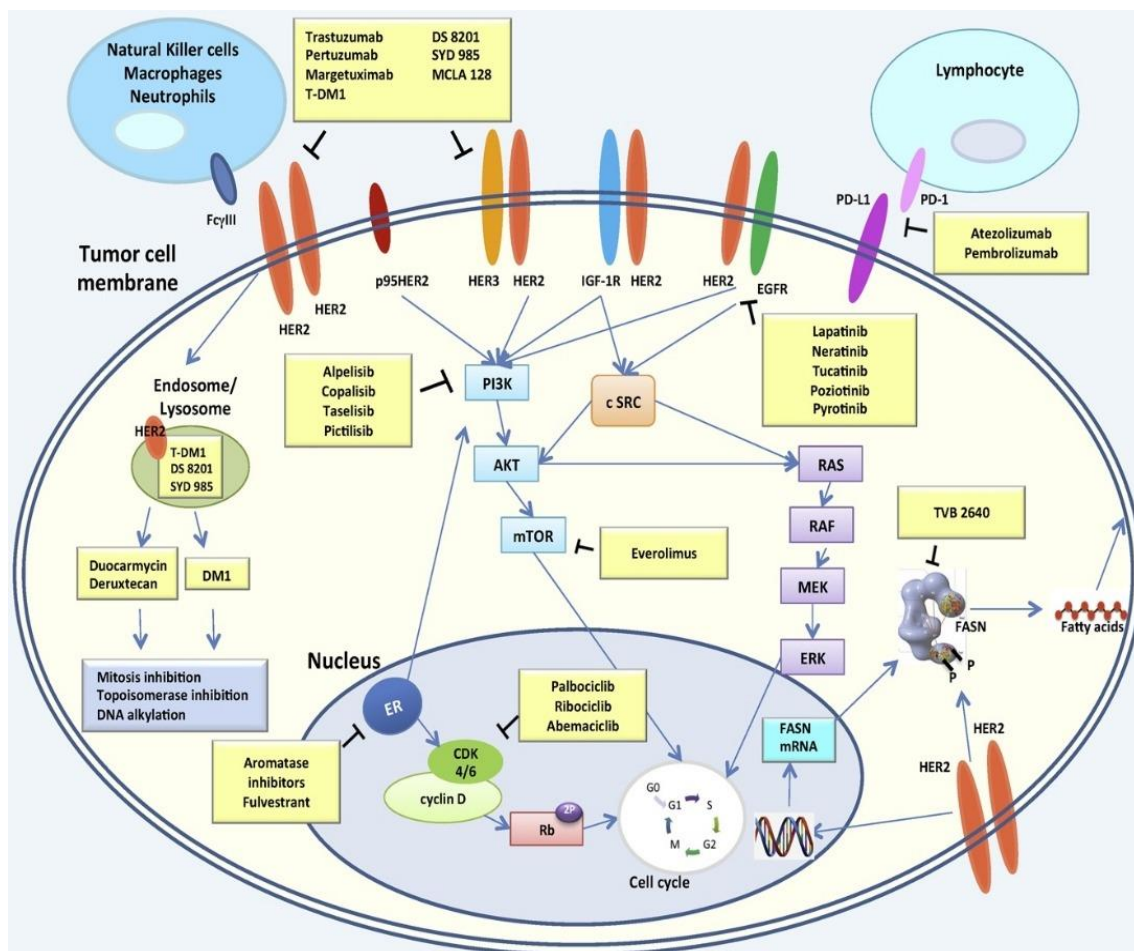
Personalizirano liječenje karcinoma dojke obuhvaća optimalan terapijski pristup na osnovu kliničkih karakteristika maligne bolesti, općeg stanja i dobi bolesnice te patohistoloških i molekularnih abnormalnosti tumora. Nakon postavljanja dijagnoze odluku o načinu liječenja treba donijeti multidisciplinarni tim. Standardni terapijski modaliteti u liječenju karcinoma dojke uključuju kirurško liječenje, zračenje, kemoterapiju, endokrinu terapiju te usmjerenu (ciljanu) terapiju. Modalitet liječenja ovisi o stadiju u kojem je bolest dijagnosticirana. Kod inicijalno metastatskog karcinoma dojke koji je neizlječiva bolest nastoji se postići ravnoteža između koristi terapije i toksičnosti terapije sa svrhom povećanja preživljenja i održanja kvalitete života.

Neoadjuvantna terapija (NAT) je liječenje koje se provodi prije konačnog kirurškog liječenja. Povijesno gledano počinje se koristiti 70-tih godina prošlog stoljeća u liječenju lokalno uznapredovale, inoperabilne bolesti dojke (17). U posljednjih nekoliko godina primjenjuje se u liječenju lokalno uznapredovalog raka dojke agresivnijih imunofenotipova. Cilj NAT je smanjiti veličinu tumora što omogućuje manji opseg kirurškog zahvata uz bolji kozmetički učinak, bolju kvalitetu života te manje nuspojava lokalnog liječenja poput limfedema (17, 81). Kirurško liječenje slijedi nakon NAT pri čemu se uklanja ležište tumora s okolnim tkivom. Opseg kirurškog zahvata ovisi o lokalizaciji, veličini i proširenosti tumora, o odnosu veličine tumora i veličine dojke, a donekle i o željama bolesnice te mogućnosti primarne ili sekundarne rekonstrukcije. Tako se operativnim zahvatom može ukloniti cijela dojka (radikalna mastektomija, supkutana mastektomija s pošedom kože i bradavice) ili samo dio dojke (segmentektomija), a ovisno o kliničkoj procjeni zahvaćenih limfnih čvorova radi se uklanjanje svih pazušnih limfnih čvorova (limfadenektomija) ili biopsija sentinel limfnih čvorova (17).

Terapija zračenjem ili radioterapija podrazumijeva izlaganje tkiva ciljanom zračenju sa svrhom reduciranja ostatnih tumorskih stanica nakon kirurškog tretmana, čime se smanjuje rizik od povrata bolesti (17). Kod bolesnica s hormonski ovisnim karcinomom dojke terapija uključuje nekoliko modaliteta ovisno o dobi bolesnice i menopauzalnom statusu. Hormonska ili endokrina terapija može biti ablativnog i aditivnog tipa. Ablativnom endokrinom terapijom uklanjamo glavne endogene izvore estrogena kao što su jajnici i najčešće se preporuča ženama u premenopauzi. Aditivnom terapijom blokiraju se učinci estrogena lijekovima kao što su: inhibitori aromataza, koji blokiraju enzim aromatazu ključan u sintezi estrogena (anastrozol, letrozol, eksemestan); selektivni modulatori estrogenskih receptora (analozi estrogena) koji blokiraju hormonske receptore (tamoksifen) i regulatori uništavanja receptora estrogena (fulvestrant) (17, 84). Bolesnice koje imaju

hormonski neovisni rak dojke primaju citotoksične lijekove (kemoterapija) koji djeluju na stanice u proliferaciji. Adjuvantna kemoterapija indicirana je kod svih visokorizičnih bolesnica, standardno uključuje antracikline i taksane. Najučinkovitiji je protokol 4xAC+12x paklitaksel dok se kod mlađih bolesnica preporučuje nešto toksičniji tzv. „dose dense“ protokol (17).

Sistemska terapija ima negativan učinak i na zdrave stanice u diobi pa njenom primjenom dolazi do niza nuspojava. Liječenje karcinoma dojke u zadnjih 15-ak godina usmjereno je prema ciljanom liječenju koje djeluje selektivno na tumorske stanice čime se smanjuje negativno djelovanje na zdrave stanice. Primjenom specifičnih protutijela i malih molekula govorimo o biološkoj terapiji. Tumorske stanice na svojoj površini imaju izražene specifične biljege na koje se može ciljano djelovati monoklonskim protutijelima. Takva terapija uglavnom blokira receptore za faktore rasta te aktivira imunološki sustav. Kod terapije malim molekulama lijekovi ulaze u tumorsku stanicu gdje ometaju unutarstanične signalne puteve koji tumorsku stanicu potiču na rast i širenje na udaljena mjesta u tijelu. Anti-HER2 monoklonsko protutijelo trastuzumab prva je monoklonska terapija korištena u liječenju HER2 pozitivnog karcinoma dojke (71). Terapija HER2 pozitivnog karcinoma dojke obuhvaća više lijekova koji se koriste u različitim fazama liječenja, ovisno i o stadiju bolesti te prethodno korištenim modalitetima liječenja (Slika 14) (42, 89–93).



Slika 14. Terapijske opcije u liječenju HER2 pozitivnih karcinoma dojke. Preuzeto iz: Vernieri i sur., 2019. (93)

Trenutni standard u neoadjuvantnom liječenju HER2+ karcinoma dojke je kemoterapija bazirana na antraciklinima i taksanima uz dualnu HER2 blokadu trastuzumabom i pertuzumabom (91,94). U slučaju postizanja pCR nastavlja se s primjenom trastuzumaba, ili dualnom terapijom trastuzumaba i pertuzumaba kod visoko rizičnih bolesnica koje su prethodno imale pozitivne limfne čvorove. Na temelju pozitivnih rezultata KATHARINE studije bolesnicama s ostatnom bolešću daje se T-DMI kroz 14 mjeseci jer njegova primjena produžuje vrijeme do povrata bolesti (DFS) (94, 95). Trastuzumab se koristi i u adjuvantnom liječenju (do godine dana) kao i kod liječenja metastatske bolesti. Kod metastatskog proširenog HER2+ raka dojke mogu se primijeniti konjugati lijeka s protutijelom (engl.

antibody-drug conjugates, ADC) (ado-trastuzumab-emantasine, fam-trastuzumab-deruxtecan) kao i male molekule, inhibitori tirozin-kinaza koji se primjenjuju peroralno (lapatinib, neratinib, tucatinib) (96)(97). HR+/HER2- bolesnice u stadiju proširene bolesti mogu primati CDK4/6 inhibitore (pablociclib, ribociclib, abemaciclib), mTOR inhibitor everolimus, a u slučaju postojanja mutacije u PI3KCA genu, koja je prisutna u oko 30-40% bolesnica, mogu biti liječene alpelisibom.

Olaparib i talazoparib su PARP inhibitori koji svoju primjenu imaju u liječenju bolesnica s TNBC i *BRCA1/2* mutacijama. Sacituzumab-govitecan primjenjuje se kod metastatskog TNBC kao i imunoterapija „check-point“ inhibitorima PD-1 i PD-L1 kod PD-1/PD-L1 pozitivnih bolesnica kao što su atezolizumab i pembrolizumab (98).

Na temelju dosadašnjih rezultata kliničkih ispitivanja može se zaključiti da će i kod nekih drugih podtipova karcinoma dojke imunoterapija primjenom protutijela koji blokiraju interakcije između molekula u imunosnim mehanizmima negativne povratne sprege postati novi modalitet liječenja (17).

1.3. Imunološki odgovor na tumore

Malignom transformacijom stanice stvaraju abnormalne ili nespecifične antigene koje izražavaju na svojoj površini ili izlučuju u mikrookoliš. Imunološki sustav je sposoban identificirati i uništiti stanice s neoplastičnim potencijalom, jer prepoznaje abnormalne antigene na površini stanice kao "ne-svoje" ili strane. Budući da su strane tvari obično opasne za tijelo imunološki sustav je programiran da ih uništi. Ovo stalno praćenje tijela za male tumore poznato je kao imunološki nadzor, a ukazuje na to da tijelo može postaviti zaštitni odgovor na rak. Uobičajen primjer je imunološki odgovor protiv infekcija virusima koji

uzrokuju tumore, kao infekcija papiloma virusima u ženskom genitalnom traktu ili protuupalne reakcije zbog različitih lezija, čime se prigušuje aktivnost čimbenika u mikrookolišu tkiva koji olakšavaju razvoj tumora (99).

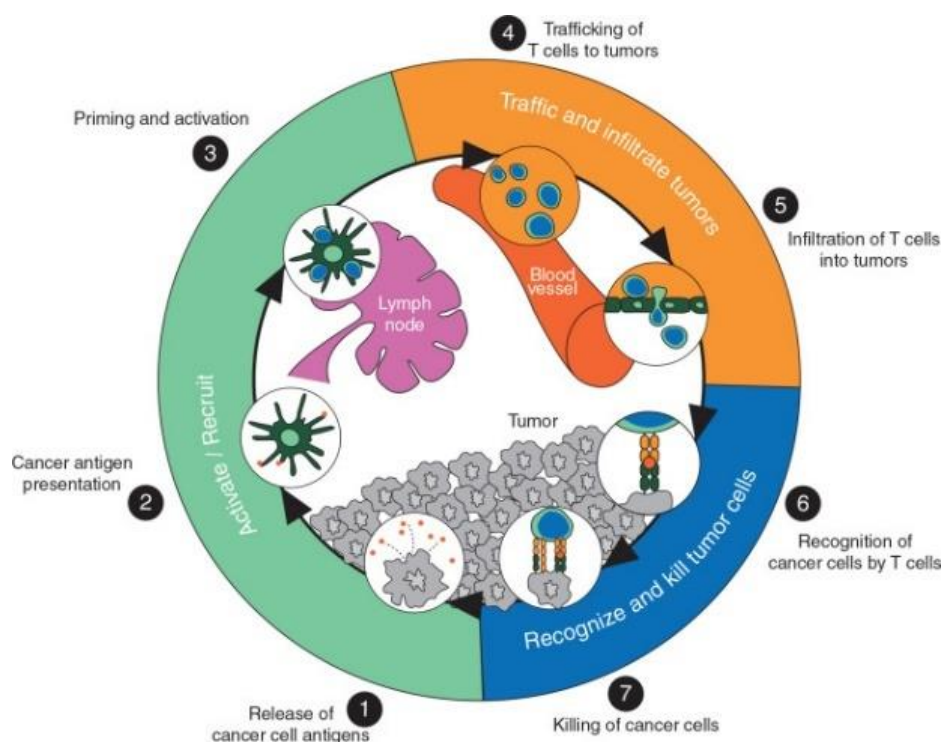
Imunološki sustav reagira na dvije opće vrste tumorskih antigena: tumor-specifične antigene (engl. *tumor-specific antigens*), koji su jedinstveni za tumorske stanice, i antigene povezane s tumorom (engl. *tumor-associated antigenes*), koji se pojavljuju i na normalnim stanicama i na stanicama raka. Antigeni specifični za tumor predstavljaju fragmente novih peptida (malih proteina) koji se nalaze na površini stanice vezani za glavne molekule histokompatibilnog kompleksa klase I. U tom obliku ih T limfociti (T stanice) prepoznaju i eliminiraju. Novi peptidi potječu od aberantnih/mutiranih proteina ili od proizvodnje proteina koji nije uobičajeno izražen u pojedinim stanicama. Prvi tumor za koji je utvrđeno da nosi tumorski specifičan antigen bio je maligni melanom. Činjenica da melanomi povremeno prolaze kroz "spontanu" regresiju kod nekih pojedinaca ukazuje na to da imunološki odgovor može biti učinkovit u eliminaciji tih tumorskih stanica. Antigeni povezani s tumorom na tumorskim stanicama nisu kvalitativno različiti u strukturi od antigena koji se nalaze na normalnim stanicama, ali su prisutni u značajno većim količinama. Zbog svog obilja često se izlijevaju u krvotok. Povišene razine tih antigena mogu se koristiti kao tumorski biljezi tj. pokazatelji razvoja tumora.

Ako je imunološki sustav potpuno funkcionalan, ima zadivljujuću sposobnost da sam ubija stanice raka. Dendritičke stanice koje se formiraju u imunološkom sustavu informiraju se o „neprijateljskim stanicama“ i tada aktiviraju T-stanice i NK stanice ubojice. Svaka NK stanica može ubiti jednu stanicu raka. Dendritičke stanice mogu proizvesti oko 40 do 60 milijardi aktiviranih stanica dnevno. Jedan značajan primjer imunološkog nadzora aktivan je kod osoba s nasljednim nepolipoznim karcinomom debelog crijeva (Lynch sindrom). Te osobe nasljeđuju mutacije u genima popravka krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*

genes, *MMR*) što za posljedicu ima mnoge aberantne proteine. Kada se takvi aberantni proteini pojave na površini stanica prepoznati su kao strani i stanice se uništavaju. Tumori koji se ipak razviju kod tih osoba uspjeli su izbjeći tjelesni imunološki nadzorni sustav.

Tumor-infiltrirajući limfociti (TIL) su mononuklearne upalne stanice koje infiltriraju u tumor i njegovu stromu. Nastaju kao odgovor domaćina na tumorske stanice, a kod tumora s visokim postotkom TIL-a postiže se bolji odgovor na NAT posebno kod TNBC i HER2 pozitivnih karcinoma dojke gdje se gusti upalni infiltrati mogu naći kod 75% tumora (100). Određuju se na HE stakalcu tumora s najviše mononuklearnih upalnih stanica, kao postotak intratumorske strome zahvaćene limfocitima i plazma stanicama prema smjernicama internacionalne grupe (International Immuno-Oncology Biomarker Working Group), a preporuke se mogu naći i na stranici www.tilsinbreastcancer.org (101,102). Neke novije studije pokazale su da je veći postotak TIL-a u rezidualnoj bolesti nakon NAT kod TNBC važan neovisan pokazatelj boljeg preživljenja dok je kod HER2+ tumora pokazatelj lošije prognoze (103–105). Iako se ne određuju rutinski kod svih karcinoma prema preporukama St. Gallena 2021. TILove bi trebali određivati kod svih TNBC, a prema preporuci WHO trebalo bi određivati kod TNBC i HER2-pozitivnih karcinoma dojke (4, 106).

Osnovni mehanizam imunološkog odgovora prikazan shematski na Slici 15 (107) uključuje oslobađanje tumorskih antigena (točka 1) koji se prezentiraju dendritičkim stanicama (točka 2) nakon čega slijedi aktivacija T-staničnog odgovora unutar limfnog čvora (točka 3). Aktivirane T-efektorske stanice putuju cirkulacijom do tumora (točka 4) gdje dolazi do infiltracije u područje tumora (točka 5). Prepoznavanjem tumorskih stanica kao stranih (točka 6) dolazi do uništavanja ciljane tumorske stanice (točka 7). Uništavanjem tumorske stanice dolazi do ponovnog oslobađanja tumorskih antigena i ciklus se ponavlja (107).



Slika 15. Shematski prikaz mehanizma imunološkog odgovora. Oslobođanje tumorskih antigena (1) te njihov kontakt s dendritičkim stanicama (2) dovodi do aktivacija T-staničnog odgovora unutar limfnog čvora (3). Aktivirane T-efektorske stanice se infiltriraju u područje tumora (4, 5) gdje prepoznavanjem tumorskih (6) dolazi do njihovog uništavanja. Preuzeto iz: Kim i sur., 2016. (107)

Tumori opisani kao "vrući" su oni koji pokazuju znakove upale, što znači da je tumor već infiltriran T-stanicama. Nasuprot tome, neimunogeni "hladni" tumori nisu infiltrirani T-stanicama, što je znak da imunološki odgovor iz nekog razloga ne radi. Nedostatak T-stanica otežava izazivanje imunološkog odgovora imunoterapijskim lijekovima. Ove vrste tumora uglavnom se liječe tradicionalnim terapijama (108). Većina karcinoma dojke, raka jajnika, raka prostate, raka gušterače i glioblastoma su tipično hladni tumori, što predstavlja problem za raširenu primjenu imunoterapije. Mikrookolina koja okružuje hladne tumore sadrži mijeloidne supresorske stanice (MDSC) i T-regulatorne stanice (Tregs), za koje je poznato

da prigušuju imunološki odgovor i inhibiraju T-efektorske stanice koje pokušavaju infiltrirati u tumor (108).

Brojne terapijske opcije razvijene tijekom zadnjih 20 godina, povećale su ili produžile preživljenje bolesnika s karcinomom. Istraživanja se fokusiraju na nekoliko metoda kojima bi pretvorili hladne tumore u tople i povećali osjetljivost na imunoterapiju kao što je cijepljenje, terapija „*check-point*“ inhibitorima kao PD-L1 ili utišavanje CXCL1 gena u tumorima (engl. „*knock out*“), te istraživanja terapijskim opcijama s ivermektinom, nivolumabom i monoklonskim protutijelom na CD40 (APX005M) (108–110). Jedna od terapija koja se sada razvija je imunoterapija stanicama. Ovaj oblik terapije koristi vlastite monocyte iz cirkulacije bolesnika oboljelih od raka, koje se umnažaju u kulturi i vraćaju u organizam kako bi pomogle organizmu u borbi protiv raka. Na ovaj način se jača se prirodna sposobnost organizma u borbi protiv raka što će u budućnosti biti vjerojatno više primjenjivani oblik ciljne terapije s malim nuspojavama i lakom podnošljivošću (109, 111).

1.3.1. PD-1/PD-L1 mehanizam

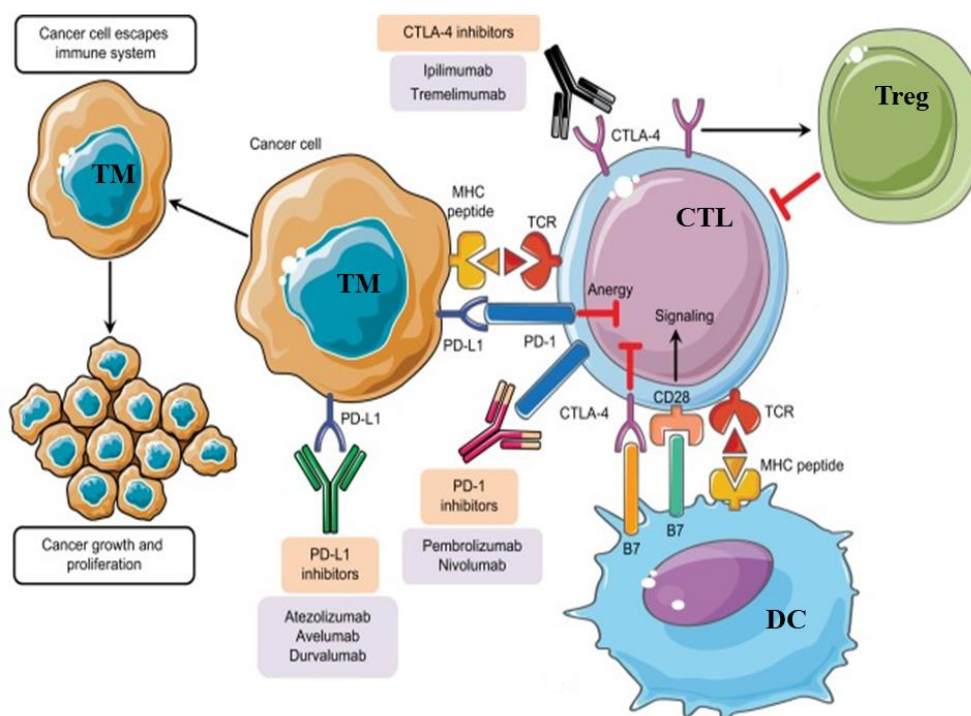
Osnovni mehanizam imunološkog odgovora čine aktivirani T limfociti (citotoksični T limfociti, CTL) koji prepoznaju antigene na tumorskim stanicama, vežu se na njih i izazivaju apoptozu. U cijelom procesu ključnu točku čini protein odgovoran za programiranu smrt stanice (PD-1) .

Humani PD-1 protein (gen PDCD1) je transmembranski glikoprotein koji pripada obitelji receptora CD28/CTLA-4 koji su kontrolne točke imunološkog odgovora (engl. *immune checkpoint proteins*). PD-1 je monomer koji sadrži jednu izvanstaničnu domenu nalik imunoglobulinu (IgV) kojom omogućava vezanje PD-1 na njegove ligande PD-L1 (gen B7-

H1; CD274) i PD-L2 (gen B7-DC; PDCD1LG2). Taj receptor, prisutan na T (CD8+) i B limfocitima te makrofazima, negativno regulira imunološki odgovor i sprječava nastanak autoimunih bolesti i to aktivacijom apoptoze antigen-specifičnih T limfocita u limfnim čvorovima ili redukcijom apoptoze u regulatornim T limfocitima (Treg) (112).

Pojačana izraženost PD-L1 liganda na tumorskim stanicama omogućava im izbjegavanje imunološkog odgovora. Zbog vezanja receptora PD-1 na limfocitima s ligandom PD-L1 na tumorskim stanicama dolazi do inhibicije citotoksične aktivnosti T-stanica (Slika 16) (112). Nemogućnost aktiviranja citotoksičnih T limfocita (CTL) u tumorskom mikrokruženju dolazi kroz supresivni učinak Tregs-a ili putem imunoloških kontrolnih točaka omogućava stanicama raka da izbjegnu imunološki odgovor. B7 ligandi izraženi na dendritičkim stanicama (DC) koje prezentiraju antigen CTL, vežu se na CD28 receptor na CTL-u što dovodi do pojačanja T stanica i imunološkog odgovora. Alternativno, vezanje B7 liganada na citotoksični antigen 4 izražen na T stanicama (CTLA-4) potiskuje njihovu aktivnost. CTLA-4 također pojačava aktivnost Treg što dovodi do imunosupresivne aktivnosti. PD-1 se eksprimira na aktiviranim T stanicama i veže na svoj PD-L1 što dovodi do nesposobnosti reakcije CTL-a na antigen (anergenost) što dalje potiče inhibicijske signale (113).

U posljednje vrijeme je razvijeno nekoliko lijekova, koji kao monoklonska protutijela blokiraju interakcije PD-1 receptora s njegovim ligandima PD-L1 i PD-L2 čime se reaktivira antitumorski imunološki odgovor (112, 114–117). Učinak ovog oblik terapije nije vezan na porijeklo tumora već ima šire antitumorsko djelovanje, stoga ulazi u primjenu kod različitih vrsta tumora (melanomi, karcinomi pluća, dojke, pankreasa, urotelni karcinomi i dr.) (Slika 16) (112).



Slika 16. Mehanizam imunološkog odgovora i terapijske opcije inhibitora signalnog puta PD-1/PD-L1 u karcinomima. Farmakološka inhibicija imunoloških kontrolnih točaka monoklonskim protutijelima obnavlja antitumorsko djelovanje CTLa i ublažava imunosupresiju. Preuzeto i modificirano iz: Ayoub i sur., 2019. (112)

Uočeno je da bolesnici čiji tumori pokazuju više TIL bolje reagiraju na terapiju i imaju bolju prognozu te je već 2014. godine preporučeno praćenje TIL kao dio procjene odgovora na neoadjuvantnu terapiju karcinoma dojke (118–123). To se posebno odnosi na TNBC (120). Karcinomi dojke pokazuju fenotipsku heterogenost koja otežava terapijski pristup. Pored toga imunofenotipska podjela dodatno raščlanjuje karcinome dojke u podskupine. Konačno, i genotipska heterogenost vidljiva kroz opterećenost tumora brojnim mutacijama (engl. *tumor mutation burden*), posebice kod pojedinih imunofenotipova (TNBC i HER2-pozitivni), te prisutnost TIL-ova i izraženost PD-L1 čine dodatnu subkategorizaciju te pojačavaju terapijsku heterogenost karcinoma dojke (124). Daljnja istraživanja pokazuju da

su PD-L1 pozitivni tumori agresivniji po tijeku bolesti, ali su stoga kandidati za terapiju PD-L1 inhibitorima (114, 125).

Monoklonska imunoterapija PD-L1 inhibitorima uvedena je u terapiju metastatskog TNBC koji izražavanju PD-L1 u više od 1% intratumorskih i peritumorskih limfocita (126,127). Prema literaturi TNBC izražavaju PD-L1 receptor u 30-80% stanica, te u 40-65% limfocita (114, 120, 122, 123, 128–132). Prema meta-analizi Cirqueira i sur. (132), status PD-L1 u kod karcinoma dojke prosječno je pozitivan u 30% TIL-ova i 19% tumorskih stanica. Od toga su 37% TNBC, 29% su Luminal B, 16% Luminalni A, a HER2+ tek 11% slučajeva. Pozitivan PD-L1 korelira s lošijim preživljenjem (HR, 2,39; $p < 0,001$), ali bez utjecaja na DFS (HR 0,17; $p=0,252$). PD-L1 pozitivni bolesnici s lokalno uznapredovalim ili metastatskim TNBC kandidati su za terapiju PD-L1 inhibitorima. Neka istraživanja su pokazala da obilan TIL i pozitivan PD-L1 status u limfocitima korelira s pCR te duljim vremenom do progresije bolesti (130, 131).

PD-L1 biljeg nije idealan biomarker, jer čak i dio PD-L1 negativnih bolesnica ima dobar odgovor na terapiju PD-L1 inhibitorima, ali će njegova primjena sigurno biti veća kada se jasno definiraju skupine bolesnica koje će imati veću korist od takve terapije (133). Lošiji odgovor na NAT utječe na lošiju prognozu bolesti, ali su studije pokazale da bolesnice s jačim TIL imaju bolji pCR (121, 134). Stoga bi jedan dio bolesnica s HER2-pozitivnim karcinomima dojke zasigurno mogao imati koristi od terapije PD-L1 inhibitorima u nastavku liječenja (112, 135). Iako se trenutno kod TNBC određuje PD-L1 status u TIL, ne treba zanemariti potencijalni prognostički i prediktivni značaj izraženosti PD-L1 u tumorskim stanicama karcinoma dojke.

2. HIPOTEZA

Bolesnice s HER2-pozitivnim i PD-L1 pozitivnim karcinomima dojke imaju lošiji odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju i kraće vrijeme do progresije bolesti u usporedbi s HER2-pozitivnim i PD-L1 negativnim karcinomima dojke.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj istraživanja je imunohistokemijskom metodom bojenja utvrditi postotak izraženosti PD-L1 u TIL te postotak izraženosti PD-L1 u stanicama ostatnog tumora nakon neoadjuvantnog liječenja HER2 pozitivnog karcinoma dojke.

Specifični ciljevi su :

- 1) usporediti izraženost PD-L1 u ostatnom tumoru i TIL-u s odgovorom na terapiju (RCB I-III)
- 2) usporediti izraženost PD-L1 u ostatnom tumoru i TIL-u s intrinzičkim podtipom karcinoma dojke (LumB/HER2-pozitivni i neluminalni HER2-pozitivni)
- 3) usporediti izraženost PD-L1 u ostatnom tumoru i TIL-u s pojavom progresije bolesti i drugim kliničko-patološkim karakteristikama HER2 pozitivnih karcinoma dojke

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Bolesnice

Presječno retrospektivno istraživanje provedeno je na 122 uzorka HER2-pozitivnih karcinoma dojke. Osnovni uključni kriterij je nalaz HER2-pozitivnog karcinoma dojke (dijagnosticiran na uzorku dobivenom iglenom biopsijom) na osnovu kojeg su bolesnice završile neoadjuvantnu kemoterapiju uz anti-HER2 terapiju (trastuzumabom ili kombinacijom pertuzumaba i trastuzumaba). Bolesnice s karcinomima koji su imali pozitivne receptore na estrogen i progesteron primale su i antihormonsku terapiju po završenoj neoadjuvantnoj terapiji.

Pregledom baze podataka Klinike za tumore Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u razdoblju od 01. siječnja 2015. do 31. prosinca 2018. izdvojene su bolesnice koje su primile neoadjuvantnu anti-HER2 terapiju te su potom operirane u istoj ustanovi. U istraživanje smo uključiti samo bolesnice koje prema patohistološkom nalazu nisu imale kompletan odgovor na neoadjuvantnu terapiju, a nakon operacije ostatni tumor je procijenjen u kategorije prema MC Anderson kriterijima (RCB score/grupa) (83).

Podatke o dobi bolesnica i patohistološkim karakteristikama tumora prije i nakon neoadjuvantne anti-HER2 terapije (veličina tumora, histološki gradus (I, II, III), broj zahvaćenih limfnih čvorova, izraženost receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR), izraženost proliferacijskog biljega Ki67) te RCB score/grupa preuzeti su iz patohistoloških nalaza bolesnica dostupnih u elektroničkoj bazi Klinike za tumore KBCSM.

Podatke o progresiji bolesti preuzeli smo iz radioloških nalaza i povijesti bolesti bolesnica dostupnih iz elektroničke baze podataka Klinike za tumore KBCSM. Progresijom bolesti smatrali smo pojavu lokalnog recidiva, lokoregionalnih ili udaljenih metastaza. Bolesnice

smo pratili u rasponu od 21 do 73 mjeseca s medijanom praćenja je 33 mjeseca. Zadnji pregled podataka obavljen je 31. listopada 2021.

Istraživanje je jednostruko slijepo te nisu korišteni osobni podaci koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost bolesnica već je svaka bolesnica dobila jedinstveni broj pod kojim je uključena u istraživanje. Pravi identitet ispitanica poznat je samo istraživačima.

4.2. Metode

Istraživanje je provedeno na histološkom materijalu HER2-pozitivnih karcinoma dojke koji su uklopljeni u parafinske kocke i pohranjeni u arhivi Zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog zavoda „Ljudevit Jurak“ KBCSM. Histološka stakla bolesnica koje su zadovoljavale osnovni kriterij za istraživanje izdvojena su iz arhive i ponovno pregledana kako bi odabrali reprezentativan uzorak s najvećim udjelom tumora i tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL). Parafinske kocke tako odabranih uzoraka izvađene su iz arhive te su tkiva pripremljena za imunohistokemijsko bojenje.

4.2.1. Imunohistokemijsko bojenje

Od svakog odabranog uzorka karcinoma dojke iz parafinskog bloka izrezan je po jedan rez debljine 3-4 μm i osušen u termostatu na 65°C oko jedan sat. Postupak deparafiniranja tkiva i demaskiranja antigena te imunohistokemijskog bojenja proveden je u potpuno automatiziranom uređaju za imunohistokemijsko bojenje Ventana BenchMark® prema protokolu proizvođača Ventana PD-L1 Assay upotrebom OptiView vizualizacijskog kita (136). Ukratko, proces obuhvaća deparafiniranje i demaskiranje antigena kuhanjem uzoraka u EZprep puferu (Ventana), ispiranje puferom (Reaction buffer) te nakapavanje zečjeg

monoklonskog protutijela na PD-L1 receptor (Ventana PD-L1, klon SP142), 30 minuta. Nakon ispiranja nakapava se sekundarno protutijelo (OptiView, Ventana), potom se primjenjuje reagens za pojačavanje signala (Amplification kit) te DAB kromogen za vizualizaciju nastalog kompleksa i na kraju kontrastno pozadinsko obojenje hematoksilinom.

4.2.2. Analiza imunohistokemijske reakcije

Prema uputama proizvođača pozitivna imunohistokemijska reakcija PD-L1 je potpuno ili nepotpuno membransko obojenje tumorskih stanica te točkasto, linearno ili cirkumferencijalno obojenje imunih stanica (limfocita infiltriranih u područje tumora ili u peritumorskom području). U odabranim uzorcima HER2+ karcinoma dojke, PD-L1 status određen je na ostatnom (rezidualnom) karcinomu (dobivenom operativnim zahvatom) onih bolesnica koje su završile neoadjuvantnu dualnu anti-HER2 terapiju te nisu imale potpuni odgovor na terapiju.

Izraženost PD-L1 smo zabilježili kao:

- a) postotak PD-L1 pozitivnih imunih stanica (limfocita, makrofaga, dendritičkih stanica i granulocita) prema smjernicama očitavanja za trostruko negativne karcinome dojke
- b) postotak PD-L1 pozitivnih tumorskih stanica

4.3. Statistička analiza

Dobivene podatke statistički smo obradili upotrebom statističkog programa StatSoft 13.5.0.17 (licenca AHN903D046305CNET5-B, Tulsa, USA) s razinom statističke značajnosti od $P < 0,05$. Razlike kvalitativnih kliničkih i patohistoloških karakteristika karcinoma između grupe PD-L1 pozitivni i PD-L1 negativni limfociti, te između imunofenotipskih grupa LuminalniHER2 i čisti HER2 testirali smo χ^2 testom i Fisher exact testom kao i u odnosu na odgovor na terapiju (klasificiran u RCB grupe I, II, III).

Spearmanovom analizom korelacija istražili smo kliničke i patohistološke varijable koje bi mogle utjecati na status PD-L1, RCB score ili na vrijeme do progresije bolesti.

Kaplan-Meirovom krivuljom prikazali smo preživljenje bolesnica do progresije bolesti ovisno o imunofenotipu i statusu PD-L1 u limfocitima i tumoru te ih usporediti Log-rank testom. Procjenu relativnog rizika za povrat bolesti između binarnih varijabli kliničkih i patohistoloških karakteristika karcinoma izračunati su upotrebom MedCalc online kalkulatora dostupnog na stranici: https://www.medcalc.org/calc/relative_risk.php

Rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

5. REZULTATI

Cilj našeg istraživanja je odrediti status PD-L1 receptora u imunim stanicama koji infiltriraju u područje tumora (TIL) prema kriterijima očitavanja za trostruko-negativne karcinome dojke. Istovremeno smo odredili i izraženost PD-L1 receptora u tumorskim stanicama.

5.1. Karakteristike karcinoma dojke uključenih u istraživanje

Osnovni uključni kriterij je nalaz HER2-pozitivnog karcinoma dojke (dijagnosticiran na uzorku dobivenom iglenom biopsijom) na osnovu kojeg su bolesnice završile neoadjuvantnu anti-HER2 terapiju (NAT). PD-L1 status određen je na ostatnom (rezidualnom) karcinomu onih bolesnica koje nisu imale potpuni odgovor na navedenu terapiju.

Sve 122 bolesnice imale su pozitivan HER2 status karcinoma dojke, od čega 102 određena imunohistokemijski (3+) te 20 (16,4%) imunohistokemijski određenih kao 2+ kojima je metodom hibridizacije *in situ* potvrđena amplifikacija HER2 gena. Ovisno o statusu receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR) izraženih u jezgrama tumorskih stanica određen je imunofenotip karcinoma dojke: ER i/ili PR pozitivni karcinomi pripadaju luminalnom imunofenotipu (LumHER2) dok ER/PR negativni karcinomi pripadaju pravom HER2-pozitivnom imunofenotipu (HER2).

Tablica 3 prikazuje osnovne kliničke i patohistološke karakteristike bolesnica s HER2-pozitivnim karcinomom dojke, uključenih u istraživanje. Bolesnice su prosječno bile stare 56,4 godine (medijan 58,5 godina), a 55% bolesnica je bilo mlađe od 60 godina starosti. Prosječna klinička veličina tumora određena slikovnim metodama prije NAT je 41,3 mm

(medijan 35 mm) s tim da je većina tumora (70,5%) imala procijenjenu veličinu između 2 i 5 cm (cT2), a samo tri bolesnice imale su tumore manje od 2 cm.

Nakon primjene neoadjuvantne kemoterapije prosječna veličina ostatnog tumora izmjerena od strane patologa prilikom preuzimanja iznosila je 20 mm (medijan 16 mm). Primjećujemo da je medijan veličine tumora reduciran za više od 50% nakon terapije. Sada većina bolesnica ima ostatne tumore manje od 2 cm (63,2%), a tek sedam bolesnica (5,7%) i dalje ima tumore veće od 5 cm (yT3).

Prosječni postotak izraženosti indeksa proliferacije Ki-67 prije neoadjuvantne kemoterapije bio je 40,5% (medijan 35%) dok je prosječna proliferacijska aktivnost ostatnog tumora nakon primjene NAT pala na 29% (medijan 21,5%) te je prosječni pad proliferacije bio oko 40%. Svega 13 bolesnica (10,5%) imalo je Ki-67 niži od 20% prije NAT dok je nakon terapije kod 48,4% bolesnica zabilježen Ki-67 niži od 20%.

Pozitivan status limfnih čvorova određen nakon NAT zabilježen je u 60 bolesnica (49,2%). Od toga su 43 bolesnice imale yN1 status (1 do 3 pozitivna limfna čvora), a 15 bolesnica je imalo yN2 status (4 do 9 pozitivnih limfnih čvorova) dok su samo 2 bolesnice imale yN3 status (više od 10 pozitivnih limfnih čvorova). Samo 27 bolesnica (22,1%) doživjelo je progresiju bolesti.

Sve bolesnice uključene u istraživanje imale su nekompletan patološki odgovor na terapiju (određen RCB). Od toga je 25,4% bolesnica imalo dobar odgovor na terapiju s minimalnom rezidualnom bolešću (RCB I) dok 26,2% gotovo uopće nije odgovorilo na terapiju (RCB III). Ipak, oko polovine bolesnica (48,4%) imalo je djelomičan odgovor na neoadjuvantnu anti-HER2 terapiju (RCB II). Zabilježen pad stanica u proliferaciji povezan je s odgovorom na terapiju. Tako je kod RCB I zabilježen pad od 65,5%, kod RCB II pad od 28,5% dok je kod RCB III pad bio svega 16,7%.

Tablica 3. Osnovni podaci o 122 bolesnice s patohistološkim karakteristikama HER2-pozitivnih karcinoma dojke uključenih u istraživanje

Karakteristika	N (%)	Medijan/mm (raspon)
Dob bolesnica/godine		
< 60	67 (55%)	58,5 godina (31-89)
≥ 60	55 (45%)	
Klinička veličina tumora		
cT1	3 (2,5%)	35 mm (16-160)
cT2	86 (70,5%)	
cT3	33 (27,0%)	
Ki-67 prije NAT(%)		
< 20	13 (10,6%)	35% (8 % -90 %)
≥ 20	109 (89,4%)	
Gradus		
I	15 (12,3%)	-
II	67 (54,9%)	
III	40 (32,8%)	
PHD veličina tumora		
yT1	77 (63,2%)	16 mm (1-140)
yT2	38 (31,1%)	
yT3	7 (5,7%)	
Ki-67 nakon NAT (%)		
< 20	59 (48,4%)	21,5% (2 % - 90 %)
≥ 20	63 (51,6%)	
Status ER		
Negativan	60 (49,2%)	-
Pozitivan	62 (50,8%)	
Status PR		
Negativan	74 (60,7%)	-
Pozitivan	48 (39,3%)	
Imunofenotip		
Luminalni HER2	62 (50,8%)	-
HER2 tip	60 (49,2%)	
Status limfnih čvorova (yN)		
Negativan	62 (50,8%)	2 (1-15)
Pozitivan	60 (49,2%)	
RCB grupa		
I	31 (25,4%)	2,0 (0,52-4,69)
II	59 (48,4%)	
III	32 (26,2%)	
Progresija bolesti		
Bez progresije	95 (77,9%)	-
Prisutna progresija	27 (22,1%)	

NAT, neoadjuvantna kemoterapija; ER, receptor za estrogen; PR, receptor za progesteron; Ki-67, biljeg proliferacije; yT i yN, veličina tumora i status limfnih čvorova nakon NAT; RCB (residual cancer burden), procjena odgovora na terapiju

5.2. Karakteristike karcinoma dojke prema imunofenotipu

Uzorci 122 HER2-pozitivna karcinoma dojke obuhvaćaju 62 karcinoma Luminalnog HER2 imunofenotipa i 60 karcinoma čistog HER2 imunofenotipa.

U Tablici 4 su prikazane razlike u osnovnim kliničkim i patohistološkim karakteristikama karcinoma ovisno o imunofenotipu HER-pozitivnih karcinoma dojke uključenih u istraživanje. Osim osnovne razlike u izraženosti hormonskih receptora za estrogen (ER) i progesteron (PR) ($P < 0,001$), između ova dva imunofenotipa nismo zabilježili statistički značajne razlike u medijanu dobi bolesnica s karcinomima kao niti razlike u veličini tumora prije NAT. Medijan starosti bolesnica je ujednačen u obje skupine imunofenotipa (58 i 59 godina; $P = 1,0$). Medijan veličine karcinoma procijenjen slikovnim metodama pri dijagnozi je 34 mm i 35 mm, što također pokazuje ujednačenost u probiru bolesnica za NAT ($P = 0,138$). Međutim, razlika u medijanu veličine karcinoma nakon NAT postaje statistički značajna ($P < 0,001$). Tako je preko 75% karcinoma čistog HER2 imunofenotipa manje od 2 cm (medijan veličine je 1 cm), za razliku od Luminalnog HER2 koji su u 50% slučajeva ostali veći od 2 cm (medijan veličine 2 cm).

Isto tako ni razlika u postotku stanica u proliferaciji (Ki-67 indeks) prije NAT nije statistički značajna ($P = 0,076$) međutim nakon NAT došlo je do smanjenja postotka stanica u proliferaciji, sa statistički značajnom razlikom između karcinoma različitog imunofenotipa ($P < 0,001$). Prije NAT 95% karcinoma čistog HER2 imunofenotipa ima Ki-67 viši od 20% s medijanom postotka od 45% dok Luminalni HER2 karcinomi imaju medijan Ki-67 od 33%. Nakon NAT karcinomi Luminalnog HER2 podtipa dvostruko češće imaju Ki-67 niži od 20% (medijan 14%) nego HER2 podtip (medijan 35%). Vidimo da je kod bolesnica Luminalnog HER2 imunofenotipa došlo do pada proliferacije od 57,6% dok je kod čistih HER2 taj pad samo 22,2%.

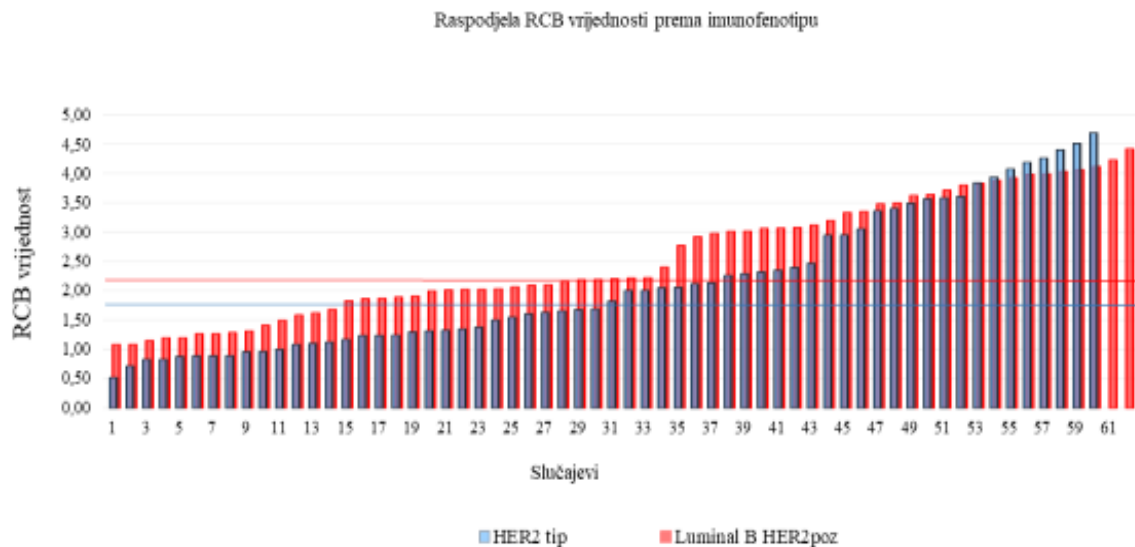
Osim toga, karcinomi HER2 imunofenotipa tri puta češće imaju visoki histološki gradus (G III) nakon NAT od Luminalnih HER2 ($P=0,001$).

Međutim, karcinomi Luminalnog HER2 imunofenotipa imaju slabiji odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju ($P=0,019$). Tako kod Luminalnih HER2 karcinoma prosječna RCB vrijednost iznosi 2,56 (medijan 2,2) dok kod karcinoma HER2 imunofenotipa iznosi 2,13 (medijan 1,76), (Slika 17). Minimalni rezidualni tumor (RCB I) uočen je češće kod karcinoma HER2 imunofenotipa (36,7%) nego kod Luminalnih HER2 (14,5%) dok je umjeren ili slab odgovor na terapiju (RCB II i RCB III) češći kod Luminalnog HER2 imunofenotipa (56,5% i 29%).

Tablica 4. Razlike kliničkih i patohistoloških karakteristika prema imunofenotipu 122
HER2-pozitivna karcinoma dojke uključenih u istraživanje

Karakteristika	Luminalni (N=62)	HER2 tip (N =60)	Fisher Exact test
	N (%)	N (%)	P
Dob bolesnica (godine)			
< 60	34 (54,8%)	33 (55%)	1,0
≥ 60	28 (45,2%)	27 (45%)	
Klinička veličina tumora			
cT1	0 (0,0%)	3 (5%)	0,138
cT2	47 (75,8%)	39 (65%)	
cT3	15 (24,2%)	18 (30%)	
Gradus			
I	10 (16,1%)	5 (8,3%)	0,001
II	41 (66,1%)	26 (43,4%)	
III	11 (17,8%)	29 (48,3%)	
Ki-67 prije NET (%)			
< 20	10 (16,1%)	3 (5%)	0,076
≥ 20	52 (83,9%)	57 (95%)	
PHD veličina tumora			
yT1	31 (50%)	46 (76,7%)	< 0,001
yT2	29 (46,8%)	9 (15%)	
yT3	2 (3,2%)	5 (8,3%)	
Ki-67 nakon NET (%)			
< 20	41 (66,1%)	18 (30%)	< 0,001
≥ 20	21 (33,9%)	42 (60%)	
Status ER			
Negativan	0 (0%)	60 (100%)	< 0,001
Pozitivan	62 (100%)	0 (0%)	
Status PR			
Negativan	14 (22,6%)	60 (100%)	< 0,001
Pozitivan	48 (77,4%)	0 (0%)	
Status limfnih čvorova (yN)			
Negativan	30 (48,4%)	32 (53,3%)	0,593
Pozitivan	32 (51,6%)	28 (46,7%)	
RCB grupa			
1	9 (14,5%)	22 (36,7%)	0,019
2	35 (56,5%)	24 (40%)	
3	18 (29%)	14 (23,3%)	
Progresija bolesti			
Prisutna	9 (14,5%)	18 (30%)	0,05
Odsutna	53 (85,5%)	42 (70%)	

NAT, neoadjuvantna kemoterapija; ER, receptor za estrogen; PR, receptor za progesteron; Ki-67, biljeg proliferacije; yT i yN, veličina tumora i status limfnih čvorova nakon NAT; RCB (residual cancer burden), procjena odgovora na terapiju



Slika 17. Raspodjela izračunate RCB vrijednosti (score) (određene po McAnderson kriterijima) prema imunofenotipu HER2 pozitivnih karcinoma dojke. Paralelne crte prikazuju medijan RCB vrijednosti koji je veći kod Luminalnog HER2 tipa i iznosi 2,2 (crvena) dok kod HER2 tipa iznosi 1,8 (plava).

Iako nismo zabilježili statistički značajnu razliku pozitivnog statusa limfnih čvorova u odnosu na imunofenotip HER2-pozitivnih karcinoma dojke ($P=0,593$), primjećujemo da karcinomi LumHER2 tipa statistički značajno rjeđe imaju progresiju bolesti od karcinoma HER2 imunofenotipa (15,5% vs. 30,0%; $P=0,05$). U obje skupine oko polovine karcinoma nema pozitivne limfne čvorove, a od onih koji imaju pozitivne limfne čvorove u obje skupine više od 70% ima 1 do 3 pozitivna limfna čvora (yN1).

5.3. Karakteristike karcinoma dojke prema statusu PD-L1

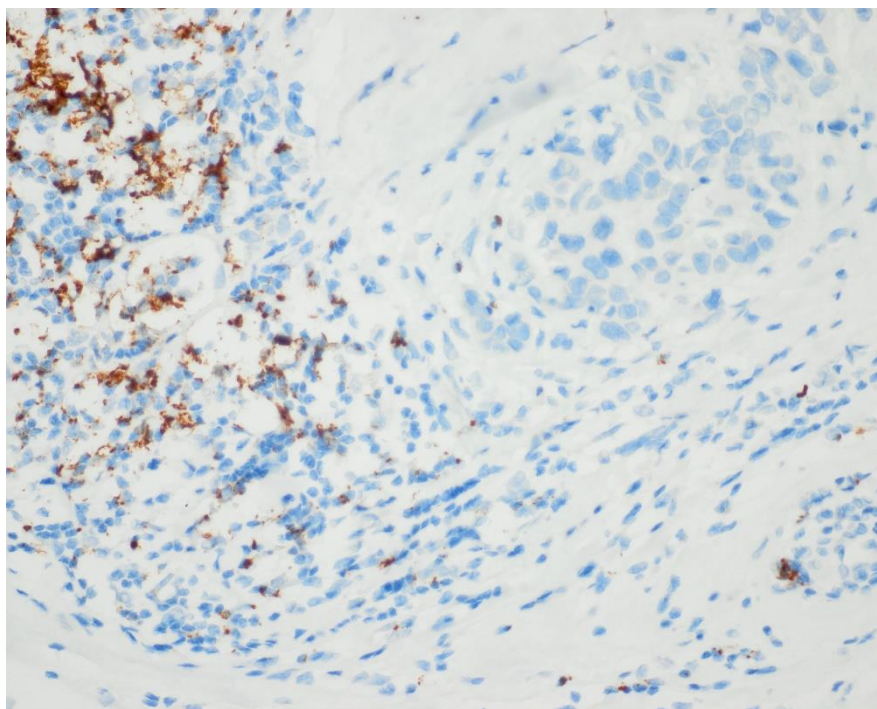
5.3.1. Imunohistokemijska izraženost PD-L1

Osnovni cilj istraživanja je odrediti status PD-L1 receptora na membrani imunoloških stanica koji infiltriraju u područje tumora. PD-L1 se analizira u području vijabilnog invazivnog tumora i njemu pridružene strome uz isključivanje područja nekroze, krvarenja, stranog materijala, DCIS-a, LCISa, kao i isključenje artefakata bojenja. Minimum je 50 tumorskih stanica s pridruženom stromom.

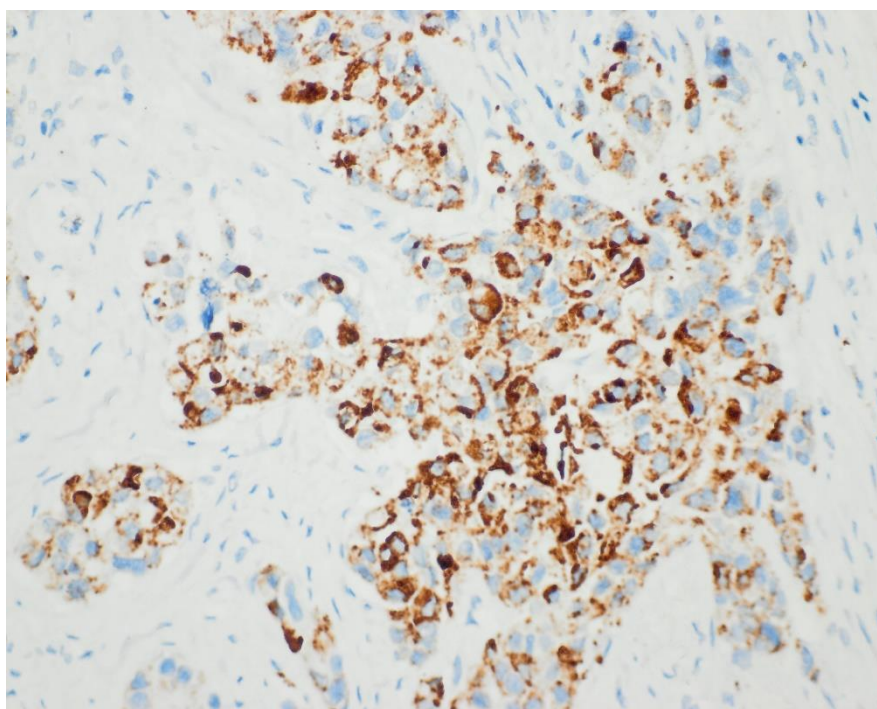
Područje analize obuhvaća samo imunološke stanice (IS) (limfocite, makrofage, dendritičke stanice i granulocite) u peritumorskoj ili intratumorskoj stomi, a očituje se kao membransko točkasto/linearno obojenje pojedinačnih ili agregata imunoloških stanica (Slika 18). $\geq 1\%$ pozitivnih IS procjenjuje se kao udio površine tumora, uključujući pridruženu intratumorsku i susjednu peritumorsku stromu, koju zauzimaju PD-L1 obojene IS.

Istovremeno smo odredili i izraženost PD-L1 receptora na membrani tumorskih stanica (Slika 19).

Pozitivan status PD-L1 definiran je graničnom vrijednosti izraženosti PD-L1 u 1% prema kriterijima analize za trostruko-negativne karcinome dojke (136), a ista granična vrijednost uzeta je i za pozitivan status izraženosti u tumorskim stanicama.

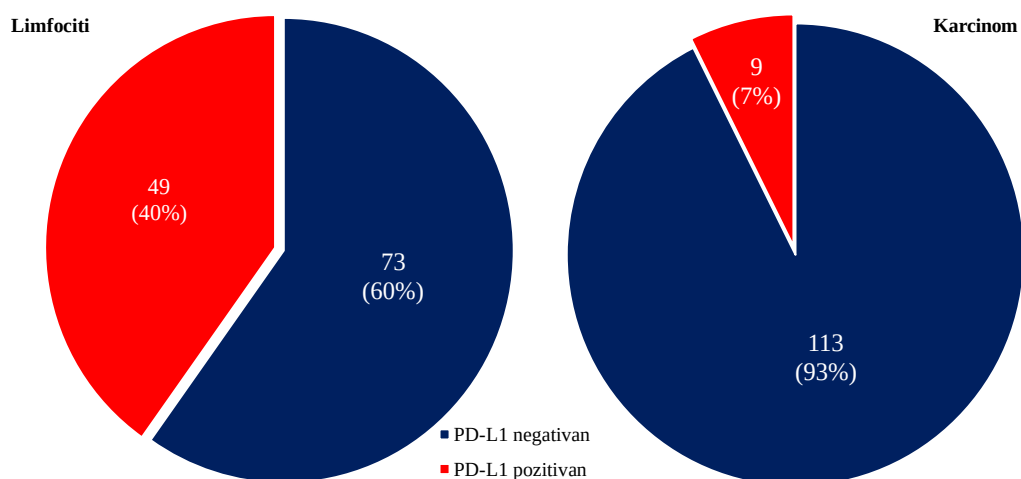


Slika 18. Imunohistokemijska izraženost PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima. Povećanje 100x



Slika 19. Imunohistokemijska izraženost PD-L1 u tumorskim stanicama. Povećanje 400x

U ukupnom uzorku 122 HER2-pozitivna karcinoma dojke, kod bolesnica koje nisu imale kompletan patološki odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju, u ostatnom tumoru određen je PD-L1. Tako je kod 49 karcinoma dojke (40,2%) detektirana izraženost PD-L1 u limfocitima (u rasponu izraženosti od 1 % do 30%) dok je u 9 karcinoma (7,4%) zabilježena izraženost PD-L1 na membrani tumorskih stanica (Slika 20). Od devet karcinoma koji pokazuju PD-L1 pozitivitet u stanicama karcinoma, njih sedam pokazuje PD-L1 pozitivitet i u limfocitima dok dva pokazuju samo pozitivan PD-L1 u stanicama karcinoma.



Slika 20. Raspodjela imunohistokemijske izraženosti PD-L1 u limfocitima i tumorskim stanicama 122 HER2-pozitivna karcinoma dojke nakon neoadjuvantne kemoterapije

5.3.1. Kliničko-patološke razlike prema izraženosti PD-L1

U Tablici 5 prikazane su razlike u osnovnim kliničkim i patohistološkim karakteristikama karcinoma ovisno o statusu PD-L1 u limfocitima infiltriranim u područje ostatnog karcinoma nakon provedene NAT HER-pozitivnih karcinoma dojke. Niti ovdje nismo zabilježili

statistički značajne razlike u medijanu dobi bolesnica prema negativnom/pozitivnom statusu PD-L1 u limfocitima kao niti razlike u veličini tumora prije i nakon NAT. Medijan veličine karcinoma procijenjen pri dijagnozi je 3,5 cm za karcinome s PD-L1 negativnim i 3,4 cm za karcinome s PD-L1 pozitivnim limfocitima. U obje skupine došlo je do redukcije veličine karcinoma za više od 50% (medijani 1,6 cm i 1,5 cm) ($P=0,61$).

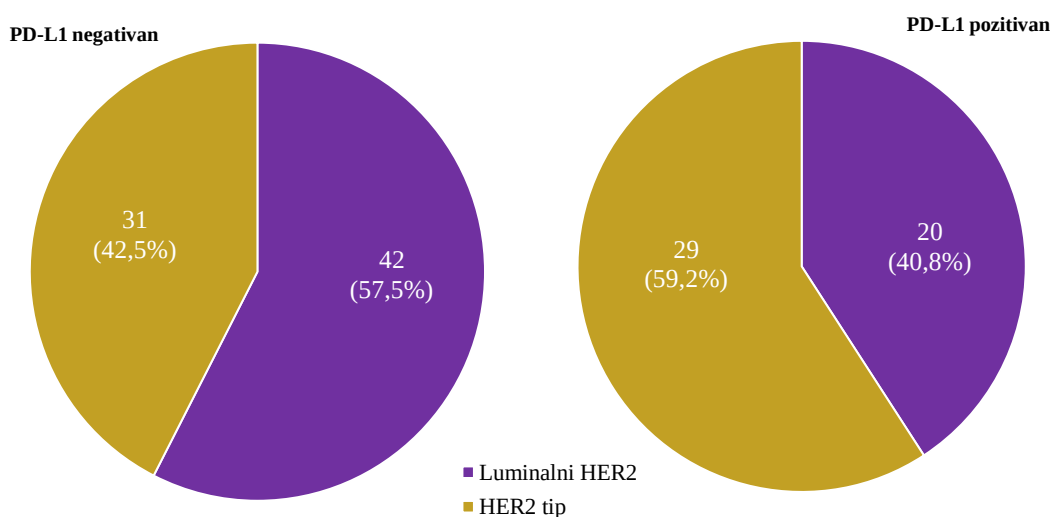
Uočena razlika indeksa Ki-67 prije NAT nije statistički značajna ($P=0,072$) iako je kod PD-L1 negativnih karcinoma češće zabilježen Ki-67 niži od 20%. Medijan postotka stanica u proliferaciji kod karcinoma s PD-L1 negativnim limfocitima je 35%, te 40% kod karcinoma s PD-L1 pozitivnim limfocitima. Međutim, nakon primjene NAT došlo je do smanjenja postotka stanica u proliferaciji sa statistički značajnom razlikom ovisno o statusu PD-L1 u TIL-ovima. Tako karcinomi s pozitivnim statusom PD-L1 u limfocitima statistički značajno češće imaju Ki-67 viši do 20% (medijan 27,5%) nego karcinomi s PD-L1 negativnim limfocitima (medijan 17,5%) ($P=0,043$). Pad proliferacije od 32% zabilježen je kod karcinoma s PD-L1 pozitivnim limfocitima, za razliku od pada proliferacije za 50% kod karcinoma s PD-L1 negativnim TILovima.

Isto tako nismo zabilježili statistički značajnu razliku ($P=0,059$) u histološkom gradusu prema izraženosti PD-L1 u TIL-ovima, ali vidimo da je niži histološki gradus bio češći kod Luminalnog HER2 tipa karcinoma nego čistih HER2 (Gr I: 17,8% vs. 4,1%).

Razlika izraženosti PD-L1 u limfocitima ovisno o imunohistokemijskoj izraženosti receptora HER2 na membrani stanica karcinoma (izraženost intenziteta 2+ i 3+) nije statistički značajna ($P=0,804$).

Iako se HER2 pozitivni karcinomi dojke dijele u imunofenotipove prema statusu receptora za estrogen (ER), razlika izraženosti ER ovisno o statusu izraženosti PD-L1 u limfocitima nije statistički značajna ($P=0,096$). Stoga nije zabilježena ni statistički značajna razlika

izraženosti PD-L1 prema imunofenotipu, iako su čisti HER2 pozitivni nešto češće imali pozitivan PD-L1 u TIL (Slika 21). Tako su čisti HER2 pozitivni karcinomi imali pozitivan status PD-L1 u TILovima u 29/60 slučajeva (48,3%), dok je kod Luminalnih HER2 taj pozitivitet zabilježen u 20/62 slučaja (32,3%) ($P=0,096$). Također smo zabilježili češće negativan status izraženosti receptora za progesteron (PR) kod karcinoma s pozitivnim statusom PD-L1 u limfocitima nego kod PD-L1 negativnih, iako bez statističke značajnosti ($P=0,059$).



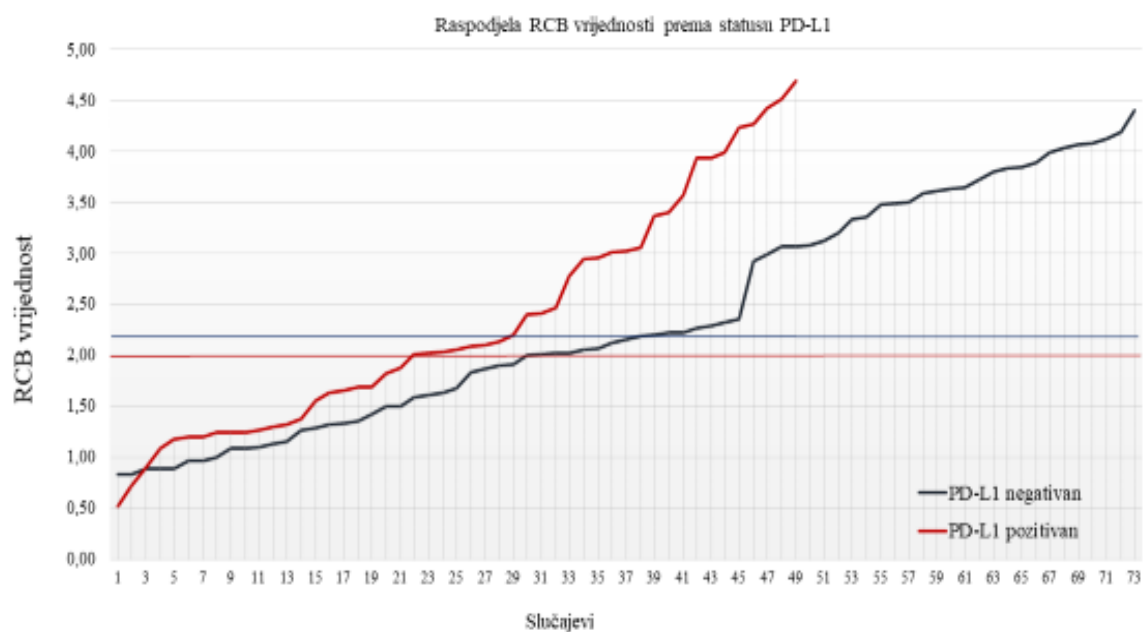
Slika 21. Raspodjela imunofenotipa 122 HER2-pozitivna karcinoma dojke prema statusu imunohistokemijske izraženosti PD-L1 u limfocitima nakon neoadjuvantne kemoterapije (Fisher exact test, $P=0,096$)

Tablica 5. Razlike kliničkih i patohistoloških karakteristika 122 HER2-pozitivna karcinoma dojke uključena u istraživanje prema statusu izraženosti PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima

Karakteristika	PD-L1 negativni N=73	PD-L1 pozitivni N=49	Fisher Exact test
	N (%)	N (%)	P
Dob bolesnica (godine) < 60 ≥ 60	40 (54,8 %) 33 (45,2 %)	27 (55,1 %) 22 (44,9 %)	1
Klinička veličina tumora cT1 cT2 cT3	1 (1,4 %) 54 (74,0 %) 18 (24,6 %)	2 (4,1 %) 32 (65,3 %) 15 (30,6 %)	0,485
Ki-67 prije NAT (%) < 20 ≥ 20	11 (15,0 %) 62 (85,0 %)	2 (4,0 %) 47 (96,0 %)	0,072
Gradus I II III	13 (17,8 %) 39 (53,4 %) 21 (28,8 %)	2 (4,1 %) 28 (57,1 %) 19 (38,8 %)	0,059
PHD veličina tumora yT1 yT2 yT3	46 (63,0 %) 24 (32,9 %) 3 (4,1 %)	31 (63,2 %) 14 (28,6 %) 4 (8,2 %)	0,61
Ki-67 nakon NAT (%) < 20 ≥ 20	41 (56,2 %) 32 (43,8 %)	18 (36,7 %) 31 (63,3 %)	0,043
Status ER Negativan Pozitivan	31 (42,5 %) 42 (57,5 %)	29 (59,2 %) 20 (40,8 %)	0,096
Status PR Negativan Pozitivan	39 (53,4 %) 34 (46,6 %)	35 (71,4 %) 14 (28,6 %)	0,059
HER2 izraženost 2+ 3+	11 (15,0 %) 62 (85,0 %)	9 (18,4 %) 40 (81,6 %)	0,804
Status limfnih čvorova Negativan Pozitivan	38 (52,1 %) 35 (47,9 %)	24 (49,0 %) 25 (51,0 %)	0,853
Progresija bolesti Bez progresije Prisutna progresija	58 (79,5%) 15 (20,5 %)	37 (75,5 %) 12 (24,5 %)	0,659

NAT, neoadjuvantna kemoterapija; ER, receptor za estrogen; PR, receptor za progesteron; Ki-67, biljeg proliferacije; RCB (residual cancer burden), procjena odgovora na terapiju

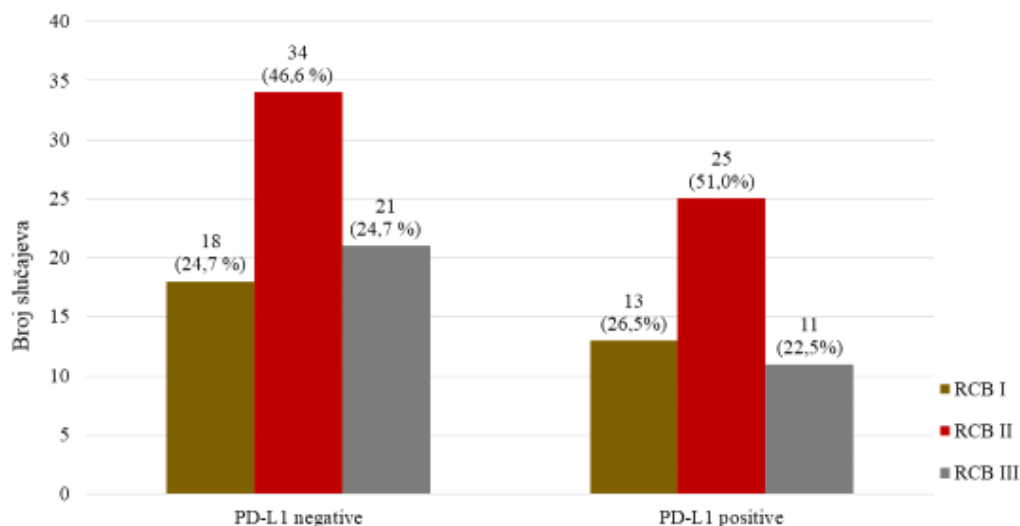
Razlika pozitivnog statusa limfnih čvorova kao niti razlike u pojavi progresije bolesti između karcinoma s pozitivnim i negativnim statusom PD-L1 u limfocitima gotovo uopće ne postoji ($P=0,853$) (Tablica 5). U obje skupine velika većina tumora pokazuje yN1 stadij, čak nešto češće kod PD-L1 pozitivnih karcinoma (76 % vs. 68,6%).



Slika 22. Raspodjela RCB (residual cancer burden) vrijednosti izračunate prema McAnderson online kalkulatoru za 122 HER2-pozitivna karcinoma dojke prema izraženost PD-L1 u tumor-infiltriranim limfocitima. Paralelne linije označavaju medijan RCB vrijednosti.

Medijan RCB vrijednosti je gotovo isti, neovisno o statusu PD-L1 izraženosti (2,2 vs. 2,0) (Slika 22). Tako je minimalan rezidualni tumor (RCB I) imalo 24,6% PD-L1 negativnih i 26,5% PD-L1 pozitivnih tumora, dok je slab odgovor na terapiju (RCB III) imalo 28,8% PD-L1 negativnih i 22,5% PD-L1 pozitivnih tumora. Statistički značajna razlika distribucije

RCB grupa prema PD-L1 statusu u limfocitima nije utvrđena (Fisher Exact test, $P=0,737$) (Slika 23).



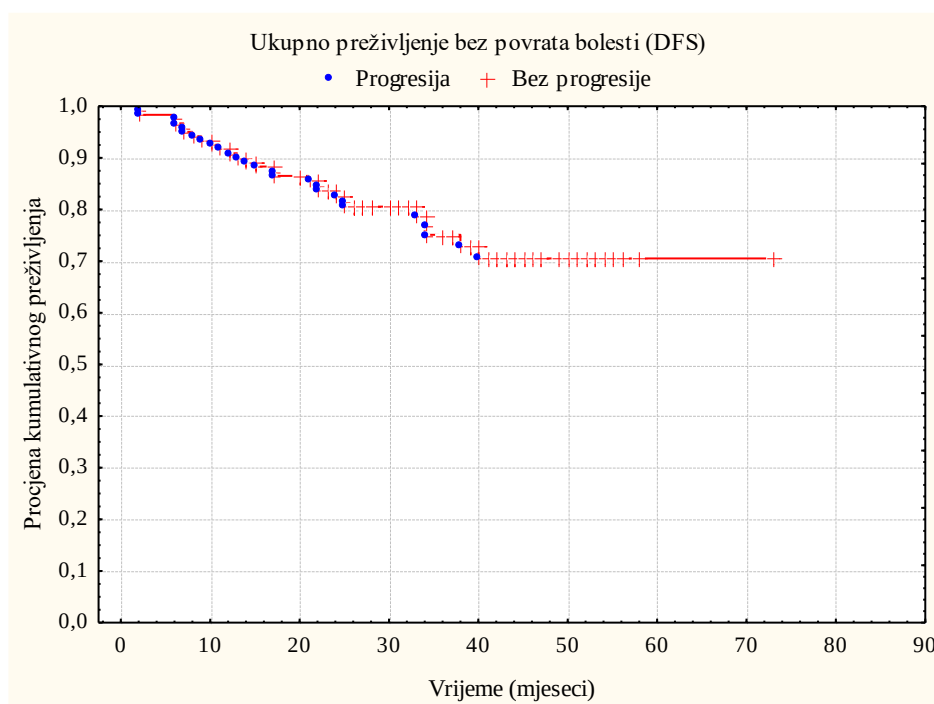
Slika 23. Imunohistokemijska izraženost PD-L1 u TIL prema odgovoru na neoadjuvantnu kemoterapiju HER2 pozitivnih karcinoma dojke (RCB grupa). Statistički značajna razlika nije utvrđena.

Izraženost PD-L1 na membrani tumorskih stanica ne pokazuje statistički značajnu korelaciju s osnovnim histološkim karakteristikama karcinoma, kao što je veličina (mjerena prije ili nakon NAT), histološki gradus niti status pozitivnih limfnih čvorova. Ipak, karcinomi pozitivni na PD-L1 imaju medijan od 4 cm koji je veći od medijana veličine ukupne skupine. Isto tako pokazuju medijan proliferacije od 45% što je više od medijana cijele skupine i najslabiji pad proliferacije od svega 6%. Tumori koji izražavaju PD-L1 na membrani svojih stanica uglavnom su HER2 imunofenotipa (8/9) te je izraženost PD-L1 u tumoru u statistički značajnoj negativnoj korelaciji s izraženosti ER (Spearmanov koeficijent korelacije $r_s = -0,204$; $P=0,024$). Od toga su četiri bolesnice imale progresiju bolesti. Isto tako bolesnice s

pozitivnim statusom PD-L1 u tumoru imaju lošiji odgovor na terapiju (medijan RCB vrijednosti je 3,0) ($r_s = 0,158$; $P = 0,082$). U 7 od 9 slučajeva PD-L1 je istovremeno izražen i na membrani TIL-ova.

5.4. Progresija bolesti

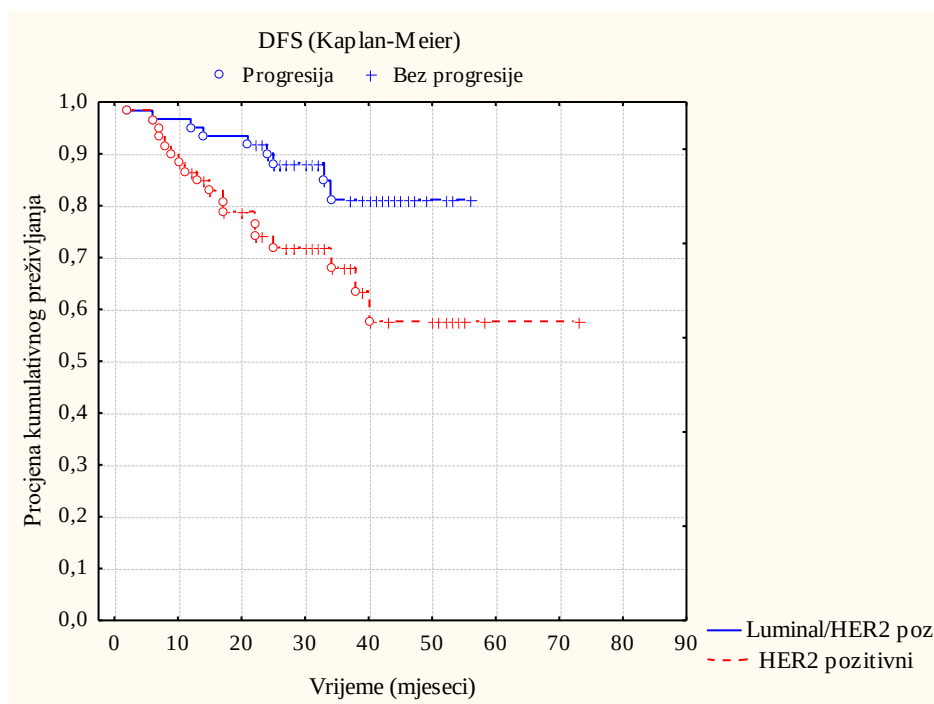
Progresija bolesti zabilježena je kod 27 bolesnica (22,1 %). Medijan praćenja je 33 mjeseca. Procijenjena stopa petogodišnjeg preživljenja bez povrata bolesti u istraživanom uzorku je 71 % (Slika 24) s medijanom vremena do povrata bolesti od 15 mjeseci (u rasponu od 2 do 40 mjeseci).



Slika 24. Procijenjena ukupna stopa preživljenja bez povrata bolesti (DFS) 122 HER2-pozitivne bolesnice s karcinomom dojke nakon neoadjuvantne anti-HER2 terapije

Analizom Spearmanove korelacije utvrdili smo da najveći utjecaj na povrat bolesti ima pozitivan status limfnih čvorova ($r_s = -0,271$; $P=0,0025$). Osim toga, povrat bolesti ovisi o veličini tumora prije terapije ($r_s = -0,207$; $P=0,022$), histološkom gradusu ostatnog tumora ($r_s = -0,192$; $P=0,046$), imunofenotipu ($r_s = 0,186$; $P=0,039$) i odgovoru na terapiju prema određenoj RCB vrijednosti ($r_s = -0,198$; $P=0,028$) dok se kategorizacijom u RCB grupe gubi statistička značajnost ($r_s = -0,159$; $P=0,081$).

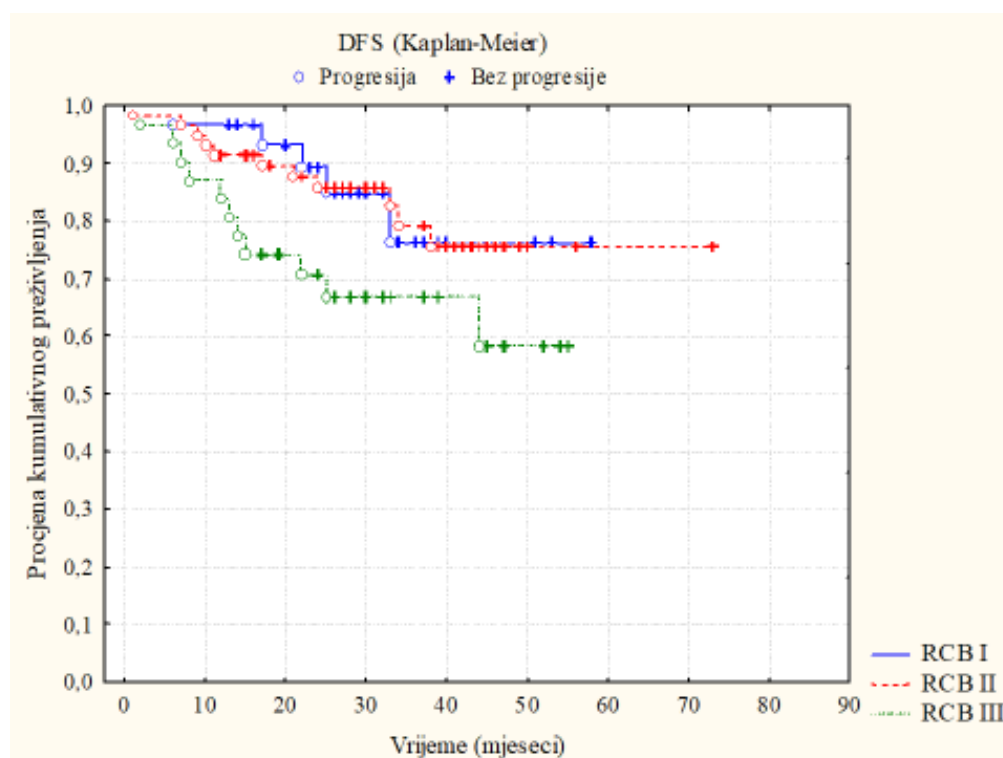
Prema rezultatima analize preživljenja do progresije bolesti statistički značajno bolju stopu preživljenja bez povrata bolesti nakon NAT imaju bolesnice s Luminalnim podtipom (Log Rank WW = -6,068, Test statistic = -2,35; $p = 0,019$) (Slika 25). Povrat bolesti zabilježen je u 18/60 (30%) bolesnica s karcinomom HER2 imunofenotipa s medijanom od 14 mjeseci (u rasponu od 2 do 40 mjeseci) u odnosu na 9/62 (14,5%) bolesnica s LumHER2 imunofenotipom kod kojih je medijan progresije bolesti 21 mjesec (u rasponu 2-38 mjeseci). Procijenjena stopa petogodišnjeg preživljenja bez povrata bolesti nakon NAT u bolesnica s karcinomom čistog HER2 imunofenotipa je niža od 60% dok je za bolesnice s Luminalnim tipom viša od 80%.



Slika 25. Procijenjena stopa preživljenja bez progresije bolesti (DFS) prema imunofenotipu HER2-pozitivnih bolesnica nakon neoadjuvantne anti-HER2 terapije ($P = 0,019$)

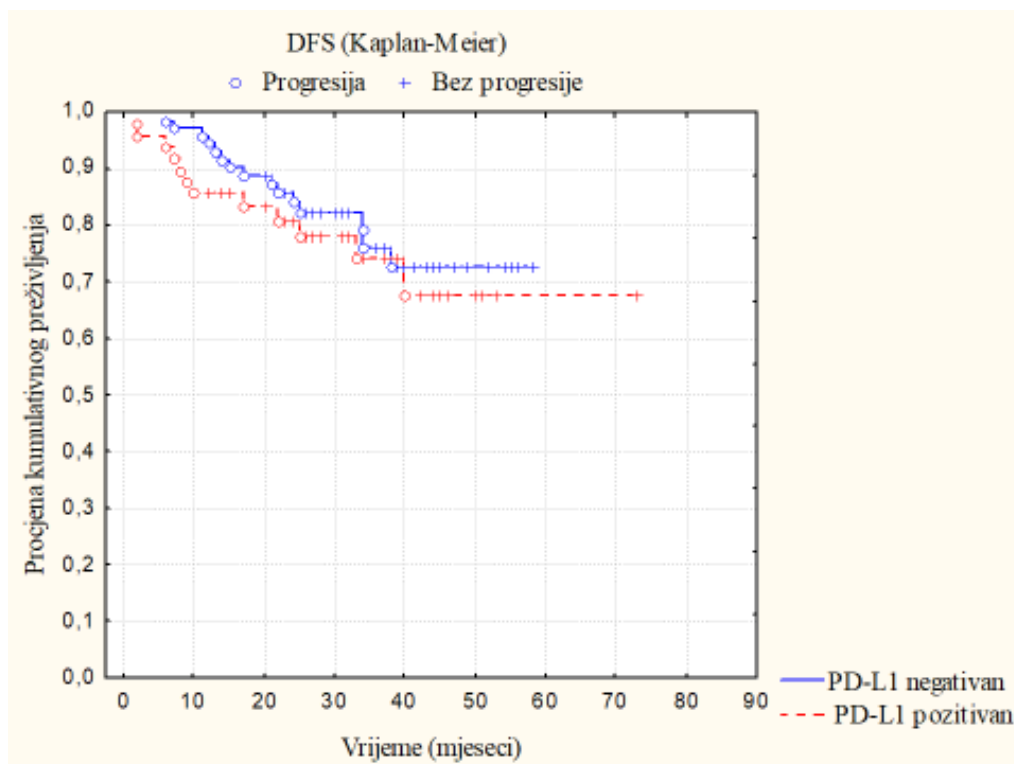
Što se tiče povrata bolesti ovisno o dogovoru na terapiju vidimo da je u bolesnica s minimalnom rezidualnom bolešću (RCB I) progresija zabilježena u svega 5/31 slučajeva (16,1%), kod RCB II odgovora na terapiju progresija je zabilježena u 11/59 (18,6%) dok je u slučaju RCB III odgovora progresija nastupila kod 11/32 (34,4%) bolesnica. Medijan vremena do progresije bolesti najduži je kod bolesnica koje su imale RCB I i iznosi 22 mjeseca, kod bolesnica s RCB II odgovorom on je 17 mjeseci, dok kod bolesnica s RCB III medijan vremena do progresije iznosi 13 mjeseci.

Kaplan-Meirova krivulja ukazuje da je petogodišnje preživljenje bez povrata bolesti najlošije u slučaju slabog odgovora na NAT (RCB III) dok procijenjena stopa petogodišnjeg preživljenja bez povrata bolesti gotovo identična za karcinome koji su odgovorili umjereno (RCB I) ili parcijalno na NAT (RCB II) ($\text{Chi-square} = 4,94$; $\text{df} = 2$; $P = 0,085$) (Slika 26).



Slika 26. Procijenjena stopa preživljenja bez progresije bolesti (DFS) prema odgovoru na neoadjuvantnu terapiju ovisno o procjeni ostatnog tumora (residual cancer burden, RCB) HER2-pozitivnih bolesnica nakon neoadjuvantne anti-HER2 terapije (P=0,085)

Progresija bolesti pojavljuje se kod 20,5% karcinoma s negativnim statusom PD-L1 u TIL-ovima i kod 24,5% karcinoma s pozitivnim statusom PD-L1 (Tablica 5). Međutim, promatrajući Kaplan-Meierovu krivulju preživljenja bez povrata bolesti ne uočavamo statistički značajnu razliku ovisno o izraženost PD-L1 u tumor-infiltrirajućim limfocitima (Log-Rank Test statistic = -0,668; P=0,504) (Slika 27). Ipak, prosječno vrijeme do progresije bolesti kod bolesnica s pozitivnim statusom PD-L1 u TIL-ovima iznosi $15 \pm 11,9$ mjeseci u odnosu na $19,5 \pm 9,6$ mjeseci do progresije karcinoma bez PD-L1 pozitivnih limfocita.



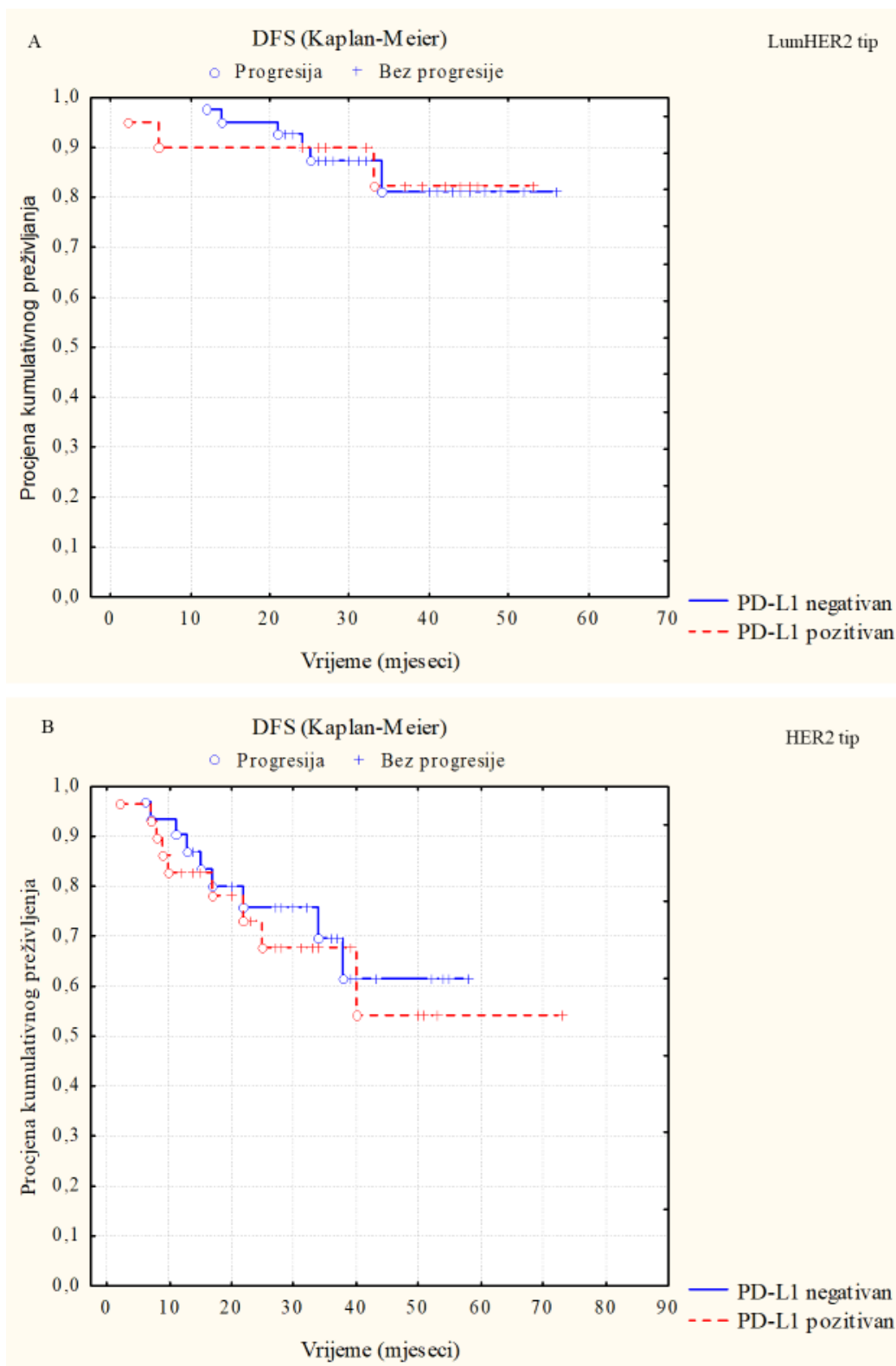
Slika 27. Procijenjena stopa preživljenja bez progresije bolesti (DFS) prema statusu imunohistokemijske izraženosti PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima u ukupnom uzorku 122 HER2-pozitivne bolesnice nakon neoadjuvantne anti-HER2 terapije ($P=0,504$)

Promatrajući procijenjeno petogodišnje preživljenje bez progresije bolesti unutar pojedine imunofenotipske skupine nismo zabilježili statistički značajne razlike u odnosu na izraženost PD-L1 u limfocitima. Kod Luminalnih HER2 pozitivnih bolesnica status PD-L1 u TIL-ovima nije pokazivao gotovo nikakvu razliku preživljenja bez progresije (Slika 28A). Tako je i u slučaju pozitivnog i negativnog statusa PD-L1 u limfocitima 15% bolesnica doživjelo progresiju bolesti (Log-Rank Test statistic = 0,0631; $P= 0,949$).

U skupini karcinoma čistog HER2 imunofenotipa također nema statistički značajne razlike u pojavi progresije bolesti u odnosu na status PD-L1 u limfocitima (Slika 28B). Tako je u

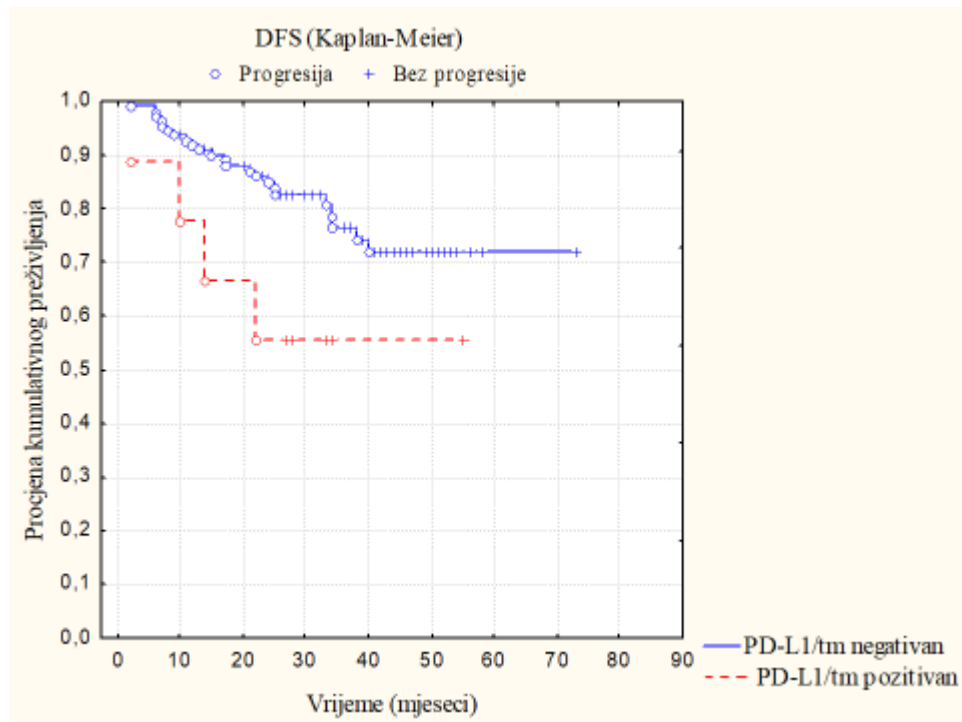
slučaju pozitivnog statusa PD-L1 u limfocitima 31% bolesnica doživjelo progresiju bolesti te 29% u slučaju negativnog PD-L1 (Log-Rank Test statistic = - 0,419; P= 0,675).

Analizom korelacija unutar pojedine imunofenotipske skupine utvrdili smo da kod čistih HER2 karcinoma postotak izraženosti PD-L1 u limfocitima statistički značajno korelira s višim Ki-67 nakon terapije ($r_s = 0,388$; $P = 0,005$). U istoj skupini izraženost PD-L1 u stanicama karcinoma je u statistički značajnoj korelaciji s lošijom RCB vrijednosti ($r_s = 0,262$; $P = 0,043$) dok takve korelacije nisu uočene kod karcinoma Luminalnog imunofenotipa.

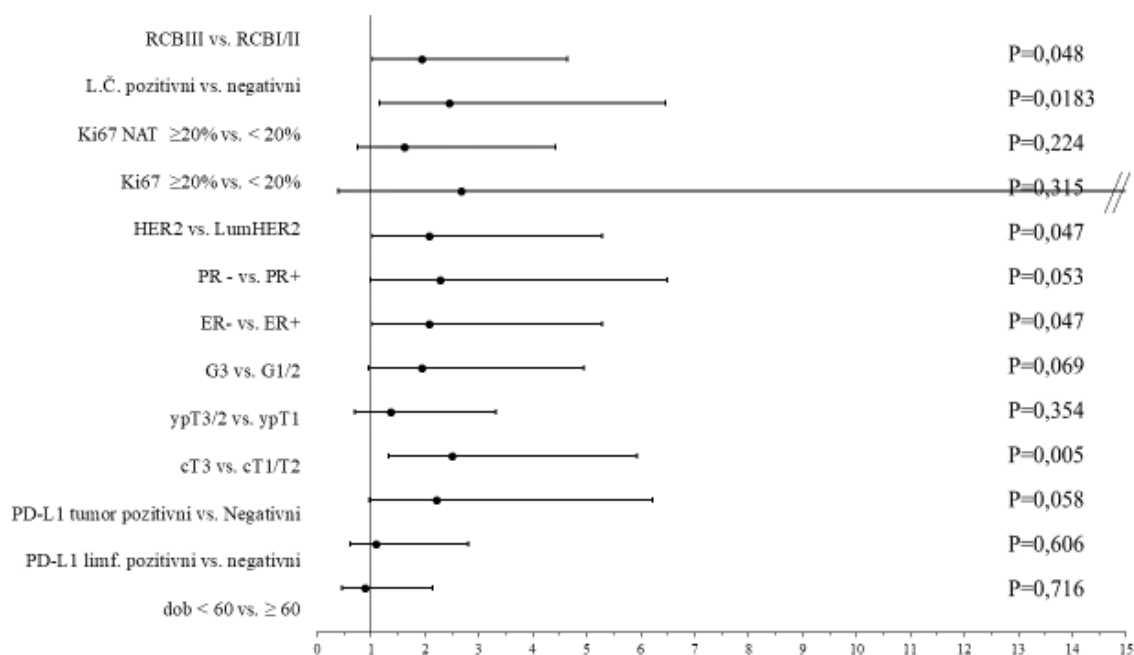


Slika 28. Procijenjena stopa preživljenja bez progresije bolesti (DFS) prema statusu PD-L1 u tumor-infiltrirajućim limfocitima unutar podskupina LumHER2 ($P=0,949$) i čistog HER2 tipa ($P=0,675$) HER2-pozitivnih bolesnica nakon NAT

U slučaju pozitivne izraženosti biljega PD-L1 u stanicama karcinoma uočili smo višu stopu povrata bolesti u odnosu na PD-L1 negativne karcinome (Slika 29), ali razlika nije statistički značajna (Log rank, Test statistic = -1,71347 P =0,086). Četiri od devet (44,4%) bolesnica imalo je progresiju bolesti, s medijanom od 12 mjeseci do progresije.



Slika 29. Procijenjena stopa preživljenja bez progresije bolesti (DFS) prema statusu imunohistokemijske izraženosti PD-L1 u tumorskim stanicama HER2-pozitivnih bolesnica nakon neoadjuvantne anti-HER2 terapije (P=0,086)



Slika 30. Procjena relativnog rizika za povrat bolesti o donosu na sve istraživane karakteristike HER2 pozitivnih karcinoma dojke

U ukupnom uzorku 122 bolesnice s HER2 pozitivnim karcinomom dojke veći relativni rizik za povrat bolesti imaju karcinomi veći od 5 cm (cT3) procijenjeni slikovnim metodama prilikom postavljanja dijagnoze (RR=2,51 95% CI 1,3-4,8; P=0,005), pozitivni limfni čvorovi detektirani na reseksijskom materijalu nakon NAT (RR=2,45 95% CI 1,2-5,2; P=0,018), negativan status ER a time i čisti HER2 pozitivni imunofenotip (RR=2,07 95% CI 1,0-4,2; P=0,005) te lošiji odgovor na NAT (RCB III) (RR=1,93 95% CI 1,0-3,7; P=0,048). Također vidimo da se veći rizik pojavljuje i u slučaju negativnog statusa PR, visokog histološkog gradusa (G III), te pozitivnog statusa PD-L1 u tumorskim stanicama, ali tek s tendencijom k statističkoj značajnosti (Slika 30).

6. RASPRAVA

Primjena ciljane anti-HER2 terapije monoklonskim protutijelom trastuzumabom značajno je unaprijedila preživljenje bolesnica s HER2-pozitivnim karcinomom dojke. Zadnjih godina terapijski pristup se promijenio pa se sada kod većine HER2 pozitivnih karcinoma dojke primjenjuje neoadjuvantna terapija (NAT) anti-HER2 lijekovima (kao mono ili dualna terapija u nekoliko kombinacija) posebice kod onih bolesnica koje imaju procijenjen visoki rizik za povrat bolesti (42). Veliki dio bolesnica s HER2 pozitivnim karcinomima ima odličan odgovor na NAT te u oko 40-70% bolesnica dođe do potpune regresije bolesti i kompletnog patološkog odgovora (engl. *pathological complete response*, pCR), bez ostatnog tumora na reseiranom materijalu (137–141). Učinak NAT je još značajniji u slučajne dualne anti-HER2 terapije u odnosu na liječenje samo trastuzumabom (141–143). Podaci iz literature napominju da bolesnice koje ostvare pCR na dualnu NAT imaju 70-90% manji rizik od povrata bolesti (77, 144). Zbog takvog pristupa liječenju danas stopa ukupnog 8-godišnjeg preživljenja HER2 pozitivnih bolesnica iznosi 37 % (141, 145). Takav učinak dualne anti-HER2 terapije, na primjer, nije postignut kod HER2 pozitivnih karcinoma želuca (146). Unatoč dosadašnjim dobrim učincima ovakvog liječenja te dodatnog produženja razdoblja bez progresije bolesti još uvijek jedan dio bolesnica nema potpun odgovor na NAT i dožive progresiju bolesti.

U našem istraživanju od 122 bolesnice s HER2 pozitivnim karcinomom dojke koje nakon neoadjuvantne anti-HER2 terapije nisu imale kompletan patološki odgovor 27 bolesnica (22,1%) je doživjelo progresiju bolesti. Prema našim podacima objavljenim u poster prezentaciji na hrvatskom onkološkom kongresu 2018. godine (147), od svih bolesnica s karcinomom dojke koje primaju NAT, potpuni patološki odgovor (RCB 0) postiže manje od 30% bolesnica. Međutim, HER2 pozitivni i trostruko-negativni karcinomi dojke postižu

značajniji potpuni učinak NAT nego luminalni. Tako oko 40% HER2 pozitivnih i trostruko negativnih karcinoma dojke postiže potpuni patološki odgovor za razliku od manje od 10% luminalnih karcinoma dojke. Isti podaci pokazuju i da unutar HER2 pozitivnih karcinoma dojke kompletan odgovor na NAT dvostruko češće (60% vs. 28,6%) postižu karcinomi čistog HER2 imunofenotipa (negativni ER/PR) nego oni Luminalnog HER2 imunofenotipa (pozitivni ER/PR). Sukladno tim rezultatima, rezultati ovog istraživanja također pokazuju da su bolji odgovor na NAT imale bolesnice s čistim HER2 imunofenotipom (HER2 tip) te su imale dvostruko češće minimalnu rezidualnu bolest (RCB I) na resektiranom materijalu od Luminalnih HER2 ($P=0,019$).

Naši rezultati odgovora na NAT potpuno su u korelaciji s najnovijim objavljenim rezultatima drugih autora. I njihovi podaci pokazuju da karcinomi dojke čistog HER2 imunofenotipa imaju kompletan odgovor (RCB 0) u 45% do 85,2% na NAT koja je uključivala ciljane anti-HER2 inhibitore za razliku od upola slabije postignutog kompletnog odgovora kod Luminalnih HER2 karcinoma dojke (77, 84, 87, 141, 148, 149).

Osim razlike u izraženosti ER i PR između ova dva imunofenotipa (Luminalni HER2 i čisti HER2) pri odluci o NAT u našem istraživanju nije bilo značajne razlike u veličini tumora, proliferacijskom statusu stanica niti statusu limfnih čvorova. Nakon terapije zabilježili smo razliku u zastupljenosti višeg histološkog gradusa ($P=0,001$) te višeg proliferacijskog biljega Ki-67 ($P<0,001$) kod čistih HER2 karcinoma unatoč činjenici da je u toj skupini zabilježen dvostruko veći postotak dobrog odgovora na NAT (RCB I) te preko tri-četvrtine tumora manjih od 2 cm ($yT1$) u usporedbi s Luminalnim HER2. Ovaj podatak donekle pokazuje nepredvidivost učinka liječenja moguće zbog velike heterogenosti karcinoma dojke, čak i unutar jedne skupine koju definiramo kao HER2 pozitivni karcinomi dojke. Prema kriterijima za odluku o neoadjuvantnom liječenju karcinoma dojke, veličina tumora, imunofenotipski profil i status limfnih čvorova ključni su u procjeni koje će bolesnice

primati NAT (42). Jasno, protokoli NAT se razlikuju ovisno o tim kriterijima, a ponajprije ovise o imunofenotipu karcinoma. Međutim, kao što smo u uvodu napomenuli, unutar skupine HER2 pozitivnih karcinoma dojke, kombinacija terapije se opet razlikuje ovisno o statusu hormonskih receptora što vjerojatno utječe na različit odgovor na NAT iako pripadaju istoj skupini HER2 pozitivnih karcinoma dojke. Osim toga, velika većina bolesnica s čistim HER2 tipom karcinoma ima potpun odgovor na NAT, te je jasno da bolesnice uključene u naše istraživanje nisu niti primarno odgovorile na NAT.

To nas dovodi to drugog rezultata našeg istraživanja, gdje bolesnice s Luminalnim HER2 podtipom imaju bolje preživljenje bez progresije bolesti nego HER2 (Log rank $P=0,019$). Nije nam u potpunosti jasan razlog zbog kojeg su čisti HER2 pozitivni karcinomi bolje odgovorili na NAT, ali imaju lošiju prognozu bolesti te bržu pojavu recidiva.

Prema rezultatima Symmans WF i sur. (87) nema veće razlike u petogodišnjem DFS za RCB I i RCB II u obje imunofenotipske podskupine HER2 pozitivnih karcinoma, samo je vidljivo da krivulja preživljenja brže pada kod čistih HER2 karcinoma. To je potpuno u korelaciji s našim podacima, ali je moguće da nastala razlika među imunofenotipovima u našem istraživanju ovisi o kraćem vremenu praćenja (medijan 33 mjeseca). Ali, isto tako je moguće da postignuta veća redukcija proliferacije te luminalni HER2 karcinomi imaju dvostruko veći postotak tumora s $Ki67 < 20\%$ nego čisti HER2, ipak u konačnici pokazuje bolju prognozu bolesnica. Taj podatak je još očitiji ako obratimo pažnju na svega 22,2% tumora čistog HER2 imunofenotipa kod kojih je došlo do pada proliferacije nakon NAT za razliku od 57,6%-tne redukcije proliferacije kod Luminalnih HER2 karcinoma. Još uvijek postoje rasprave o prediktivnom i prognostičkom značaju Ki-67 nakon NAT, iako viši Ki-67 ukazuje na bolji učinak kemoterapije dok je veći pad proliferacije nakon NAT prediktor boljeg odgovora na terapiju i dužeg perioda kontrole bolesti te je informativniji od RCB-a (63, 77, 150).

Kao što vidimo, bolesnice s HER2 pozitivnim karcinomima uključene u naše istraživanje već u početku imaju drugačiji molekularni profil karcinoma koji nije odgovorio na NAT. Brojna istraživanja bave se pitanjem primarne rezistencije HER2 pozitivnih karcinoma dojke na trastuzumab, s ciljem pronalaženja biljega koji bi izdvojili karcinome s brзом progresijom. Liječenje trastuzumabom inhibira dimerizaciju receptora HER2 s ostalim receptorima HER obitelji i njihovu nizvodnu signalizaciju posebice preko MAPK i PI3K signalnog puta, smanjuje sposobnost popravka DNK sprječavanjem aktivacije proteina p21, povećava apoptozu i sprječava angiogenezu u većini HER2 pozitivnih karcinoma dojke (151).

Najveći problem liječenja ciljanom anti-HER2 terapijom je rezistencija u značajnom postotku, koja do danas još uvijek nije premoštena. Razlozi za rezistenciju su brojni, a vrlo često nastaje zbog aberantnih aktivacija (mutacije) HER2 nizvodnih signalnih puteva (PI3K/AKT ili RAS/ERK) ili aktivacijom drugih signalnih puteva zbog dimerizacije nastale vezanjem drugih liganada; zbog narušenog vezanja lijeka za HER receptore (defektni receptor); smanjenom aktivacijom imunološkog sustava (77). Iako se istražuju brojne terapijske opcije koje bi poništile rezistenciju, do danas niti jedna nije pokazala dovoljno jak klinički učinak.

Pored svega navedenog, ključni mehanizam učinka trastuzumaba, i općenito terapije inhibicije HER2 receptora vezanjem monoklonskog lijeka na izvanstaničnu domenu receptora, je aktivacija imunoodgovora, stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC, eng. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) koja nastaje kao posljedica imunološke reakcije NK stanica. Vezanjem NK stanica za slobodni Fc fragment trastuzumaba otpuštaju se citotoksične granule i luče protuupalni citokini (tj. $\text{IFN}\gamma$ i $\text{TNF}\alpha$) i kemokini koji izazivaju apoptozu tumorskih stanica (152). Sposobnost HER2 pozitivnih karcinoma dojke da izbjegnu/blokiraju invaziju imuno stanica je svakako jedan od

mehanizama nastanka rezistencije na trastuzumab (100, 152, 153). Jedan od mogućih mehanizama je povećana regulacija PD-L1 nastala zbog trastuzumabom aktiviranih imunoloških efektorskih stanica u području tumora (154).

Stoga su novija istraživanja i terapijski pristupi fokusirani na obnovu imunoodgovora. Odnedavno je kod trostruko negativnih karcinoma dojke u primjeni terapija atezolizumabom (Tecentriq®, Roche), monoklonskim protutijelom dizajniranim da veže protein PD-L1, blokira njegove interakcije s receptorima PD-1 i B7.1 te omogućava aktivaciju T-stanica (155). Međutim, atezolizumab ne inhibira interakciju PD-L2 liganda s PD-1 receptorom. Atezolizumab je imunoterapija raka koja ima potencijal korištenja kao kombinirani partner s drugim imunoterapijama, ciljanim lijekovima i raznim kemoterapijama u širokom rasponu karcinoma (156). Osim toga, nedavno objavljeni rezultati međunarodne studije KEYNOTE-522 (21 zemlja uključena u studiju) na preko 1100 bolesnika pokazuju bolje učinke neoadjuvantnog liječenja ukoliko je u NAT uključen „*check-point*“ inhibitor PD-1, pembrolizumab (Keytruda®, Merck Sharp & Dohme B.V). Ovi oblici terapije nisu specifični za pojedini tip karcinoma već obnavljaju imunoodgovor organizma čime su primjenjivi za razne tipove karcinoma. Prema uputama Europske medicinske agencije (EMA) terapija PD-1 ili PD-L1 inhibitorima može biti indicirana kod karcinoma malih i nemalih stanica pluća, pločastih karcinoma glave i vrata, urotelnih karcinoma, hepatocelularnih karcinoma, trostruko-negativnih karcinoma dojke, melanoma i non-Hodgkin limfoma, kolorektalnih karcinoma i karcinoma bubrega i endometrija (155,157). Prema studijama čiji su rezultati omogućili registraciju lijeka, dodatak inhibitora kontrolnih točaka PD-1/PD-L1 standardnoj kemoterapiji poboljšava prognozu neresektabilne i metastatske bolesti (157).

Stoga je cilj našeg istraživanja bio procijeniti da li bi bolesnice s HER2 pozitivnim karcinomom dojke koje nisu odgovorile na NAT bile kandidati za primjenu inhibitora PD-L1 u nastavnoj terapiji. Imunohistokemijskom metodom je određen status PD-L1 receptora

u limfocitima infiltriranim u područje tumora (TIL), prema kriterijima za trostruko negativne karcinome dojke.

Naši rezultati pokazuju da je PD-L1 u TILovima izražen u 40,2% svih HER2 pozitivnih karcinoma dojke, s tim da je izraženost češća u karcinomima čistog HER2 imunofenotipa nego Luminalnog HER2 imunofenotipa (48,3% vs. 32,3%) te stoga negativno korelira sa statusom ER i PR. Naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu korelaciju izraženosti PD-L1 s kliničko-patološkim karakteristikama HER2 pozitivnih karcinoma dojke. Doduše, naši rezultati upućuju da karcinomi infiltrirani limfocitima pozitivnim na PD-L1 imaju viši stupanj proliferacije ($P=0,043$) te viši histološki gradus ($P=0,059$) i negativne hormonske receptore (posebice PR; $P=0,059$), ali bez statistički značajne razlike među PD-L1 pozitivnim i negativnim tumorima. Također nismo detektirali razliku statusa pozitivnih limfnih čvorova niti progresije bolesti ovisno o statusu PD-L1 u TILovima.

Rad Lu i sur. (158) pokazuju da je razina PD-L1 mRNA značajno niža u ER-pozitivnim staničnim linijama karcinoma dojke što potvrđuje naš podatak razlike izraženosti PD-L1 po ER statusu čak i unutar HER2 pozitivnih karcinoma dojke. Međutim, prema dostupnoj literaturi na kliničkim uzorcima podaci su vrlo neujednačeni. Tako Hoffman i sur. (159) nalaze češće pozitivan PD-L1 u TILovima i stanicama luminalnih HER2+ karcinoma dojke. Cirqueira i sur. (132) u svojoj meta-analizi na 15 studija, utvrdili su statistički značajniju izraženost PD-L1 kod bolesnika starijih od 50 godina, češće kod negativnih limfnih čvorova, te kod HER2 negativnih karcinoma dojke bez korelacije s imunofenotipom. Sveukupno nije zabilježena korelacija izraženosti PD-L1 u TILovima s progresijom bolesti, ali je pokazatelj lošijeg ukupnog preživljenja (132). Na žalost, navedena meta-analiza trenutno dostupnih istraživanja pokazuje veliku heterogenost rezultata, jer su skupine na kojima su rađena istraživanja raznolike, primijenjene terapijske opcije su široke, ima manje podataka o PD-L1 izraženosti nakon NAT (kao u našem istraživanju) te su korištena različita protutijela u

detekciji PD-L1 pozitiviteta (132). U obje studije jedini podatak koji odgovara našem je korelacija pozitivnog PD-L1 u TIL-ovima s višim Ki-67 (132, 159).

Inače, tumori višeg histološkog gradusa i višeg stupnja proliferacije često pokazuju visoko mutacijsko opterećenje (engl. *tumor mutation burden*, TMB) zbog visoke mikrosatelitne nestabilnosti. Ono se pojavljuje zbog mutacija u genima popravka krivo sparenih baza DNA (engl. *mismatch repair*, MMR) a za posljedicu ima nastanak hipermutacija u tumorskim stanicama koje bi zapravo mogle utjecati na imunološki odgovor (160, 161). Karcinomi dojke pokazuju TMB u manjem postotku od ostalih karcinoma (160–162). Odnos između prediktivnih vrijednosti ekspresije PD-L1 i TMB-a je predmet velike rasprave. Nekoliko studija pokazalo je da su PD-L1 i TMB neovisni prediktori odgovora na terapiju „check point“ inhibitorima, a izraženost PD-L1 i TMB ima nisku korelaciju kod više tipova tumora (160–162).

Naši rezultati nisu utvrdili povezanost izraženosti PD-L1 u TILovima s odgovorom na terapiju. Medijan vrijednosti RCB scora kao i raspodjela RCB grupa su gotovo isti neovisno o statusu PD-L1 u TILovima. Unutar svake RCB grupe (I, II, III) oko 40% tumora ima PD-L1-pozitivne limfocite. Što se tiče procjene povrata bolesti prema RCB statusu naši podaci pokazuju da je rizik od povrata bolesti najveći kod slabog odgovora na NAT (RCB III) dok kod umjerenog (RCB I) i parcijalnog odgovora (RCB II) rizik upola manji ($P=0,085$). Također nismo detektirali korelaciju izraženosti PD-L1 u TILovima s prognozom bolesti. Bolesnice imaju progresiju bolesti podjednako i u slučaju PD-L1 negativnih i PD-L1 pozitivnih TILova (20,5% vs. 24,5%). Međutim, naši podaci pokazuju da bolesnice s PD-L1 pozitivnim TILovima dvostruko ranije imaju progresiju bolesti. Niti unutar pojedinog imunofenotipa nema korelacije prognoze bolesti s izraženosti PD-L1, iako je kod čistih HER2 karcinoma izraženost PD-L1 u korelaciji s višom proliferacijom ($P=0,05$) i lošijim RCB ($P=0,043$), što nije utvrđeno unutar skupine Luminalnih HER2 karcinoma.

Rezultati Symmans WF i sur. (87) također pokazuju lošiji petogodišnji DFS u slučaju RCB III (47%) bez razlike među ER+ i ER- HER2 pozitivnih karcinoma dojke. Rezultati nekoliko istraživanja provedenih na uzorcima trostruko negativnih karcinoma dojke nakon NAT ne nalaze pozitivnu korelaciju izraženosti PD-L1 u limfocitima s DFS ili OS (163, 164) niti s većinom kliničko-patoloških karakteristika karcinoma. Yuan i sur. (165) nisu detektirali razliku izraženosti PD-1/PD-L1 među imunofenotipovima karcinoma dojke kao niti korelaciju s kliničkopatološkim karakteristikama karcinoma u nativnim uzorcima tumora prije bilo kakvog tretmana. Kod karcinoma drugih sijela rezultati su vrlo heterogeni (166). Tako postoji korelacija izraženosti PD-L1 i lošije stope preživljenja do povrata bolesti (DFS) u bolesnika s kolorektalnim ili hepatocelularnim karcinomom te karcinomom bubrega i testisa, ali ne i karcinoma pločastih stanica glave i vrata, melanoma, karcinoma nazofarinksa, raka želuca i urotelnog karcinoma, a značajno je povezana s boljim DFS u bolesnika s karcinomom jajnika (166). Iako isti rad pokazuje korelaciju izraženost PD-L1 sa značajno lošijom stopom ukupnog preživljenja, to se uglavnom odnosi na karcinome jednjaka, bubrega i mezoteliome. S druge strane, izraženost PD-L1 nije bila u korelaciji s lošijim ukupnim preživljenjem bolesnika s nekim malignim tumorima kao što su adrenokortikalni karcinom, rak dojke, urotelni karcinom, kolorektalni karcinom, glioblastom, hepatocelularni karcinom, karcinom pločastih stanica glave i vrata, melanom, te karcinomi želuca, timusa, testisa ili karcinomi cerviksa.

Preliminarni rezultati Loi i sur. (167) pokazuju da bi kod trastuzumab-rezistentnih karcinoma dojke koji imaju PD-L1 pozitivne TILove bilo korisno uključiti anti-PD-L1 inhibitore u nastavnu terapiju kako bi se zaobišao mehanizam rezistencije (klinička studija PANACEA). I naši podaci podržavaju tu kliničku studiju, čije konačne rezultate tek očekujemo. Terapija inhibitorima kontrolnih točaka imunološkog odgovora u primjeni je kod bolesnika s malignim bolestima drugih sijela, ali trenutno dostupni podaci pokazuju

veliku heterogenost u terapijskim kombinacijama i linijama primjene PD-1/PD-L1 inhibitora, te je zasigurno potrebno još neko vrijeme do značajnijih kliničkih podataka (168–170).

Rezultati kliničke prakse bit će ključni za postizanje konsenzusa oko definiranog primarnog protutijela i protokola za imunohistokemijsko bojenje PD-1/PD-L1 (171), kao i očitavanje (u limfocitima ili i tumorskim stanicama) o čemu će zapravo ovisiti koju terapijsku anti-PD-1/PD-L1 opciju treba primijeniti u liječenju karcinoma različitih sijela (133, 172, 173). Naše istraživanje fokusirano je na izraženost PD-L1 nakon NAT, pri čemu smo izdvojili jedan dio bolesnica koje bi zbog utvrđene izraženosti PD-L1 bile kandidati na terapiju inhibitora kontrolnih točaka imunoodgovora. Neka istraživanja provedena su na uzorcima bioptiranog materijala prije bilo kakve terapije te su Kurozumi i sur. (174) detektirali dvostruko više PD-L1 pozitivnih stanica (17,5 %) kod HER2-pozitivnih netretiranih karcinoma dojke.

Međutim, svaka terapija ima utjecaj na tumorsku biologiju pa tumori koji ne odgovore dobro na terapiju postižu sekundarne mehanizme rezistencije. Zbog toga je moguće da primarno „topli“ tumori na koje organizam stvara imunološki odgovor mogu postati „hladni“ pod utjecajem terapije i obrnuto (175). Stoga još ostaje pitanje da li bi određivanje statusa PD-L1 na nativnim uzorcima prije NAT, te uključivanje anti-PD-L1 inhibitora u ciljanu neoadjuvantnu terapiju unaprijed spriječilo nastanak rezistencije na trastuzumab. Ili bi, možda, analiza izraženosti PD-L1 na uzorcima karcinoma istih bolesnica prije NAT pokazala jasniju korelaciju s boljim preživljenjem (171). Neki radovi napominju razliku izraženosti PD-L1 u tretiranim i post NAT uzorcima, kao i među primarnim karcinomima i njihovim metastazama, drugi ne (159, 176). Stoga je potrebno još kliničkih istraživanja kako bi se jasnije utvrdilo da li je bolje određivati PD-L1 na nativnim uzorcima ili poslije NAT.

Ako stanice karcinoma izražavaju PD-L1, koji je ligand PD-1 receptora na limfocitima, znači da imaju sposobnost inaktivirati limfocite u njihovom imunološkom odgovoru. Stoga bi, bolesnice koje imaju rezidualnu bolest nakon NAT te u području tumora imaju infiltrirane PD-L1 pozitivne limfocite ili pak pokazuju PD-L1 pozitivitet u tumorskim stanicama, bile idealni kandidati za terapiju PD-L1 inhibitorima. Prema našim rezultatima to posebice obuhvaća karcinome čistog HER2 imunofenotipa. Istraživanja se bave i mehanizmima pretvaranja hladnih tumora u tople kako bi se ponovno reaktivirao imunološki odgovor te opcije ciljane imunoterapije (177). Posebno je zanimljiv klinički slučaj bolesnice s trastuzumab-rezistentnim karcinomom koji ima tumor-mutation burden (TMB) i pozitivan status PD-1 koja je na terapiji pembrolizumabom i trastuzumabom (178). Također je trenutno u tijeku klinička studija PANACEA koja uključuje bolesnice rezistentne na terapiju trastuzumabom, s pozitivnim statusom PD-1 koje će imati uključenu terapiju pembrolizumabom (179). Prema ovoj studiji i bolesnice iz našeg istraživanja s pozitivnim statusom PD-L1 bile bi kandidati za uključivanje inhibitora PD-L1 u nastavnu terapiju, što je i bio cilj našeg istraživanja. Uzimajući u obzir sličan terapijski pristup konstruirano je kombinirano monoklonsko protutijelo trastuzumaba s veznom domenom za PD-L1, čime se pojačava ADCC učinak liječenja trastuzumaba (180, 181).

Naše istraživanje obuhvatilo je i detekciju izraženosti PD-L1 u tumorskim stanicama te je zabilježeno svega 7,4% PD-L1-pozitivnih karcinoma i to velikom većinom kod čistog HER2 imunofenotipa. Prema našim rezultatima ti karcinomi koreliraju s višim Ki-67 i imaju statistički značajno lošiji DFS. Neki radovi također pronalaze korelaciju izraženosti PD-L1 u stanicama karcinoma s višim gradusom i pozitivnim statusom HER2 (117) ili negativnim ER/PR (182) dok druga istraživanja i ovdje pokazuju odstupanja. Tako rad Rozenblit i sur. (183) pokazuje sličan postotak izraženosti (8,3%) drugi radovi pokazuju izraženost višu od 20 % (117, 176, 182, 184). Rad Kurozumija i sur. (174) ne nalazi korelaciju u izraženosti

PD-L1 u stanicama HER2 pozitivnih karcinoma s DFS, iako su utvrdili bolji odgovor na NAT u slučaju pozitivnih PD-L1. Dok Hou i sur. (182) otkriva bolje ukupno preživljenje u slučaju prisutnih TILova, ali i pozitivnog PD-L1 kod HER2 pozitivnih karcinoma dojke, Tsung i sur. utvrđuju lošije preživljenje u slučaju neluminalnog HER2 karcinoma dojke pozitivnih na PD-L1 (185). Prema Qu i sur. (170) *ERBB2* gen (HER2) je jedan od ključnih gena pokretača imunoodgovora u karcinomima pluća ne-malih stanica. Huang i sur. (186) povezuju izraženost PD-L1 u TNBC s veličinom tumora ≥ 2 cm, višim histološkim gradusom i proliferacijom Ki-67 $\geq 20\%$ te pozitivnim limfnim čvorovima. Rezultati istraživanja provedenih na uzorcima trostruko negativnih karcinoma dojke nakon NAT se razlikuju te jedni nalaze pozitivnu korelaciju izraženosti PD-L1 ($\geq 20\%$) u stanicama karcinoma s boljim DFS, ali ne i u slučaju izraženosti u limfocitima (163). Klinički se već neko vrijeme određuje PD-L1 u stanicama karcinoma bubrega te je povezan s lošijim preživljenjem (187). Prema EMA-inim smjernicama za indikaciju terapije inhibitorima kontrolnih točaka nužno je odrediti status PD-1 ili PD-L1 u stanicama karcinoma ili u TILovima, ovisno o sijelu karcinoma i ciljanoj terapiji koja će biti primijenjena. Uskoro će vjerojatno biti potrebno odrediti i PD-L2 koji je također ligand za receptor PD-1, kao i PD-L1, te može omogućiti tumorskim stanicama da izbjegnu anti-PD-L1 blokadu. Osim toga danas je već u upotrebi nekoliko klonova pojedinih protutijela za imunohistokemijsko dokazivanje prisutnosti PD-1/PD-L1 ovisno o terapijskoj opciji. Stoga je jasno da će prije šire primjene ovakvog oblika terapije biti potrebno jasno odrediti smjernice za testiranje. To se zapravo ponajprije odnosi i na trenutne različite rezultate istraživanja nastale zbog različite primjene klonova protutijela u detekciji i razlike u načinu analiziranja PD-L1 statusa.

Naše istraživanje ima i neka ograničenja. Kao prvo broj bolesnica u svakoj podskupini je umjeren. Razlog tome nastaje u činjenici da se neoadjuvantna terapija značajnije više provodi tek posljednjih nekoliko godina. Osim toga veliki broj bolesnica ima potpun

patološki odgovor na terapiju, bez ostatnog tumora, posebice nakon uvođenja dualne anti-HER2 terapije. Stoga će svakako biti potrebno više kliničkih podataka o korelaciji izraženosti PD-1/PD-L1 u uzorcima biopsije netretiranih tumora i kolika je promjena njihovog statusa zbog djelovanja terapije. Naše istraživanje svakako bi trebalo nastaviti i usporediti ima li razlike u izraženosti PD-L1 ovisno o tipu primijenjene NAT (mono ili dualna anti-HER2 terapije s pridruženom kemoterapijom) i da li u nekom protokolu dolazi do povećanja ili smanjenja infiltracije limfocita u područje tumora. Možda bi i određivanjem statusa MSI, kao što se određuje kod karcinoma debelog crijeva, selektirali dio bolesnica prema drugačijem modalitetu liječenja. Isto tako vidimo da je potrebno nastaviti praćenje bolesnica te jasnije utvrditi da li razlika u preživljenju bez bolesti postoji između različitih imunofenotipova HER2 pozitivnih karcinoma dojke.

Zaključno možemo reći da je naše istraživanje ostvarilo zadani cilj. Utvrdili smo da 40% bolesnica ima pozitivan status PD-L1 u limfocitima te mogu imati koristi od uvođenja terapije inhibitorima kontrolnih točaka signalnog puta PD-1/PD-L1. Obzirom da je u tijeku razvoj bifazičnih antitijela u anti-HER2 terapiji (monoklonsko anti-HER2 protutijelo s veznom domenom za PD-1 receptor) bolesnice selektirane u našem istraživanju bile bi kandidati i za takav oblik neoadjuvantne terapije. To se posebno odnosi na bolesnice s HER2 pozitivnim karcinomima bez izraženih hormonskih receptora, koje imaju brz povrat bolesti nakon neostvarenog potpunog odgovora na NAT. Duže kliničko praćenje naših bolesnica moglo bi dati veći uvid u značaj izraženosti PD-L1 na dugoročno preživljenje bolesnica s HER2 pozitivnim karcinomom dojke.

7. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima našeg istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

1. HER2 pozitivni karcinomi dojke čistog HER2 podtipa imaju statistički značajno bolji odgovor na neoadjuvantnu anti-HER2 kemoterapiju (niži RCB) od LumHER2 ($P=0,019$)
2. 40,2% HER2 pozitivnih karcinoma dojke pokazuje pozitivan PD-L1 status u tumor-infiltrirajućim limfocitima (TIL) i 7,4% u stanicama tumora
3. Izraženosti PD-L1 u TIL nije u statistički značajnoj korelaciji s imunofenotipom HER2 pozitivnih karcinoma dojke ($P=0,096$), dok je izraženost u stanicama tumora u korelaciji s čistim HER2 imunofenotipom ($P=0,024$)
4. Pozitivan status PD-L1 u TIL korelira s višim Ki-67 u ostatnom tumoru ($P=0,043$)
5. Izraženost PD-L1 u TIL nije u statistički značajnoj korelaciji s odgovorom na terapiju (RCB) ($P=0,737$) niti s povećanim rizikom od povrata bolesti ($P=0,606$)
6. Progresija bolesti nakon NAT HER2 pozitivnih karcinoma dojke je češća u slučaju PD-L1 izraženog u stanicama karcinoma
7. Izraženost PD-L1 u stanicama karcinoma čistog HER2 podtipa je u statistički značajnoj korelaciji s lošijom RCB vrijednosti (score)
8. HER2 pozitivni karcinomi dojke LumHER2+ imunofenotipa značajno rjeđe imaju progresiju bolesti nego oni čistog HER2+ imunofenotipa ($P=0,019$)
9. Najveći utjecaj na povrat bolesti HER2 pozitivnih karcinoma dojke ima pozitivan status limfnih čvorova, veći tumori pri dijagnozi te lošiji odgovor na neoadjuvantnu terapiju (viši RCB score)

8. KRATKI SADRŽAJ

Do pojave ciljane anti-HER2 terapije, HER2 pozitivni karcinomi dojke (HER2+ KD) imali su najlošiju prognozu, a uvođenjem neoadjuvantne anti-HER2 terapije (NAT) dodatno je poboljšano preživljenje bolesnica. Unatoč uspjesima NAT, dio bolesnica pokazuje rezistenciju na ciljanu terapiju i za njih se traže drugi terapijski modaliteti.

Cilj našeg istraživanja je odrediti imunohistokemijsku izraženost PD-L1 na limfocitima infiltriranim u područje tumora (TIL) i tumorskim stanicama 122 bolesnice s HER2+ KD (62 luminalni podtip i 60 čisti HER2 podtip) koje nisu imale kompletan patološki odgovor na NAT. Naši rezultati pokazuju da HER2+ KD čistog HER2+ imunofenotipa imaju bolji odgovor na NAT od LumHER2+ ($P=0,019$). Pozitivan PD-L1 u TILovima zabilježen je u 40,2% svih uzoraka dok je u 7,4% slučajeva PD-L1 pozitivan u stanicama karcinoma. Čisti HER2+ podtip češće ima pozitivan PD-L1 u TIL ($P=0,096$) i u stanicama karcinoma ($P=0,024$) nego LumHER2+. Pozitivan PD-L1 u TIL ne korelira s kliničkopatološkim karaktersitikama KD, osim s višim Ki-67 u ostatnom tumoru ($P=0,043$). Izraženost PD-L1 u TIL nije u korelaciji s RCB niti s rizikom od povrata bolesti dok izraženost PD-L1 u karcinomu korelira s lošijom prognozom. LumHER2+ značajno rjeđe imaju progresiju bolesti od HER2+ podtipa ($P=0,019$). Najveći utjecaj na povrat bolesti ima pozitivni status limfnih čvorova ($P=0,003$), veći tumori pri dijagnozi ($P=0,022$) te lošiji odgovor na NAT ($P=0,028$). Naši rezultati upućuju da bi dio bolesnica koje nisu imale potpun odgovor na NAT bile kandidati za terapiju blokatorima PD-L1, posebice one s čistim HER2+ podtipom.

Ključne riječi: karcinomi dojke, anti-HER2 neoadjuvantna terapija, PD-L1 izraženost, DFS

9. SUMMARY

Expression and prognostic significance of PD-L1 in HER2 positive breast carcinomas

Melita Perić Balja, Zagreb 2022.

Prior to targeted therapy, HER2-positive breast cancers (HER2+ BC) had a poor prognosis, and further improvement in survival was achieved with the introduction of neoadjuvant anti-HER2 therapy (NAT). However, some patients still have resistance. Therefore, our goal was to determine the immunohistochemical expression of PD-L1 on tumor-infiltrated lymphocytes (TIL) of HER2+ BC who did not have a complete pathological response to NAT. Our results show that HER2+ BC of pure HER2+ immunophenotype (ER-negative) have a better response to NAT than LumHER2+ ($P=0.019$). PD-L1 in TILs was positive in 40.2% of all cases, and 7.4% of BC expressed PD-L1 in cancer cells. The expression of PD-L1 in TILs does not correlate with clinicopathological characteristics of BC, nor with the response to therapy or recurrence of the disease. PD-L1 positive cancer cells are more common in HER2+ than LumHER2+ ($P = 0.024$) and correlate with a poorer prognosis. LumHER2+ have better disease-free survival than HER2+ subtype ($P=0,019$). Positive status of lymph nodes ($P=0.003$), larger tumors at diagnosis ($P=0.022$) and poorer response to NAT ($P=0.028$) have the greatest impact on recurrence. We can conclude that therapy with anti-PD-L1 inhibitors could target PD-L1-positive BC without a complete response to NAT, especially those with pure HER2+ immunophenotype.

Key words: breast cancer, anti-HER2 neoadjuvant chemotherapy, PD-L1 expression, DFS

10. LITERATURA

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, Lukić S, Nola M, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. Str. 886.
2. Lynch PJ, medicinski ilustrator. Građa dojke [slika s interneta]. Breast_anatomy_normal_scheme.png. [pristupljeno 20.12.2021.]. Dostupno na https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0f/Breast_anatomy_normal_scheme.png
3. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije - Udžbenik i atlas prema 10. američkom izdanju. Zagreb: Školska knjiga; 2006. Str. 524.
4. IARC - WHO Breast Tumours [Internet]. [pristupljeno 11.11.2021.]. Dostupno na: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Breast-Tumours-2019>.
5. Amin MB, Gress DM, Meyer Vega LR, Edge SB, Amin MB, Greene FL, ur. AJCC Cancer Staging Manual, 8. izdanje. Chicago: Springer Inc.; 2018. Str. 1049.
6. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C., ur. Tumor, Node, Metastasis (TNM) staging classification for breast cancer. 8.izdanje. Oxford: John Wiley & Sons, Inc., 2017. Str. 241.
7. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, i sur. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. CA Cancer J Clin [Internet]. 2017 Mar [cited 2020 Apr 27];67(2):93-9. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21388>
8. Ajani J, In H, Sano T. AJCC Cancer Staging Manual. In: Amin M, ur. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. Chicago; 2017.
9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
10. Park J, Huang D, Chang YJ, Lim MC, Myung SK. Oral contraceptives and risk of breast cancer and ovarian cancer in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation: A meta-analysis of observational studies. Carcinogenesis. 2021 Dec 27;bgab107. doi:

10.1093/carcin/bgab107. Epub ahead of print.

11. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, i sur. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018;103:356-87.
12. Šamija M, Juzbašić S, Šeparović V, Vrdoljak D, ur. Tumori dojke. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
13. Tchow J, Morrow M. Available models for breast cancer risk assessment: how accurate are they? *undefined*. 2003;197(6):1029-35.
14. McCarthy AM, Guan Z, Welch M, Griffin ME, Sippo DA, Deng Z, i sur. Performance of Breast Cancer Risk-Assessment Models in a Large Mammography Cohort. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2020;112(5):489-97.
15. Gail MH, Mai PL. Comparing Breast Cancer Risk Assessment Models. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2010;102(10):665-8.
16. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, i sur. Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(18):1371-88.
17. Beketić-Orešković L, Šantek F., ur. Karcinom dojke: Multidisciplinarno liječenje. Zagreb; Medicinska naklada; 2018. Str. 221.
18. Borovečki A, Braš M, Brkljačić B, Canki-Klain N, Plavetić ND, Grahovac B, i sur. Guidelines for genetic counselling and testing for hereditary breast and ovarian cancer. *Lijec Vjesn*. 2017;139(5-6):107-17.
19. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, i sur. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nat*. 2012;490(7418):61-70.
20. Levanat S. Molecular diagnostics of hereditary breast cancer. *Rad Hrvat Akad Znan i Umjet Med Znan*. 2014;520(40):25-31.
21. Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes A-M, Kruse TA. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast Cancer (Auckl)*. 2014;8:145-55.
22. Palacios J, Robles Frías MJ, Castilla MA, López-García MA, Benítez J. The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology*. 2008;75(2):85-94.
23. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, i

- sur. Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumors. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
24. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak: Incidencija raka u Hrvatskoj 2016. godine. Šekerija M, ur. [Internet]. 2019 travnja 03. [pristupljeno 20.01.2022.]: Bilten;41. 2019;Bilten 41.
 25. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak: Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. godine. Šekerija M, ur. [Internet]. 2020 veljače 03. [pristupljeno 20.01.2022.]: Bilten;42. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2017-final.pdf>
 26. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak: Incidencija raka u Hrvatskoj 2018. godine. Šekerija M, ur. [Internet]. 2021 prosinca 08. [pristupljeno 20.01.2022.]: Bilten;43. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2020/12/Bilten_2018_final.pdf
 27. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak: Incidencija raka u Hrvatskoj 2019. godine. Šekerija M, ur. [Internet]. 2021 prosinca 09. [pristupljeno 20.01.2022.]: Bilten;44. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/12/Bilten44_2019.pdf
 28. 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* (London, England) [Internet]. 2018 Mar 17 [pristupljeno 24.01.2022.];17(391(10125)):1023-75. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29395269/>
 29. Program probira raka dojke. Hrvatski zavod za javno zdravstvo [Internet]. 2021. svibanj 10. [pristupljeno 15.10.2021.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/program-probira-raka-dojke/>
 30. Capak K, ur. Hrvatske smjernice za osiguranje kvalitete probira i dijagnostike raka dojke. [Internet]. Zagreb;Hrvatski zavod za javno zdravstvo: 2017. [ažurirano 17. 02.2020.; pristupljeno 26.10.2021.] Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/26356/>
 31. Lambaša S, Tomasović Lončarić Č, Stanec Z, Trutin Ostović K, Križanac Š. Analiza dobne distribucije i stupnja lokalne proširenosti raka dojke kod bolesnica operiranih u 11-godišnjem razdoblju u Kliničkoj bolnici "Dubrava". *Liječ Vjesn* 2011;133:312-14.
 32. Ramić S, Perić Balja M, Ramljak V, Zadro S, Kirac I, Orešić T, i sur. Histopathological features of breast cancer from 2005 to 2019 in a single center in croatia: An overview of

- changes following the introduction of mammography screening. *Libr Oncol.* 2020;48(1):13-9.
33. Kelava I, Tomičić K, Kokić M, Ćorušić A, Planinić P, Kirac I, i sur. Breast and gynecological cancers in Croatia, 1988-2008. *Croat Med J.* 2012;53(2):100-8.
 34. Taghian A, Smith BL, Erban J., ur. *Breast Cancer: A Multidisciplinary Approach to Diagnosis and Management.* Demos Medical Publishing; 2009. Str. 384.
 35. Ping Z, Xia Y, Shen T, Parekh V, Siegal GP, Eltoum IE, i sur. A microscopic landscape of the invasive breast cancer genome. *Sci Reports* 2016;6(1):1-10.
 36. 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.
 37. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, i sur. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607.
 38. National Cancer Institute. Cancer staging [Internet]. 2015 March [pristupljeno 01.05.2021]. Dostupno na: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging/staging>
 39. Abramowitz MC, Li T, Morrow M, Sigurdson ER, Anderson P, Nicolaou N, i sur. Dermal lymphatic invasion and inflammatory breast cancer are independent predictors of outcome after postmastectomy radiation. *Am J Clin Oncol.* 2009;32(1):30-3.
 40. Hadjiloucas I, Bundred NJ. Axillary surgery: is it necessary? *Breast.* 2000;9(1):2-4.
 41. Dobrila F, Strčić M, Lovasić F, Jurišić D. Uloga kirurškog odstranjenja aksilarnih limfnih čvorova kod operabilnog raka dojke. U: Prpić I, Unušić J, ur. *Bolesti dojke: zbornik radova XI. znanstvenog sastanka „Bolesti dojke“.* Zagreb, 2001;93-99.
 42. Kumar R, Burns J, Abraham J, Aft R, Agnese D, Allison KH, i sur. NCCN Guidelines Version 2.2022 Breast Cancer. 2021 January [pristupljeno 09.01.2022.]; Dostupno na: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast_risk.pdf
 43. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, Meijnen P, van de Velde CJH, Mansel RE, i sur. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol* 2014;15(12):1303-10.

44. Andea AA, Bouwman D, Wallis T, Visscher DW. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer*. 2004;100(1):20-7.
45. Raap M, Antonopoulos W, Dämmrich M, Christgen H, Steinmann D, Länger F, i sur. High frequency of lobular breast cancer in distant metastases to the orbit. *Cancer Med*. 2015;4(1):104–11.
46. Perić Balja M, Velemir Vrdoljak D, Stanec M, Šitić S, Krleža Supić D, Knežević F. Rectal metastasis from lobular carcinoma of the breast: A case report. *Coll Antropol*. 2010;34(2):719-21.
47. Winston CB, Hadar O, Teitcher JB, Caravelli JF, Sklarin NT, Panicek DM, i sur. Metastatic lobular carcinoma of the breast: patterns of spread in the chest, abdomen, and pelvis on CT. *AJR Am J Roentgenol*. 2000;175(3):795-800.
48. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2004;6(3):109-18.
49. Walaszczyk A, Gabryś D. Molecular markers used in breast cancer diagnosis - Current practice and future perspectives. *Nowotwory*. 2018;68(5-6):259-67.
50. Wang D, Xu J, Shi G, Yin G. Molecular markers' progress of breast cancer treatment efficacy. *J Cancer Res Ther* [Internet]. 2015 Aug [pristupljeno 15.10.2021.];11(1): C11(5). doi: 10.4103/0973-1482.163832.
51. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* [Internet]. 2002;346(5):340-52.
52. Williams C, Lin CY. Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. *Ecancermedicallscience* [Internet]. 2013 Nov [pristupljeno 12.10.2021.];7:370. doi: 10.3332/ecancer.2013.370.
53. Fuqua SAW, Cui Y, Lee AV, Osborne CK, Horwitz KB. Insights into the role of progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(4):931-2.
54. Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, i sur. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res*. 2004;10(8):2751-60.
55. Mote PA, Leary JA, Avery KA, Sandelin K, Chenevix-Trench G, Kirk JA, i sur. Germ-line mutations in BRCA1 or BRCA2 in the normal breast are associated with altered

- expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor A. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;39(3):236-48.
56. Alvarez Goyanes RI, Escobar Pérez X, Camacho Rodríguez R, Orozco López M, Franco Odio S, Llanes Fernández L, i sur. Hormone receptors and other prognostic factors in breast cancer in Cuba. *MEDICC Rev*. 2010;12(1):36-40.
 57. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, i sur. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144(5):545-63.
 58. Yao N, Song Z, Wang X, Yang S, Song H. Prognostic impact of progesterone receptor status in Chinese estrogen receptor positive invasive breast cancer patients. *J Breast Cancer*. 2017;20(2):160-9.
 59. World Health Organisation. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
 60. Beltjens F, Molly D, Bertaut A, Richard C, Desmoulins I, Loustalot C, i sur. ER–/PR+ breast cancer: A distinct entity, which is morphologically and molecularly close to triple-negative breast cancer. *Int J Cancer*. 2021;149(1):200-13.
 61. Arena V, Pennacchia I, Vecchio FM, Carbone A. ER–/PR+/HER2– breast cancer type shows the highest proliferative activity among all other combined phenotypes and is more common in young patients: Experience with 6643 breast cancer cases. *Breast J*. 2019;25(3):381-5.
 62. Kreiger N, King WD, Rosenberg L, Clarke EA, Palmer JR, Shapiro S. Steroid receptor status and the epidemiology of breast cancer. *Ann Epidemiol*. 1991;1(6):513-23.
 63. Zhang A, Wang X, Fan C, Mao X. The Role of Ki67 in evaluating neoadjuvant endocrine therapy of hormone receptor-positive breast cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:1426. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.687244>
 64. 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 Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
65. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, i sur. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):539-52.
 66. Reis-Filho JS, Davidson NE. Ki67 Assessment in Breast Cancer: Are We There Yet? *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(7):797-8.
 67. Davey MG, Hynes SO, Kerin MJ, Miller N, Lowery AJ. Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17):4455. doi: 10.3390/cancers13174455.
 68. Ács B, Zámbo V, Vízkeleti L, Szász AM, Madaras L, Szentmártoni G, i sur. Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Diagn Pathol*. 2017;12(1):1-12.
 69. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, i sur. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(7):808-19.
 70. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, i sur. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of American pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(2):241-56.
 71. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*. 2009;14(4):320-68.
 72. Hui Y, Lu S, Wang H, Resnick MB, Wang Y. Discordant HER2 immunohistochemical expression and gene amplification in ductal carcinoma in situ – evaluating HER2 in synchronous in-situ and invasive carcinoma. *Histopathology*. 2019;74(2):358-62.
 73. Ahn S, Woo JW, Lee K, Park SY. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. *J Pathol Transl Med*. 2020;54(1):34-44.
 74. Wolff AC, Elizabeth Hale Hammond M, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, i sur. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/ college of American pathologists clinical practice guideline

- focused update. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2105-22.
75. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(19):10869-74.
 76. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020;27(1):27-35.
 77. Chica-Parrado MR, Godoy-Ortiz A, Jiménez B, Ribelles N, Barragan I, Alba E. Resistance to Neoadjuvant Treatment in Breast Cancer: Clinicopathological and Molecular Predictors. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):1-27.
 78. Bossuyt V, Provenzano E, Symmans WF, Boughey JC, Coles C, Curigliano G, et al. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1280-91.
 79. Sethi D, Sen R, Parshad S, Khetarpal S, Garg M, Sen J. Histopathologic changes following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Indian J Cancer*. 2013;50(1):58-64.
 80. Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D, Badve S, Denkert C, et al. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: Recommendations from an international working group. *Mod Pathol*. 2015;28(9):1185-201.
 81. Viale G, Fusco N. Pathology after neoadjuvant treatment – How to assess residual disease. *Breast [Internet]*. 2021 Nov 16. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2021.11.009>. [Epub ahead of print].
 82. Sethi D, Sen R, Sen J, Parshad S, Khetarpal S, Garg M. Histopathologic changes following neoadjuvant chemotherapy in various malignancies. *Int J Appl Basic Med Res*. 2012;2(2):111-6.
 83. Residual Cancer Burden Calculator [Internet]. [pristupljeno 12.09.2021.]. Dostupno na: <http://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert3>
 84. Candás G, García A, Ocampo MD, Korbenfeld E, Vuoto HD, Isetta J, et al. Impact of immunohistochemical profile changes following neoadjuvant therapy in the treatment of breast cancer. *Ecancermedicalscience*. 2021;15:1-12.

85. Suppan C, Posch F, Mueller HD, Mischitz N, Steiner D, Klocker EV, i sur. Patterns of recurrence after neoadjuvant therapy in early breast cancer, according to the residual cancer burden index and reductions in neoadjuvant treatment intensity. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 May 2 [pristupljeno 22.01.2022.];13(10). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34065332/>
86. Katayama A, Miligy IM, Shiino S, Toss MS, Eldib K, Kurozumi S, i sur. Predictors of pathological complete response to neoadjuvant treatment and changes to post-neoadjuvant HER2 status in HER2-positive invasive breast cancer. *Mod Pathol*. 2021;34(7):1271-81.
87. Symmans WF, Wei C, Gould R, Yu X, Zhang Y, Liu M, i sur. Long-term prognostic risk after neoadjuvant chemotherapy associated with residual cancer burden and breast cancer subtype. *J Clin Oncol*. 2017;35(10):1049-60.
88. Yoshida A, Hayashi N, Suzuki K, Takimoto M, Nakamura S, Yamauchi H. Change in HER2 status after neoadjuvant chemotherapy and the prognostic impact in patients with primary breast cancer. *J Surg Oncol*. 2011;116(8):1021-8.
89. Cesca MG, Vian L, Cristóvão-Ferreira S, Pondé N, de Azambuja E. HER2-positive advanced breast cancer treatment in 2020. *Cancer Treat Rev*. 2020;88:102033. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102033.
90. Giordano SH, Temin S, Kirshner JJ, Chandarlapaty S, Crews JR, Davidson NE, i sur. Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2014;32(19):2078-99.
91. Chen S, Liang Y, Feng Z, Wang M. Efficacy and safety of HER2 inhibitors in combination with or without pertuzumab for HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1-15.
92. Nielsen DL, Andersson M, Kamby C. HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(2):121-36.
93. Vernieri C, Milano M, Brambilla M, Mennitto A, Maggi C, Cona MS, i sur. Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: Current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;139:53-66.

94. Ban M, Petrić Miše B, Vrdoljak E. Early HER2-Positive Breast Cancer: Current Treatment and Novel Approaches. *Breast Care*. 2020;15(6):560-9.
95. von Minckwitz G, Huang C-S, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, i sur. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(7):617-28.
96. Kunte S, Abraham J, Montero AJ. Novel HER2-targeted therapies for HER2-positive metastatic breast cancer. *Cancer*. 2020;126(19):4278-88.
97. Wang J, Xu B. Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2019 Sep 19 [pristupljeno 14.09.2021.];4(34). Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-019-0069-2>.
98. American Cancer Society. Targeted Drug Therapy. Breast Cancer Treatment. [Internet]. 2022. [pristupljeno 16.01.2022.]. Dostupno na: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/targeted-therapy-for-breast-cancer.html>
99. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*. 2018;32(19-20):1267-84.
100. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, i sur. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: Results from the FinHER trial. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1544-50.
101. International TILS Working Group [Internet]. [pristupljeno 12.12.2021.]. Dostupno na: <https://www.tilsinbreastcancer.org/>
102. Dieci MV, Radošević-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, i sur. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol*. 2018;52:16-25.
103. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, i sur. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2014;25(3):611-8.
104. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA, Salgado R, Denkert C, Savas P, i sur. RAS/MAPK

- activation is associated with reduced tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: Therapeutic cooperation between MEK and PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2016;22(6):1499-509.
105. Hamy AS, Pierga JY, Sabaila A, Laas E, Bonsang-Kitzis H, Laurent C, i sur. Stromal lymphocyte infiltration after neoadjuvant chemotherapy is associated with aggressive residual disease and lower disease-free survival in HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017;28(9):2233-40.
 106. Burstein HJ, Curigliano G, Thürlimann B, Weber WP, Poortmans P, Regan MM, i sur. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol.* 2021;32(10):1216-35.
 107. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: Seven steps to success (or failure). *Ann Oncol.* 2016;27(8):1492-504.
 108. Bonaventura P, Shekarian T, Alcazer V, Valladeau-Guilemond J, Valsesia-Wittmann S, Amigorena S, et al. Cold tumors: A therapeutic challenge for immunotherapy. *Front Immunol [Internet].* 2019 Feb 8 [pristupljeno 31.01.2022.];10:168. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00168>
 109. Vonderheide RH. The Immune Revolution: A Case for Priming, Not Checkpoint. *Cancer Cell.* 2018;33(4):563-9.
 110. Draganov D, Han Z, Rana A, Bennett N, Irvine DJ, Lee PP. Ivermectin converts cold tumors hot and synergizes with immune checkpoint blockade for treatment of breast cancer. *NPJ breast cancer [Internet].* 2021;7(1):22. <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00229-5>
 111. Venetis K, Invernizzi M, Sajjadi E, Curigliano G, Fusco N. Cellular immunotherapy in breast cancer: The quest for consistent biomarkers. *Cancer Treat Rev.* 2020;102089. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102089>
 112. Ayoub NM, Al-Shami KM, Yaghan RJ. Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: Recent advances and combination therapeutic approaches. *Breast Cancer Targets Ther.* 2019;11:53-69.
 113. Planes-Laine G, Rochigneux P, Bertucci F, Chrétien AS, Viens P, Sabatier R, i sur. PD-1/PD-L1 targeting in breast cancer: The first clinical evidences are emerging. a literature

- review. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):1-25.
114. Xiang X, Yu PC, Long D, Liao XL, Zhang S, You XM, i sur. Prognostic value of PD -L1 expression in patients with primary solid tumors. *Oncotarget*. 2018;9(4):5058–72.
 115. Tan TJ, Chan JJ, Kamis S, Dent RA. What is the role of immunotherapy in breast cancer? *Chinese Clin Oncol*. 2018;7(2). doi: 10.21037/cco.2018.04.01
 116. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727-42.
 117. Ayoub NM, Fares M, Marji R, Al Bashir SM, Yaghan RJ. Programmed death-ligand 1 expression in breast cancer patients: Clinicopathological associations from a single-institution study. *Breast Cancer Targets Ther*. 2021;13:603-15.
 118. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, i sur. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259-71.
 119. Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, Sinn B V., Gade S, Kronenwett R, i sur. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol*. 2015;33(9):983-91.
 120. Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, Madore J, Wilmott JS, Harvey K, i sur. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology*. 2016;69(1):25-34.
 121. Goto W, Kashiwagi S, Asano Y, Takada K, Takahashi K, Hatano T, i sur. Predictive value of improvement in the immune tumour microenvironment in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *ESMO Open*. 2018;3(6):1-10.
 122. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Morisaki T, i sur. Prediction of treatment responses to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer by analysis of immune checkpoint protein expression. *J Transl Med*. 2018;16(1):1-12. doi.org/10.1186/s12967-018-1458-y
 123. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Hatano T, i sur. Prediction of treatment response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer by subtype using tumor-infiltrating lymphocytes. *Anticancer Res*. 2018;38(4):2311-21.
 124. Marmé F. Immunotherapy in Breast Cancer. *Oncol Res Treat*. 2016;39(6):335-45.

125. Li M, Li A, Zhou S, Xu Y, Xiao Y, Bi R, i sur. Heterogeneity of PD-L1 expression in primary tumors and paired lymph node metastases of triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1-9.
126. Miles D, Gligorov J, André F, Cameron D, Schneeweiss A, Barrios C, i sur. Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2021;32(8):994-1004.
127. FDA Approves Atezolizumab for PD-L1 Positive Unresectable Locally [Internet]. [pristupljeno 16.01.2022.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-atezolizumab-pd-l1-positive-unresectable-locally-advanced-or-metastatic-triple-negative>
128. Chen S, Wang RX, Liu Y, Yang WT, Shao ZM. PD-L1 expression of the residual tumor serves as a prognostic marker in local advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Int J Cancer*. 2017;140(6):1384-95.
129. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, i sur. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(4):361-70.
130. Marra A, Viale G, Curigliano G. Recent advances in triple negative breast cancer: The immunotherapy era. *BMC Med*. 2019;17(1):1-9.
131. Kwa MJ, Adams S. Checkpoint inhibitors in triple-negative breast cancer (TNBC): Where to go from here. *Cancer*. 2018;124(10):2086–103.
132. Cirqueira MB, Mendonça CR, Noll M, Soares LR, de Paula Carneiro Cysneiros MA, Paulinelli RR, et al. Prognostic Role of PD-L1 Expression in Invasive Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(23):6090. doi: 10.3390/cancers13236090.
133. Radulović P, Krušlin B. Immunohistochemical expression of PD-L1 in solid tumors. *Libr Oncol*. 2017;45(2-3):43-5.
134. Miyoshi Y, Shien T, Ogiya A, Ishida N, Yamazaki K, Horii RIE, i sur. Associations in tumor infiltrating lymphocytes between clinicopathological factors and clinical outcomes in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2 negative breast cancer. *Oncol Lett*. 2019;17(2):2177-86.
135. Holgado E, Perez-Garcia J, Gion M, Cortes J. Is there a role for immunotherapy in HER2-

- positive breast cancer? *npj Breast Cancer* [Internet]. 2018;4(1):2-4.
136. VENTANA PD-L1 (SP142) Assay (US FDA Approved) [Internet]. [ažurirano 03.02.2022; pristupljeno 03.02.2022.]. Dostupno na: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/tests/ventana-pd-l1-sp142-assay1.html>
 137. Beitsch P, Whitworth P, Baron P, Rotkis MC, Mislowsky AM, Richards PD, i sur. Pertuzumab/Trastuzumab/CT Versus Trastuzumab/CT Therapy for HER2+ Breast Cancer: Results from the Prospective Neoadjuvant Breast Registry Symphony Trial (NBRST). *Ann Surg Oncol*. 2017;24(9):2539-46.
 138. Swain SM, Baselga J, Kim S-B, Ro J, Semiglazov V, Campone M, i sur. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(8):724-34.
 139. Wuerstlein R, Harbeck N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. *Rev Recent Clin Trials*. 2017;12(2):81-92.
 140. Choi JDW, Hughes TMD, Marx G, Rutovitz J, Hasovits C, Ngui NK. Pathological outcomes of HER2-positive non-metastatic breast cancer patients treated with neoadjuvant dual anti-HER2 therapy and taxane: An Australian experience. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2020;16(3):103-7.
 141. Wang C, Chen J, Xu X, Hu X, Kong D, Liang G, et al. Dual HER2 blockade in neoadjuvant treatment of HER2+ breast cancer: A meta-analysis and review. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2020 Jan 1 [pristupljeno 05.01.2022.]. 2020;19:1533033820960721. doi: 10.1177/1533033820960721
 142. Genentech PERJETA® (pertuzumab) Neoadjuvant Outcomes [Internet]. [ažurirano 2021; pristupljeno 16.01.2022.]. Dostupno na: <https://www.perjeta.com/hcp/neoadjuvant/efficacy.html>
 143. Falcon S, Riva L, Flores C, Vera D, Pinto JA, Gomez HL. Neoadjuvant pertuzumab in non - metastatic HER2 - positive breast tumors: Multicentric study in Peru (NeoHer). 2022;70. Dostupno na: <https://doi.org/10.3892/mco.2022.2503>
 144. Tokunaga E, Masuda N, Yamamoto N, Iwata H, Bando H, Aruga T, i sur. Long-term outcomes of a randomized study of neoadjuvant induction dual HER2 blockade with trastuzumab and lapatinib followed by weekly paclitaxel plus dual HER2 blockade for

- HER2-Positive primary breast cancer (Neo-Lath Study). *Cancers (Basel)*. 2021;13(16):4008. doi: 10.3390/cancers13164008
145. Swain SM, Miles D, Kim SB, Im YH, Im SA, Semiglazov V, i sur. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2020;21(4):519-30.
 146. Tabernero J, Hoff PM, Shen L, Ohtsu A, Shah MA, Cheng K, i sur. Pertuzumab plus trastuzumab and chemotherapy for HER2-positive metastatic gastric or gastro-oesophageal junction cancer (JACOB): final analysis of a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2018;19(10):1372-84.
 147. Perić Balja M, Veliki Dalić I, Milković Periša M, Šitić S, Ramić S. Residual breast cancer score after neoadjuvant chemotherapy. U: Vrdoljak, E. (ur.) 11. hrvatski onkološki kongres. 2018;86.
 148. Yau C, Osdoit M, van der Noordaa M, Shad S, Wei J, de Croze D, i sur. Residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy and long-term survival outcomes in breast cancer: a multicentre pooled analysis of 5161 patients. *Lancet Oncol*. 2021;23:149-60.
 149. Hamy AS, Darrigues L, Laas E, De Croze D, Topciu L, Lam GT, i sur. Prognostic value of the Residual Cancer Burden index according to breast cancer subtype: Validation on a cohort of BC patients treated by neoadjuvant chemotherapy. *PLoS One [Internet]*. 2020;15(6):e0234191. doi: 10.1371/journal.pone.0234191.
 150. Chen C, Zhang Y, Huang Z, Wu J, Huang W, Zhang G. Decrease in the Ki67 index during neoadjuvant chemotherapy predicts favorable relapse-free survival in patients with locally advanced breast cancer. *Cancer Biol Med*. 2019;16(3):575-86.
 151. Maadi H, Soheilifar MH, Choi WS, Moshtaghian A, Wang Z. Trastuzumab mechanism of action; 20 years of research to unravel a dilemma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(14):1-17.
 152. Muntasell A, Cabo M, Servitja S, Tusquets I, Martínez-García M, Rovira A, i sur. Interplay between Natural killer cells and Anti-HER2 antibodies: Perspectives for breast cancer immunotherapy. *Front Immunol*. *Front Immunol*. 2017;8:1544. doi:10.3389/fimmu.2017.01544.
 153. Loi S, Salgado R, Adams S, Pruneru G, Francis PA, Lacroix-Triki M, i sur. Tumor infiltrating lymphocyte stratification of prognostic staging of early-stage triple negative

- breast cancer. *npj Breast Cancer* 2022 81 [Internet]. 2022 Jan 11 [pristupljeno 22.01.2022];8(3):1-4. doi.org/10.1038/s41523-021-00362-1
154. Chaganty BKR, Qiu S, Gest A, Lu Y, Ivan C, Calin GA, i sur. Trastuzumab upregulates PD-L1 as a potential mechanism of trastuzumab resistance through engagement of immune effector cells and stimulation of IFN γ secretion HHS Public Access. *Cancer Lett.* 2018;430:47-56.
 155. Davis AA, Patel VG. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: An analysis of all US food and drug administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):1-8.
 156. Roche - Roche provides update on Tecentriq US indication for PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer [Internet]. 2021 Aug 27 [pristupljeno 14.12.2021.]. Dostupno na: <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2021-08-27.htm>
 157. EMA. Sažetak opisa svojstva lijeka atezolizumaba-Tecentriq. [Internet] 2017 Sep 21 [pristupljeno 14.09.2021.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecentriq-epar-product-information_hr.pdf
 158. Liu L, Shen Y, Zhu X, Lv R, Li S, Zhang Z, i sur. ER α is a negative regulator of PD-L1 gene transcription in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;505(1):157-61.
 159. Hoffmann LG, Sarian LO, Vassallo J, Russano de Paiva Silva G, Oliveira Botelho Ramalho S, Canato Ferracini A, i sur. Evaluation of PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in paired pretreatment biopsies and post neoadjuvant chemotherapy surgical specimens of breast carcinoma. *Sci Rep.* 2021;11:22478. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00944-w>
 160. O'Meara TA, Tolaney SM. Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response in breast cancer. *Oncotarget.* 2021;12(5):394-400. doi:10.18632/oncotarget.27877
 161. McGrail DJ, Pilié PG, Rashid NU, Voorwerk L, Slagter M, Kok M, i sur. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. Ann Oncol.* 2021;32(5):661-72. doi: 10.1016/j.annonc.2021.02.006. Epub 2021 Mar 15.

162. DiGiulio S. Genomic Evaluation of Tumor Mutational Burden in Breast Cancer. *Oncol Times*. 2021;43(S15):24. doi: 10.1097/01.COT.0000771932.96409.6f
163. Oner G, Önder S, Karatay H, Ak N, Tükenmez M, Müslümanoğlu M, i sur. Clinical impact of PD-L1 expression in triple-negative breast cancer patients with residual tumor burden after neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol*. 2021;19(1):1-9.
164. Grandal B, Mangiardi-veltin M, Laas E, Laé M, Meseure D, Bataillon G, i sur. PD-L1 Expression after Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancers Is Associated with Aggressive Residual Disease, Suggesting a Potential for Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):1-17.
165. Yuan Y, Xiao WW, Xie WH, Cai PQ, Wang QX, Chang H, i sur. Neoadjuvant chemoradiotherapy for patients with unresectable radically locally advanced colon cancer: a potential improvement to overall survival and decrease to multivisceral resection. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1-13.
166. Pyo JS, Kang G, Kim JY. Prognostic role of PD-L1 in malignant solid tumors: a meta-analysis. *Int J Biol Markers*. 2017;32(1):e68–74. doi:10.5301/jbm.5000225
167. Loi S, Giobbie-Hurder A, Gombos A, Bachelot T, Hui R, Curigliano G, i sur. International Breast Cancer Study Group and the Breast International Group. Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(3):371-82. doi:10.1016/S1470-2045(18)30812-X.
168. Joung KI, Song JH, Suh K, Lee SM, Jun JH, Park T, i sur. Effect of Treatment with the PD-1/PD-L1 Inhibitors on Key Health Outcomes of Cancer Patients. *BioDrugs*. 2021;35(1):61-73. doi:10.1007/s40259-020-00459-2
169. Stecca C, Abdeljalil O, Sridhar SS. Metastatic Urothelial Cancer: a rapidly changing treatment landscape. *Ther Adv Med Oncol*. 2021;13:17588359211047352. doi:10.1177/17588359211047352
170. Qu J, Mei Q, Liu L, Cheng T, Wang P, Chen L, i sur. The progress and challenge of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in treating non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2021;13:1758835921992968. doi:10.1177/1758835921992968.
171. Erber R, Hartmann A. Understanding PD-L1 Testing in Breast Cancer: A Practical Approach. *Breast Care*. 2020;15(5):481-90.

172. Kossai M, Radosevic-Robin N, Penault-Llorca F. Refining patient selection for breast cancer immunotherapy: beyond PD-L1. *ESMO Open*. [Internet]. 2021;6(5):100257. doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100257. Epub 2021 Sep 03.
173. Segovia-Mendoza M, Romero-Garcia S, Lemini C, Prado-Garcia H. Determining factors in the therapeutic success of checkpoint immunotherapies against PD-L1 in breast cancer: A Focus on epithelial-mesenchymal transition activation. [Internet]. 2021 Jan 07. [pristupljeno 18.01.2022.] *J Immunol Res*. 2021;6668573. https://doi.org/10.1155/2021/6668573
174. Kurozumi S, Inoue K, Matsumoto H, Fujii T, Horiguchi J, Oyama T, i sur. Clinicopathological values of PD-L1 expression in HER2-positive breast cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-9.
175. Frank MS, Bødtger U, Høegholm A, Stamp IM, Gehl J. Re-biopsy after first line treatment in advanced NSCLC can reveal changes in PD-L1 expression. *Lung Cancer*. 2020;149:23-2.
176. Yuan C, Liu Z, Yu Q, Wang X, Bian M, Yu Z, i sur. Expression of PD-1/PD-L1 in primary breast tumours and metastatic axillary lymph nodes and its correlation with clinicopathological parameters. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-8.
177. Behravan N, Zahedipour F, Jaafari MR, Johnston TP, Sahebkar A. Lipid-based nanoparticulate delivery systems for HER2-positive breast cancer immunotherapy. *Life Sci*. 2022;291:120294. doi:10.1016/j.lfs.2021.120294.
178. Li A, Goodyear S, Fuss C, Mitri Z. Exceptional response to pembrolizumab and trastuzumab in a heavily pretreated patient with HER2-positive TMB-H and MSI-H metastatic breast cancer. *JCO Precis Oncol*. 2021;5(5):904-9.
179. Anti-PD-1 Monoclonal Antibody in Advanced, Trastuzumab-resistant, HER2-positive Breast Cancer - ClinicalTrials.gov [Internet]. [pristupljeno 16.01.2022.]. Dostupno na: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02129556
180. Chen Y-L, Cui Y, Liu X, Liu G, Dong X, Tang L, et al. A bispecific antibody targeting HER2 and PD-L1 inhibits tumor growth with superior efficacy. *J Biol Chem*. 2021;297(6):101420. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101420
181. Huang L, Wang R, Xie K, Zhang J, Tao F, Pi C, i sur. A HER2 target antibody drug conjugate combined with anti-PD-(L)1 treatment eliminates hHER2+ tumors in hPD-1

- transgenic mouse model and contributes immune memory formation. *Breast Cancer Res Treat.* 2022;191(1):51-61. doi: 10.1007/s10549-021-06384-4.
182. Hou Y, Nitta H, Wei L, Banks PM, Lustberg M, Wesolowski R, i sur. PD-L1 expression and CD8-positive T cells are associated with favorable survival in HER2-positive invasive breast cancer. *Breast J.* 2018;24(6):911-9.
 183. 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.
 184. Litvin IE, Paganella MP, Wendland EM, Roehe AV. Prognosis of PD-L1 in human breast cancer: Protocol for a systematic review and meta-Analysis. *Syst Rev.* 2020;9(1):1-7.
 185. Tsang JYS, Au WL, Lo KY, Ni YB, Hlaing T, Hu J, i sur. PD-L1 expression and tumor infiltrating PD-1+ lymphocytes associated with outcome in HER2+ breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;162(1):19-30.
 186. Huang X, Wang X, Qian H, Jin X, Jiang G. Expression of PD-L1 and BRCA1 in triple-negative breast cancer patients and relationship with clinicopathological characteristics. *Evid based Complement Altern Med.* 2021;2021:1-5.
 187. Shen M, Chen G, Xie Q, Li X, Xu H, Wang H, i sur. Association between PD-L1 expression and the prognosis and clinicopathologic features of renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Urol Int.* 2020;104(7-8):533-41.

11. ŽIVOTOPIS

Melita Perić Balja rođena je 21.07.1973. u Brežicama, Republika Slovenija. Osnovnu i srednju školu završila je u Zagrebu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1999. godine. Pripravnički staž odradila je u Domu zdravlja Zaprešić. Od 2004. do 2008. specijalizirala patološku anatomiju u Klinici za tumore, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice gdje je od polaganja specijalističkog ispita u svibnju 2008. trajno zaposlena. Titulu primarijusa stječe 2018. godine. Od završetka specijalizacije sudjeluje u nastavi na dodiplomskom studiju iz predmeta Patologija na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Kao vanjski suradnik više je godina držala nastavu iz predmeta Patologija i patofiziologija u Školi za medicinske sestre Vinogradska i Školi za medicinske sestre Vrapče. Autor je i koautor 25 znanstvenih i stručnih članaka od kojih je 15 indeksirano u Current Contents te više od trideset kongresnih sažetaka indeksiranih u ostalim znanstvenim bazama. Članica je Hrvatskog društva za patologiju i sudsku medicinu, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog onkološkog društva te Europskog društva za patologiju. Članica je Hrvatske udruge bolničkih liječnika te kao predsjednica podružnice Klinike za tumore aktivno sudjeluje u radu Hrvatskog liječničkog sindikata, a od 2015. do 2019. kao delegat je aktivno sudjelovala u radu Skupštine Hrvatske liječničke komore.

Udana je i majka dvoje djece.