

UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET

Jelena Vučinić

Međusobna korelacija gustine tumor-
infiltrirajućih limfocita, CD4 i CD8 pozitivnih
limfocita i PD-L1 ekspresije i njihova
povezanost sa patološkim prognostičkim
parametrima u molekularnim podtipovima
ranog karcinoma dojke

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

Podgorica, 2024.

UNIVERSITY OF MONTENEGRO
FACULTY OF MEDICINE

Jelena Vučinić

Correlation between the density of tumor-
infiltrating lymphocytes, CD4 and CD8
positive lymphocytes and PD-L1
expression and their association with
pathological prognostic parameters in
molecular subtypes of early breast cancer

- DOCTORAL DISSERTATION -

Podgorica, 2024.

PODACI O DOKTORANDU, MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

Doktorand:

Ime i prezime: Jelena Vučinić

Datum rođenja: 11. 6. 1989. godine

Naziv završenog studijskog programa i godina završetka: Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, 2014. godina

Mentor:

Prof. dr Ljiljana Vučković, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet u Podgorici

Komisija za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidata:

Prof. dr Filip Vukmirović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet u Podgorici

Prof. dr Vladimir Todorović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet u Podgorici

Prof. dr Ljiljana Vučković, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet u Podgorici

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije:

Datum odbrane:

Želim da zahvalim svojoj porodici na bezrezervnoj podršci, ljubavi i požrtvovanosti koje me inspirišu i motivišu da svakog dana pomjeram sopstvene granice i pružam svoj maksimum na svim životnim poljima.

Zahvalna sam mentorki, prof. dr Ljiljani Vučković, na nesebičnom dijeljenju znanja i svesrdnoj pomoći tokom mog cjelokupnog stručnog i akademskog usavršavanja.

Veliku zahvalnost dugujem kolektivu Centra za patologiju Kliničkog centra Crne Gore, kao i dr Dragomiru Ćuku i kolektivu patohistološke laboratorije Histocentar iz Novog Sada, koji su učestvovali u prikupljanju i obradi uzoraka korišćenih u ovom istraživanju.

PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Naziv doktorskih studija:

Doktorske akademske studije Univerziteta Crne Gore

Medicinski fakultet u Podgorici

Doktorski studijski program: Medicina

Naziv doktorske disertacije:

Međusobna korelacija gustine tumor-infiltrirajućih limfocita, CD4 i CD8 pozitivnih limfocita i PD-L1 ekspresije i njihova povezanost sa patološkim prognostičkim parametrima u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke

Datum prijave doktorske teze:

30. 8. 2021. godine

Datum sjednice Senata Univerziteta Crne Gore na kojoj je prihvaćena teza:

15. 4. 2022. godine; br. 03-574/2.

Rezime/Izvod iz teze

Uvod: Uprkos činjenici da su početni koraci u razvoju i ispitivanju mogućnosti primjene imunološke terapije u karcinomu dojke napravljeni prije više od 20 godina, njeno uključivanje u zvanične terapijske protokole teklo je mnogo sporije u poređenju sa ostalim solidnim neoplazmama. Iako su inhibitori imunoloških kontrolnih tačaka odobreni od strane FDA i EMA u liječenju lokalno uznapredovalog i metastatskog TNBC, prognostička i prediktivna vrijednost PD-L1, kao jedinog biomarkera na osnovu kog se vrši selekcija pacijentkinja podobnih za ovaj modalitet ciljane terapije, još uvijek je kontroverzna. Dok su pojedine studije ukazale na povezanost PD-L1 sa nepovoljnim prognostičkim faktorima, poput većih dimenzija, visokog histološkog gradusa i

proliferativnog indeksa tumora, kao i odsustva ekspresije steroidnih receptora, druge su u prvi plan stavile njegovu udruženost sa TIL kao nezavisnim povoljnim prognostičkim parametrom u karcinomu dojke. Štaviše, rezultati novijih kliničkih studija doveli su u pitanje prediktivnu vrijednost PD-L1 ekspresije u odabiru kandidatkinja za imunoterapiju, čak i unutar TNBC. Iz tog razloga, brojni autori smatraju da je neophodno optimizovati upotrebu PD-L1 ekspresije kao biomarkera u karcinomu dojke, dominantno kroz njenu interpretaciju u kontekstu gustine i sastava TIL.

Ciljevi: U svijetlu najnovijih istraživanja na temu imunogenosti karcinoma dojke, za koju se smatra da opada sa progresijom bolesti, glavni cilj predmetnog istraživanja bio je da se ispita povezanost između markera imunološkog odgovora, kao što su gustina i sastav sTIL i prisustvo peritumorskih limfoidnih agregata, i PD-L1 ekspresije u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke. Pored toga, nastojali smo da ispitamo postojanje korelacije između PD-L1 ekspresije i standardnih kliničko-patholoških parametara u karcinomu dojke, u prvom redu ekspresije steroidnih receptora i HER-2 proteina, ali i histološkog tipa, gradusa i proliferativne aktivnosti tumora kao i pTNM stadijuma bolesti u momentu postavljanja dijagnoze.

Metodologija: Imunohistohemijska ekspresija PD-L1, uz detekciju prisustva peritumorskih limfoidnih agregata, gustine i sastava sTIL (CD4 i CD8 T-limfociti) i analizu tradicionalnih prognostičkih parametara, ispitana je na 95 uzoraka tumorskog tkiva ranog invazivnog karcinoma dojke, dobijenih tokom hirurškog liječenja pacijentkinja koje prethodno nijesu primale neoadjuvantnu terapiju, a koje su subklasifikovane u pet grupa (sa po 19 pacijentkinja u svakoj) na osnovu pripadnosti tumora nekom od pet definisanih molekularnih podtipova (Luminal A, Luminal B HER-2 pozitivni, Luminal B HER-2 negativni, ne-luminalni HER-2 pozitivni i TNBC).

Rezultati: PD-L1 ekspresija detektovana je u 21,2% slučajeva, uz jaku pozitivnu korelaciju sa gustinom sTIL ($p < 0,001$) i prisustvom peritumorskih limfoidnih agregata ($p < 0,05$), ali ne i sa molekularnim podtipom tumora ($p > 0,05$). Primjenom statističkih metoda, po prvi put izračunata je granična vrijednost gustine sTIL od 53%, iznad koje se PD-L1 pozitivnost tumora može predvidjeti sa odličnom dijagnostičkom tačnošću. PD-L1 ekspresija je statistički značajno češće registrovana u tumorima sa višim apsolutnim vrijednostima broja CD4 i CD8 T-limfocita u stromalnom infiltratu, visokim histološkim

gradusom, kao i Ki67 proliferativnim indeksom ($p < 0,001$). Osim statistički značajno češće pojave PD-L1 ekspresije u ER negativnim tumorima ($p < 0,05$), nije ustanovljena njena značajna povezanost sa ekspresijom PR i statusom HER-2 proteina, niti sa histološkim tipom, veličinom i pTNM stadijumom bolesti u vrijeme postavljanja dijagnoze ($p > 0,05$).

Zaključak: Dobijeni rezultati ukazuju na to da bi gustina sTIL mogla biti bolji prediktor PD-L1 pozitivnosti u ranom karcinomu dojke nego što je to molekularni podtip tumora, te da ključ za optimizaciju PD-L1 kao biomarkera u karcinomu dojke leži u interpretaciji njegove ekspresije u kontekstu drugih markera imunološkog odgovora, uključujući i prisustvo različitih subpopulacija T i B limfocita. S ciljem rasvjetljavanja dinamičnih promjena u gustini i sastavu intra i peritumorskog limfocitnog infiltrata u PD-L1 pozitivnim tumorima, kao i njihovog uticaja na tok bolesti i preživljavanje pacijenata, neophodne su kliničke studije na velikim uzorcima. Očekuje se da bi njihovi rezultati mogli dovesti do proširenja indikacija za upotrebu imunološke terapije, na način da se njima obuhvate i ostali molekularni podtipovi karcinoma dojke, kao i raniji stadijumi bolesti.

Ključne riječi: rani karcinom dojke, PD-L1, tumor-infiltrirajući limfociti, CD4 T limfociti, CD8 T limfociti, peritumorski limfoidni agregati.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Histopatologija

UDK broj:

DATA ON THE DOCTORAL DISSERTATION

Name of doctoral studies:

Doctoral academic studies at the University of Montenegro

Faculty of Medicine in Podgorica

Doctoral study program: Medicine

Doctoral thesis title:

Correlation between the density of tumor-infiltrating lymphocytes, CD4 and CD8 positive lymphocytes and PD-L1 expression and their association with pathological prognostic parameters in molecular subtypes of early breast cancer

Thesis application date:

30th August 2021

Thesis acceptance date (University of Montenegro Senate session)

15th April 2022; decision number: 03-574/2.

Abstract/Thesis Overview

Introduction: Despite the fact that the research and development of immunotherapy in breast cancer began over 20 years ago, its clinical application was substantially slower compared to other solid neoplasms. Although immune checkpoint inhibitors have been approved by the FDA and EMA for the treatment of locally advanced and metastatic TNBC, prognostic and predictive values of PD-L1, as the only biomarker for selection of patients who might benefit from this type of target therapy, remain controversial until present day. While some studies suggested its association with negative prognostic parameters, such as large tumor size, high histological grade and proliferative activity and absence of steroid receptor expression, others reported a highly significant association between PD-L1 expression and TILs, which are known to be an independent favorable prognostic factor in breast cancer. Furthermore, the predictive value of PD-L1 expression

in the selection of candidates for immune checkpoint inhibitor therapy, even within the TNBC subtype, has been questioned by some recent studies. Therefore, numerous authors share the opinion that it is necessary to optimize the use of PD-L1 as a biomarker in breast cancer, mainly by analyzing its expression in the context of the density and composition of TILs.

Objectives: In the light of the most recent research into the breast cancer immunity, which suggest that the immunogenicity of these tumors actually decreases with the disease progression, the main goal of present study was to examine the relationship between immune response markers, such as the density and composition of sTILs and presence of peritumoral lymphoid aggregates and PD-L1 expression in different molecular subtypes of early breast cancer. Furthermore, we aimed to investigate the correlation between PD-L1 expression and standard clinico-pathological parameters in breast cancer, namely expression of steroid receptors and HER-2 protein, as well as the histological grade, type, proliferative activity and pTNM stage of the disease at the time of diagnosis.

Methods: Immunohistochemical expression of PD-L1, along with the presence of peritumoral lymphoid aggregates, density and composition of sTIL (CD4 and CD8 T-lymphocytes), as well as traditional prognostic and predictive parameters, were analyzed in surgically obtained tumor samples of 95 treatment naive female patients, diagnosed with early invasive breast cancer, which were further subclassified into five groups (each containing 19 patients) based on the tumor molecular subtype (Luminal A, Luminal B HER-2 positive, Luminal B HER-2 negative, non-luminal HER-2 positive and TNBC).

Results: PD-L1 expression was identified in 21,2% of cases in the examined sample and displayed a strong positive correlation with the density of sTIL ($p < 0,001$) and presence of peritumoral lymphoid aggregates ($p < 0,05$), but no significant association with the molecular subtype of breast cancer ($p > 0,05$). A cut-off value of 53% coverage of tumor stroma by lymphocytes, with which PD-L1 positivity can be predicted with excellent diagnostic accuracy, was determined for the first time using statistical methods. PD-L1 expression was observed significantly more often in tumors with higher absolute number of both CD4 and CD8 T-lymphocytes in the stromal infiltrate and higher values of Ki67 proliferation index, as well as tumors with high histological grade ($p < 0,001$). Apart from

occurring significantly more often in ER negative tumors ($p < 0,05$), no significant association was found between PD-L1 expression and PR and HER-2 status, nor the tumor size, histological type, or pTNM stage of the disease at the initial diagnosis ($p > 0,05$).

Conclusion: Our results indicate that the density of stromal lymphocytic infiltrate might be a better predictor of PD-L1 positivity in early breast cancer than the molecular subtype and that the key to the optimization of PD-L1 as a biomarker in breast cancer lies in its interpretation in the context of other immune response markers, namely different subpopulations of T- and B-lymphocytes. Further studies on large samples, that will aim to elucidate the dynamic changes in density and composition of intra- and peritumoral lymphocytic infiltrate in PD-L1 positive tumors and their impact on the course of the disease and patient survival are mandatory. These in turn may result in the expansion of indications for the application of immunotherapy in breast cancer, in order to include other molecular subtypes and earlier stages of the disease.

Key words: early breast cancer, PD-L1, tumor-infiltrating lymphocytes, CD4 T-lymphocytes, CD8 T-lymphocytes, peritumoral lymphoid aggregates.

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Histopathology

UDC number:

PREDGOVOR

Karcinom dojke je najčešće dijagnostikovani malignitet i vodeći uzrok smrtnosti u ženskoj populaciji na globalnom nivou. Kako se ne radi o jedinstvenom entitetu, već o veoma heterogenoj grupi tumora sa različitim kliničkim ponašanjem i odgovorom na sve širi spektar terapijskih modaliteta, napori naučne zajednice su konstantno usmjereni na identifikaciju novih biomarkera kako radi definisanja prognoze tako i sa ciljem selekcije pacijenata za neki od vidova ciljane terapije.

Sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora jedno je od osnovnih obilježja maligniteta, a imunoterapija je pronašla svoje mjesto u tretmanu velikog broja solidnih tumora. Međutim, kada je u pitanju karcinom dojke, integracija inhibitora imunoloških kontrolnih tačaka u terapijske protokole tekla je mnogo sporije, a još uvijek predstavlja kontroverznu temu u naučnim krugovima. U tom kontekstu, u fokusu interesovanja već duže vrijeme nalazi se PD-L1 protein, dio signalnog puta uključenog u negativnu regulaciju imunološkog odgovora. Njegova ekspresija do danas ostaje jedini biomarker koji se koristi u selekciji pacijentkinja potencijalno podobnih za ovaj vid personalizovane terapije, a koje se regrutuju isključivo iz grupe kojoj je dijagnostikovano uznapredovalo, neresktabilno i metastatski karcinom dojke trostruko-negativnog molekularnog podtipa. Na nesavršenosti primjene PD-L1 kao biomarkera u karcinomu dojke ukazuje sve veći broj studija koje su, pored izazova u rutinskoj interpretaciji ekspresije ovog markera, problematizovale i njegovu prognostičku vrijednost u karcinomu dojke i dovele u pitanje pouzdanost predikcije povoljnog odgovora na imunološku terapiju na osnovu PD-L1 statusa *per se*.

Polazeći od pretpostavke da imunogenost karcinoma dojke opada sa progresijom bolesti i da u njenim ranim fazama ne korelira nužno sa molekularnim podtipom tumora, čije se uporište nalazi u studijama koje su se bavile kvantitativnim i kvalitativnim promjenama u tumorskoj mikrookolini tokom evolucije ovog oboljenja, željeli smo da ispitamo učestalost i karakteristike PD-L1 ekspresije u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke.

Pored toga, predmetnim istraživanjem nastojali smo da, kroz pregled razlika u gustini i sastavu stromalnog inflamatornog infiltrata, kao i razlika u karakteristikama peritumorskih limfoidnih agregata među molekularnim podtipovima ranog karcinoma

dojke, popunimo praznine u dostupnoj naučnoj literaturi i ispitamo korelaciju PD-L1 statusa sa navedenim parametrima s ciljem potencijalne identifikacije drugih markera imunološkog odgovora koji bi mogli usmjeriti dalja istraživanja i proces optimizacije PD-L1 ekspresije kao biomarkera u karcinomu dojke.

Takođe, kroz ispitivanje povezanosti PD-L1 ekspresije sa konsenzusom usvojenim prognostičkim parametrima u karcinomu dojke, pokušali smo djelimično pronaći u njen prognostički značaj u ranom karcinomu dojke, koji ćemo nakon prispjeha relevantnih kliničkih podataka o toku bolesti i ishodima liječenja težiti da ispitamo u okviru novih studija u bliskoj budućnosti.

Konačno, ovim istraživanjem po prvi put ispitana je zastupljenost PD-L1 ekspresije u karcinomu dojke na crnogorskoj populaciji, što bi moglo imati značajne implikacije u nacionalnoj strategiji započinjanja primjene imunološke terapije u liječenju karcinoma dojke, naročito ako se ima u vidu da se inhibitori imunoloških kontrolnih tačaka za sada ne nalaze na pozitivnoj listi lijekova Fonda za zdravstveno osiguranje Crne Gore za navedenu indikaciju.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1 Embrionalni razvoj i histomorfološka organizacija dojki..... | 1 |
| 1.1.1 Histogeneza dojki..... | 1 |
| 1.1.2 Histomorfološka organizacija tkiva dojke..... | 3 |
| 1.2 Epidemiologija karcinoma dojke | 6 |
| 1.3 Etiologija i patogeneza karcinoma dojke | 9 |
| 1.3.1 Faktori rizika | 9 |
| 1.3.2 Patogeneza karcinoma dojke..... | 10 |
| 1.4 Kliničko-patološke karakteristike karcinoma dojke | 12 |
| 1.4.1 Morfologija karcinoma dojke..... | 12 |
| 1.4.2 Biomarkeri u kreiranju novih modela klasifikacije karcinoma dojke | 18 |
| 1.4.3 Značaj TIL u karcinomu dojke..... | 20 |
| 1.5 Uloga imunog sistema u evoluciji malignih tumora..... | 23 |
| 1.5.1 Izbjegavanje imunološkog nadzora..... | 23 |
| 1.5.2 PD-1/PD-L1 signalni put..... | 25 |
| 1.6 PD-1/PD-L1 signalizacija u kanceru i njene terapijske implikacije | 28 |
| 1.7 Teorijski i klinički aspekti PD-1/PD-L1 signalizacije u karcinomu dojke..... | 32 |
| 1.7.1 Zastupljenost i efekti PD-L1 ekspresije u karcinomu dojke | 32 |
| 1.7.2 Primjena anti-PD-1/PD-L1 terapije u liječenju karcinoma dojke | 34 |
| 1.7.3 Povezanost između PD-L1 ekspresije i prognostičkih parametara u karcinomu dojke i njen značaj kao biomarkera..... | 37 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE..... | 40 |
| 2.1 Ciljevi istraživanja | 40 |
| 2.2 Hipoteze | 41 |

| | |
|---|----|
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 43 |
| 3.1 Uzorak..... | 43 |
| 3.2 Analiza hematoksilin-eozin bojenih histoloških preparata:..... | 43 |
| 3.3 Formiranje tkivnih mikroisječaka..... | 46 |
| 3.4 Imunohistohemijsko bojenje:..... | 47 |
| 3.5 Analiza imunohistohemijski bojenih TMA..... | 48 |
| 3.6 Statistička analiza:..... | 50 |
| 3.7 Etički aspekti..... | 51 |
| 4. REZULTATI..... | 52 |
| 4.1 Deskriptivna statistika i frekvencija kliničkih i patoloških karakteristika..... | 52 |
| 4.2 Prisustvo i obrazac PD-L1 ekspresije u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke..... | 57 |
| 4.3 PD-L1 ekspresija u odnosu na gustinu intra i peritumorskog limfocitnog infiltrata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke..... | 58 |
| 4.3.1 Gustina stromalnog limfocitnog infiltrata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke..... | 58 |
| 4.3.2 PD-L1 ekspresija u odnosu na gustinu stromalnog limfocitnog infiltrata u ranom karcinomu dojke..... | 59 |
| 4.3.3 Predikcija PD-L1 pozitivnosti na osnovu gustine stromalnog limfocitnog infiltrata..... | 60 |
| 4.3.4 Karakteristike peritumorskih limfoidnih agregata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke..... | 62 |
| 4.3.5 PD-L1 ekspresija u odnosu na karakteristike peritumorskih limfoidnih agregata..... | 62 |
| 4.4 PD-L1 ekspresija u odnosu na gustinu i sastav sTIL u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke..... | 64 |
| 4.4.1 Gustina sTIL i apsolutni broj CD4 i CD8 T-limfocita po mm ² u stromalnom infiltratu kod različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke..... | 64 |

| | |
|---|----|
| 4.4.2 Sastav stromalnog limfocitnog infiltrata (izražen u obliku CD4/CD8 odnosa) kod različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke | 65 |
| 4.4.3 PD-L1 ekspresija u odnosu na sastav stromalnog limfocitnog infiltrata | 67 |
| 4.5 PD-L1 ekspresija u odnosu na kliničko-patološke prognostičke parametre kod ranog karcinoma dojke..... | 70 |
| 4.5.1 PD-L1 ekspresija u odnosu na starosnu dob pacijentkinja..... | 70 |
| 4.5.2 PD-L1 ekspresija u odnosu na veličinu tumora u milimetrima..... | 70 |
| 4.5.3 PD-L1 ekspresija u odnosu na pT, pN i klinički stadijum bolesti..... | 71 |
| 4.5.4 PD-L1 ekspresija u odnosu na histološki tip ranog karcinoma dojke | 72 |
| 4.5.5 PD-L1 ekspresija u odnosu na histološki gradus ranog karcinoma dojke..... | 73 |
| 4.5.6 PD-L1 ekspresija u odnosu na kliničko-patološke prognostičko-prediktivne parametre (status steroidnih receptora, HER-2 i Ki67 indeks proliferacije) kod ranog karcinoma dojke | 74 |
| 5. DISKUSIJA | 77 |
| 6. ZAKLJUČCI | 95 |
| 7. REFERENCE | 97 |

1. UVOD

1.1 Embrionalni razvoj i histomorfološka organizacija dojki

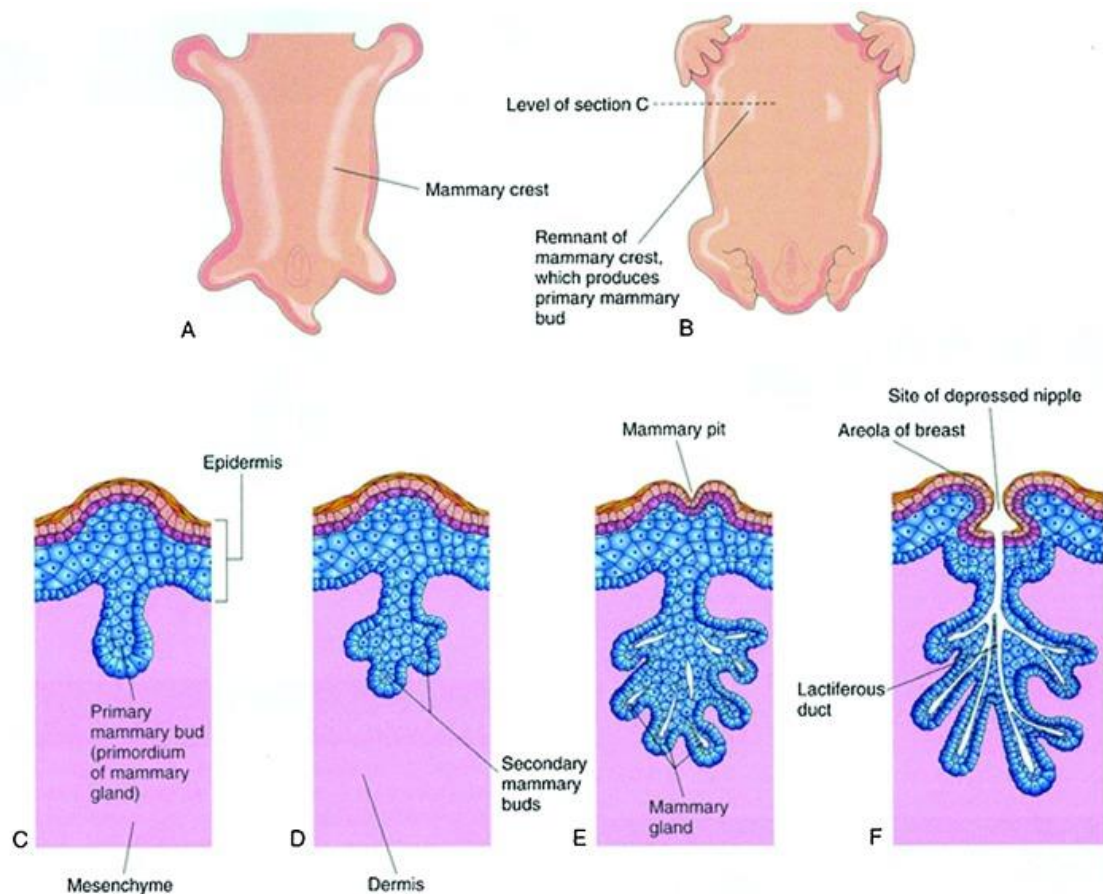
1.1.1 Histogeneza dojki

Dojke (mliječne žlijezde) predstavljaju visoko modifikovane apokrine znojne žlijezde, odnosno kožne derivate, čiji se embrionalni razvoj odvija kroz više stadijuma, orkerstriranih od strane signalnih puteva koji se nalaze pod kontrolom sistemskih hormona (1, 2).

Parenhimsku komponentu dojke, koja je ektodermalnog porijekla, čini sistem razgranatih kanala iz kojih će nastati sekretorna komponenta – acinusi, dok se stroma, koja je mezodermalnog porijekla, dominantno sastoji od vezivno-masnog tkiva. Diferencijacija dukalnog sistema i acinusa (morfogeneza grananja) počinje u fetalnoj fazi razvoja i zaustavlja se u ranom djetinjstvu (oko 2. godine), da bi se nastavila u pubertetu pod dejstvom hormonske stimulacije (1).

Prenatalnu fazu razvoja dojki (Šema 1) čine dva glavna stadijuma: formiranje primarnog mamarnog pupoljka i razvoj rudimentarne mliječne žlijezde. Početni stadijumi embriogeneze uglavnom su hormon nezavisni, a hormonski regulatorni faktori dobijaju svoju ulogu početkom drugog trimestra (1).

Specifične mamarne progenitorske ćelije mogu se pronaći već između 4. i 6. nedjelje gestacije, a oko 35. dana dolazi do proliferacije epitelnih ćelija epidermisa koje formiraju zadebljanja - mamarne grebene (mliječne linije) između aksila i ingvinalnih regija obje strane tijela. Mamarni grebeni najvećim dijelom atrofiraju, ostavljajući dvije solidne epitelne mase u nivou 4. interkostalnog prostora pektoralne regije, koje formiraju primarne mamarne pupoljke (2). Krajem prvog trimestra, pod uticajem mezenhimalnih regulatornih faktora dolazi do urastanja primarnih mamarnih pupoljaka u ispodležeći mezenhim, sa njihovim sljedstvenim uvećanjem i formiranjem indentacija duž bazolateralnih margina. Na kraju prvog trimestra mezenhimalne ćelije diferentuju se u fibroblaste, glatke mišićne ćelije, kapilarne endotelne ćelije i adipocite, dok se unutar primarnih pupoljaka pojavljuju dvije populacije ćelija: centralne i bazalne (1).



Šema 1. Embriogeneza dojke. (A) Ventralni aspekt embriona sa 28 dana gestacije, sa vidljivim mamarnim grebenima. (B) Isti aspekt kod embriona u 6. nedjelji gestacije, gdje se zapažaju ostaci mamarnih grebena. (C-F) Poprečni presjeci kroz mamarni greben na mjestu nastanka mliječne žlijezde od 12. nedjelje gestacije do rođenja. Izvor: *Development of the human breast. In: Seminars in plastic surgery, 2013.* (1)

U drugom trimestru, na indentacijama primarnog mamarnog pupoljka pojavljuju se sekundarni epitelni pupoljci koji vertikalno urastaju u okolni mezenhim i čijim srastanjem i kanalizovanjem nastaju laktiferne kanale. Epitelne ćelije koje oblažu laktiferne kanale aranžirane su u dva sloja, pri čemu luminalni sloj ćelija dobija sekretornu funkciju, dok se ćelije bazalnog sloja diferentuju u mioepitel. Sa šest mjeseci gestacije formirana je osnova mliječne žlijezde sa jasno definisanom tubularnom arhitektonikom parenhimske komponente u gusnoj fibroznoj stromi (1).

Grananje i kanalizovanje sekundarnih epitelnih pupoljaka nastavljaju se tokom trećeg trimestra, kada se formira i bradavica. Najprije se pojavljuje mamarna jamica kao ulegnuće pripadajućeg epidermisa prema kom konvergiraju retroareolarne ampule, u koje se dreniraju laktiferni duktusi. Opisana invaginacija ektoderma stimuliše proliferaciju ispodležećeg mezoderma, dovodeći do diferencijacije glatko mišićnih ćelija, koje u bazi bradavice dobijaju cirkularnu orijentaciju dok su prema njenom vrhu aranžirane longitudinalno. Okolna areola je prethodno formirana od strane ektoderma, tokom 5. mjeseca gestacije.

Kod terminskog novorođenčeta formirano je između 15 i 20 glandularnih jedinica, od kojih svaka posjeduje laktiferni duktus koji se otvara na površini kože u predjelu mamarne jamice.

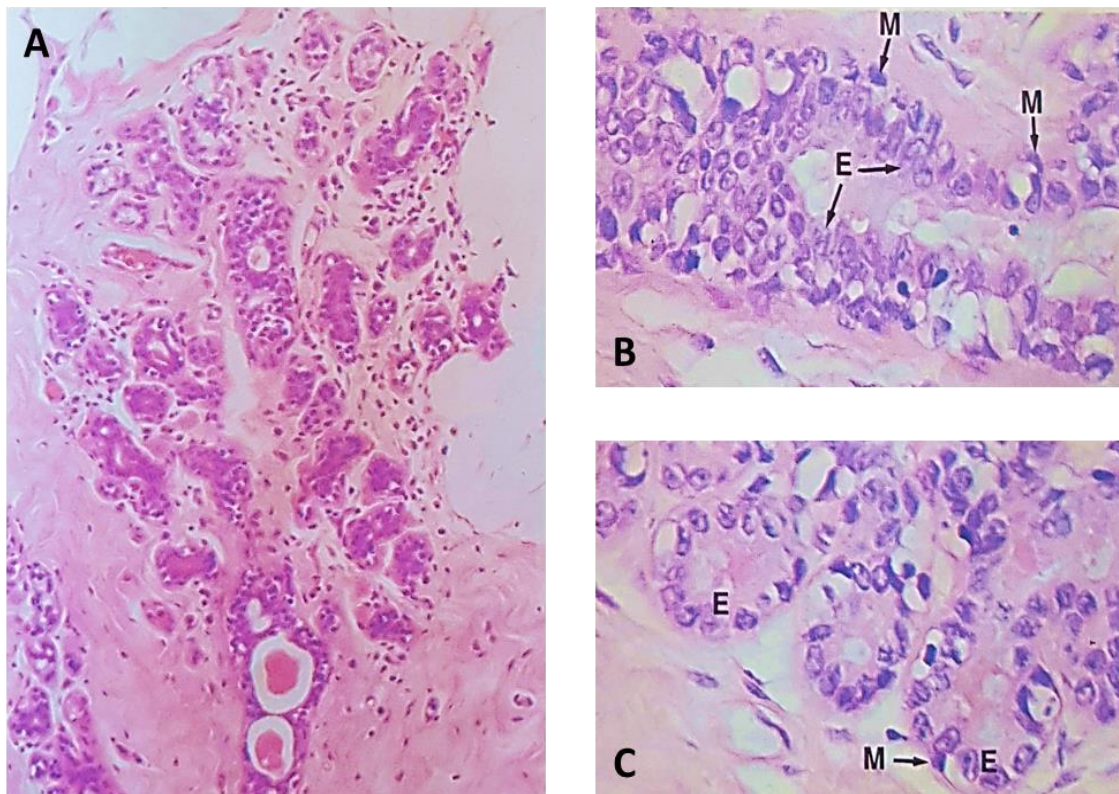
Tokom prve dvije godine života, u zavisnosti od nivoa cirkulišućih rezidualnih maternalnih i novosintetisanih hormona, dolazi do širokog spektra morfoloških i funkcionalnih promjena u glandularnim jedinicama. Ove promjene nemaju linearnu dinamiku i pokazuju širok opseg individualnih varijacija, koje se ogledaju u stepenu razgranatosti dukalnog sistema i dinamici razvoja lobulusa, kao i u citomorfologiji luminalnih ćelija, koja varira od sekretornih, preko apokrinih karakteristika, do involutivne morfologije.

Nakon ovog perioda, u fiziološkim uslovima, razvoj dojki ulazi u dormantnu fazu koja traje sve do puberteta, kada se pod uticajem hormona hipofize i ovarijuma intenzivno nastavlja samo kod osoba ženskog pola, gdje dojke imaju važnu ulogu u produkciji i izlučivanju mlijeka za ishranu novorođenčeta (3, 4).

1.1.2 Histomorfološka organizacija tkiva dojke

Mliječna žlijezda se sastoji od 15 do 25 zasebnih radijalno aranžiranih glandularnih jedinica – lobusa, uklopljenih u vezivno-masnu stromu čije guste fibrozne septe razdvajaju teritoriju svakog pojedinačnog lobusa. Svaki lobus je sačinjen od složenih tubulo-alveolarnih žlijezda i posjeduje sopstveni izvodni kanal (*ductus lactiferus*) koji se otvara na površini bradavice, prethodno formirajući proširenje – laktiferni sinus (*sinus lactiferus*). Unutar svakog lobusa mliječne žlijezde, glavni izvodni kanal višestruko se

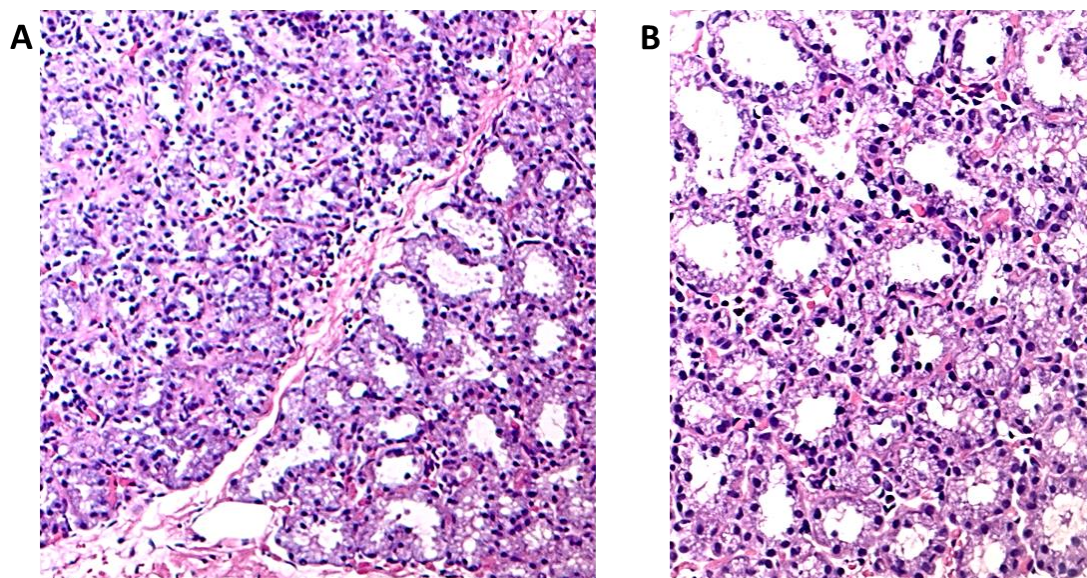
grana, formirajući veći broj terminalnih duktusa koji se završavaju lobulusima, sačinjenim od brojnih acinusa (3).



Slika 1. Histološka građa dojke. (A) Periferni dio lobulusa dojke u drugoj polovini menstrualnog ciklusa, HE x150; (B) Morfologija luminalnih – E i mioepitelnih – M ćelija u duktusima većeg kalibra i (C) malim duktusima i acinusima, HE x400. Izvor: modificovano *Female reproductive system. In: Wheater's functional histology, 2000.* (4)

Terminalni duktus sa pripadajućim lobulusom čini morfološku i funkcionalnu strukturu koja se naziva terminalna duktulo-lobularna jedinica. Dok lobuse razdvaja umjereno gusto kolageno (interlobularno) vezivno tkivo, vezivno tkivo intralobularne strome sadrži manju količinu kolagenih vlakana i gušću vaskularnu mrežu (Slika 1A). Duktusi i acinusi okruženi su bazalnom membranom i obloženi sa dva sloja ćelija: luminalnim slojem kubičnih do cilindričnih epitelnih ćelija i diskontinuiranim bazalnim slojem pljosnatih mioepitelnih ćelija (Slika 1B i 1C) (4).

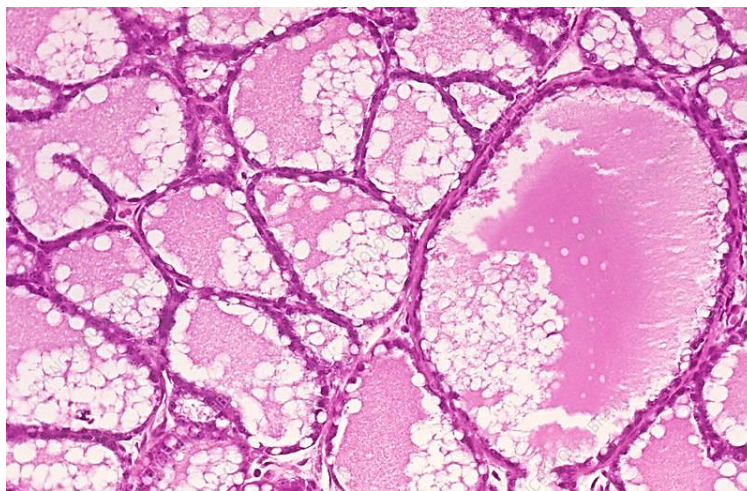
U reproduktivnom periodu, tkivo dojke prolazi kroz ciklične promjene u aktivnosti koje su kontrolisane hormonima ovarijalnog ciklusa, što uslovljava diskretne promjene u izgledu dukalnog epitela na mjesečnom nivou. Naime, u prvoj polovini menstrualnog ciklusa lumeni duktusa nijesu jasno uočljivi, dok krajem ciklusa postaju prominentni i često sadrže homogeni, eozinofilni sekretorni produkt (Slika 1A) (4).



Slika 2. Histomorfološke promjene tkiva dojke u trudnoći. (A) Umnožavanje glandularne komponente na račun vezivno-masnog tkiva strome, HE x100; (B) Prominentna citoplazmatska vakuolizacija luminalnih ćelija, čiji apikalni polovi protrudiraju u dilatirane lumene acinusa – „hobnail” morfologija, HE x150. Izvor: modifikovano Agarwal I, Blanco L, 2022. (5)

Histomorfologija dojke značajno se mijenja u trudnoći (Slika 2) kada, pod uticajem estrogena i progesterona produkovanih od strane žutog tijela a potom i placente, dolazi do proliferacije epitela terminalnih duktusa i formiranja većeg broja sekretornih acinusa. Posljedično povećanje zapremine glandularne komponente dešava se na račun inter i intralobularnog vezivno-masnog tkiva. U citoplazmi luminalnih ćelija mogu se zapaziti vakuole, lumeni acinusa postaju dilatirani, a sa napredovanjem trudnoće u njima se akumulira proteinima bogat eozinofilni sekretorni produkt – kolostrum. U periodu laktacije (Slika 3), u velikom broju lobulusa luminalne ćelije su aplatirane, a lumeni

acinusa izrazito distendirani velikom količinom sitno granulisanog eozinofilnog materijala sa vidljivim lipidnim kapljicama – mlijeko (4).



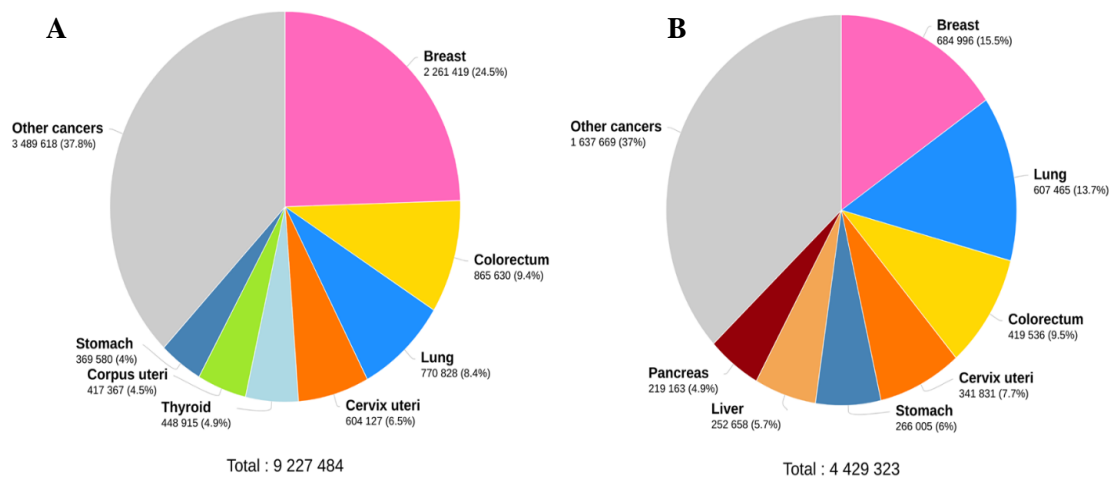
Slika 3. Histomorfologija dojke u laktaciji, HE x100. Izvor: *Biophoto Associates/Science photo library, 2023.* (6)

Nakon menopauze tkivo dojke podliježe progresivnoj atrofiji i involuciji, kao i ostali organi ženskog reproduktivnog sistema, a prateće promjene u histološkoj građi odnose se na atrofiju parenhimske komponente i dominaciju stromalnih elemenata (4).

Dakle, parenhimsku komponentu dojke čini veoma razgranata mreža kanala koji se odlikuju visokim celularnim plasticitetom i ekstenzivnim remodelovanjem u adultnom dobu, što je čini veoma podložnom razvoju malignih tumora (1).

1.2 Epidemiologija karcinoma dojke

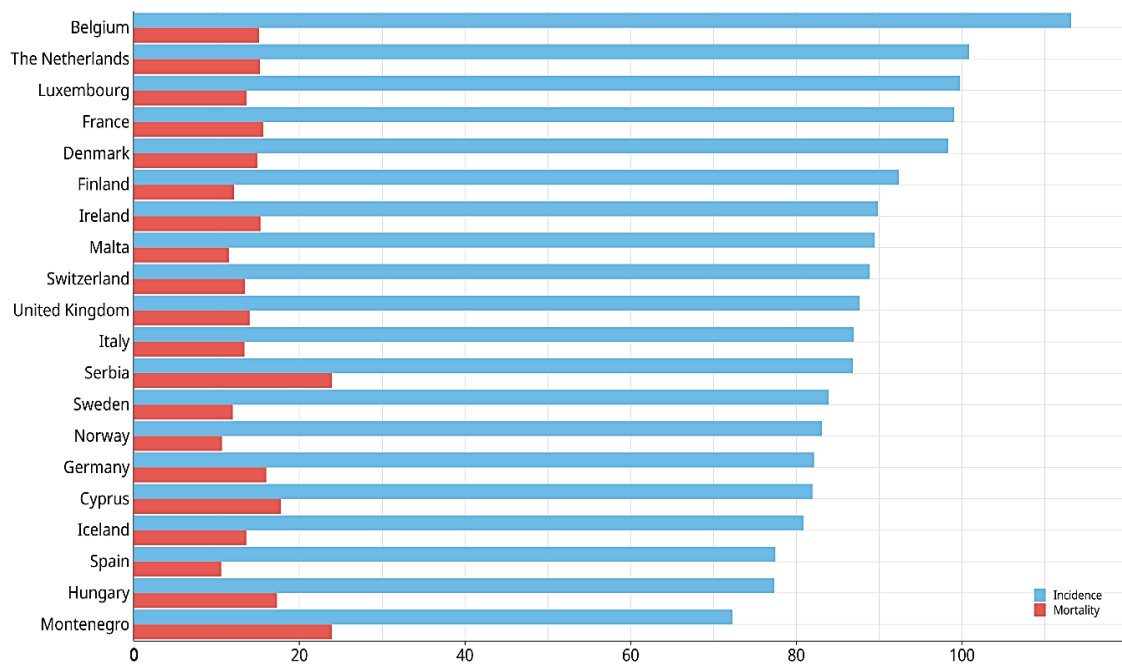
Karcinom dojke predstavlja najčešći malignitet i vodeći uzrok smrtnosti od malignih bolesti u ženskoj populaciji na globalnom nivou, sa procijenjenih 2.261.419 novootkrivenih i 684.996 smrtnih slučajeva samo tokom 2020. godine (Grafikon 1) (7). Kada se u obzir uzmu i slučajevi dijagnostikovani kod pripadnika muškog pola, karcinom dojke se nalazi na drugom mjestu prema učestalosti, čineći 11,6% svih maligniteta (8).



Grafikon 1. Procijenjena incidenca (A) i mortalitet (B) od malignih tumora u ženskoj populaciji na globalnom nivou za 2020. godinu. Izvor: *Globocan, 2020* (7)

Posljednjih decenija bilježi se porast incidence karcinoma dojke u zemljama sa niskim i srednjim prihodima. Sa druge strane, njegova incidenca i mortalitet u zemljama sa visokim prihodima (poput Sjedinjenih Američkih Država, Kanade, Ujedinjenog Kraljevstva, Francuske i Australije) smanjeni su u ranim 2000-im godinama zahvaljujući racionalizaciji primjene hormonske terapije kod žena nakon menopauze i visokom obuhvatu pacijentkinja mamografskim skrining programima (8). Od sredine 80-ih godina prošlog vijeka do danas, samo u Sjedinjenim Američkim Državama mortalitet od karcinoma dojke opao je sa 30 na 20%, što je uglavnom rezultat ranijeg otkrivanja bolesti skriningom i blagovremene primjene odgovarajuće terapije (9).

Kada je u pitanju Crna Gora, prema dostupnim podacima iz Registra malignih neoplazmi za 2013. godinu, karcinom dojke je bio najčešće dijagnostikovani tumor u ženskoj populaciji (čineći više od četvrtine ukupnog broja novoregistrovanih malignih neoplazmi); najveći broj pacijentkinja pripadao je starosnoj grupi između 50 i 64 godine, a čak 46,1% njih je u vrijeme postavljanja dijagnoze imalo udaljene metastaze (10).



Grafikon 2. Procijenjene stope incidence i mortaliteta od karcinoma dojke na 100.000 stanovnika u 20 evropskih zemalja, standardizovane u odnosu na starosnu dob u 2020. godini. Izvor: *Globocan 2020*. (7)

Prema procjenama Internacionalne Agencije za istraživanje malignih oboljenja Svjetske zdravstvene organizacije, stopa incidence karcinoma dojke u ženskoj populaciji Crne Gore iznosi 72,3 na 100.000 stanovnika, što je niže u odnosu na zemlje Srednje i Zapadne Evrope. S druge strane, procijenjena stopa mortaliteta od karcinoma dojke iznosi 23,9 na 100.000 stanovnika, što Crnu Goru stavlja na prvo mjesto u Evropi po smrtnosti od ovog oboljenja (7).

Razlog za ovakve rezultate može se tražiti u neefikasnoj implementaciji nacionalnog skrining programa za karcinom dojke u Crnoj Gori i u posljedično manjem procentu pacijentkinja kod kojih se ovo oboljenje detektuje u ranom stadijumu, kada su šanse za izlječenje mnogo veće.

1.3 Etiologija i patogeneza karcinoma dojke

1.3.1 Faktori rizika

Etiologija karcinoma dojke je multifaktorijalna, a do danas je identifikovan veliki broj faktora rizika za nastanak ovog oboljenja kao što su starosna dob, pozitivna porodična anamneza, reproduktivna istorija i socio-ekonomski faktori (11).

Karcinom dojke se u čak 75% slučajeva dijagnostikuje kod žena starosti iznad 50 godina i u najvećoj mjeri pogađa žene evropskog porijekla (9). Deskriptivni epidemiološki podaci ukazuju da se radi o oboljenju imućnih društava sa tzv. zapadnjačkim stilom života, koji karakteriše kalorična ishrana bogata proteinima i mastima životinjskog porijekla, u kombinaciji sa nedostatkom fizičke aktivnosti, gojaznošću, manjim brojem trudnoća i ostvarivanjem prve trudnoće u starijoj životnoj dobi, kao i skraćenim periodom laktacije, što se sve može smatrati faktorima rizika za njegov nastanak (8, 11).

Konsumacija alkohola povezana je sa umjereno povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke (12), dok su podaci o uticaju pušenja na obolijevanje kontradiktorni, ali ukazuju na postojanje većeg rizika za nastanak karcinoma dojke kod žena koje su sa konzumacijom duvanskih proizvoda počele u adolescenciji i u perimenarhalnom periodu (13).

Slično tome, izloženost jonizujućem zračenju povezuje se sa povećanim rizikom od nastanka karcinoma dojke ukoliko se zračenje dogodilo tokom adolescencije ili u ranim dvadesetim godinama, dok histogeneza dojki još uvijek traje. S druge strane, izloženost radijaciji kasnije u životu nije udružena sa povećanim rizikom od nastanka ovog oboljenja (9).

Često porodično grupisanje slučajeva karcinoma dojke ukazalo je na bitan uticaj genetike kao faktora rizika, a u tom smislu posebno su ugrožene žene u čijoj porodičnoj anamnezi postoji više bliskih srodnika kojima je karcinom dojke dijagnostikovao u mlađoj životnoj dobi (9). Inicijalno se smatralo da je naslijeđena kombinacija „slabih” kancerskih gena niske penetrantnosti odgovorna za povećan rizik od nastanka karcinoma dojke u najvećem broju pogođenih porodica. Međutim, danas se zna da 5-10% ovih tumora nastaje kod osoba koje naslijede visoko penetrantne mutacije u tumor-supresorskim

genima, prvenstveno *BRCA1* i *BRCA2* (8, 9). Rizik za nastanak karcinoma dojke tokom života kod ovih individua može biti i veći od 90% (9).

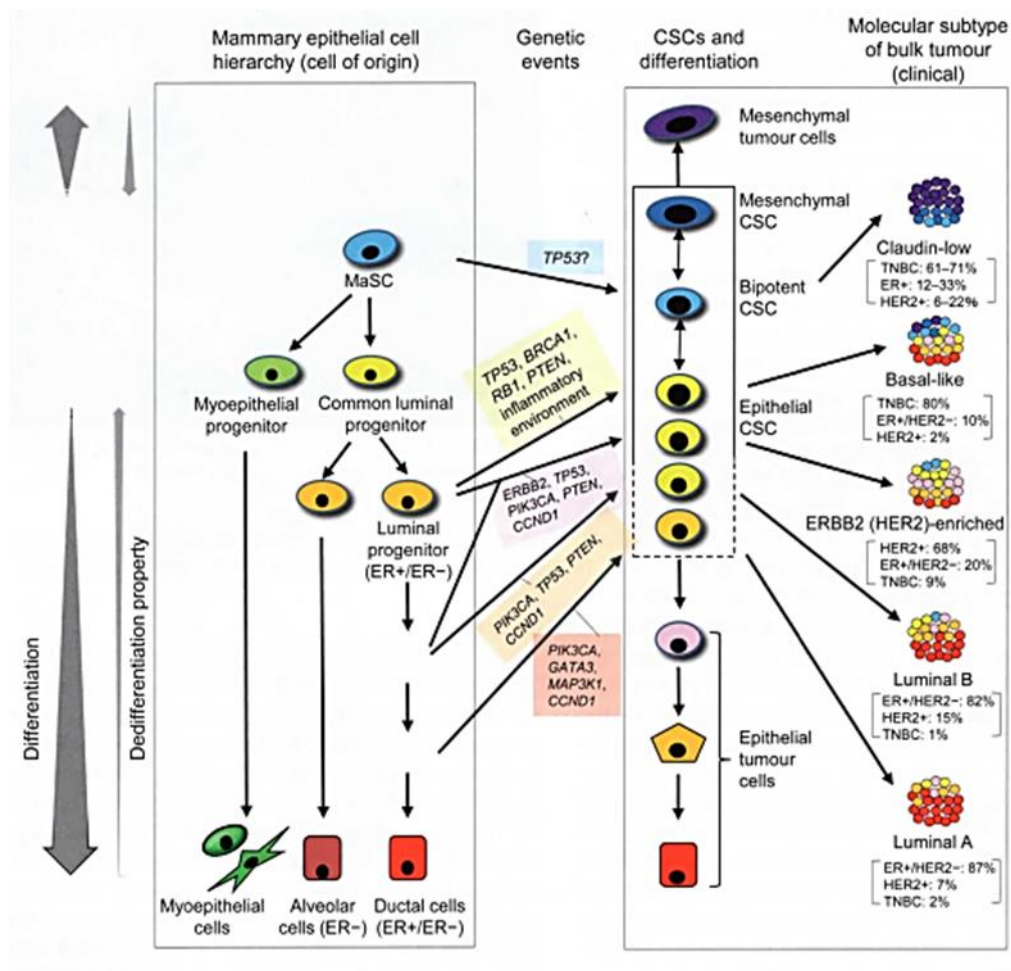
1.3.2 Patogeneza karcinoma dojke

Do danas je opisano mnogo kompleksnih modela inicijacije, transformacije i progresije karcinoma dojke, koji se uglavnom zasnivaju na statusu hormonskih receptora i tipu prekursorske ćelije/lezije samog tumora (8).

Model koji u fokus stavlja status receptora steroidnih hormona tretira karcinome dojke sa pozitivnim estrogenskim receptorima (ER) kao etiološki i patogenetski potpuno drugačiji entitet u odnosu na ER negativne karcinome. U histomorfološkom smislu, ER pozitivni model prepoznaje ravnu („flat”) epitelnu atipiju, atipičnu duktalnu hiperplaziju i ER pozitivni karcinom in situ (DCIS) kao neobligatne prekursorske lezije invazivnog i metastatskog karcinoma dojke, dok se u ER negativnom modelu ER negativni DCIS i mikroglandularna adenoza smatraju promjenama koje prethode ER negativnim karcinomima (14).

Među ER pozitivnim, ali i ER negativnim karcinomima, mogu se naći tumori koji prekomjerno ekspimiraju HER-2 protein, tirozin kinazni receptor uključen u signalne puteve koji promovišu ćelijsku proliferaciju, a za koje se prekursorskom lezijom smatra atipična apokrina adenoza (9).

Na nivou prekursorske ćelije opisana su dva osnovna modela kancerogeneze karcinoma dojke: model sporadične klonalne evolucije i model kancerskih stem ćelija, koji su sumirani na Šemi 2. Rezultati molekularnih istraživanja ukazuju na to da nastanak i progresija karcinoma dojke prate dva divergentna molekularna puta, koji su snažno povezani sa hormonskim receptorima. U skladu sa tim, pored fundamentalnih razlika između ER pozitivnih i negativnih tumora, utvrđeno je da su stepen diferencijacije i proliferacije ER pozitivnih tumora direktno uslovljeni rasprostranjenošću, kompleksnošću i vrstom genetskih aberacija (8).



Šema 2. Patogeneza karcinoma dojke. Lijeva polovina dijagrama prikazuje diferencijaciju ćelijsku hijerarhiju u normalnoj dojci, dok su u ostatku dijagrama objedinjeni modeli sporadične klonalne evolucije i kancerskih stem ćelija (u odnosu na ćeliju porijekla, proporciju epitelnih i mezenhimalnih kancerskih matičnih ćelija, molekularni podtip tumora i genetska dešavanja karakteristična za određeni molekularni podtip). MaSC – mamarne matične ćelije, CSC – kancerske stem ćelije. Izvor: modifikovano *WHO classification of breast tumours*, 2019. (8)

Pored klasičnog genetskog obrasca ekspresije koji je udružen sa fenotipom ER pozitivnih tumora, ER pozitivni molekularni put karakteriše se viškom genetskog materijala na 1q, gubitkom istog na 16q i rijetkom amplifikacijom 17q12 gena. Ove lezije ne ispoljavaju prekomjernu ekspresiju HER2, ne ekspimiraju bazalne markere i imaju relativno jednostavan, najčešće diploidan kariotip. U skladu s tim, više od 90% ovih tumora se

morfološki definišu kao dobro ili umjereno diferentovani, što ne isključuje mogućnost progresije ka tumorima visokog histološkog gradusa (14, 15).

Za ER negativni molekularni put najčešće se vezuje gubitak genetskog materijala na 13q, višak istog u hromozomskom regionu 11q13, amplifikacija 17q12 gena i obrazac genske ekspresije u kom dominiraju geni vezani za ćelijski ciklus i proliferaciju. U zavisnosti od prisustva amplifikacije 17q12 gena, ovi tumori mogu biti HER-2-pozitivni i HER-2 negativni, a najčešće se radi o loše diferentovanim i genetski veoma nestabilnim, aneuploidnim tumorima, pri čemu lezije sa HER-2 negativnim fenotipom dodatno karakteriše visoka proliferativna aktivnost, gust inflamatorni infiltrat i deficitarna homologa rekombinacija (14, 15).

Mutacije *TP53* tumor-supresorskog gena dominantno se vezuju za ER negativni molekularni put, dok se mutacije u *PIK3CA* genu mogu sresti i kod ER pozitivnih tumora, kao i ER negativnih HER-2 pozitivnih tumora (8, 14, 15).

1.4 Kliničko-patološke karakteristike karcinoma dojke

1.4.1 Morfologija karcinoma dojke

Karcinomi dojke najčešće nastaju u njenom gornjem spoljnom kvadrantu (50%), potom u centralnom dijelu (20%), a u oko 4% slučajeva radi se o bilateralnim tumorima ili lezijama koje se sekvencijalno javljaju u istoj dojci (9). Većina invazivnih karcinoma dojke se makroskopskim pregledom lako palpira i uočava unutar tkiva dojke kao nejasno ograničena masa čvršće konzistencije, iregularnog ili stelatnog oblika, mada može imati i nodularnu konfiguraciju. U određenom broju slučajeva mogu se zapaziti i promjene na koži bradavice (u vidu induracije i diskoloracije), kao i ulceracije na koži iznad samog tumora, a u rijetkim slučajevima cijela dojka može biti indurirana, sa kožom izgleda narandžine kore (9). U određenom broju slučajeva tumor se ne može makroskopski jasno diferencirati, pa je prilikom uzorkovanja materijala za patohistološku dijagnostiku neophodna korelacija sa radiološkim nalazom (8).

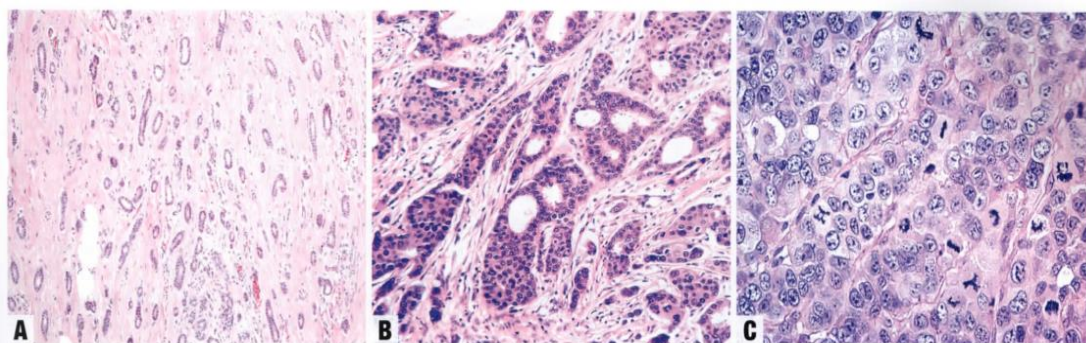
Karcinomi dojke vode porijeklo iz epitelnih ćelija terminalne duktulo-lobularne jedinice i mogu se javiti u dva osnovna oblika: 1) *in situ* karcinom – kada su tumorske ćelije ograničene na duktus/lobulus, oko kog se nalazi intaktna bazalna membrana i 2) invazivni karcinom – kada tumorske ćelije narušavaju integritet bazalne membrane i infiltruju okolno tkivo (9).

Histomorfološki, u više od 95% slučajeva radi se o adenokarcinomima, koji su histološki veoma raznovrsni, a o čijem se malignom potencijalu može zaključivati na osnovu: 1) histološkog tipa (određenog na osnovu tumorske arhitektonike, citomorfologije i karakteristika tumorske strome); 2) histološkog gradusa (odnosno stepena diferencijacije tumora, određenog prema *Nottingham* sistemu skorovanja – Tabela 1); 3) prisustva peritumorske limfovaskularne invazije i 4) prisustva pridružene *in situ* komponente (8).

Tabela 1. Određivanje histološkog gradusa invazivnog karcinoma dojke na osnovu *Nottingham* sistema skorovanja. Izvor: modifikovano *WHO classification of breast tumours*, 2019. (8)

| Histomorfološka karakteristika | Skor |
|---|-------------------|
| Formiranje tubula i žlijezda | |
| Izraženo (u >75% zapremine tumora) | 1 |
| Umjereno (između 10% i 75% zapremine tumora) | 2 |
| Slabo izraženo ili odsutno (<10% zapremine tumora) | 3 |
| Nuklearni pleomorfizam | |
| Mala, regularna, uniformna jedra | 1 |
| Umjereno uvećanje i varijacije u veličini jedara | 2 |
| Izražene varijacije u veličini jedara | 3 |
| Mitotski indeks | |
| Broj mitoza po mm ² u zavisnosti od dijametra vidnog polja mikroskopa (prema uputstvima) | 1-3 |
| Ukupni skor (zbir skorova za formaciju žlijezda, nuklearni pleomorfizam i mitotski indeks) | Histološki gradus |
| 3-5 | Gradus 1 |
| 6 i 7 | Gradus 2 |
| 8 i 9 | Gradus 3 |

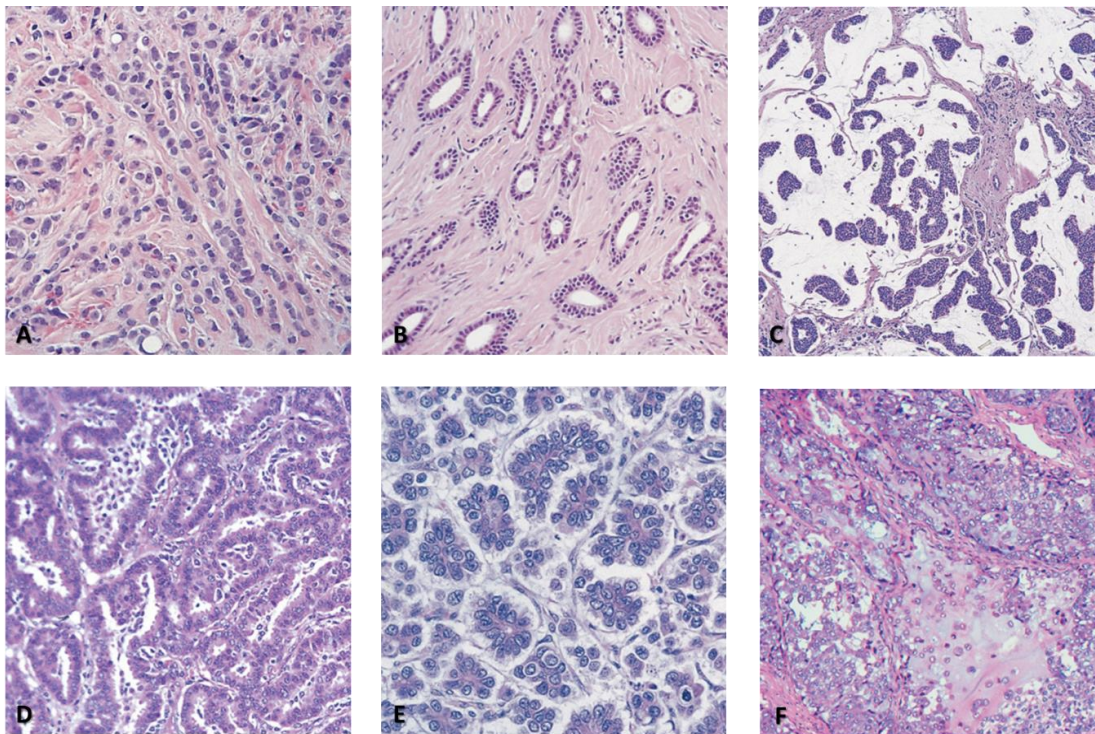
Prva klasifikacija karcinoma dojke izvršena je na osnovu histološkog tipa tumora, a u najvećem broju slučajeva, uključujući i mješovite tumore, radi se o tzv. invazivnom karcinomu dojke bez posebnih karakteristika (IBC-NST), odnosno invazivnom duktalnom karcinomu (8, 9). U okviru ovog entiteta prepoznat je širok spektar histomorfoloških varijacija, od dobro diferentovanih tumora, građenih od tubularnih formacija sa ćelijama blago pleomorfnih jedara, do loše diferentovanih tumora koje grade difuzni aranžmani anaplastičnih ćelija (Slika 4). Većina IBC-NST praćena je izraženim dezmoplastičnim odgovorom strome, što uslovljava prethodno opisanu makroskopsku prezentaciju u vidu palpabilnog, iregularnog tumorskog čvora tvrđe konzistencije (9).



Slika 4. Invazivni karcinom dojke bez posebnih karakteristika: (A) dobro diferentovan, (B) srednje diferentovan, (C) loše diferentovan. Izvor: modifikovano *WHO classification of breast tumours*, 2019 (8).

Prema posljednjoj WHO klasifikaciji tumora dojke, karcinomi sa medularnim obrascem, invazivni karcinomi sa neuroendokrinom diferencijacijom, te pleomorfnim, melanocitnim i horiokarcinomatозnim karakteristikama, kao i nekim drugim rijetkim histomorfološkim obrascima (onkocitni, lipidima bogat, glikogenom bogat, svijetloćelijski i sebacealni karcinom) više se ne smatraju posebnim entitetima, već specijalnim morfološkim obrascima IBC-NST. Među navedenim histomorfološkim obrascima, neophodno je izdvojiti IBC-NST sa medularnim karakteristikama, koji se karakteriše ekspanzivnim marginama, visokim histološkim gradusom sa sincicijalnim aranžmanima tumorskih ćelija, širokim područjima nekroze i prominentnim TIL (8).

Daleko rjeđi u odnosu na IBC-NST su tzv. specijalni karcinomi dojke (poput lobularnog, tubularnog, mucinoznog, mikropapilarnog, metaplastičnog, itd.), koji se karakterišu specifičnom morfologijom u više od 90% ukupne zapremine tumora (Slika 5) (8).



Slika 5. Specijalni tipovi karcinoma dojke: (A) Invazivni lobularni karcinom, (B) tubularni karcinom, (C) mucinozni karcinom, (D) invazivni papilarni karcinom, (E) invazivni mikropapilarni karcinom, (F) metaplastični karcinom. Izvor: modificovano *Diagnostic Histopathology of Tumors*, 2013 (16).

Između 10% i 15% invazivnih karcinoma dojke histološki odgovara lobularnom karcinomu, koji se karakteriše invazijom tkiva dojke relativno uniformnim pojedinačnim tumorskim ćelijama ili tumorskim ćelijama aranžiranim u tračke debljine jedne ćelije, što često nije praćeno intenzivnim dezmpoplastičnim odgovorom (Slika 5A), pa ovi tumori mogu biti klinički okultni i teško radiološki detektabilni (9). S druge strane, tubularni karcinomi se odlikuju se izrazito dezmpoplastičnom stromom, u koju su uklopljeni ovalni

ili angulirani tubuli otvorenog lumena, obloženi tumorskim ćelijama niskog stepena atipije (Slika 5B) (16).

Mucinozni karcinomi (Slika 5C) obično se prezentuju kao mekane, želatinozne, jasno ograničene lezije, usljed produkcije velike količine ekstracelularnog mucina od strane tumorskih ćelija, dok celularnost samog tumora može biti varijabilna (8).

Invazivni papilarni karcinomi (Slika 5D) odlikuju se formiranjem karakterističnih papilarnih formacija čija fibrovaskularna središta oblažu tumorske ćelije različitog stepena atipije, dok se kod mikropapilarnih karcinoma (Slika 5E) radi o morulama sličnim nakupinama tumorskih ćelija reverznog polariteta, bez fibro-vaskularnih središta, u stromi sunderastog izgleda, sa praznim prostorima oko ćelijskih klastera (16).

Pod entitetom „metaplastični karcinom” objedinjeni su invazivni karcinomi dojke koji se karakterišu diferencijacijom neoplastičnih ćelija u pravcu skvamoznog epitela i/ili elemenata mezenhimalnog izgleda, koji može varirati od vretenasto-ćelijskog, preko hondroidnog, do osealnog (Slika 5F) (8).

Pored navedenih karakteristika, prognostički značaj imaju i veličina tumora, njegova udaljenost od resekcionih rubova preparata, prisustvo tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL), kao i stadijum bolesti u vrijeme postavljanja dijagnoze (8). Stadijum bolesti se u kliničkoj praksi najčešće određuje primjenom TNM sistema koji objedinjuje: T - karakteristike primarnog tumora (dimenzije i/ili lokalnu raširenost), N – prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i M – prisustvo udaljenih metastaza (Tabela 2) (17). Na osnovu ova tri parametra, prema posebnom algoritmu (Tabela 3) utvrđuje se i ukupni klinički stadijum bolesti (17).

Ranim karcinomom dojke smatra se bolest koja je ograničena na dojku, bez ekstenzije u kožu i zid grudnog koša i kod koje sekundarni depoziti nijesu nađeni, ili su detektovani u najviše devet limfnih čvorova pazušne jame (18), odnosno bolest u kliničkom stadijumu 0 do IIIA (17).

Tabela 2. Određivanje patološkog TNM stadijuma (pTNM) karcinoma dojke prema 8. izdanju TNM klasifikacije malignih tumora. Izvor: modifikovano *TNM classification of malignant tumours. 8th ed., 2016* (17).

| Veličina primarnog tumora (pT) | |
|---|--|
| Tx | Ne može se procijeniti |
| Tis | Karcinom <i>in situ</i> |
| T0 | Nema znakova prisustva primarnog tumora |
| T1 T1mi T1a T1b T1c | Invazivni karcinom ≤ 20 mm: <ul style="list-style-type: none"> - Invazivni karcinom ≤ 1 mm - invazivni karcinom > 1 mm ≤ 5 mm - invazivni karcinom > 5 mm ≤ 10 mm - invazivni karcinom > 10 mm ≤ 20 mm |
| T2 | Invazivni karcinom > 20 mm ≤ 50 mm |
| T3 | Invazivni karcinom > 50 mm |
| T4 T4a T4b T4c T4d | Tumor koji direktno zahvata zid grudnog koša i/ili kožu, sa makroskopski vidljivim promjenama: <ul style="list-style-type: none"> - invazija zida grudnog koša (isključujući pektoralni mišić) - makroskopski vidljive promjene na koži (uključujući ulceraciju i/ili satelitske kutane nodule i/ili edem) - tumor koji istovremeno zadovoljava kriterijume T4a i T4b - inflamatorni karcinom |
| Status regionalnih limfnih čvorova (pN) | |
| Nx | Ne može se procijeniti |
| N0 | Nema metastaza u limfnim čvorovima |
| N1 | Metastaze u 1-3 aksilarna limfna čvora (ukoliko je veličina sekundarnog depozita $> 0,2$ mm i ≤ 2 mm, bolest se smatra mikrometastatskom i označava kao N1mi) |
| N2 | Metastaze u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova |
| N3 | Metastaze u infra, ili supraklavikularnim limfnim čvorovima, ili metastaze u ≥ 10 aksilarnih limfnih čvorova |
| Prisustvo udaljenih metastaza (pM) | |
| Mx | Ne može se procijeniti |
| M0 | Nema udaljenih metastaza |
| M1 | Prisutne udaljene metastaze |

Tabela 3. Određivanje kliničkog stadijuma karcinoma dojke na osnovu T, N i M kategorije. Izvor: modifikovano *TNM classification of malignant tumours. 8th ed., 2016* (17).

| Ukupni stadijum karcinoma dojke | T kategorija | N kategorija | M kategorija |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Stadijum 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadijum IA | T1 | N0 | M0 |
| Stadijum IB | T0 | N1mi | M0 |
| | T1 | N1mi | M0 |
| Stadijum IIA | T0 | N1 | M0 |
| | T1 | N1 | M0 |
| | T2 | N0 | M0 |
| Stadijum IIB | T2 | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| Stadijum IIIA | T0 | N2 | M0 |
| | T1 | N2 | M0 |
| | T2 | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| Stadijum IIIB | T4 | bilo koji N | M0 |
| Stadijum IIIC | bilo koji T | N3 | M0 |
| Stadijum IV | bilo koji T | bilo koji N | M1 |

1.4.2 Biomarkeri u kreiranju novih modela klasifikacije karcinoma dojke

Imajući u vidu kompleksnu etiologiju i patogenezu, kao i širok spektar morfoloških varijanti karcinoma dojke, uz višedecenijsko iskustvo u njegovom liječenju tradicionalno dostupnim terapijskim modaliteima, postalo je jasno da se ova bolest ne može smatrati jedinstvenim entitetom, već da je čini veoma heterogena grupa tumora sa različitim

biološkim ponašanjem koje se ne može u potpunosti predvidjeti samo na osnovu klasične histomorfologije. Iz tog razloga javila se potreba za osmišljavanjem alternativnih modela klasifikacije karcinoma dojke, kojih danas ima sve više zahvaljujući ekspanziji bioinformatike.

Najširu primjenu u onkologiji pronašao je model koji se zasniva na ekspresiji receptora steroidnih hormona (ER i PR) i HER-2 receptora, kao klinički najsvrsishodniji, jer imunohistohemijska analiza ekspresije pomenutih biomarkera predstavlja sastavni dio rutinske patohistološke obrade karcinoma dojke.

U tom smislu, svi karcinomi dojke mogu se svrstati u jednu od tri grupe: 1) ER pozitivni karcinomi (koji su HER-2 negativni i čine 50-65% svih karcinoma dojke); 2) HER-2 pozitivni karcinomi (koji mogu ekspimirati i ER/PR i čine 10-20% svih karcinoma dojke) i 3) trostruko negativni karcinomi (TNBC; koji su ER, PR i HER-2 negativni i čine 10-20% svih karcinoma dojke). Unutar ove tri grupe tumora zapažaju se velike razlike kako u karakteristikama pacijenata, patomorfologiji tumora i obrascima njihovog metastaziranja, tako i u odgovoru na terapiju, mogućnosti relapsa i kliničkom ishodu. Najbolju prognozu imaju ER pozitivni karcinomi koji se javljaju kod starijih žena, uglavnom su dobro do umjereno diferentovani i odlikuju se kasnim relapsima, a najlošiju TNBC koji pogađaju žene mlađe životne dobi, po pravilu su loše diferentovani i imaju kratak period do relapsa (9).

Jedan od alternativnih klasifikacionih sistema, koji se u velikoj mjeri preklapa sa pomenutim, kreiran je na osnovu rezultata dobijenih genskim profilisanjem tumora (Tabela 4) (9). Prema ovoj klasifikaciji, karcinomi dojke mogu se razvrstati u četiri osnovna molekularna podtipa: luminal A, luminal B (sa HER-2 negativnom i HER-2 pozitivnom potkategorijom), neluminalni HER-2 pozitivni i TNBC. Zbog veće ekonomičnosti i dostupnosti u odnosu na molekularne tehnike, pripadnost tumora nekom od definisanih molekularnih podtipova može se odrediti upotrebom imunohistohemije, dodatkom procjene Ki67 proliferativnog indeksa standardnoj analizi ekspresije ER, PR i HER-2 (18).

Pored prognostičkih implikacija, određivanje molekularnog podtipa karcinoma dojke ima terapijski značaj pa se tako, pored standardnih onkoloških tretmana poput citotoksičnih agenasa i radioterapije, pacijentkinjama sa luminal podtipovima može ordinirati

endokrinološka terapija, a pacijentkinjama sa HER-2 obogaćenim fenotipom anti-HER-2 ciljana terapija. Najveći terapijski izazov još uvijek predstavlja TNBC, između ostalog i zbog nedostatka potencijalnih „meta” za primjenu ciljane terapije (19).

Tabela 4. Kliničko-patološka definicija molekularnih podtipova karcinoma dojke.

Izvor: modifikovano *WHO classification of breast tumours, 2019* (8).

| Molekularni podtip | Kliničko-patološka definicija |
|-----------------------------|---|
| Luminal A | ER i/ili PR pozitivan HER-2 negativan nizak Ki67 |
| Luminal B (HER-2 negativni) | ER i/ili PR pozitivan HER-2 negativan visok Ki67 |
| Luminal B (HER-2 pozitivni) | ER i/ili PR pozitivan HER-2 pozitivan bilo koja vrijednost Ki67 |
| Neluminalni HER-2 pozitivni | ER i PR negativni HER-2 pozitivan |
| TNBC | ER, PR i HER-2 negativni |

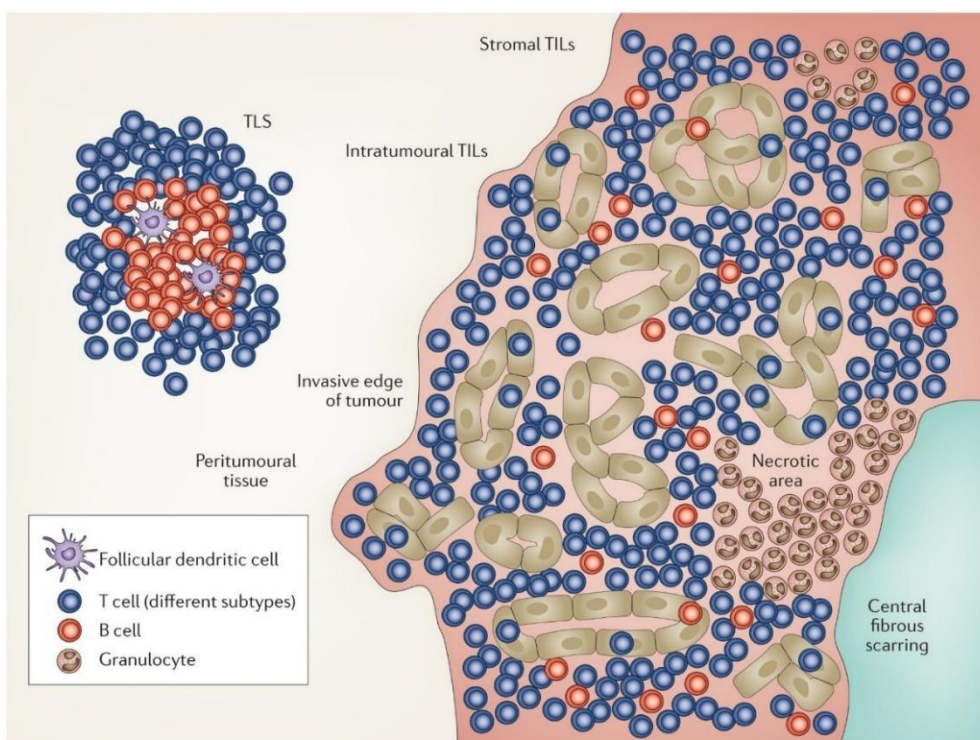
Međutim, imajući u vidu globalni teret karcinoma dojke, naponi naučne zajednice konstantno su usmjereni kako na na optimizaciju već postojećih tako i na identifikaciju novih biomarkera, prvenstveno s ciljem adekvatne selekcije pacijentkinja za sve širi spektar dostupnih modaliteta ciljane terapije.

1.4.3 Značaj TIL u karcinomu dojke

Tumor-infiltrirajući limfociti (TIL) predstavljaju mononuklearne imunološke ćelije koje prožimaju tumorsko tkivo i opisane su u velikom broju solidnih tumora (20), a njihova

povezanost sa povoljnijim kliničkim ishodom kod karcinoma dojke dokumentovana je u kliničkoj kohorti već u ranim dvadesetim godinama prošlog vijeka (21).

Danas se zna da su TIL odraz imunološkog odgovora organizma na prisustvo malignih ćelija, o čemu će više riječi biti kasnije, kao i da ih čine različite populacije inflamatornih ćelija koje pokazuju prostornu heterogenost (Šema 3) (22).



Šema 3. Grafički prikaz imunološke mikrookoline u karcinomu dojke. Tumor-infiltrirajući limfociti (TIL) u karcinomu dojke mogu se detektovati u vezivnom tkivu tumorske strome – stromalni TIL (sTIL) ili unutar tumorskih plaža, gdje ostvaruju direktan kontakt sa tumorskim ćelijama – intratumorski TIL (iTIL). Populacija TIL se sastoji od citotoksičnih i „*helper*” T limfocita, B limfocita i folikularnih dendritičnih ćelija. TLS – tercijarne limfoidne strukture. Izvor: *Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic, 2016* (22)

Uprkos kompleksnosti antitumorskog imunološkog odgovora, TIL se smatraju snažnim prognostičkim i prediktivnim markerom u ranom karcinomu dojke, zbog čega su

smjernice za njihovu analizu utvrđene međunarodnim ekspertskim konsenzusom, sa ciljem dobijanja što pouzdanijih i reproducibilnijih rezultata u rutinskoj patohistološkoj dijagnostici (Tabela 5) (22).

Tabela 5. Preporuke međunarodne radne grupe za procjenu TIL u karcinomu dojke. Izvor: modifikovano *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014, 2015* (23).

| Procjena TIL u karcinomu dojke |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Procjena TIL vrši se na operativnom materijalu kada god je to moguće, izuzetno na „core” biopsijama, ali isključivo u okviru neoadjuvantnog pristupa.2. Procjena na jednom histološkom rezu (debljine 4-5 µm, na uveličanju x200-x400) po pacijentu smatra se dovoljnom.3. TIL se procjenjuje unutar granica invazivnog tumora, u stromalnoj komponenti, pri čemu se infiltrat oko <i>in situ</i> komponente tumora i normalnih lobulusa dojke isključuje iz analize.4. U procjenu ne ulaze TIL u zonama nekroze, „crush“ artefakta, regresivne hijalinizacije i prethodno učinjene „core“ biopsije.5. U obzir se uzimaju sve mononuklearne inflamatorne ćelije (uključujući limfocite i plazma ćelije), dok se polimorfonukleari isključuju iz analize.6. Procjenjuje se prosječna prekrivenost strome TIL u cijelom tumoru, bez fokusiranja na „hot spot” područja.7. Poželjno je da se TIL skoruje kao kontinuirana varijabla a ne semikvantitativno, te da se izražava kao procenat stromalnog tkiva prekriven mononuklearnim inflamatornim ćelijama. |

Prema aktuelnim preporukama, TIL treba procjenjivati u stromalnoj komponenti tumora i skorovati kao kontinuiranu varijablu, u vidu procenta tumorske strome koji je prekriven mononuklearnim inflamatornim ćelijama. Iako još uvijek nije poznata granična vrijednost ovog parametra koja ima klinički značaj, u prvi plan stavljena je standardizacija

metodologije za procjenu TIL, kao ključni korak u budućim naporima da se dođe i do ovog saznanja (23).

Alternativno se može razmotriti statistička analiza TIL kao nekontinuirane varijable, pa se u literaturi često nailazi i na pojam limfocit-predominantnog karcinoma dojke (LPBC). LPBC predstavlja deskriptivni termin kojim su objedinjeni svi tumori koji „sadrže više limfocita nego karcinomskih ćelija”, a u kojima gustina TIL načelno iznosi najmanje 50-60%. Za sada nije jasno da li će ova granična vrijednost TIL biti značajna u budućnosti, jer se prisustvo tako gustog inflamatornog infiltrata ne smatra čestom pojavom u karcinomu dojke, gdje se javlja u približno 10% slučajeva (23).

Limfoidni agregati, tzv. tercijarne limfoidne strukture (TLS), sa ili bez vidljivih germinativnih centara, koje se ponekad mogu uočiti unutar očuvanog tkiva dojke u neposrednoj okolini malignog tumora, također se smatraju indikatorom aktivnog antitumorskog imunološkog odgovora (24). Za razliku od TIL, u čijem sastavu dominiraju T limfociti, peritumorski limfoidni agregati sačinjeni su od heterogenije populacije limfocita, među kojima značajan procenat čine B limfociti, zbog čega se TLS izuzimaju prilikom procjene TIL. Uzimajući u obzir da su kriterijumi za njihovu identifikaciju nejasni kao i da ne postoje zvanične preporuke za njihovo rutinsko skorovanje, TLS se mogu opisivati posebno, ali isključivo u istraživačke svrhe dok se ne utvrdi njihov značaj u kliničkoj praksi (23).

1.5 Uloga imunog sistema u evoluciji malignih tumora

1.5.1 Izbjegavanje imunološkog nadzora

Maligna transformacija ćelije determinisana je poremećajima na nivou šest intracelularnih procesa, gdje tumorske ćelije: postaju autonomne u odnosu na signale rasta i rezistentne na signale inhibicije rasta, izbjegavaju mehanizme programirane ćelijske smrti, neograničeno se dijele, pokreću mehanizme neoangiogeneze i stiču sposobnost invazije okolnih tkiva i vaskularnih postora (25). Uloga imunog sistema u prevenciji razvoja i progresije malignih tumora odavno je prepoznata, a sve veću pažnju

naučne zajednice privlače mehanizmi izbjegavanja imunološkog nadzora koji su razvijeni od strane tumorskih ćelija. U tom kontekstu, imunološki nadzor predstavlja kompleksan proces u kom ćelije i molekuli urođenog i stečenog imuniteta koordinisano učestvuju u prepoznavanju i destrukciji malignih ćelija i njihovih prekursora prije nego što bolest postane klinički evidentna (26).

Odgovor imunog sistema na prisustvo tumorskih ćelija ogleda se u infiltraciji tumora imunološkim ćelijama, u prvom redu stromalnim limfocitima (sTIL), među kojima dominantnu populaciju čine T limfociti. Smatra se da ključnu ulogu u antitumorskom imunološkom odgovoru imaju citotoksični (CD8) T limfociti koji, nakon aktivacije od strane "helper" (CD4) T limfocita, direktno eliminišu tumorske ćelije preko ekspresije Fas liganda na svojoj površini i pokretanja spoljašnjeg puta apoptoze u tumorskim ćelijama, ili oslobađanjem potentnih citotoksina. Međutim, CD4 limfociti imaju mnogo kompleksniju ulogu u medijaciji antitumorskog imunološkog odgovora jer se, u zavisnosti od predominantnih citokina sekretovanih u tumorskoj mikrookolini, mogu diferencirati u različite podtipove efektorskih ćelija sa potpuno oprečnim ulogama u ovom procesu (27).

Dva osnovna mehanizma kojim tumorske ćelije izbjegavaju efektore urođenog i stečenog imuniteta jesu imunološka selekcija i imunološka subverzija. Imunološka selekcija ili *immunoediting* predstavlja favorizovanje i opstanak neimunogenih klonova tumorskih ćelija u procesu prirodne selekcije. U nastavku će dominantno biti riječi o fenomenu imunološke subverzije koja podrazumijeva aktivnu supresiju imunološkog odgovora na prisustvo tumorskih ćelija, kada odbrambeni fiziološki procesi i kontrolni mehanizmi bivaju stavljeni u službu razvoja neoplazme (27).

Imuni sistem čini veoma složena mreža efektorskih ćelija, molekula i biohemijskih procesa, čija je osnovna uloga odbrana organizma od stranih čestica, uz istovremeno ograničavanje autoreaktivnosti i štetnog dejstva imunih ćelija i pratećeg inflamatornog procesa na sam organizam (28). Glavni efektori imunološkog odgovora, ali i orkestracije njegovih signala, jesu T limfociti (29). Uspješna aktivacija naivnih T limfocita zahtijeva dva signala sa antigen-prezentujućih ćelija (APC). Prvi podrazumijeva prepoznavanje antigena kroz interakciju glavnog molekula histokompatibilnosti (*Major Histocompatibility Complex*; MHC) sa T-ćelijskim receptorom (*T-cell receptor*; TCR),

dok je drugi nezavisan od antigena i predstavlja kostimulatorni signal, uslovljen ekspresijom kostimulatornih molekula (u prvom redu CD28) na površini APC i njihovim vezivanjem za odgovarajuće receptore na T limfocitima. U odsustvu kostimulatornog signala, uprkos adekvatnoj antigen-specifičnoj stimulaciji TCR, T ćelija neće adekvatno odgovoriti na dalju antigenu stimulaciju (30). Dalje, u procesu svoje maturacije, ove ćelije prolaze kroz timičnu selekciju kojom autoreaktivni T limfociti uglavnom bivaju uklonjeni iz organizma. Pojedine frakcije ovih ćelija ipak uspiju da zaobiđu mehanizam centralne tolerancije, zadržavajući potencijal indukcije autoimunih reakcija (29). Iz tog razloga imuni sistem razvio je kontrolne mehanizme koji se zasnivaju na isporučivanju koinhibitornih signala imunološkim ćelijama preko odgovarajućih receptora na njihovoj površini, među kojima je najbolje proučena CTLA-4 posredovana imunoinhibicija (31). Danas je poznato da je pravilno funkcionisanje imunog sistema, počev od efektivne aktivacije T ćelija do očuvanja periferne tolerancije i sprječavanja razvoja autoimunosti, direktno uslovljeno ravnotežom između kostimulatornih i koinhibitornih signala posredovanih članovima B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4 superfamilije proteina (29).

Jedan od članova ove superfamilije je i PD-1 (*Programmed death receptor 1*), identifikovan 1992. godine kao molekul udružen sa apoptozom (32), da bi se nekoliko godina kasnije ispostavilo da se zapravo radi o negativnom regulatoru imunološkog odgovora (33). Od tog momenta signalni putevi u koje je uključen PD-1 postali su predmet brojnih istraživanja, kako u imunologiji tako i u onkologiji.

1.5.2 PD-1/PD-L1 signalni put

PD-1 je transmembranski protein molekularne mase 55 kDa, koji je kao monomer eksprimiran na površini aktiviranih CD4 i CD8 T limfocita, B limfocita, NK ćelija i monocita, ali i pojedinih APC (29, 34). Sastoji se od jednog N-terminalnog IgV-like domena, koji je od plazmaleme odvojen peteljkom dužine 20 aminokiselina, potom od transmembranskog domena i citoplazmatskog repa na kom se nalaze dva tirozinska signalna motiva. N-terminalna sekvenca citoplazmatskog repa formira ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) neophodan za vezivanje fosfataza koje posjeduju SH2-domen, dok C-terminalna sekvenca formira ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*), koji je od krucijalnog značaja za inhibitornu funkciju PD-

1 receptora (29). Ekspresiju ovog receptora na T limfocitima, između ostalog, mogu indukovati proinflamatorni citokini (IL-2, IL-7, IL-15 i IL-21), kao i NFATc1 transkripcijski faktor čija ekspresija prati aktivaciju T ćelija (35).

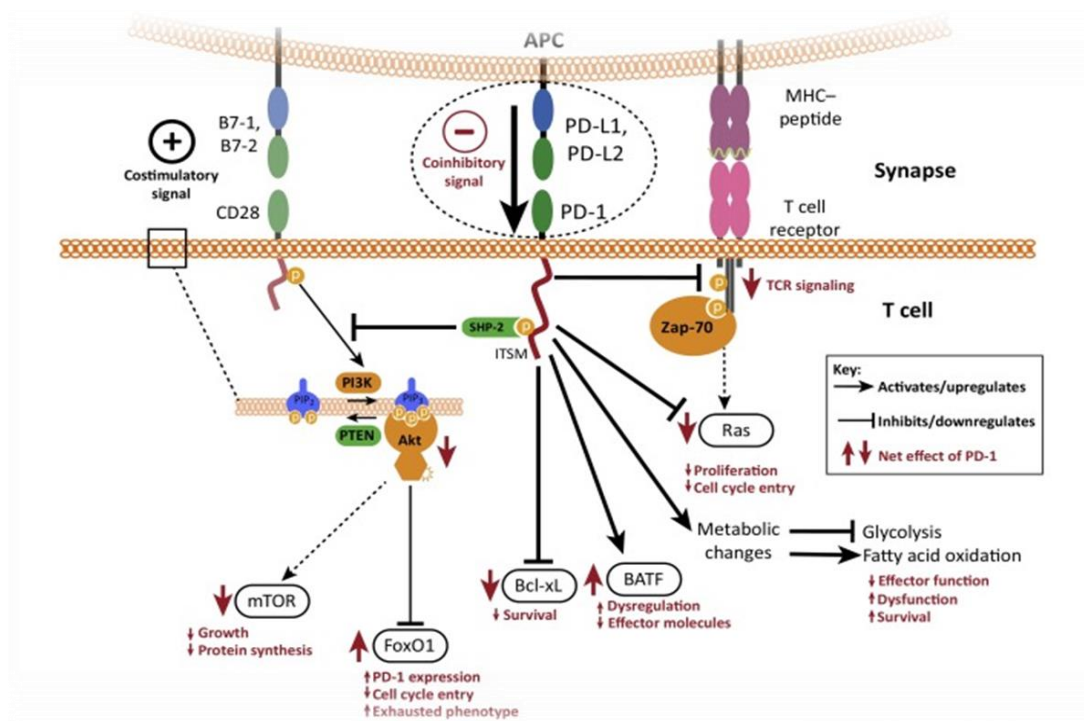
Prema svojoj strukturi, svi ligandi PD-1 su transmembranski glikoproteini tipa 1 i sadrže IgV i IgC domen. Iako uglavnom dijele induktore ekspresije sa PD-1, obrazac ekspresije ovih liganada je nešto drugačiji. Jedan od njih, PD-L1 (*Programmed cell death ligand 1*), pored konstitutivne ekspresije na površini inflamatornih ćelija (B i T limfocita, APC i mastocita), eksplicira se i na površini ćelija vezivne potke jetre, mezenhimalnih stem ćelija, insulocita pankreasa, neurona, keratinocita, te sinciciotrofoblasta i sl., odnosno u onim tkivima i organima gdje očuvanje imunološke tolerancije i prevencija razvoja autoimunosti imaju vitalni značaj (29).

Prenos signala preko PD-1/PD-L1 osovine (Šema 4) moguć je samo nakon unakrsnog povezivanja PD-1 sa B- ili T-ćelijskim antigenskim receptorom, a njegov početni korak je regrutovanje Src homology 2 domena (koji sadrži fosfataze SHP-1/SHP-2) na ITSM. Nakon toga dolazi do defosforilacije signalnih kinaza poput CD3 ζ , PKC θ i ZAP70, sa atenuacijom TCR signalizacije, što za posljedicu ima inhibiciju T-ćelijske ekspanzije. Takođe, PD-1/PD-L1 signalizacija ima značajne efekte na ćelijski ciklus, TGF- β posredovanu ćelijsku signalizaciju, kao i na metabolizam T ćelija (29, 36).

Uticaj na ćelijski ciklus ostvaruje se inhibicijom signalizacije preko PI3K/Akt/mTOR i Ras/MEK/Erk signalnih puteva, koji djeluju sinergistički u procesu aktivacije T ćelija. Naime, usljed niske ekspresije ciklina i slabe aktivnosti odgovarajućih ciklin-zavisnih kinaza, u prvom redu Cdk2 kao posljedice visoke ekspresije njenog inhibitora p27, primarni T limfociti se normalno nalaze u G0 fazi ćelijskog ciklusa (37). Aktivacija T ćelije, između ostalog, podrazumijeva inicijaciju njenog ulaska u S fazu ćelijskog ciklusa, za šta je neophodan preduslov ubikvitin zavisna degradacija p27 pod dejstvom enzima Skp2 iz SCF familije ubikvitin ligaza (38). Indukcija transkripcije ovih enzima rezultat je sinergističkog dejstva simultane aktivacije PI3K/Akt/mTOR i Ras/MEK/Erk signalnih puteva, kao posljedice CD28-posredovane kostimulacije TCR signalizacije (37). Aktivacijom PD-1/PD-L1 signalnog puta inhibira se aktivnost proksimalnih članova PI3K/Akt/mTOR i Ras/MEK/Erk signalnih kaskada, što za rezultat ima smanjenu ekspresiju Skp2, sa posljedično visokom koncentracijom p27 u ćeliji, koji inhibira Cdk2

(39). Inhibicija PI3K/Akt/mTOR signalnog puta rezultat je SHP-2 posredovane defosforilacije kazein kinaze 2 i posljedične aktivacije PTEN, koji je fiziološki antagonista PI3K-Akt signalizacije. Inhibitorni efekat PD-1 na Ras-MEK-ERK kaskadu uglavnom zavisi od direktne inhibicije Ras proteina (29).

Opisani proces PD-1 posredovane inhibicije Cdk2 praćen je reprogramiranjem transkripcije gena za Smad3 protein, čime se snižava prag TGF- β posredovane signalizacije, što rezultira konverzijom naivnih T limfocita u indukovane T regulatorne ćelije (iT_{Reg}) koje imaju važnu ulogu u očuvanju periferne tolerancije i sprječavanju odbacivanja transplantata. Paralelno sa indukcijom diferencijacije T_{Reg} dolazi do supresije stvaranja, ali i funkcije, efektorskih T limfocita (T_{Eff}), sa posljedičnom snažnom inhibicijom imunološkog odgovora (40). Osim toga, antagonistički efekat na signalizaciju putem PI3K odgovoran je za blokadu ekspresije *BCL-XL* antiapoptotskog gena, što pokretanjem unutrašnjeg mehanizma uvodi T ćeliju u proces programirane ćelijske smrti (28).



Šema 4. Prenos signala preko PD-1/PD-L1 osovine. Izvor: *New immunotherapies targeting the PD-1 pathway*; 2015 (36).

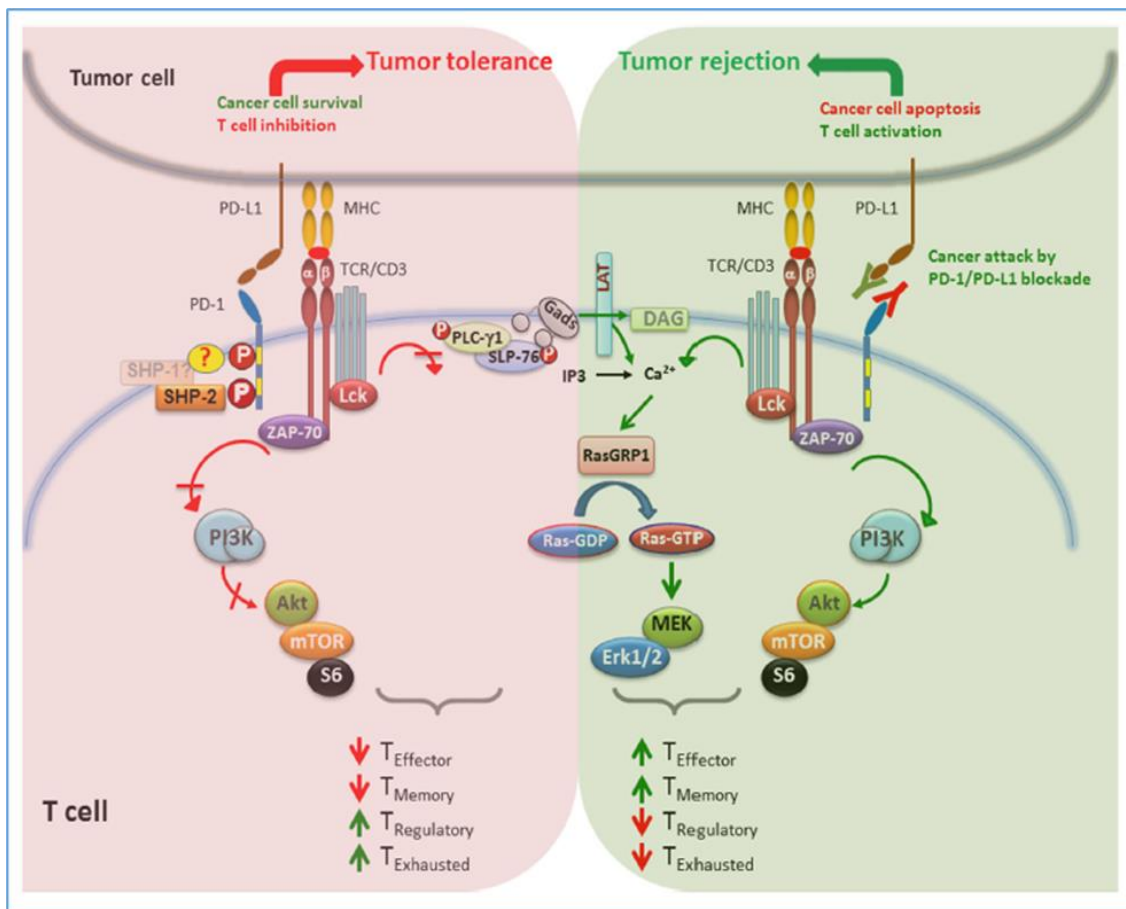
Signali koje T ćelije u procesu aktivacije primaju putem CD28-posredovane kostimulacije dovode do reprogramiranja njihovog metabolizma, na način što se oksidativna fosforilacija zamjenjuje glikolizom, kako bi se za relativno kratko vrijeme obezbijedila energija neophodna za njihovu proliferaciju, rast i efektorske funkcije (41). Danas se zna da upravo metaboličko reprogramiranje određuje pravac diferencijacije T ćelija, te da favorizovanje glikolize usmjerava ovaj proces ka nastanku T_{Eff}, dok potenciranje β-oksidacije masnih kiselina dovodi do konverzije efektorskih u memorijske T ćelije (42). Studije u kojima je ispitivan metabolički profil T limfocita izloženih PD-1/PD-L1 signalizaciji pokazale su da ona za ishod ima inhibiciju ekspresije receptora i enzima glikolize i glutaminolize, te favorizovanje β-oksidacije masnih kiselina putem stimulacije ekspresije karnitin-palmitoil transferaze (43), što je najvjerojatnije još jedna manifestacija inhibicije PI3K/Akt/mTOR i Ras/MEK/Erk signalnih puteva (29).

Krajnji rezultat PD-1/PD-L1 signalizacije jeste inhibicija nastanka efektorskih i memorijskih T limfocita i stvaranje većeg broja regulatornih i T limfocita iscrpljenog fenotipa (29).

1.6 PD-1/PD-L1 signalizacija u kanceru i njene terapijske implikacije

Aktivacija PD-1/PD-L1 signalnog puta ima važnu ulogu u uspostavljanju periferne imunološke tolerancije, kao i u očuvanju stabilnosti i integriteta T limfocita (44). Ovaj prirodni mehanizam zaštite od štetnog dejstva imunološkog odgovora i inflamacije iskorišćen je od strane pojedinih malignih tumora, koji kroz povećanu ekspresiju PD-L1 na površini svojih ćelija, a često potpomognuti visokom ekspresijom PD-1 na TIL, aktiviraju PD-1/PD-L1 signalnu kaskadu (Šema 5, lijevo).

Pretpostavljeno je da bi izbjegavanje imunološkog nadzora organizma putem indukcije anergije i apoptoze T limfocita neminovno povezal ove tumore sa lošijom prognozom. Ovu hipotezu potvrdili su *Iwai* i saradnici, pokazavši da prekomjerna ekspresija PD-L1 u ćelijskoj liniji mastocitoma miša inhibira citolitičku aktivnost CD8 T limfocita, čime se intenzivira tumorski rast i invazivnost (45). Studije koje su uslijedile nakon toga pokazale su povezanost između povećane ekspresije PD-L1 i lošije prognoze u brojnim solidnim tumorima, uključujući karcinom jajnika, urotela, želuca i pankreasa, potom melanom i nesitnoćelijski karcinom pluća (46-50).



Šema 5. Uloga PD-1/PD-L1 blokade u neutralizaciji tumora putem aktivacije T ćelija. Lijevo: Kada je PD-1/PD-L1 signalizacija aktivna, ona se nalazi u službi preživljanja malignih ćelija kroz inhibiciju signalnih puteva koji dovode do aktivacije i ekspanzije T ćelija koje prepoznaju tumorske antigene. Poremećaj stvaranja efektorskih i memorijskih T ćelija, uz preferencijalnu diferencijaciju iscrpljenih i regulatornih T ćelija, promoviše tumorsku toleranciju. Desno: Blokodom PD-1/PD-L1 signalnog puta primjenom anti-PD-1 ili anti-PD-L1 antitijela čuva se integritet TCR signalizacije i pospješuje prenos signala preko PI3K/Akt i Ras/MAPK signalnih puteva. Posljedičnom promocijom diferencijacije efektorskih i memorijskih T ćelija, uz istovremenu supresiju nastanka iscrpljenih i regulatornih T ćelija, pospješuje se njihov antitumorski odgovor. Izvor: *The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation, 2016 (29).*

Povećana ekspresija PD-L1 na površini tumorskih ćelija može biti konstitutivna – kao posljedica onkogene mutacije, ili inducibilna – kao odgovor na prisustvo interferon γ (IFN- γ) produkcijskih T limfocita u tumorskoj mikrookolini, kada se ovaj ligand može pojačano eksprimirati i na površini drugih netumorskih ćelija. Isto tako, smanjena ekspresija PD-L1 na tumorskim ćelijama može biti posljedica odsustva T limfocita u intratumorskom inflamatornom infiltratu, ali i rezultat genetskih mutacija koje onemogućavaju ekspresiju ovog proteina čak i nakon T ćelijske infiltracije i IFN γ posredovane indukcije (51).

Koncept blokade PD-1/PD-L1 signalizacije (Šema 5, desno) primjenom antitijela usmjerenih na PD-L1 eksprimiran na površini tumorskih ćelija ili pak PD-1 koji se nalazi na površini imunoloških ćelija, osmišljen je sa namjerom da se očuva funkcionalnost T limfocita kao jedan od osnovnih preduslova za prepoznavanje i destrukciju tumorskih ćelija od strane imunog sistema (52). Tako je razvijen novi terapijski modalitet (inhibitori imunoloških kontrolnih tačaka), u kom je prethodno postojeći pristup imunoterapije s ciljem stimulacije imunog odgovora zamijenjen novim, koji podrazumijeva blokadu koinhibitornih signala u postizanju adekvatnog antitumorskog odgovora T ćelija (29).

Poput nekih drugih metoda ciljane antitumorske terapije, očekivalo se da inhibitori imunoloških kontrolnih tačaka daju poseban doprinos u terapiji uznapredovale bolesti, između ostalog i zbog ispoljavanja manje neželjenih efekata u poređenju sa konvencionalnom hemioterapijom (53). Do danas je veći broj PD-1/PD-L1 inhibitora registrovan i odobren za upotrebu, ali posebnu pažnju privlači činjenica da klinička upotreba ovih lijekova napreduje mnogo bržom dinamikom nego što je to slučaj sa bazičnim studijama i razumijevanjem svih aspekata PD-1/PD-L1 posredovane signalizacije (54).

Osnovni preduslov za primjenu PD-1/PD-L1 inhibitora jeste potvrda povećane ekspresije ovih proteina od strane tumorskih ćelija, odnosno neneoplastičnih ćelija tumorske mikrookoline, što se u rutinskoj praksi najčešće procjenjuje mikroskopskom analizom imunohistohemijski bojenih tkivnih isječaka. Do sada je razvijeno više imunohistohemijskih markera koji odgovaraju specifičnim epitopima na ovom receptor-ligand kompleksu (kako PD-1, tako i PD-L1), ali je tehnički aspekt interpretacije pozitivnosti imunohistohemijske reakcije još uvijek kontroverzan. Između ostalog, u

pitanje se dovode specifičnost pojedinih klonova antihumanih PD-L1 antitijela, potreba evaluacije pozitivnosti na netumorskim populacijama ćelija, kao i artefakti koji mogu nastati kao rezultat upotrebe različitih tehnika fiksacije tkiva i povlačenja antigena (55). Iako se mnogi tehnički problemi mogu prevazići standardizacijom reagenasa, obrade tkiva i performansa same analize, najveći izazov predstavlja adekvatna dihotomna karakterizacija rezultata PD-L1 ekspresije kao pozitivne odnosno negativne, jer trenutno ne postoji konsenzus oko relevantne vrijednosti ekspresije koja predstavlja granicu između ove dvije kategorije, pa se ona kreće od 1% do 50% u različitim studijama (51). Situaciju dodatno komplikuje činjenica da svaki od dostupnih anti-PD-1 odnosno anti-PD-L1 inhibitora ima sopstvenu prateću imunohistohemijsku probu (56). S napretkom istraživanja na ovom polju, očekivano je da će se komparabilnost rezultata dobijenih različitim klonovima antitijela i sistemima skorovanja ekspresije značajno popraviti, ali će ostati dilema u vezi sa biološkim značajem dobijenog rezultata, jer različiti mehanizmi povećanja ekspresije PD-L1 (konstitutivni/inducibilni) mogu imati potpuno različite implikacije kada je u pitanju anti-PD-1/PD-L1 terapija (51).

Ovaj problem se najbolje ogleda u opservaciji da, iako su anti-PD-1/PD-L1 imunoterapijom postignuti impresivni rezultati kod nekoliko različitih tipova maligniteta, jako mali broj pacijenata ima dobrobit od monoterapije ovim lijekovima, zbog čega se anti-PD-1/PD-L1 antitijela najčešće kombinuju sa drugim imunomodulatornim agensima čime se značajno povećavaju toksični efekti terapije (57). Takođe, primijećeno je da neki pacijenti sa potvrđenom tumorskom ekspresijom PD-L1 ne odgovore na terapiju, ali i da se kod određenog broja slučajeva gdje je ova ekspresija procijenjena kao negativna ipak može dobiti pozitivan terapijski odgovor, što ukazuje na nesavršenosti primjene ovog biomarkera (58).

Prije svega, tumorski odgovor na anti-PD-1/PD-L1 terapiju nije uslovljen samim antitijelom, već oslobađanjem tumor-specifičnih T limfocita supresivnog dejstva PD-1/PD-L1 interakcije (51). Inicijalne studije pokazale su da, pored ekspresije na površini tumorskih ćelija, prisustvo PD-1 liganda na površini drugih ćelija u tumorskoj mikrookolini, prvenstveno T limfocita ali i makrofaga M2 fenotipa, mijeloidnih dendritskih i supresorskih ćelija, stromalnih fibroblasta i endotelinih ćelija, korelira sa povoljnim odgovorom na terapiju PD-1/PD-L1 inhibitorima (59). Dakle, sva dosadašnja saznanja o PD-1/PD-L1 posredovanoj imunološkoj supresiji ukazuju na to da bi procjenu

podobnosti za imunoterapiju odgovarajućim inhibitorima trebalo staviti u kontekst prisustva i karakteristika intratumorskog T ćelijskog infiltrata (51).

1.7 Teorijski i klinički aspekti PD-1/PD-L1 signalizacije u karcinomu dojke

1.7.1 Zastupljenost i efekti PD-L1 ekspresije u karcinomu dojke

Imajući u vidu globalni teret karcinoma dojke, veliki broj studija u posljednjih nekoliko godina bio je usmjeren na ispitivanje prisustva i efekata ekspresije PD-L1 u ovim tumorima, kao i njegove povezanosti sa drugim signalnim putevima u različitim tipovima karcinoma dojke, prvenstveno s ciljem sagledavanja mogućnosti primjene inhibitora imunoloških kontrolnih tačaka u liječenju ovog oboljenja. Najznačajniji rezultati sprovedenih molekularnih studija sumirani su u Tabeli 6.

Kao što je i bilo očekivano, dokazan je neosporan uticaj prekomjerne ekspresije PD-L1 na supresiju imunološkog odgovora na tumorske ćelije kod različitih tipova karcinoma dojke (60). Međutim, ispostavilo se da su interakcije ovog molekula sa drugim signalnim putevima mnogo kompleksnije nego što se inicijalno pretpostavljalo. Naime, pokazano je da prekomjerna ekspresija PD-L1 može biti indukovana oštećenjem funkcije pojedinih tumor supresorskih gena, kao što je *PTEN* (61), kao i njena pozitivna korelacija sa ekspresijom poznatih onkogeno, poput *EGFR* i *MYC* u TNBC (62, 63). Takođe, dokazana je povezanost PD-L1 ekspresije i biomarkera stem ćelija i epitelno-mezenhimalne transformacije (EMT) u TNBC (62), ali i značajan efekat PD-L1 proteina u regulaciji transkripcionih faktora zaduženih za očuvanje stem svojstava u tumorskim ćelijama kod različitih podtipova karcinoma dojke (64). Nakon što je prepoznat uticaj estradiola na porast ekspresije PD-L1 posredstvom PI3K/Akt signalnog puta, identifikovana je i sprega ovog molekula i ER-posredovane signalizacije u ER pozitivnim karcinomima dojke (65).

Tabela 6. Pregled studija u kojima su izučavani molekularni mehanizmi regulacije PD-L1 u ćelijama karcinoma dojke. Izvor: modificirano *PD-L1 status in breast cancer: Current view and perspectives*, 2021 (66).

| Gen/signalni put | Mehanizam PD-L1 regulacije i/ili njegova funkcija | Podtip karcinoma dojke | Referenca |
|------------------------|--|---|-----------------------|
| 9p24.1 amplikon | PD-L1 amplifikacija na 9p24.1 (često uz koamplifikaciju JAK2) | TNBC (bazalni fenotip) HER-2 pozitivni | 67, 68, 69, 70, 71 |
| PTEN/PIK3CA | Deregulacija PTEN dovodi do povećanja ekspresije PD-L1 | TNBC | 61 |
| EGFR | Pozitivna asocijacija između ekspresije PD-L1 i EGFR | TNBC | 62 |
| | Inhibicija EGFR smanjuje PD-L1 ekspresiju | | |
| | PD-L1 ekspresija korelira sa markerima EMT i CSC | | |
| ER signalizacija | E2 povećava ekspresiju PD-L1 putem PI3K/Akt signalnog puta | ER pozitivni | 65, 72 |
| | SERD (anti-ER terapija) inhibira rast karcinoma dojke i ostvaruje efekat na njegovu mikrookolinu, uključujući proteine imunoloških kontrolnih tačaka | | |
| MUC1 | Aktivacija MYC1 i NF- κ B povećava PD-L1 ekspresiju | TNBC | 63 |
| Regulacija stem ćelija | PD-L1 reguliše ekspresiju OCT-4A, Nanog i dr. | Različiti tipovi karcinoma dojke | 64 |
| STAT3 | Aktivira PD-L1 i suprimira imunološki odgovor kod karcinoma dojke | Različite ćelijske linije i tkiva karcinoma dojke | 60 |
| HER-2 | Anti-HER-2 terapija povećava broj PD-L1 receptora | HER-2 pozitivni | 73 |
| PARP inhibitori | Povećavaju broj PD-L1 receptora kroz aktivnost GSK3 β | TNBC (<i>BRCA</i> mutirani) | 74 |
| Anti-PD-L1 blokada | Smanjenje broja PD-L1 receptora uz supresiju različitih gena zaduženih za ćelijski rast/invaziju, EMT i hipoksiju | TNBC ćelijske linije | 75, 76 |
| | Inicijacija T ćelijama posredovane citotoksičnosti i supresija invazivnosti PD-L1 pozitivnih tumorskih ćelija | | |

Pojedine studije bavile su se izučavanjem efekata primjene različitih modaliteta ciljane terapije na PD-L1 ekspresiju kod karcinoma dojke. Tako je dokazano da primjena SERD

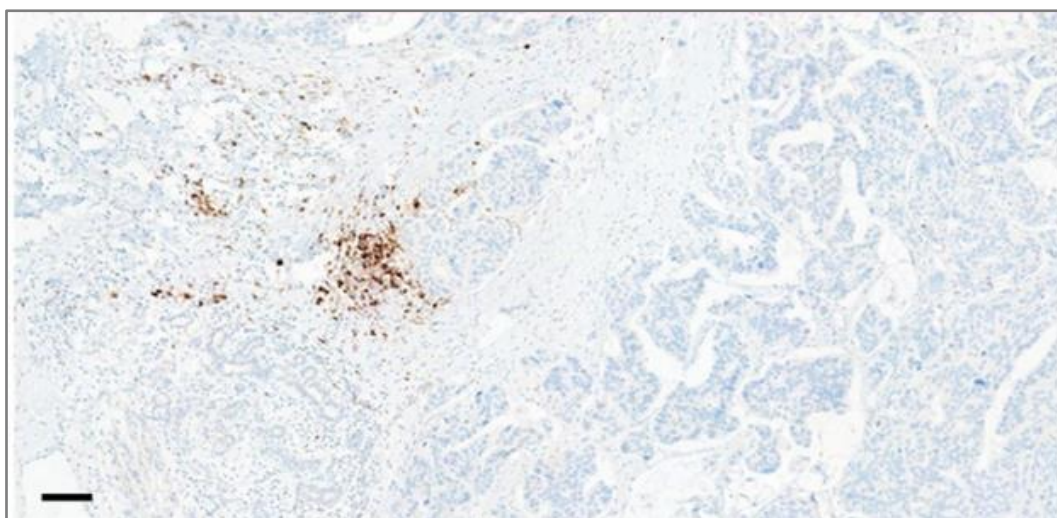
(selektivnih inhibitora estrogenskih receptora) ne samo da inhibira rast ER pozitivnih karcinoma dojke već ima izvjesne efekte na tumorsku mikrookolinu, uključujući i uticaj na proteine imunoloških kontrolnih tačaka, kao što je PD-L1 (72). Posebno su interesantni rezultati studija koji ukazuju na krucijalnu ulogu ovog molekula kao induktora imunosupresije u nastanku terapijske rezistencije kod pojedinih vidova ciljane terapije. Naime, *Chaganty* i saradnici pokazali su da primjena trastuzumaba (jedan od oblika HER-2 blokade) dovodi do povećanja broja PD-L1 receptora na površini HER-2 pozitivnog karcinoma dojke (73), dok su *Jiao* i saradnici GSK3 β (glikogen sintazna kinaza 3 β) indukovanim povećanjem ekspresije PD-L1 objasnili mogući mehanizam nastanka rezistencije na PARP inhibitore kod *BRCA* mutiranih TNBC (74).

1.7.2 Primjena anti-PD-1/PD-L1 terapije u liječenju karcinoma dojke

Zahvaljujući velikom broju studija koje su za cilj imale komparaciju učestalosti PD-L1 ekspresije u tumorskim ćelijama karcinoma dojke različitih molekularnih podtipova, TNBC je izdvojen kao podtip u kom se ovaj marker češće eksprimira u odnosu na ostale podtipove tumora (66). Uzimajući u obzir da TNBC predstavlja poseban terapijski izazov u onkologiji zbog nedostatka potencijalnih meta za ciljanu terapiju, kao i činjenicu da se radi o najimunogenijem podtipu karcinoma dojke sa potencijalno najvećim benefitima od imunološke terapije (77), uslijedila su brojna klinička istraživanja s ciljem ispitivanja efekata primjene inhibitora imunoloških kontrolnih tačaka u liječenju ovog oboljenja.

U III fazi Impassion130 studije, atezolizumab je u kombinaciji sa nab-paklitakselom identifikovan kao prvi imunoterapijski agens koji je pokazao efikasnost u prvoj liniji terapije PD-L1 pozitivnog metastatskog TNBC, kako u smislu poboljšanja ukupnog preživljavanja pacijentkinja tako i u dužem preživljavanju bez progresije bolesti (78). Nedugo nakon toga atezolizumab je, kao prvi lijek iz grupe inhibitora imunoloških kontrolnih tačaka, odobren od strane Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (FDA) u tretmanu lokalno uznapređovalog, neresektabilnog i metastatskog TNBC (mTNBC) (79). Drugi lijek iz ove grupe koji je zvanično uvršten u terapiju mTNBC bio je pembrolizumab, nakon što su u III fazi KEYNOTE-355 studije postignuti bolji ishodi u liječenju PD-L1 pozitivnog mTNBC kada je uz hemioterapiju (paklitaksel, nab-paklitaksel ili gemcitabin uz karboplatin) uključen i ovaj lijek (80).

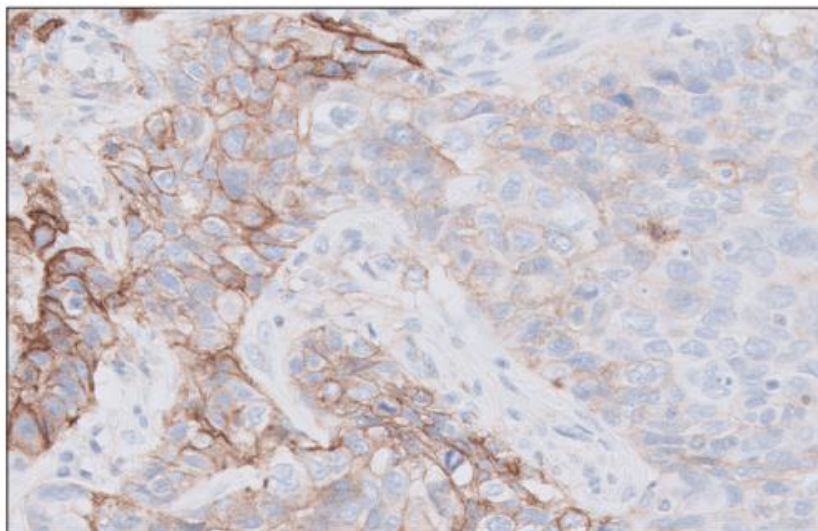
Prema instrukcijama FDA, selekcija pacijentkinja podobnih za ovaj vid ciljane terapije sprovodi se na osnovu analize PD-L1 ekspresije u tumorskom tkivu upotrebom imunohistohemije, pri čemu za svaki od odobrenih lijekova postoji poseban dijagnostički test. Ovi testovi se međusobno razlikuju u primarnom antitijelu i platformi na kojoj se imunohistohemijsko bojenje vrši, kao i u kriterijumima za skorovanje PD-L1 ekspresije u tumorskom tkivu, odnosno u definiciji PD-L1 pozitivnosti.



Slika 6. Karcinom dojke sa pozitivnom PD-L1 ekspresijom, potvrđenom imunohistohemijskim bojenjem antitijelom VENTANA SP142. Pozitivna reakcija se registruje u klasterima, kao i u manjem broju pojedinačnih imunoloških ćelija, dominantno unutar tumorske strome, sa vrijednošću ICS $\geq 1\%$. Vrijednost mjerne skale u donjem lijevom uglu mikrofotografije iznosi 100 μm . Izvor: modifikovano *Determining PD-L1 Status in Patients with Triple-Negative Breast Cancer: Lessons Learned from IMpassion130*, 2022 (81).

Ukoliko se liječenje sprovodi atezolizumabom, za imunohistohemijsku analizu koristi se VENTANA SP142 anti-PD-L1 antitijelo (Ventana, Tucson, Arizona), prisustvo PD-L1 ekspresije procjenjuje se u inflamatornim ćelijama tumorske mikrookoline (uključujući limfocite, plazma ćelije, granulocite, makrofage i dendritične ćelije). Pozitivnom reakcijom smatra se membransko i/ili citoplazmatsko bojenje bilo kog intenziteta, a njena

kvantifikacija vrši se upotrebom ICS-a (*immune cell score*) koji se izražava kao procenat PD-L1 pozitivnih imunoloških ćelija u ukupnoj površini koju zauzima tumor. Vrijednost ICS kreće se u rasponu od 0% do 100%, a pozitivnim rezultatom PD-L1 ekspresije u TNBC smatra se $ICS \geq 1\%$ (81) (Slika 6).



Slika 7. Karcinom dojke sa pozitivnom PD-L1 ekspresijom, potvrđenom imunohistohemijom bojenjem anitijelom 22C3 pharmDx, x20. Izvor: modifikovano *PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual – Triple-Negative Breast Cancer (TNBC)*, 2022 (82).

S druge strane, ukoliko se kao terapijska opcija razmatra pembrolizumab, za imunohistohemijku analizu koristi se 22C3 pharmDx esej (DAKO, Carpinteria, California) (Slika 7). U tom slučaju prisustvo PD-L1 ekspresije procenjuje se u tumorskim ćelijama i u inflamatornim ćelijama tumorske strome, pri čemu se iz analize izostavljaju plazma ćelije i različite subpopulacije granulocita. Pozitivnom reakcijom u tumorskim ćelijama smatra se kompletno ili inkompletno membransko bojenje bilo kog intenziteta, dok se u inflamatornim ćelijama u obzir uzima i citoplazmatsko bojenje različitog intenziteta. Kvantifikacija ekspresije vrši se pomoću CPS-a (*combined positive score*), čija se vrijednost izračunava tako što se broj svih PD-L1 pozitivnih ćelija (i tumorskih i imunoloških) podijeli sa brojem vijabilnih tumorskih ćelija i pomnoži sa 100. Njegova vrijednost kreće se od 0 do 100, iako rezultat opisanog proračuna može biti i

veća brojčana vrijednost, a pozitivnim rezultatom PD-L1 ekspresije u TNBC smatra se $CPS \geq 10$ (81).

Iako se imunološka terapija kao vid ciljane terapije povezuje sa manje neželjenih efekata u odnosu na tradicionalnu hemioterapiju, imunoterapija PD-1/PD-L1 inhibitorima udružena je sa potencijalno veoma ozbiljnim neželjenim dejstvima, naročito ukoliko se kombinuje sa drugim hemioterapeuticima (83). Međutim, potencijalna toksičnost ovih lijekova samo je jedan od razloga zbog kojih je njihova rutinska primjena u tretmanu karcinoma dojke još uvijek praćena brojnim kontroverzama.

Uzimajući u obzir da se odluka o uvođenju imunološke terapije u liječenje pacijentkinja sa mTNBC mora zasnivati na tačnoj imunohistohemijskoj procjeni PD-L1 ekspresije, postavlja se pitanje da li dostupnost određenog lijeka treba da bude odlučujući faktor u odabiru dijagnostičkog testa ili se, obrnuto, lijek od kog bi pacijentkinja mogla imati terapijski benefit identifikuje nakon sprovedenih testova (81). Kao jedan od najvećih problema prepoznata je upotreba različitih dijagnostičkih testova, praćenih različitim algoritmima za procjenu PD-L1 ekspresije u tumorskom tkivu, što je dovedeno u vezu sa velikom varijabilnošću, lošom komparabilnošću ali i reproducibilnošću dobijenih rezultata (84).

Konačno, prediktivna vrijednost PD-L1 kao biomarkera, ozbiljno je dovedena u pitanje nakon što su objavljeni rezultati III faze Impassion131 studije, prema kojima nijesu postignuti bolji ishodi u liječenju kod pacijentkinja sa PD-L1 pozitivnim uznapredovalim/metastatskim TNBC, koje su pored paklitaksela primale i atezolizumab (85).

1.7.3 Povezanost između PD-L1 ekspresije i prognostičkih parametara u karcinomu dojke i njen značaj kao biomarkera

Nezavisno od problematične predikcije terapijskog odgovora na imunoterapiju, pregledom literature nailazi se i na veliki broj studija sa konfliktnim rezultatima po pitanju prognostičkog značaja PD-L1 ekspresije u karcinomu dojke.

Kako je kod velikog broja solidnih tumora dokazana jasna povezanost PD-L1 ekspresije sa lošom prognozom (46-50), bilo je očekivano da se slična korelacija ustanovi i kada je

u pitanju karcinom dojke. Mada su rezultati brojnih istraživanja zaista ukazali na značajnu povezanost PD-L1 ekspresije sa negativnim prognostičkim parametrima kao što su veće dimenzije, visok histološki gradus i proliferativna aktivnost tumora, te odsustvo ekspresije steroidnih receptora (86-90), u mnogim studijama dokazana je visoko značajna veza između ekspresije PD-L1 i velike gustine TIL, koja predstavlja nezavisan povoljan prognostički faktor u karcinomu dojke (58, 70, 88, 91-93). Takođe, u većem broju studija utvrđena je povezanost između visoke gustine TIL u tumorskoj mikrookolini karcinoma dojke i boljeg odgovora, kako na terapiju inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka tako i na klasičnu hemioterapiju, te generalno bolje prognoze kod ovih pacijentkinja (58, 91, 92). Iako se ne može zanemariti problematična komparabilnost do sada publikovanih rezultata, koja je prvenstveno posljedica primjene različite metodologije za evaluaciju PD-L1 ekspresije od strane različitih autora, u naučnoj zajednici trenutno preovladava mišljenje da je optimizacija upotrebe PD-L1 kao biomarkera u karcinomu dojke imperativ i da je analizu njegove ekspresije neophodno staviti u kontekst gustine TIL (56, 94-96).

Pored povezanosti PD-L1 ekspresije sa gustinom sTIL, pojedine studije utvrdile su pozitivnu korelaciju sa ekspresijom i apsolutnim brojem CD8 limfocita u tumorskoj stromi TNBC, te je ukazano na mogućnost udruženosti visoke ekspresije PD-L1 na tumorskim ćelijama sa adaptivnom imunološkom rezistencijom u prisustvu TIL (61). Uzimajući u obzir da infiltracija tumorske mikrookoline imunološkim ćelijama pokazuje prostornu heterogenost (97), pojedini autori smatraju da bi prilikom analize TIL, a naročito u kontekstu donošenja terapijskih odluka, u obzir trebalo uzeti i sastav intratumorskog inflamatornog infiltrata (24). Ovakav pristup pronalazi uporište i u studijama čiji su rezultati doveli u vezu predominaciju CD4 T-limfocita i visok CD4/CD8 odnos u tumorskom inflamatornom infiltratu sa nepovoljnim ishodom kod karcinoma dojke (98).

Takođe, imajući u vidu da PD-L1 može pokazati različite obrasce ekspresije: konstitutivnu (koja je posljedica onkogene mutacije) i inducibilnu (koja je rezultat prisustva IFN- γ produkujućih T-limfocita u tumorskoj mikrookolini) (51), pojedini autori smatraju da metode skorovanja koje u obzir uzimaju samo jednu ćelijsku populaciju nijesu adekvatne, odnosno da bi dijagnostička informacija bila kompletnija ukoliko bi se ekspresija ovog markera paralelno procjenjivala i u tumorskim ćelijama i u inflamatornim ćelijama tumorske mikrookoline (56, 96). U tom kontekstu ukazano je na mogućnost

razlikovanja dva obrasca prekomjerne ekspresije PD-L1 na osnovu rezultata imunohistohemijskog bojenja. Intenzivno i homogeno bojenje u gotovo svim tumorskim ćelijama ukazivalo bi na konstitutivnu ekspresiju, dok bi mrljasto bojenje tumorskih ćelija ograničeno na invazivni front i neposrednu blizinu stromalnih inflamatornih ćelija koje se i same često boje mnogo intenzivnije od tumorskih, išlo u prilog inducibilnoj ekspresiji PD-L1 proteina (51). U skladu sa osnovnim principima onkogeneze, različiti obrasci PD-L1 ekspresije mogli bi imati različite efekte na biološko ponašanje tumora, ali i različitu vrijednost kao prediktivni markeri u selekciji pacijentkinja koje bi eventualno imale korist od terapije inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (51).

Iako je danas generalno prihvaćeno da se PD-L1 ekspresija češće javlja u TNBC u odnosu na ostale molekularne podtipove karcinoma dojke, pojedini autori, pozivajući se na nekonzistentnosti u metodologiji velikog broja istraživanja sprovedenih u ovoj oblasti, smatraju da bi se veći broj pozitivnih tumora registrovao među drugim molekularnim podtipovima a naročito neluminalnom HER-2 pozitivnom karcinomu dojke, ukoliko bi se ekspresija ovog markera analizirala u imunološkim ćelijama tumorske mikrookoline (66).

Osim toga, kako je u fokusu istraživača do sada gotovo isključivo bio lokalno uznapredovali i metastatski TNBC, podaci o PD-L1 ekspresiji i karakteristikama intratumorskog upalnog infiltrata u drugim molekularnim podtipovima, naročito ranog karcinoma dojke, još uvijek su insuficijentni u naučnoj literaturi (86).

Uzimajući u obzir rezultate najnovijih studija koji su pokazali da se imunogenost karcinoma dojke, koja se ogleda kroz stepen infiltracije tumora sTIL, smanjuje sa progresijom bolesti (99), postavlja se pitanje sa kojom učestalošću i u kom kontekstu bi se PD-L1 ekspresija mogla registrovati u ranijim fazama karcinoma dojke, kada se prisustvo prominentnih sTIL češće javlja i u ostalim molekularnim podtipovima, pored TNBC i neluminalnog HER-2 pozitivnog karcinoma (100).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

2.1 Ciljevi istraživanja

U skadu sa temom koja je izložena u uvodu, ciljevi doktorskog istraživanja su:

1. Utvrditi obrasce ekspresije PD-L1 proteina u tumorskom tkivu (konstitutivna/inducibilna) različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke.
2. Ispitati postojanje razlika u učestalosti PD-L1 ekspresije između molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke.
3. Ispitati postojanje razlika u obrascu PD-L1 ekspresije između molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke.
4. Ispitati karakteristike (gustinu i sastav) sTIL i peritumorskih limfoidnih agregata u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke.
5. Ispitati povezanost PD-L1 ekspresije sa gustom sTIL i karakteristikama peritumorskih limfoidnih agregata u ranom karcinomu dojke.
6. Utvrditi graničnu vrijednost gustine sTIL iznad koje se povećava vjerovatnoća prisustva PD-L1 ekspresije u tumorskom tkivu kod ranog karcinoma dojke.
7. Ispitati povezanost PD-L1 ekspresije i sastava sTIL (apsolutnog broja CD4 i CD8 pozitivnih T limfocita i CD4/CD8 odnosa) u ranom karcinomu dojke.
8. Ispitati povezanost PD-L1 ekspresije sa patološkim prognostičkim parametrima (veličinom i histološkim gradusom tumora, Ki67 indeksom proliferacije i statusom steroidnih receptora i HER2 i patološkim TNM stadijumom) kod ranog karcinoma dojke.

2.2 Hipoteze

Uzimajući u obzir epidemiološki značaj karcinoma dojke u ženskoj populaciji, kao i prepoznatu ulogu imunog sistema u progresiji malignih tumora, očekujemo da predloženo istraživanje doprinese razumijevanju ekspresije konstituenta imunološkog odgovora kao što su: PD-L1 protein, prisustvo tumor infiltrirajućih limfocita, te CD4 i CD8 T limfocita u tumorskom tkivu ranog karcinoma dojke. Rasvjetljavanjem povezanosti obrasca PD-L1 ekspresije sa gustinom i sastavom intratumorskog limfocitnog infiltrata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke, želimo dati svoj doprinos trenutno insuficijentnoj naučnoj literaturi ali i procesu optimizacije upotrebe PD-L1 kao prognostičkog i prediktivnog biomarkera u karcinomu dojke.

U skladu s tim, postavili smo sljedeće hipoteze:

1. postoje razlike u prisustvu ali i obrascu PD-L1 ekspresije (konstitutivna/inducibilna) u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke;
2. postoje razlike u karakteristikama intratumorskog i peritumorskog limfocitnog infiltrata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke;
3. PD-L1 ekspresija češće se javlja u tumorima sa većom gustinom intra i peritumorskog limfocitnog infiltrata, bez obzira na molekularni podtip karcinoma dojke;
4. statističkim metodama moguće je odrediti graničnu vrijednost gustine sTIL iznad koje se može očekivati veća učestalost PD-L1 ekspresije u ranom karcinomu dojke;
5. postoje razlike u sastavu sTIL (zastupljenosti i međusobnom odnosu CD4 i CD8 T limfocita) između različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke;
6. tumori sa pozitivnom PD-L1 ekspresijom imaju drugačiji sastav sTIL u odnosu na tumore sa odsutnom ekspresijom PD-L1 kod ranog karcinoma dojke;
7. prisustvo PD-L1 ekspresije povezano je sa nepovoljnim patološkim prognostičkim parametrima (većim dimenzijama i histološkim gradusom tumora, te odsustvom ekspresije steroidnih receptora i HER-2, višim Ki67 indeksom proliferacije, kao i TNM stadijumom) u ranom karcinomu dojke.

Konačno, ovim istraživanjem po prvi put će biti ispitana prevalenca i kliničko-patološki aspekti PD-L1 ekspresije u ranom karcinomu dojke u crnogorskoj populaciji, te bi naši

rezultati mogli dati doprinos kreiranju nacionalne strategije za primjenu inhibitora imunoloških kontrolnih tačaka u liječenju ove bolesti u Crnoj Gori.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Uzorak

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 95 pacijentkinja kojima je u Centru za patologiju Kliničkog centra Crne Gore u periodu od 2016. do 2020. godine na operativnom materijalu dijagnostikovani invazivni karcinom dojke stadijuma IA-IIIa prema osmom izdanju TNM klasifikacije (17), a koje nijesu primale neoadjuvantnu terapiju i kod kojih je u dostupnim arhiviranim parafinskim kalupima bilo dovoljno materijala za planiranu dalju imunohistohemijsku analizu.

Pregledom patohistoloških izvještaja sa podacima o stepenu imunohistohemijske ekspresije estrogenskih (ER) i progesteronskih receptora (PR), receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER-2) i vrijednosti Ki67 indeksa proliferacije, a prema St. Gallen konsenzusu (18), određena je pripadnost tumora jednom od pet molekularnih podtipova (Luminal A, Luminal B HER-2 pozitivni, Luminal B HER-2 negativni, neluminalni HER-2 pozitivni i trostruko-negativni). ER i PR smatrani su pozitivnim ukoliko je Allred score iznosio ≥ 3 , dok je prisustvo prekomjerne ekspresije HER-2 procijenjeno prema aktuelnim smjernicama ASCO/CAP (*American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists*) na imunohistohemijski bojenim isječcima, odnosno isječcima bojenim metodom DDISH (*Dual-color dual-hapten in situ hybridization*) u slučaju ekvivokalnog rezultata prethodno sprovedene imunohistohemijske analize (101).

Na osnovu pripadnosti tumora određenom molekularnom podtipu pacijentkinje su razvrstane u pet grupa, a definitivni uzorak formiran je tako da se unutar svake grupe nalazi jednak broj pacijentkinja sa približno istom prosječnom starošću.

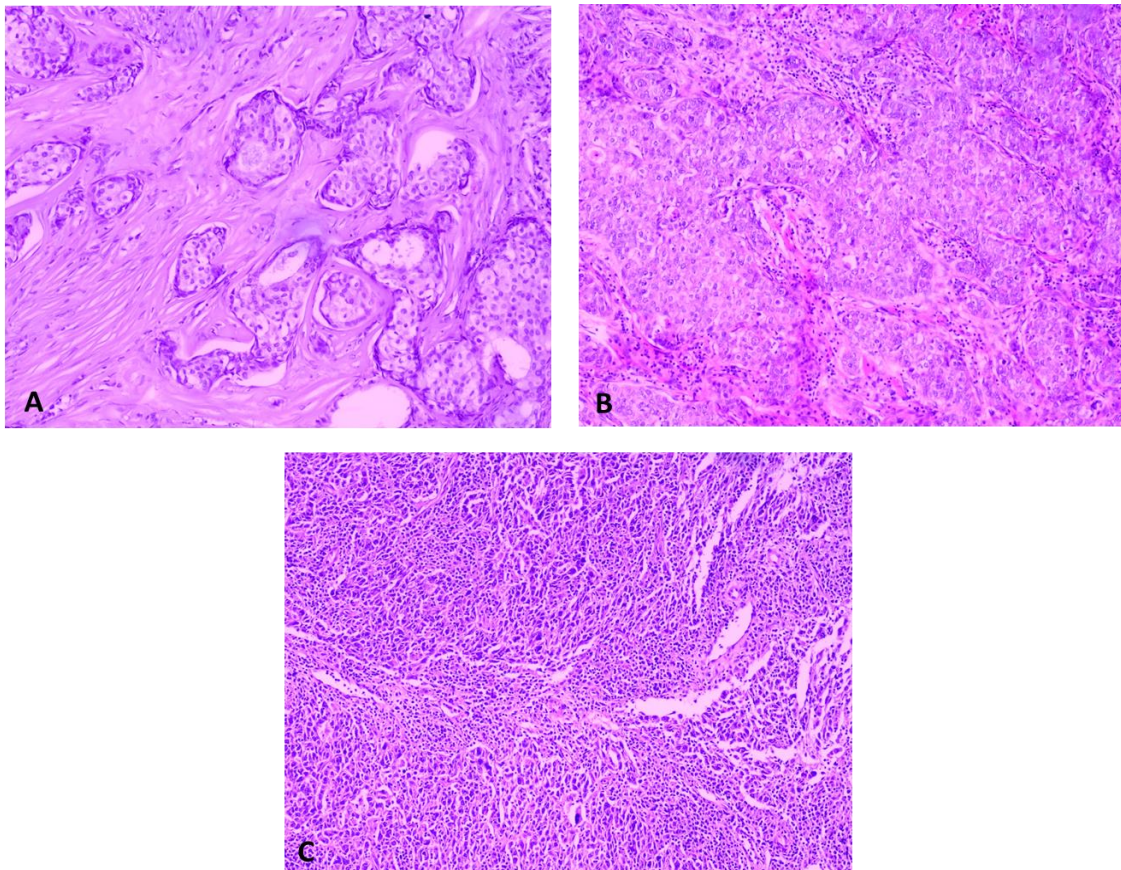
3.2 Analiza hematoksilin-eozin bojenih histoloških preparata:

Pregledom operativnog materijala na arhiviranim mikroskopskim pločicama bojenim tehnikom hematoksilin-eozin (HE), potvrđen je histološki tip i gradus tumora, kvantifikovano prisustvo sTIL i evidentirano prisustvo peritumorskih limfoidnih agregata.

Prema aktuelnim preporukama međunarodne radne grupe za TIL (23), gustina sTIL izračunata je kao procenat tumorske strome prekriven limfocitima i izražena kao kontinuirana varijabla, a dodatno je, po uzoru na metodologiju *Cimino-Mathews* i saradnika (94), stromalni limfocitni infiltrat (sTIL) skorovan i na semikvantitativan način kao:

- oskudan (limfociti prekrivaju <5% strome tumora);
- umjeren (prisutan fokalni limfocitni infiltrat u 5-50% strome tumora);
- gust (prisutan difuzan limfocitni infiltrat u $\geq 50\%$ strome tumora).

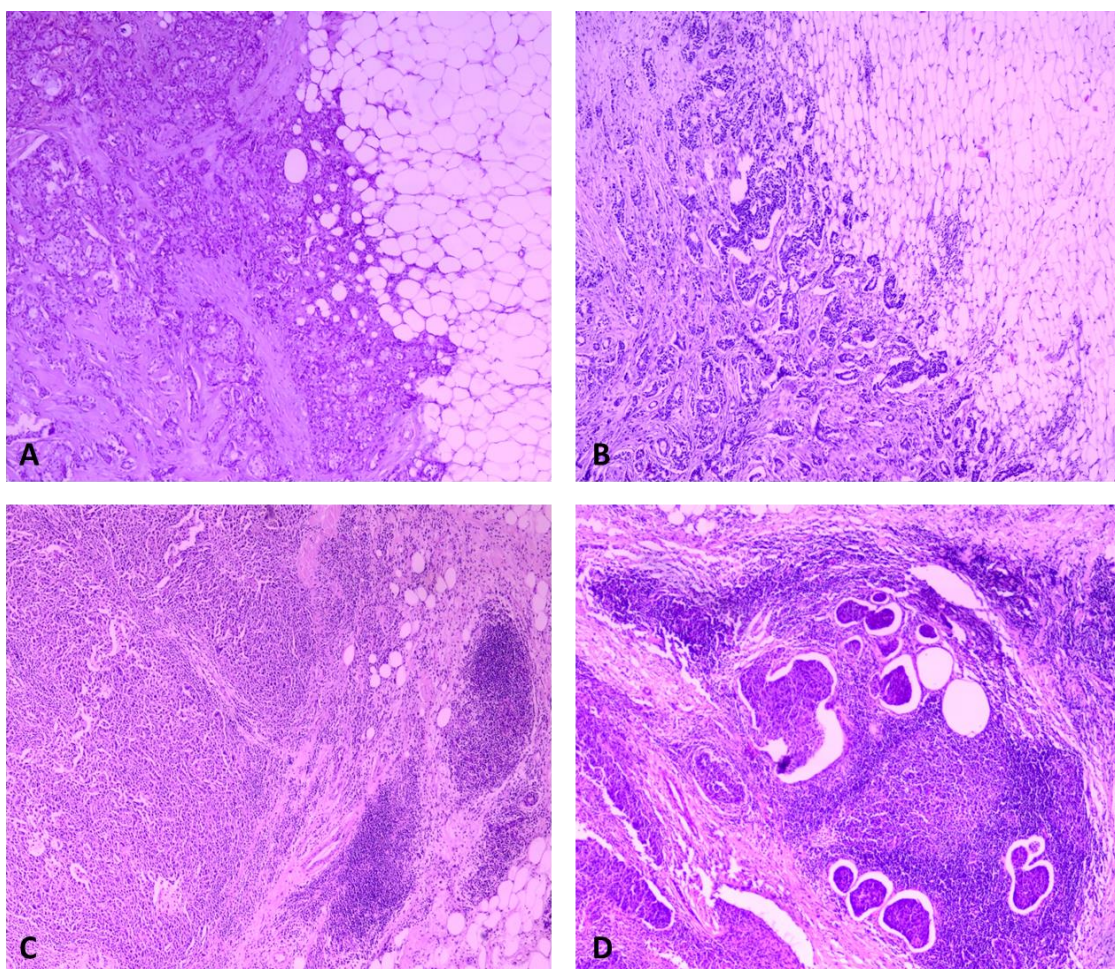
Mikroskopske karakteristike tumora sa različitim gustinom sTIL prikazane su na Slici 8.



Slika 8. Histološke karakteristike tumora sa A) oskudnim; B) umjerenim i C) gustim stromalnim limfocitnim infiltratom, HE x100.

Prema istom metodološkom modelu (94), peritumorski limfoidni agregati takođe su skorovani semikvantitativno (Slika 9) kao:

- odsutni;
- fokalni (rijetke izolovane nakupine limfoidnih ćelija);
- umjereno razvijeni (multipli limfoidni agregati);
- dobro razvijeni (multipli agregati sa dobro razvijenim germinativnim centrima).



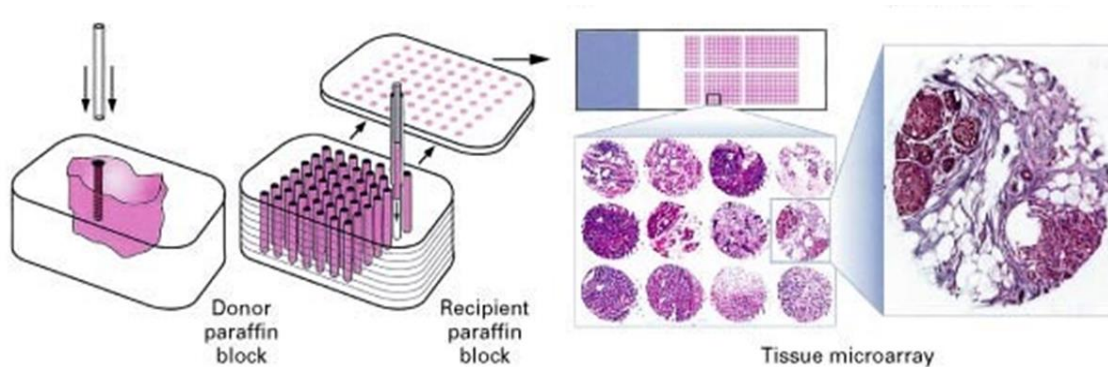
Slika 9. Histološke karakteristike tumora sa A) odsutnim; B) fokalnim, C) umjereno razvijenim i D) dobro razvijenim peritumorskim limfoidnim agregatima, HE x40.

3.3 Formiranje tkivnih mikroisječaka

Za svaku od pacijentkinja, sa invazivnog fronta tumora, iz arhiviranih parafinskih kalupa, formirana su po dva tkivna mikroisječaka (*tissue microarray* – TMA) promjera 3 mm, upotrebom *Quick Ray Manual Tissue Microarrayer seta* (*Untima Co., Ltd., Gyeonggi-do, South Korea*). Iz novodobijenih kalupa, pomoću *Leica SM2000 R* klizajućeg mikrotoma (*Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany*) napravljeni su serijski presjeci debljine 4 µm, koji su najprije bojeni standardnom HE tehnikom.

Naime, nakon deparafinizacije u ksilolu (2 puta po 3 minuta) i mješavini ksilola i apsolutnog alkohola u odnosu 1:1 (3 minuta), te sprovedene rehidracije tkiva u rastvorima etanola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70% - po 3 minuta), isječci su bojeni hematoksinom po *Mayer-u* i 1% rastvorom eozina, zatim prosvjetljivani i montirani na pločice sa *DPX* medijumom. Histološkom analizom dobijenih preparata utvrđena je adekvatnost uzorka i olakšana je orijentacija TMA prilikom interpretacije naknadno urađenih imunohistohemijskih bojenja.

Procedura pripreme tkivnih mikroisječaka sumirana je na Šemi 6.



Šema 6. Procedura pripreme tkivnih mikroisječaka iz osnovnih parafinskih kalupa. Izvor: *Gene-expression profiles in hereditary breast cancer, 2001* (102).

3.4 Imunohistohemijsko bojenje:

Na serijskim presjecima TMA, koji su deparafinizovani i rehidratirani prema prethodno objašnjenom postupku, tretmanom u 10 mM rastvoru citratnog pufera u mikrotalasnoj pećnici dva puta po 10 minuta, izvršeno je demaskiranje antigena, nakon čega su isječki isprani dejonizovanom vodom. Endogena peroksidaza blokirana je upotrebom 3% rastvora vodonik-peroksida na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta. Nakon toga, tkivni isječki su prekriveni primarnim antitijelom i inkubirani u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi tokom 1 sata. Za imunohistohemijsku vizuelizaciju antigena korišćena je streptavidin-biotin-peroksidaza tehnika, prema standardnoj LSAB+ proceduri (DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark). Isječki su najprije inkubirani sa biotinizovanim anti-mišjim antitijelom 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom sa streptavidin-peroksidaza kompleksom još 30 minuta. Kao hromogeni supstrat korišćen je 3-amino-9-etilkarbazol (DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark). Nakon svake inkubacije isječki su ispirani puferisanim Tris rastvorom (TBS: 0.05 M, pH 7.6) i kontrastirani hematoksilinom.

Za imunohistohemijsko bojenje prethodno opisanom procedurom korišćena su sljedeća primarna antitijela:

- **CD4** (*Monoclonal Mouse Anti-Human CD4, Clone 4B12, FLEX Ready to use, DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark*);
- **CD8** (*Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, Clone C8/144B, FLEX Ready to use, DAKO, Carpinteria, CA and Glostrup, Denmark*).

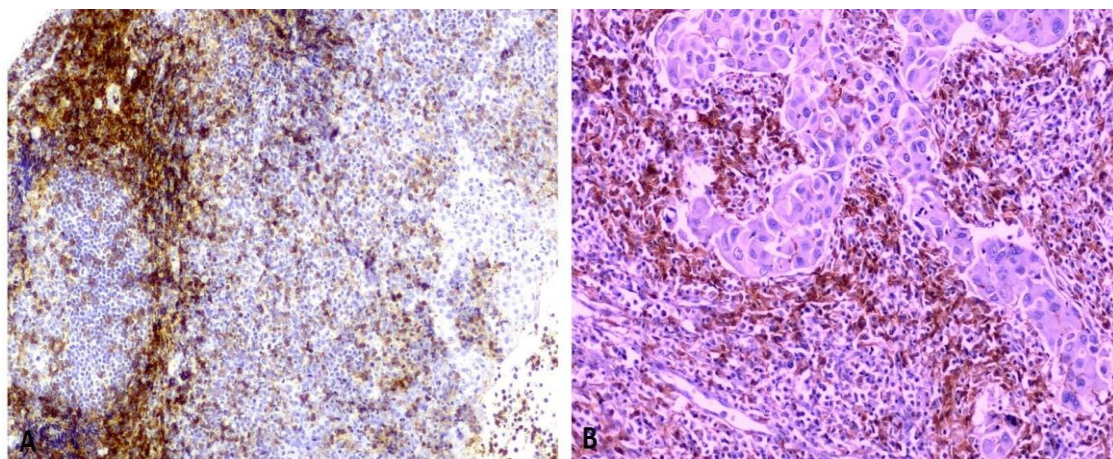
Imunohistohemijsko bojenje za PD-L1 sprovedeno je upotrebom **PD-L1** (*Monoclonal Rabbit Anti-Human PD-L1, Clone SP142, Roche/Ventana medical systems, Tucson, Arizona, United States*) antitijela na *Ventana Benchmark Ultra* (*Roche/Ventana medical systems, Tucson, Arizona, United States*) automatizovanoj platformi prema uputstvima proizvođača.

Kao spoljašnja kontrola imunohistohemijskog bojenja za sva tri navedena markera korišćeno je tkivo tonzile.

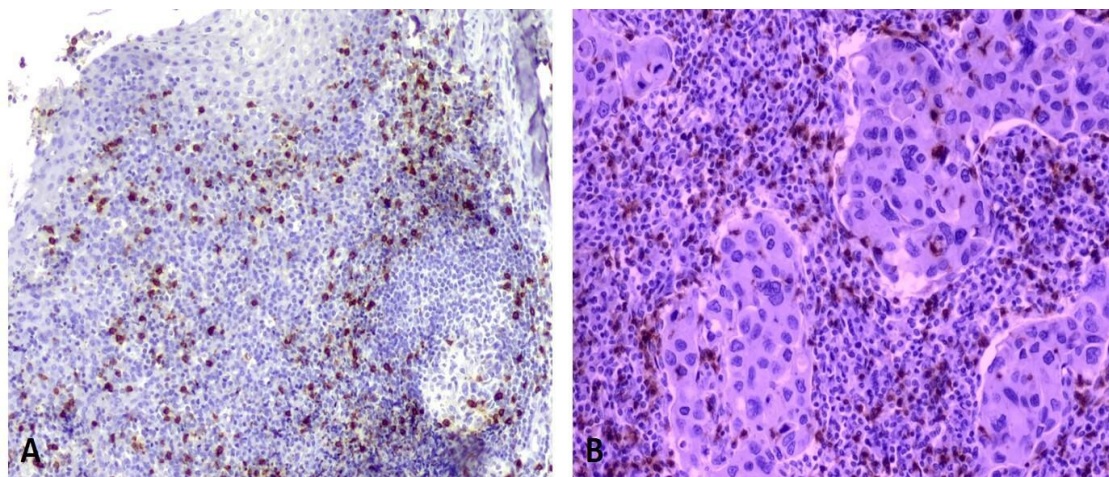
3.5 Analiza imunohistochemijskih bojenih TMA

Za morfološku analizu korišćen je *Zeiss Axiolab 5* mikroskop (*Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany*), na kom jedno vidno polje velikog uveličanja (*high power field* – HPF) odgovara površini 0,332 mm².

Rezultati imunohistochemijskog bojenja za markere CD4 i CD8 prikazani su na slikama 10 i 11, a prilikom analize intenzivno membransko bojenje interpretirano je kao pozitivan rezultat. Kvantifikacija CD4 i CD8 pozitivnih sTIL vršena je manuelno, brojanjem pozitivnih ćelija na 9 HPF (što odgovara površini od 3 mm²) po TMA, odnosno 18 HPF (čiji je ekvivalent 6 mm²) po pacijentu. Dobijene vrijednosti izražene su kao prosječan broj ćelija po mm², i na osnovu njih izračunat je CD4/CD8 odnos.



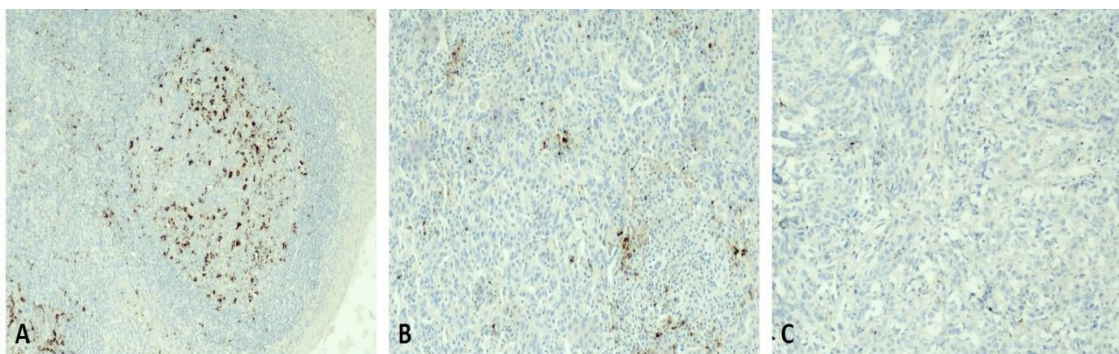
Slika 10. Rezultati imunohistochemijskog bojenja na CD4 u A) kontrolnom tkivu (tonzili) i B) uzorku karcinoma dojke. U tkivu tonzile (A) zapaža se jaka membranska pozitivnost u T limfocitima interfolikularne zone i umjerena pozitivnost u makrofagima germinativnog centra, uz odsutnu reakciju u skvamoznom epitelu. U tumorskom tkivu (B) uočava se jaka pozitivnost u stromalnim T limfocitima, uz pozitivnu reakciju malog broja intratumorskih T limfocita koji nijesu uzimani u obzir prilikom kvantifikacije. Imunohistochemija (CD4), A) x40, B) x100.



Slika 11. Rezultati imunohistohemijskog bojenja na CD8 u A) kontrolnom tkivu (tonzili) i B) uzorku karcinoma dojke. U tkivu tonzile (A) konstatuje se jaka membranska pozitivnost u T limfocitima interfolikularne zone, uz nekoliko pozitivnih intraepitelnih T imfocita i odsutnu reakciju u skvamoznom epitelu. U tumorskom tkivu (B) uočava se jaka pozitivnost u stromalnim T limfocitima, uz pozitivnu reakciju određenog broja intratumorskih T limfocita koji nijesu uzimani u obzir prilikom kvantifikacije. Imunohistohemija (CD8), A) x40, B) x100.

Prilikom analize PD-L1 ekspresije u tumorskim i imunološkim ćelijama, u obzir su uzete one ćelije koje pokazuju parcijalno ili kompletno membransko, odnosno membransko ili citoplazmatsko bojenje bilo kog intenziteta. Ekspresija PD-L1 u tumorskim ćelijama kvantifikovana je primjenom TPS algoritma skorovanja (*tumor proportion score* - odnos broja PD-L1 pozitivnih tumorskih ćelija prema ukupnom broju vitalnih tumorskih ćelija, pomnožen sa 100%), dok je za kvantifikaciju ekspresije u imunološkim ćelijama korišćen ICS algoritam (*immune cell score* - procenat svih PD-L1 pozitivnih imunih ćelija u ukupnoj površini koju zauzima tumor) (56). Krajnji rezultat predstavljala je srednja vrijednost TPS i ICS, očitanih sa oba mikrozeka svakog pojedinačnog tumora. Prema trenutno važećem protokolu za procjenu PD-L1 ekspresije u metastatskom TNBC, pozitivnim nalazom u imunološkim ćelijama smatran je $ICS \geq 1\%$ (56), dok je vrijednost $TPS \geq 1\%$ uzeta kao granična za pozitivnu PD-L1 ekspresiju u tumorskim ćelijama.

Rezultati i imunohistohemijskog bojenja i interpretacija ekspresije PD-L1 prikazani su na Slici 12.



Slika 12. Rezultati imunohistohemijskog bojenja na PD-L1 u A) kontrolnom tkivu (tonzila), B) uzorku PD-L1 pozitivnog i C) PD-L1 negativnog karcinoma dojke. U tkivu tonzile (A) zapaža se umjereno do jako membransko/citoplazmatsko bojenje u limfocitima i makrofagima u germinativnom centru, uz odsustvo reakcije u limfocitima interfolikularne zone i skvamoznom epitelu. Kod PD-L1 pozitivnih tumora (B), imunohistohemijaska reakcija obično je registrovana unutar klastera imunoloških ćelija u tumorskoj stromi, uz $ICS \geq 1\%$, dok su PD-L1 negativni tumori (C) pokazali ili kompletno odsusvo reakcije u imunološkim ćelijama ili je pozitivna reakcija zabilježena u malobrojnim pojedinačnim stromalnim inflamatornim ćelijama, uz $ICS < 1\%$. Imunohistohemija, PD-L1, A) x40, B) i C) x100.

3.6 Statistička analiza:

Za analizu primarnih podataka korišćene su deskriptivne statističke metode, metode za testiranje statističkih hipoteza i metode za ispitivanje korelacije i prediktivne sposobnosti.

Od deskriptivnih statističkih metoda korišćene su mjere centralne tendencije (aritmetička sredina), mjere varijabiliteta (standardna devijacija) i relativni brojevi (pokazatelji strukture).

Od metoda za testiranje statističkih hipoteza korišćene su neparametrijske statističke analize (χ^2 test, *Fisher's exact test*, *Mann-Whitney U test* i *Kruskal-Wallis test*), a korelacija između parametara opisana je uz pomoć Phi korelacionog koeficijenta. Za prikaz granične („*cut-off*“) vrijednosti kontinuirane varijable gustine sTIL u predikciji prisustva PD-L1 ekspresije korišćene su statističke „ROC“ krive i formula za izračunavanje *Youden*-ovog indeksa ($J = \text{senzitivnost} + \text{specifičnost} - 1$). Hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (α nivo) od 0,05.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički, a obrada podataka vršena je upotrebom standardnog statističkog paketa *IBM SPSS Statistics version 23.0* softvera (*IBM SPSS for Windows, Armonk, NY, USA*).

3.7 Etički aspekti

Predmetno istraživanje odobreno je od strane institucionalnog Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (odluka br. 1492/2 od 23.9.2022. godine) i sprovedeno je u skladu sa pravilima istaknutim u Helsinškoj deklaraciji.

Prema standardnom protokolu Kliničkog centra Crne Gore, od svake pacijentkinje dobijen je pisani informisani pristanak prije započinjanja hirurškog liječenja i prateće patohistološke dijagnostike.

4. REZULTATI

4.1 Deskriptivna statistika i frekvencija kliničkih i patoloških karakteristika

Studijom je obuhvaćeno 95 pacijentkinja, po 19 u svakoj od prethodno definisanih pet grupa na osnovu pripadnosti tumora određenom molekularnom podtipu (Luminal A, Luminal B HER-2+, Luminal B HER-2-, Neluminalni HER-2+ i TNBC), sa približno istom prosječnom starošću unutar svake grupe.

Prosječna starost pacijentkinja uključenih u studiju iznosila je $59,68 \pm 11,71$ godina ($\bar{x} \pm SD$). Najmlađa pacijentkinja imala je 32 godine a najstarija 86 godina.

Prosječna veličina tumora u našem uzorku iznosila je $24,78 \pm 10,91$ mm ($\bar{x} \pm SD$), pri čemu je najveći tumor imao prečnik od 60 mm a najmanji 6 mm. Na osnovu veličine tumora ispitanice su klasifikovane prema pT stadijumu karcinoma dojke. Tako su u vrijeme postavljanja dijagnoze, u stadijumu pT1 (veličina tumora manja od 20 mm) bile 42 pacijentkinje, u stadijumu pT2 (tumor veličine 20 i više mm, ali manji od 50 mm) bilo je 48 pacijentkinja, dok je u stadijumu pT3 (tumor veći od 50 mm) bilo samo 5 pacijentkinja (Tabela 7).

Tabela 7. Zastupljenost pT stadijuma karcinoma dojke u ukupnom uzorku

| Stadijum | Učestalost | Procenat (%) |
|---------------|------------|--------------|
| pT1 | 42 | 44,2 |
| pT2 | 48 | 50,5 |
| pT3 | 5 | 5,3 |
| Ukupno | 95 | 100 |

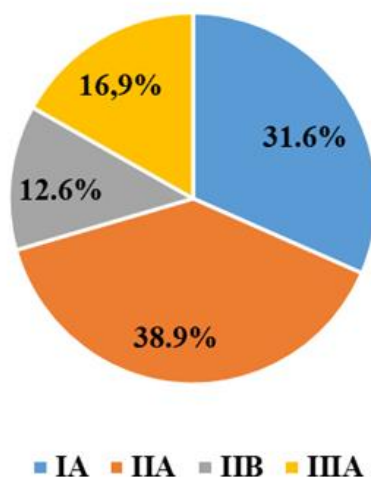
Na osnovu broja limfnih čvorova sa histološki verifikovanim sekundarnim depozitima u pazušnoj jami, ispitanice u našoj studiji klasifikovane su prema pN stadijumima karcinoma dojke. Kod najvećeg broja pacijentkinja (njih 65) u vrijeme postavljanja dijagnoze nijesu detektovane metastaze u limfnim čvorovima, dok se po 15 pacijentkinja nalazilo u stadijumima pN1 i pN2 (Tabela 8).

Tabela 8. Zastupljenost pN stadijuma karcinoma dojke u ukupnom uzorku

| Patohistološka dijagnoza | Učestalost | Procenat (%) |
|--------------------------|------------|--------------|
| pN0 | 65 | 68,4 |
| pN1 | 15 | 15,8 |
| pN2 | 15 | 15,8 |
| Ukupno | 95 | 100 |

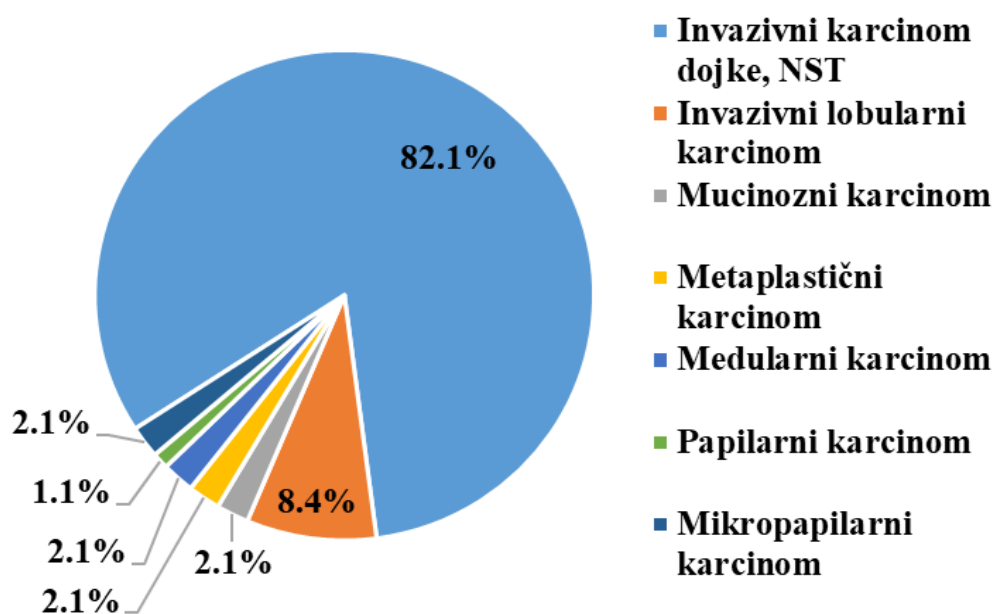
Imajući u vidu da je jedan od osnovnih kriterijuma za uključivanje u studiju bio da pacijentkinje boluju od ranog karcinoma dojke, nijedna od njih nije imala klinički suspektno a samim tim ni histološki potvrđeno prisustvo udaljenih metastaza u vrijeme postavljanja dijagnoze.

Kada se u obzir uzmu i veličina primarnog tumora i status limfnih čvorova pazušne jame, kod najvećeg broja pacijentkinja bolest je otkrivena u kliničkim stadijumima IA i IIA. Značajno manje pacijentkinja je u vrijeme postavljanja dijagnoze imalo bolest stadijuma IIB i IIIA, dok u našem uzorku nije bilo pacijentkinja sa mikrometastazama u aksilarnim limfnim čvorovima (stadijum IB) (Grafikon 3).



Grafikon 3. Distribucija različitih kliničkih stadijuma karcinoma dojke u ukupnom uzorku

Među histološkim tipovima invazivnog karcinoma dojke u našoj studiji najviše je dijagnostikovani invazivni duktalni karcinom, NST (*no special type*), zatim invazivni lobularni karcinom, dok su u manjem procentu dijagnostikovani ostali specijalni tipovi karcinoma dojke poput mucinoznog, metaplastičnog, medularnog, mikropapilarnog i invazivnog papilarnog karcinoma dojke (Grafikon 4).



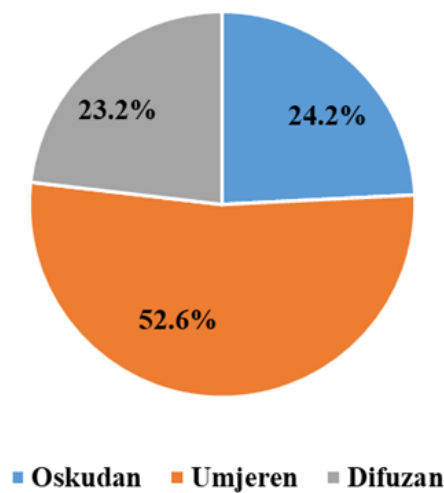
Grafikon 4. Procentualna zastupljenost histoloških tipova karcinoma dojke u ukupnom uzorku

Najveći broj dijagnostikovanih malignih tumora dojke imao je histomorfološke karakteristike srednje diferentovanog karcinoma (54). U nešto manjem broju (37) detektovani su loše diferentovani karcinomi, dok su dobro diferentovani tumori dijagnostikovani u svega četiri slučaja (Tabela 9).

Tabela 9. Procentualna zastupljenost histoloških gradusa karcinoma dojke u ukupnom uzorku

| Histološki gradus | Učestalost | Procenat (%) |
|-------------------|------------|--------------|
| G1 | 4 | 4,2 |
| G2 | 54 | 56,8 |
| G3 | 37 | 39 |
| Ukupno | 95 | 100 |

Kod svih ispitanica određena je gustina sTIL i izražena kao procenat strome primarnog tumora prekriven limfocitima u vidu kontinuirane varijable i na semikvantitativan način. Prosječna vrijednost gustine sTIL iznosila je $26,66 \pm 26,55$ procenata ($\bar{x} \pm SD$). Oskudan sTIL (<5% strome tumora) utvrđen je u 22 slučaja, umjeren sTIL (5-50% strome tumora) u 50 slučajeva, dok je difuzan sTIL ($\geq 50\%$ strome tumora) zabilježen u 23 slučaja (Grafikon 5).

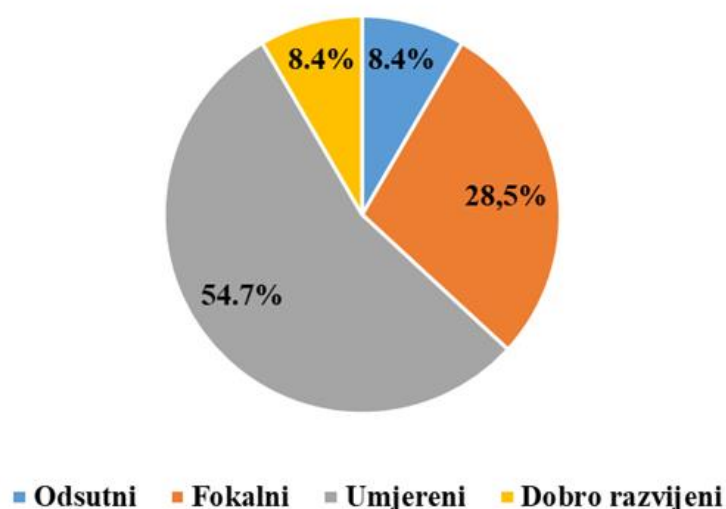


Grafikon 5. Zastupljenost različitih gustina sTIL u ukupnom uzorku

Prosječan broj CD4 pozitivnih limfocita u tumorskoj stromi u čitavom uzorku iznosio je $63,68 \pm 62,27$ po mm^2 ($\bar{x} \pm SD$), sa minimalnom vrijednošću od 1 po mm^2 i maksimalnom 317 po mm^2 . Prosječan broj CD8 pozitivnih limfocita u sTIL iznosio je $55,48 \pm 53,77$ po

mm² ($\bar{x} \pm SD$), sa minimalnom vrijednošću od 1 po mm² a maksimalnom 309 po mm². U nešto više od 2/3 slučajeva odnos CD4 i CD8 limfocita u upalnom infiltratu bio je < 1.

Pored gustine sTIL, u uzorcima je analizirano i prisustvo peritumorskih limfoidnih agregata. U najvećem broju slučajeva tercijarne limfoidne strukture bile su fokalno prisutne ili umjereno razvijene, dok su najrjeđe registrovani dobro formirani limfoidni agregati ili njihovo potpuno odsustvo (Grafikon 6).



Grafikon 6. Zastupljenost različitih vrsta peritumorskih limfnih agregata u ukupnom uzorku

U našoj studiji imunohistohemijska ekspresija PD-L1 analizirana je u tumorskim ćelijama i u imunološkim ćelijama inflamatornog infiltrata na invazivnom frontu tumora, sa ciljem utvrđivanja obrasca ekspresije ovog markera (konstitutivna/inducibilna) u svakom tumoru. Od ukupno 95 pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke uključenih u studiju, kod 20 (21,5%) je utvrđeno postojanje PD-L1 ekspresije. U svim slučajevima pozitivne ekspresije PD-L1 je bio eksprimiran u imunološkim ćelijama, dok je samo kod tri pacijentkinje (15%) utvrđena ekspresija ovog markera i u tumorskim i u imunološkim ćelijama.

4.2 Prisustvo i obrazac PD-L1 ekspresije u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke

Ispitivanjem PD-L1 ekspresije kod različitih molekularnih podtipova karcinoma dojke, u našoj studiji utvrđena je pozitivnost kod svih. U najvećem broju slučajeva (osam), prisustvo PD-L1 ekspresije zabilježeno je u tumorima trostruko negativnog podtipa, ali je pozitivnost nađena i kod pet pacijentkinja sa neluminalnim HER-2+ molekularnim podtipom, po tri pacijentkinje sa Luminal B HER-2+ i Luminal B HER-2- molekularnim podtipom i samo kod jedne pacijentkinje sa Luminal A molekularnim podtipom karcinoma dojke.

Kako se u 100% slučajeva radilo o inducibilnom tipu ekspresije PD-L1, nije utvrđena statistički značajna razlika u obrascu ekspresije (konstitutivna/inducibilna) ovog markera među različitim molekularnim podtipovima na našem uzorku.

Takođe, nije utvrđena statistički značajna razlika u prisustvu PD-L1 ekspresije kod različitih molekularnih podtipova karcinoma dojke (Fisher's exact test = 8,25; p = 0,07) (Tabela 10).

Tabela 10. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na različite molekularne podtipove karcinoma dojke

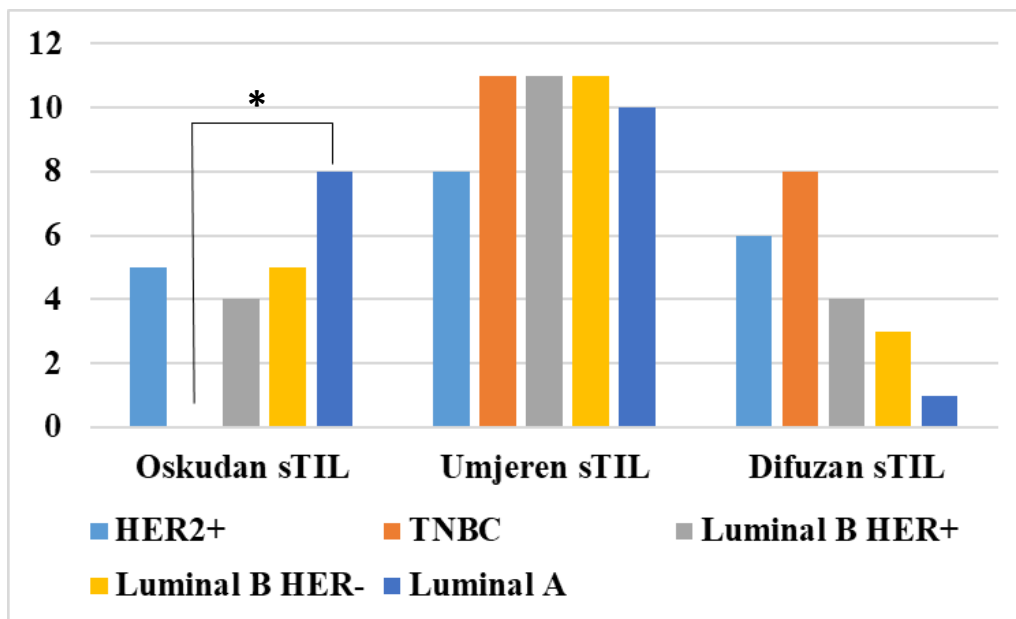
| Molekularni podtip | PD-L1 | | Ukupno | p |
|------------------------|-------------|-------------|--------------|------|
| | Negativan | Pozitivan | | |
| HER2+ | 14 14,7% | 5 5,3% | 19 20,0% | 0,07 |
| TNBC | 11 11,6% | 8 8,4% | 19 20,0% | |
| Luminal B HER2+ | 16 16,8% | 3 3,2% | 19 20,0% | |
| Luminal B HER2- | 16 16,8% | 3 3,2% | 19 20,0% | |
| Luminal A | 18 18,9% | 1 1,1% | 19 20,0% | |
| Ukupno | 75 78,8% | 20 21,2% | 95 100,0% | |

U sva tri slučaja gdje je prisustvo PD-L1 ekspresije pored imunoloških ćelija zabilježeno i u tumorskim ćelijama, radilo se o tumorima trostruko negativnog molekularnog podtipa. Shodno tome, utvrđena je statistički značajna razlika u PD-L1 ekspresiji od strane tumorskih ćelija u različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke (Fisher's exact test = 6,23; $p = 0,03$), dok je koeficijent korelacije pokazao postojanje umjerene pozitivne korelacije u tom kontekstu ($\Phi = 0,36$; $p = 0,03$), što govori u prilog tome da će se PD-L1 pozitivnost u tumorskim ćelijama značajno češće sresti kod TNBC u odnosu na karcinome dojke drugih molekularnih podtipova.

4.3 PD-L1 ekspresija u odnosu na gustinu intra i peritumorskog limfocitnog infiltrata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke

4.3.1 Gustina stromalnog limfocitnog infiltrata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke

Upoređivanjem gustine sTIL, izražene na semikvantitativan način, u različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u gustini inflamatornog infiltrata među njima (Fisher exact test = 16,21; $p = 0,03$). Korelacioni test pokazao je umjerenu pozitivnu korelaciju između molekularnog podtipa karcinoma dojke i gustine sTIL ($\Phi = 0,4$; $p = 0,04$), a dodatnim analizama utvrđeno je da se oskudan sTIL statistički značajno češće javlja kod Luminal A podtipa karcinoma dojke (8; 8,4%) u odnosu na TNBC (0; 0,0%), dok je kod svih ostalih molekularnih podtipova podjednako distribuiran. Umjereni sTIL pokazao je ujednačenu distribuciju među različitim molekularnim podtipovima. Iako je uočena manja zastupljenost difuznog sTIL kod karcinoma Luminal A podtipa u odnosu na TNBC, ova razlika nije dostigla statistički značaj (Grafikon 7).



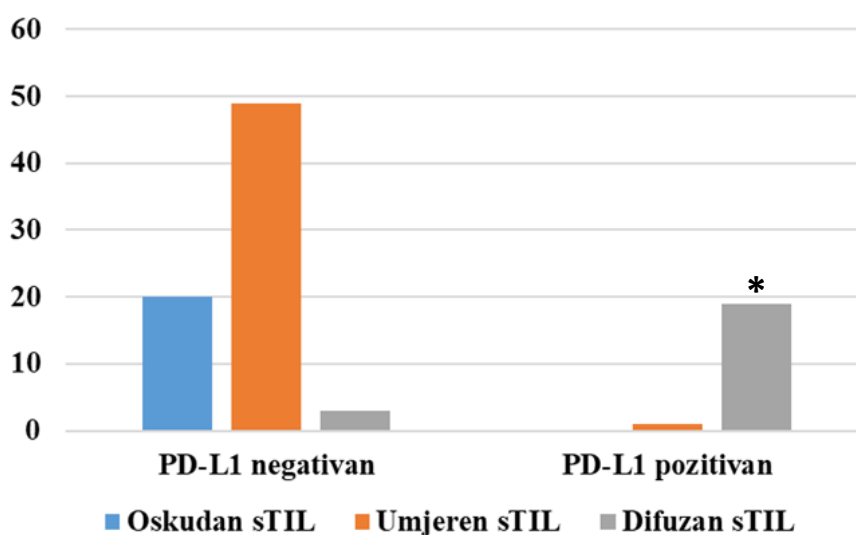
Grafikon 7. Distribucija različitih tipova sTIL u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke (*p < 0,05)

4.3.2 PD-L1 ekspresija u odnosu na gustinu stromalnog limfocitnog infiltrata u ranom karcinomu dojke

Tabela 10. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na semikvantitativno izraženu gustinu sTIL

| sTIL | PD-L1 | | Ukupno | p |
|---------------|-------------|-------------|--------------|--------|
| | Negativan | Pozitivan | | |
| Oskudan | 22 23,2% | 0 0,0% | 22 23,2% | <0,001 |
| Umjeren | 50 52,6% | 1 1,1% | 51 53,7% | |
| Difuzan | 3 3,1% | 19 20,0% | 22 23,1% | |
| Ukupno | 75 78,9% | 20 21,1% | 95 100,0% | |

Prilikom ispitivanja prisustva PD-L1 ekspresije kod pacijentkinja sa različitom gustinom sTIL u našoj studiji, izuzev jednog slučaja pozitivne PD-L1 ekspresije u tumoru sa umjerenim sTIL, svi PD-L1 pozitivni tumori pokazali su prisustvo gustog difuznog sTIL, dok ni u jednom slučaju sa oskudnim sTIL nije detektovana PD-L1 ekspresija. Koeficijent korelacije pokazao je jaku pozitivnu korelaciju između PD-L1 ekspresije i tipa sTIL ($\Phi = 0,88$; $p < 0,001$), a Z test je pokazao da se pozitivna PD-L1 ekspresija statistički značajno češće javlja kod difuznih sTIL u odnosu na umjerene i oskudne sTIL (Tabela 10, Grafikon 8).

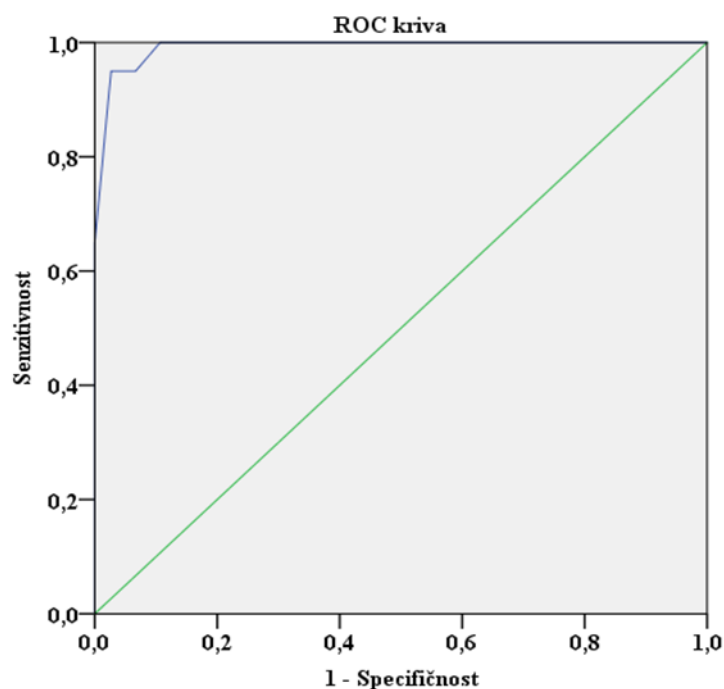


Grafikon 8. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na gustinu sTIL (* $p < 0,001$)

4.3.3 Predikcija PD-L1 pozitivnosti na osnovu gustine stromalnog limfocitnog infiltrata

Prosječna gustina sTIL, izražena kao kontinuirana varijabla, iznosila je $15,31 \pm 14,32$ procenata ($\bar{x} \pm SD$) u ranom karcinomu dojke sa negativnom PD-L1 ekspresijom i $68,75 \pm 16,85$ procenata ($\bar{x} \pm SD$) u ranom karcinomu dojke sa prisutnom PD-L1 ekspresijom ($U = 12,50$; $p < 0,001$). S ciljem ispitivanja mogućnosti predikcije PD-L1 pozitivnosti na osnovu gustine sTIL, konstruisana je ROC krivulja (*receiver operating characteristic curve*) ukrštanjem proporcije stvarno pozitivnih (y osa) i lažno pozitivnih opservacija (x

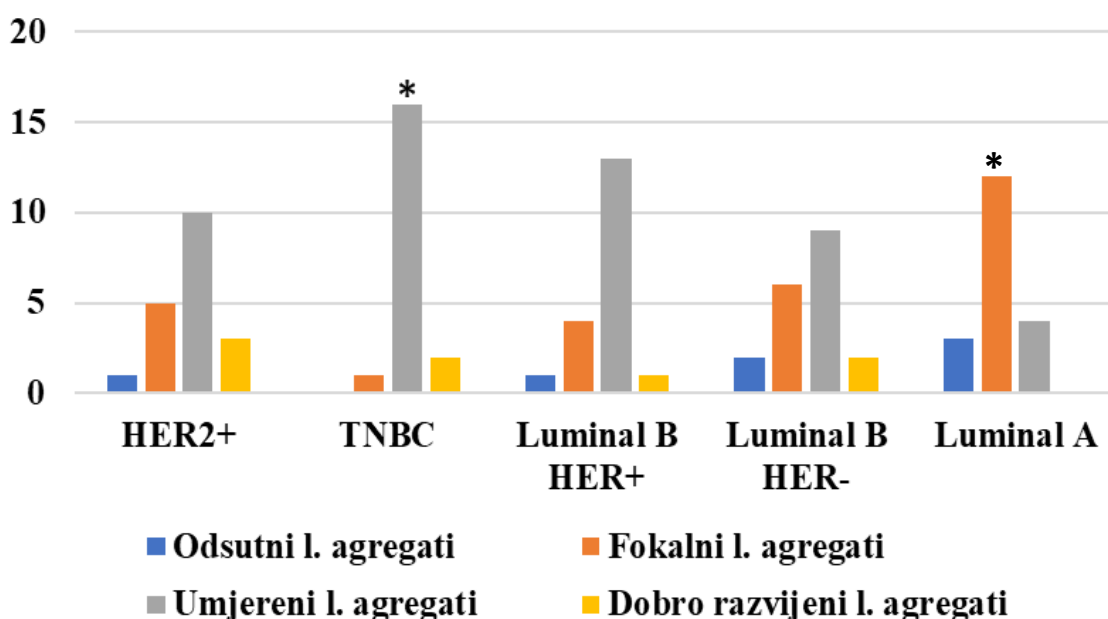
osa). Površina ispod dobijene ROC krive za procjenu pozitivne PD-L1 ekspresije na osnovu gustine sTIL izražene kao kontinuirane varijable, govori u prilog odlične dijagnostičke tačnosti (AUC = 0,992; $p < 0,001$). Na osnovu najveće vrijednosti Youden-ovog indeksa (Youden's index = 0,923) utvrđena je granična vrijednost (*cut-off*) koja iznosi 53% prekrivenosti tumorske strome TIL, a na osnovu koje se sa visokom pouzdanošću može predvidjeti prisustvo PD-L1 ekspresije u ranom karcinomu dojke (Grafikon 9).



Grafikon 9. ROC kriva za procjenu pozitivne PD-L1 ekspresije na osnovu gustine sTIL izražene kao kontinuirane varijable. Na y osi nalazi se proporcija stvarno pozitivnih slučajeva (opservacije koje su tačno predviđene kao pozitivne u ukupnom broju pozitivnih slučajeva), a na x osi proporcija lažno pozitivnih slučajeva (opservacije koje su netačno predviđene kao pozitivne u ukupnom broju negativnih slučajeva) (AUC = 0,992; $p < 0,001$).

4.3.4 Karakteristike peritumorskih limfoidnih agregata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke

Poređenjem karakteristika peritumorskih limfoidnih agregata u različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika (Fisher's exact test = 25,55; $p = 0,002$), te da je prisutna umjerena pozitivna korelacija između molekularnog podtipa karcinoma dojke i vrste limfoidnog agregata ($\Phi = 0,53$; $p = 0,002$). Z test je pokazao da se kod žena sa TNBC, statistički značajno češće javljaju umjereni limfoidni agregati (16; 16,8%) u odnosu na ostale tipove limfoidnih agregata. Takođe, kod žena sa Luminal A karcinomom dojke statistički značajno češće javljaju se fokalni limfoidni agregati (12; 12,6%) u odnosu na ostale tipove limfoidnih agregata. (Grafikon 10).



Grafikon 10. Distribucija različitih vrsta peritumorskih limfoidnih agregata u molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke (* $p < 0,05$).

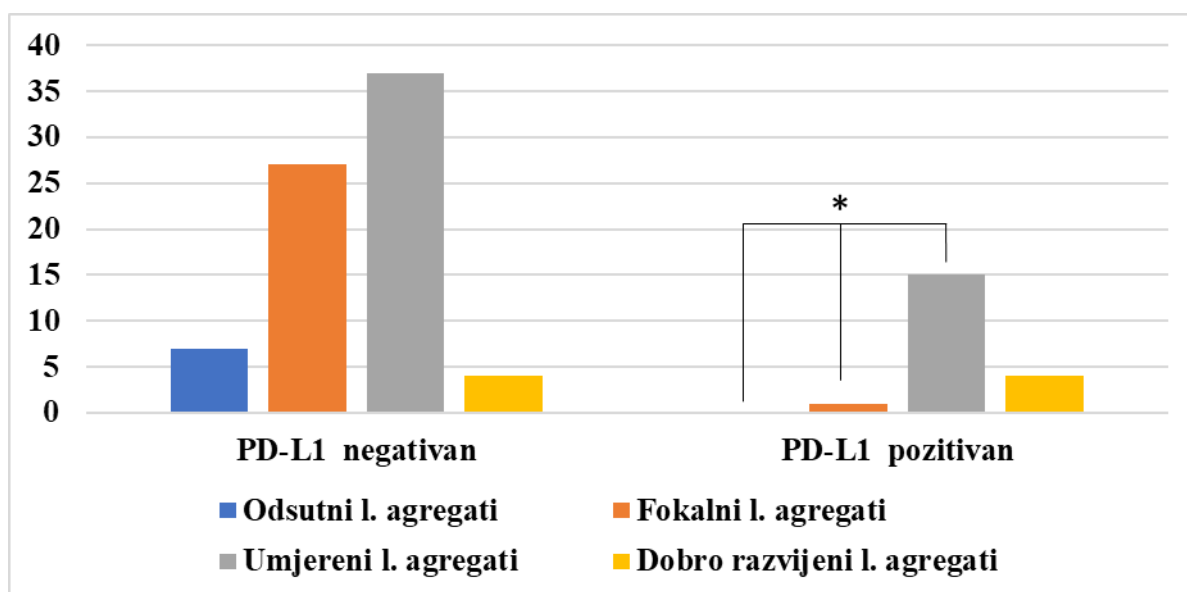
4.3.5 PD-L1 ekspresija u odnosu na karakteristike peritumorskih limfoidnih agregata

Među pacijentkinjama kod kojih je utvrđeno prisustvo PD-L1 ekspresije, umjereno razvijene peritumorske limfoidne agregate imalo je njih 15 (15,8%), dobro razvijene 4

(4,2%), dok je samo jedna pacijentkinja (1,1%) imala fokalne limfoidne agregate. Nije utvrđen nijedan slučaj pozitivne PD-L1 ekspresije kod tumora u čijoj su neposrednoj okolini limfoidni agregati bili odsutni.

Utvrđena je statistički značajna razlika u prisustvu PD-L1 ekspresije kod pacijentkinja sa različitim tipovima peritumorskih limfoidnih agregata (Fisher's exact test = 12,87; $p = 0,003$). Koeficijentom korelacije utvrđena je umjerena pozitivna korelacija između PD-L1 ekspresije i tipa peritumorskih limfoidnih agregata ($\Phi = 0,37$; $p = 0,003$), a Z test je pokazao da se kod tumora sa prisutnom PD-L1 ekspresijom statistički značajno češće notiraju umjereni peritumorski limfoidni agregati u odnosu na fokalne ili kompletno odsustvo limfoidnih agregata (Grafikon 11).

Nije pronađena statistički značajna razlika između prisustva dobro razvijenih limfoidnih agregata u odnosu na ostale tipove peritumorskih limfoidnih agregata kod slučajeva sa pozitivnom PD-L1 ekspresijom.



Grafikon 11. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na vrstu peritumorskih limfoidnih agregata u ranom karcinomu dojke (* $p < 0,05$)

4.4 PD-L1 ekspresija u odnosu na gustinu i sastav sTIL u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke

4.4.1 Gustina sTIL i apsolutni broj CD4 i CD8 T-limfocita po mm² u stromalnom infiltratu kod različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke

Ispitivanjem gustine (izražene kao kontinuirane varijable) i sastava sTIL u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke, Kruskal Wallis test pokazao je statistički značajnu razliku u srednjim vrijednostima gustine sTIL ($\chi^2 = 12,68$; $p = 0,01$) i broju CD4 limfocita po mm² ($\chi^2 = 24,73$; $p < 0,001$) u odnosu na molekularni podtip ranog karcinoma dojke.

Srednja vrijednost gustine sTIL statistički značajno se razlikovala između TNBC i Luminal B HER-2- molekularnog podtipa ($U = 101,50$; $p = 0,02$), kao i između TNBC i Luminal A molekularnog podtipa ($U = 68,50$; $p = 0,01$). Drugim riječima, utvrđena je značajno veća gustina sTIL kod TNBC u odnosu na Luminal B HER-2- i Luminal A molekularne podtipove ranog karcinoma dojke.

Srednja vrijednost broja CD4 limfocita po mm² razlikovala se između neluminalnog HER-2+ i Luminal A molekularnog podtipa ($U = 86,00$; $p = 0,005$), između TNBC i Luminal B HER-2- molekularnog podtipa ($U = 63,50$; $p = 0,001$), između TNBC i Luminal A molekularnog podtipa ($U = 38,50$; $p = 0,001$), te Luminal B HER-2+ i Luminal B HER-2- molekularnog podtipa ($U = 108,50$; $p = 0,03$), kao i između Luminal B HER-2+ i Luminal A molekularnog podtipa ($U = 72,00$; $p = 0,001$). Odnosno, apsolutni broj CD4 limfocita u stromalnom infiltratu bio je značajno veći kod TNBC i Luminal B HER-2+ u odnosu na Luminal B HER-2- molekularni podtip karcinoma dojke, dok su tumori svih molekularnih podtipova, izuzev Luminal B HER-2-, u stromi sadržali veći broj CD4 pozitivnih limfocita u odnosu na tumore Luminal A molekularnog podtipa.

Nije nađena statistički značajna razlika u srednjoj vrijednosti broja CD8 limfocita po mm² između različitih molekularnih podtipova karcinoma dojke ($\chi^2 = 7,00$; $p = 0,136$).

Rezultati gore navedenih analiza sumirani su u Tabeli 11.

Tabela 11. Srednje vrijednosti parametara imunološkog odgovora u zavisnosti od molekularnog podtipa ranog karcinoma dojke

| Molekularni podtip | sTIL (%) ($\bar{x} \pm SD$) | CD4 (po mm ²) ($\bar{x} \pm SD$) | CD8 (po mm ²) ($\bar{x} \pm SD$) |
|--------------------|----------------------------------|---|---|
| HER2+ | 29,74±29,95 | 81,16±99,18 ^a | 70,84±85,72 |
| TNBC | 43,32±32,42 ^{a, b} | 112,95±95,39 ^b | 77,42±85,79 |
| Luminal B HER2+ | 25,32±22,69 | 67,19±59,54 ^c | 51,05±62,45 |
| Luminal B HER2- | 22,22±21,94 ^a | 29,61±23,92 ^{b, c} | 43,26±48,67 |
| Luminal A | 13,65±14,05 ^b | 21,24±26,62 ^{a, b, c} | 27,11±39,39 |

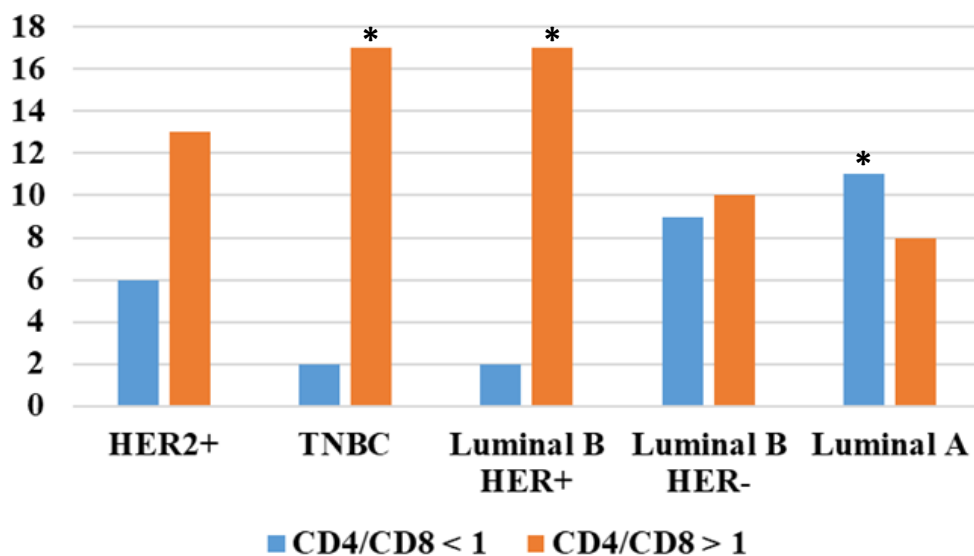
^{a, b, c} p < 0,05

4.4.2 Sastav stromalnog limfocitnog infiltrata (izražen u obliku CD4/CD8 odnosa) kod različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke

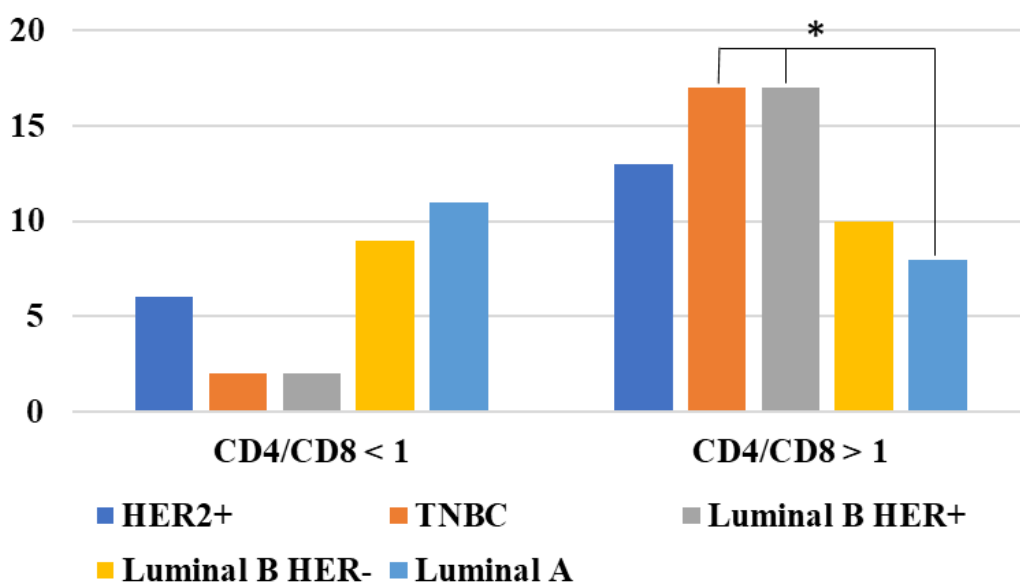
Statistička analiza ukazuje da se sastav limfocitnog infiltrata (izražen u obliku CD4/CD8 odnosa), odnosno dominantna subpopulacija T limfocita u stromalnom infiltratu, značajno razlikuje između pojedinih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke ($\chi^2 = 16,07$ p = 0,003) a korelacioni koeficijent pokazao je umjerenu pozitivnu povezanost između navedenih parametara (Phi = 0,41; p = 0,003).

Naime, među TNBC i Luminal B HER-2+ karcinomima dojke uočen je statistički značajno veći broj tumora sa CD4/CD8 odnosom većim od 1 (po 17 tumora, odnosno po 17,9% od ukupnog broja ispitanih slučajeva) u poređenju sa tumorima koji imaju CD4/CD8 odnos manji od 1 (po 2 tumora, odnosno po 2,1% od ukupnog broja ispitanih slučajeva). S druge strane, među karcinomima Luminal A molekularnog podtipa statistički značajno češće su uočeni tumori sa CD4/CD8 odnosom manjim od 1 (11; 11,6%) u poređenju sa tumorima čiji je CD4/CD8 odnos bio veći od 1 (8; 8,4%).

Rezultati navedenih analiza prikazani na Grafikonu 12.



Grafikon 12. Razlike u dominantnoj subpopulaciji T-limfocita (CD4/CD8 odnosu) u stromalnom infiltratu različitih molekularnih podtipova ranoj karcinoma dojke (*p < 0,05)



Grafikon 13. Razlike u distribuciji CD4/CD8 odnosa manjeg i većeg od 1 u različitim molekularnim podtipovima ranoj karcinoma dojke (*p < 0,05)

Dalje analize pokazale su i da se CD4/CD8 odnos veći od 1 statistički značajno češće javlja kod TNBC i Luminal B HER-2+ (17; 17,9%) karcinoma dojke u odnosu na tumore Luminal A molekularnog podtipa (8; 8,4%). Uočene razlike u distribuciji CD4/CD8 odnosa manjeg od 1 u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke nijesu dostigle statističku značajnost (Grafikon 13).

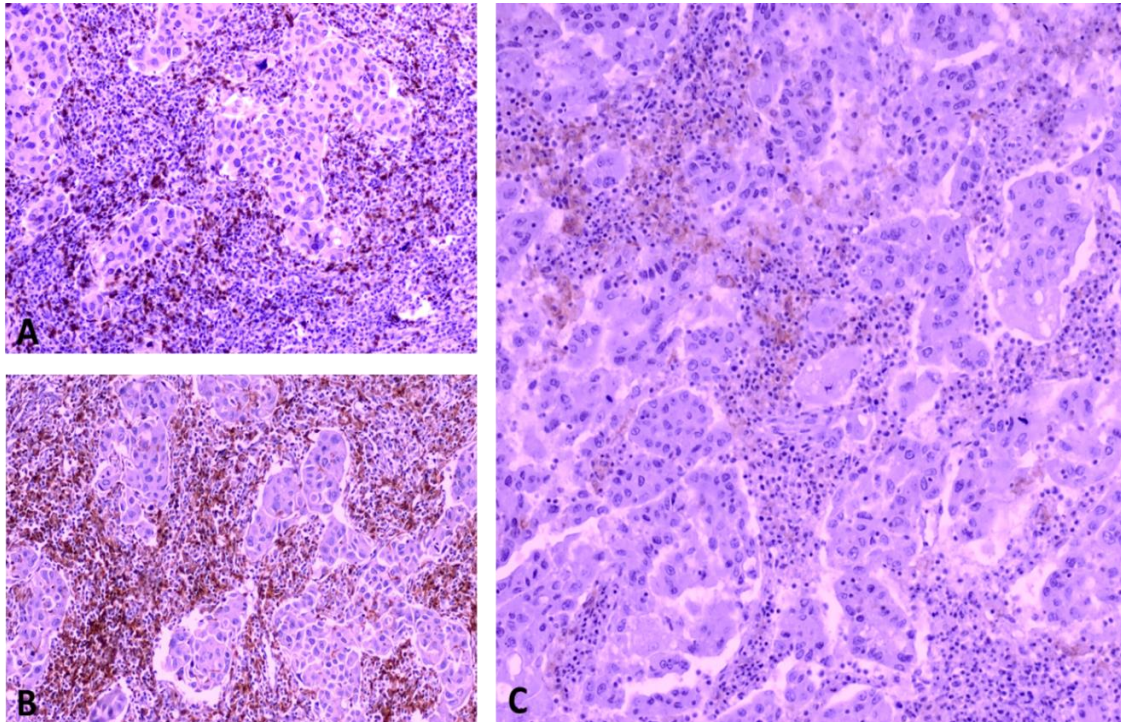
4.4.3 PD-L1 ekspresija u odnosu na sastav stromalnog limfocitnog infiltrata

Pri analizi povezanosti PD-L1 ekspresije sa parametrima vezanim za imunološki odgovor kod ranog karcinoma dojke, Mann Whitney test je pokazao statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti gustine sTIL ($U = 12,50$; $p < 0,001$), kao i srednjih vrijednosti apsolutnog broja CD4 ($U = 61,50$; $p < 0,001$) i CD8 ($U = 90,50$; $p < 0,001$) limfocita po mm^2 stromalnog infiltrata kod tumora sa pozitivnom u odnosu na tumore sa negativnom PD-L1 ekspresijom.

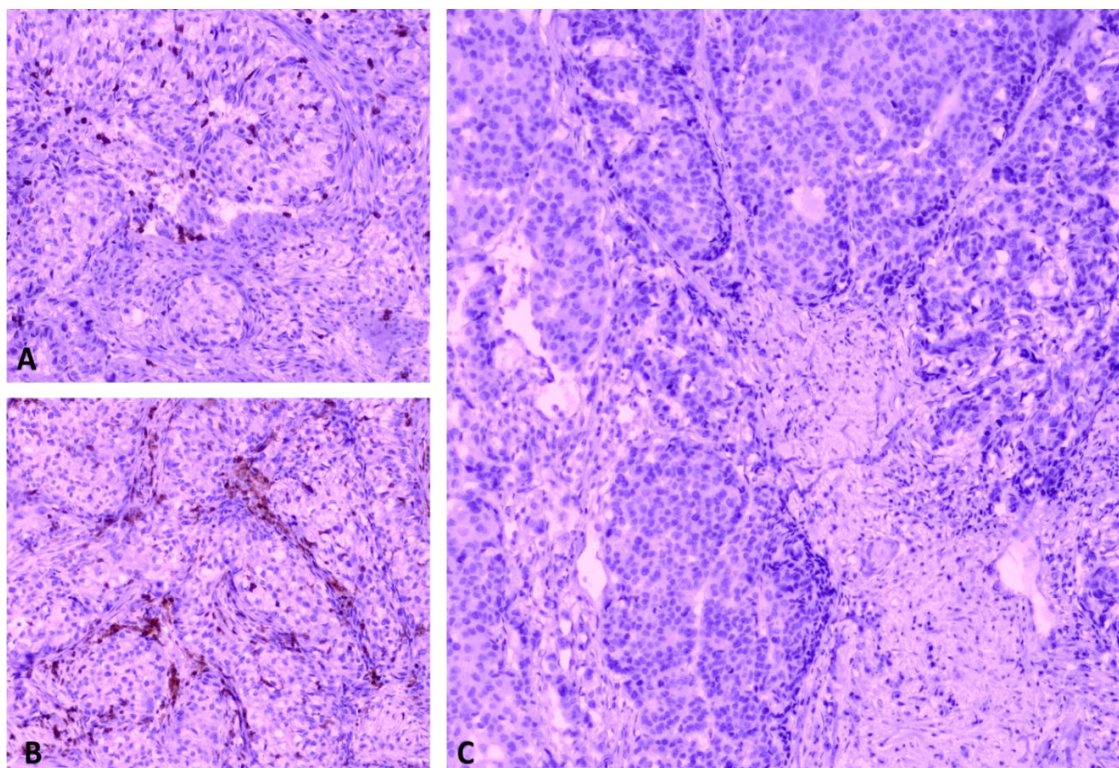
Naime, srednje vrijednosti gustine sTIL, kao i apsolutnog broja CD4 i broja CD8 T-limfocita u stromalnom inflamatornom infiltratu, bile su statistički značajno veće kod tumora sa pozitivnom PD-L1 ekspresijom u odnosu na tumore u kojima nije registrovano prisustvo PD-L1 ekspresije (Tabela 12) (Slika 13 i 14).

Tabela 12. Srednje vrijednosti parametara vezanih za imuni odgovor kod karcinoma dojke sa pozitivnom i negativnom PD-L1 ekspresijom (* $p < 0,05$)

| | PD-L1 | Srednja vrijednost ($\bar{x} \pm \text{SD}$) | p |
|-------------------------|-----------|--|---------|
| sTIL (%) | Negativan | 15,31±14,32 | < 0,001 |
| | Pozitivan | 68,75±16,85* | |
| CD4 (po mm^2) | Negativan | 31,65±30,18 | < 0,001 |
| | Pozitivan | 175,25±87,62* | |
| CD8 (po mm^2) | Negativan | 28,16±33,79 | < 0,001 |
| | Pozitivan | 150,60±78,19* | |



Slika 13. Gustina i sastav stromalnog inflamatornog infiltrata u PD-L1 pozitivnom ranom karcinomu dojke. Gusti, difuzni mononuklearni inflamatorni infiltrati sa većim apsolutnim brojem A) CD8 i B) CD4 T-limfocita po jedinici površine, statistički su značajno povezani sa C) prisustvom PD-L1 ekspresije u ranom karcinomu dojke. Imunohistohemija, A) CD4, x100, B) CD8, x100 i C) PD-L1, x200.



Slika 14. Gustina i sastav stromalnog inflamatornog infiltrata u PD-L1 negativnom ranom karcinomu dojke. Fokalni mononuklearni inflamatorni infiltrati sa manjim apsolutnim brojem A) CD8 i B) CD4 T-limfocita po jedinici površine povezani su sa C) odsustvom PD-L1 ekspresije u ranom karcinomu dojke. Imunohistohemija A) CD4, B) CD8 i C) PD-L1, x100.

Ispitivanjem povezanosti predominacije određene subpopulacije T-limfocita u stromalnom inflamatornom infiltratu sa PD-L1 ekspresijom u ranom karcinomu dojke, utvrđeno je prisustvo PD-L1 ekspresije kod osam (8,7%) tumora sa CD4/CD8 odnosom manjim od 1 odnosno 12 (13,0%) tumora sa CD4/CD8 odnosom većim od 1, ali ova razlika nije bila statistički značajna (Fisher exact test = 0,851; $p = 0,42$) (Tabela 13).

Tabela 13. Distribucija PD-L1 ekspresije u zavisnosti od CD4/CD8 odnosa u stromalnom inflamatornom infiltratu ranog karcinoma dojke

| Odnos CD4/CD8 | PD-L1 | | Ukupno | p |
|---------------|-------------|-------------|--------------|------|
| | Negativan | Pozitivan | | |
| CD4/CD8 < 1 | 22 23,2% | 8 8,4% | 30 31,6% | 0,42 |
| CD4/CD8 > 1 | 53 55,8% | 12 12,6% | 65 68,4% | |
| Ukupno | 75 79,0% | 20 21,0% | 95 100,0% | |

Drugim riječima, analizom nije utvrđena statistički značajna predominacija jedne subpopulacije T-limfocita u stromalnom infiltratu PD-L1 pozitivnih tumora.

4.5 PD-L1 ekspresija u odnosu na kliničko-patološke prognostičke parametre kod ranog karcinoma dojke

4.5.1 PD-L1 ekspresija u odnosu na starosnu dob pacijentkinja

Prosječna starost pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke koji ima pozitivnu PD-L1 ekspresiju ($61,55 \pm 10,79$; $\bar{x} \pm SD$) bila je nešto veća u poređenju sa pacijentkinjama kojima su dijagnostikovani PD-L1 negativni tumori ($59,19 \pm 11,96$; $\bar{x} \pm SD$). Međutim, Mann Whitney test nije pokazao statistički značajnu razliku u starosnoj dobi ($U = 672,00$; $p = 0,48$) između ove dvije grupe pacijentkinja.

4.5.2 PD-L1 ekspresija u odnosu na veličinu tumora u milimetrima

Iako je uočena mala razlika u srednjoj vrijednosti najvećeg dijametra tumora izraženoj u milimetrima između karcinoma dojke sa pozitivnom ($25,30 \pm 10,99$; $\bar{x} \pm SD$) i

negativnom ($24,64 \pm 10,96$; $\bar{x} \pm SD$) PD-L1 ekspresijom, Mann Whitney testom nije utvrđen njen statistički značaj ($U = 717,00$; $p = 0,76$).

4.5.3 PD-L1 ekspresija u odnosu na pT, pN i klinički stadijum bolesti

Najveći broj pacijentkinja sa PD-L1 pozitivnim ranim karcinomom dojke dijagnostikovano je u pT2 stadijumu bolesti (11). Nešto manje pacijentkinja (sedam) je u vrijeme postavljanja dijagnoze imalo tumor pT1 stadijuma, dok se svega par pacijentkinja nalazilo u pT3 stadijumu. Daljom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost između pT stadijuma bolesti i ekspresije PD-L1 u ranom karcinomu dojke (Fisher exact test = 1,92; $p = 0,37$) (Tabela 14).

Tabela 14. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na pT stadijum bolesti

| pT stadijum | PD-L1 | | Ukupno | p |
|---------------|-------------|-------------|--------------|------|
| | Negativan | Pozitivan | | |
| pT1 | 35 36,8% | 7 7,4% | 42 44,2% | 0,37 |
| pT2 | 37 38,9% | 11 11,6% | 48 50,5% | |
| pT3 | 3 3,2% | 2 2,1% | 5 5,3% | |
| Ukupno | 75 78,9% | 20 21,1% | 95 100,0% | |

Analizom histološkog statusa limfnih čvorova pacijentkinja sa PD-L1 pozitivnim ranim karcinomom dojke utvrđeno je da kod najvećeg broja njih (13) nijesu postojali sekundarni depoziti u aksilarnim limfnim čvorovima u vrijeme postavljanja dijagnoze, a da se približno isti broj pacijentkinja nalazio u pN1 (četiri pacijentkinje) i pN2 (tri pacijentkinje) stadijumu. Nakon sprovedenog Fisher exact testa, statistički značajna povezanost između pN stadijuma i ekspresije PD-L1 u ranom karcinomu dojke nije nađena (Fisher exact test = 0,52; $p = 0,93$) (Tabela 15).

Tabela 15. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na pN stadijum

| pN stadijum | PD-L1 | | Ukupno | p |
|---------------|-------------|-------------|--------------|------|
| | Negativan | Pozitivan | | |
| pN0 | 52 54,7% | 13 13,7% | 65 68,4% | 0,93 |
| pN1 | 11 11,6% | 4 4,2% | 15 15,8% | |
| pN2 | 12 12,6% | 3 3,2% | 15 15,8% | |
| Ukupno | 75 78,9% | 20 21,1% | 95 100,0% | |

Pozitivna PD-L1 ekspresija nađena je kod pet (5,3%) pacijentkinja koje su u vrijeme postavljanja dijagnoze bile u kliničkom stadijumu bolesti IA, sedam (7,3%) pacijentkinja u stadijumu IIA, pet (5,3%) pacijentkinja u stadijumu IIB i samo tri (3,2%) pacijentkinje u stadijumu IIIA karcinoma dojke. Kao i u slučaju pT i pN stadijuma, daljom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost između PD-L1 ekspresije i kliničkog stadijuma ranog karcinoma dojke u vrijeme postavljanja dijagnoze (Fisher exact test = 3,30; p = 0,35).

4.5.4 PD-L1 ekspresija u odnosu na histološki tip ranog karcinoma dojke

Ispitivanjem PD-L1 ekspresije kod različitih histoloških tipova karcinoma dojke u našoj studiji među 20 PD-L1 pozitivnih tumora, u čak 17 slučajeva radilo se o invazivnom duktalnom karcinomu dojke NST (ne računajući tumore sa medularnim karakteristikama). Dvije pacijentkinje imale su invazivni duktalni karcinom dojke medularnih karakteristika, dok je kod jedne pacijentkinje dijagnostikovao metaplastični karcinom dojke. Međutim, daljom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost između PD-L1 ekspresije i određenog histološkog tipa ranog karcinoma dojke (Fisher's exact test = 9,52; p = 0,09) (Tabela 16).

Tabela 16. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na histološki tip ranog karcinoma dojke

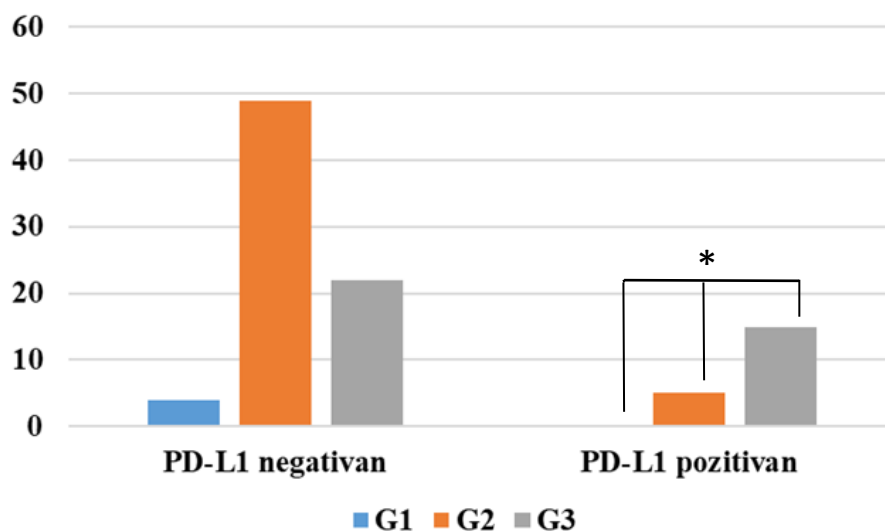
| Histološki tip | PD-L1 | | Ukupno | p |
|---|-------------|-------------|--------------|------|
| | Negativan | Pozitivan | | |
| Invazivni duktalni karcinom (IDC), NST | 61 64,2% | 17 17,9% | 78 82,1% | 0,09 |
| Invazivni lobularni karcinom | 8 8,3% | 0 0,0% | 8 8,3% | |
| Mucinozni karcinom | 2 2,1% | 0 0,0% | 2 2,1% | |
| Metaplastični karcinom | 1 1,1% | 1 1,1% | 2 2,2% | |
| IDC sa medularnim karakteristikama | 0 0,0% | 2 2,1% | 2 2,1% | |
| Mikropapilarni karcinom | 1 1,1% | 0 0,0% | 1 1,1% | |
| Papilarni karcinom | 2 2,1% | 0 0,0% | 2 2,1% | |
| Ukupno | 75 78,9% | 20 21,1% | 95 100,0% | |

4.5.5 PD-L1 ekspresija u odnosu na histološki gradus ranog karcinoma dojke

Prilikom analize PD-L1 ekspresije u tumorima različitog histološkog gradusa, uočena je visoka učestalost PD-L1 pozitivnosti kod loše diferentovanih tumora. Tako se, od 20 PD-L1 pozitivnih slučajeva ranog karcinoma dojke čak u 15 slučajeva radilo o loše diferentovanim tumorima (G3). Kod pet pacijentkinja dijagnostikovano je srednje diferentovano (G2) karcinom dojke, dok među pacijentkinjama sa dobro diferentovanim tumorima nije bilo slučajeva pozitivne PD-L1 ekspresije.

Daljim analizama dokazana je statistički značajna razlika u postojanju PD-L1 ekspresije kod ranog karcinoma dojke različitog histološkog gradusa (Fisher exact test = 12,81; $p = 0,003$). Phi korelacioni koeficijent pokazao je umjerenu pozitivnu korelaciju između PD-L1 ekspresije i histološkog gradusa karcinoma dojke (Phi = 0,38; $p = 0,003$), dok je Z

testom utvrđeno da se kod pacijentkinja sa dijagnostikovanim karcinomom dojke gradusa G3 (loše diferentovani tumori) statistički značajno češće javlja pozitivna PD-L1 ekspresija u odnosu na pacijentkinje kojima su dijagnostikovani dobro i umjereno diferentovani karcinomi (gradus G1 i G2) (Grafikon 14).



Grafikon 14. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na histološki gradus ranog karcinoma dojke (*p < 0,05)

4.5.6 PD-L1 ekspresija u odnosu na kliničko-patološke prognostičko-prediktivne parametre (status steroidnih receptora, HER-2 i Ki67 indeks proliferacije) kod ranog karcinoma dojke

Upoređivanjem prisustva PD-L1 ekspresije u tumorima različitog ER statusa, uočeno je da kod najvećeg procenta ER pozitivnih tumora (50 od 57) nije bilo prisustva PD-L1 ekspresije. Daljim analizama dokazana je statistički značajna razlika u postojanju PD-L1 ekspresije u odnosu na ER status kod ranog karcinoma dojke (Fisher exact test = 6,597; p = 0,019), koja ukazuje na to da se PD-L1 ekspresija statistički značajno češće sreće kod ER negativnih tumora (Tabela 17).

Tabela 17. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na status ER

| ER | PD-L1 | | Ukupno | p |
|------------------|-------------|-------------|--------------|-------|
| | Negativan | Pozitivan | | |
| Negativan | 25 26,3% | 13 13,7% | 38 40,0% | <0,05 |
| Pozitivan | 50 52,6% | 7 7,4% | 57 60,0% | |
| Ukupno | 75 78,9% | 20 21,1% | 95 100,0% | |

Analizom PD-L1 ekspresije kod ranog karcinoma dojke različitog PR statusa, uočena je relativno ravnomjerna distribucija PR pozitivnih i PR negativnih tumora među slučajevima sa negativnom PD-L1 ekspresijom, dok je među PD-L1 pozitivnim tumorima nešto veći broj imao negativan PR status. Daljom analizom nije dokazano postojanje statistički značajne razlike u PD-L1 ekspresiji u odnosu na PR status kod ranog karcinoma dojke u pregledanom uzorku (Fisher exact test = 6,597; p = 0,019) (Tabela 18).

Tabela 18. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na PR status

| PR | PD-L1 | | Ukupno | p |
|------------------|-------------|-------------|--------------|------|
| | Negativan | Pozitivan | | |
| Negativan | 42 44,2% | 14 14,8% | 56 58,9% | 0,26 |
| Pozitivan | 33 34,7% | 6 6,3% | 39 41,1% | |
| Ukupno | 75 78,9% | 20 21,1% | 95 100,0% | |

Slična opservacija napravljena je i prilikom poređenja distribucije PD-L1 ekspresije u odnosu na HER-2 status kod ranog karcinoma dojke, gdje statističkom analizom nije dokazano postojanje značajne razlike u prisustvu PD-L1 ekspresije među tumorima različitog HER-2 statusa (Fisher exact test = 0,000; p = 0,61) (Tabela 19).

Tabela 19. Distribucija PD-L1 ekspresije u odnosu na HER-2 status

| HER-2 | PD-L1 | | Ukupno | p |
|-----------|-------------|-------------|--------------|------|
| | Negativan | Pozitivan | | |
| Negativan | 45 47,3% | 12 12,7% | 57 60,0% | 0,61 |
| Pozitivan | 30 31,6% | 8 8,4% | 38 40,0% | |
| Ukupno | 75 78,9% | 20 21,1% | 95 100,0% | |

Načelno, PD-L1 pozitivni tumori pokazali su veću mitotsku aktivnost, izraženu kroz Ki67 indeks proliferacije, ($48,50 \pm 21,527$ %; $\bar{x} \pm SD$) u odnosu na tumore sa negativnom ekspresijom ovog markera ($33,07 \pm 23,980$ %; $\bar{x} \pm SD$). Daljom analizom potvrđeno je da je vrijednost Ki67 proliferativnog indeksa statistički značajno veća kod ranog karcinoma dojke sa pozitivnom PD-L1 ekspresijom u odnosu na PD-L1 negativne karcinome ($U = 437,00$; $p = 0,006$).

5. DISKUSIJA

Kao najčešće dijagnostikovan malignitet u ženskoj populaciji na globalnom nivou, karcinom dojke predstavlja veliki javnozdravstveni problem (7). Iako u razvijenim zemljama, zahvaljujući uspješnoj implementaciji skrining programa i posljedičnom dijagnostikovanju bolesti u ranom stadijumu, postoji trend smanjenja mortaliteta, liječenje karcinoma dojke sa sobom nosi velike izazove (8).

Danas je opšteprihvaćeno da se ne radi o jedinstvenom entitetu, već da karcinom dojke čini veoma heterogena grupa tumora koji zahtijevaju različite terapijske pristupe. Sa ekspanzijom savremenih terapijskih modaliteta u onkologiji, prvenstveno biološke terapije, svakodnevno se pojavljuju novi izazovi u vezi sa adekvatnom selekcijom pacijentkinja koje će imati benefite od istih. Iako je primjena ciljane terapije povezana sa mnogo manje sistemskih neželjenih efekata u odnosu na klasičnu hemioterapiju, mogućnost nastanka ozbiljnih komplikacija ne može se zanemariti. Iz tog razloga, napori naučne zajednice konstantno su usmjereni na identifikaciju novih i pouzdanijih ali i optimizaciju postojećih biomarkera, koji će se koristiti u te svrhe (103).

Značaj adekvatnog imunološkog odgovora u sprječavanju nastanka i progresije malignih tumora danas je dobro poznat (25). Iako njegov primarni zadatak predstavlja uspješna eliminacija tumorskih ćelija, jednako je važno da imunološki odgovor bude svrsishodan, odnosno da se istovremeno ograniče njegovi štetni efekti na sam organizam (104). Odgovor imunog sistema na prisustvo tumorskih ćelija se morfološki ogleda kroz infiltraciju tumora mononuklearnim imunološkim ćelijama, dominantno T limfocitima, ali i folikularnim dendritičnim ćelijama, makrofagima, B limfocitima i plazma ćelijama, koje su objedinjene terminom tumor-infiltrirajući limfociti (TIL) (23). Većina autora smatra da su CD8 T limfociti glavni nosioci antitumorskog imunološkog odgovora, a da je uloga CD4 T limfocita u ovom procesu mnogo kompleksnija jer se, u zavisnosti od predominantnih citokina produkovanih od strane tumorske mikrookoline, mogu diferencirati u različite populacije efektorskih ćelija koje čak mogu imati i oprečna svojstva (27). Adekvatnost imunološkog odgovora uslovljena je ravnotežom između kostimulatornih i koinhibitornih signala, posredovanih članovima B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4 superfamilije proteina, a jedan od njenih članova je i PD-1 koji se može eksprimirati na površini različitih imunoloških ćelija (28, 30, 34, 35). Njegov ligand, transmembranski glikoprotein PD-L1, pored imunoloških ćelija eksprimira se i na

ćelijama pojedinih tkiva i organa, u kojima je očuvanje imunološke tolerancije i sprječavanje razvoja autoimunosti od krucijalnog značaja (29), a krajnji ishod aktivacije PD-1/PD-L1 signalnog puta jesu anergija i programirana ćelijska smrt T limfocita (44).

Do danas je identifikovan veliki broj solidnih tumora koji su, kroz ekspresiju PD-L1 proteina na površini tumorskih ćelija ali i imunoloških ćelija tumorske mikrookoline, uspjeli da ove prirodne mehanizme zaštite od nepovoljnih efekata imunog sistema stave u svoju službu i na taj način izbjegnu imunološki nadzor organizma (29, 47, 48, 50). Na taj način je imunoterapija, kao jedan od oblika ciljane terapije, postala dio rutinskog protokola liječenja velikog broja malignih tumora, na prvom mjestu nesitnoćelijskog karcinoma pluća (105, 106).

Studije u kojima su proučavani parametri imunološkog odgovora u karcinomu dojke pokazale su da tumori sa većom gustom sTIL i razvijenim peritumorskim limfoidnim agregatima imaju mnogo bolju prognozu i pokazuju bolji odgovor na hemioterapiju (94). Ova opservacija posebno se odnosila na TNBC i neluminalni HER-2 pozitivni karcinom dojke (91, 92), koji su u različitim studijama ujedno izdvojeni i kao podtipovi koji češće ekspimiraju PD-L1 u poređenju sa luminalnim molekularnim podtipovima karcinoma dojke (88). Ipak, anti-PD-1/PD-L1 terapija je zasad pronašla svoje mjesto samo u terapiji lokalno uznapredovalog, neresektabilnog i metastatskog TNBC, kao najimunogenijeg podtipa ovih tumora sa potencijalno najvećim benefitima od imunoterapije (75, 79).

Međutim, pregledom literature nailazi se na veliki broj studija sa oprečnim rezultatima po pitanju prognostičke i prediktivne vrijednosti PD-L1 kao biomarkera u karcinomu dojke (56, 107, 108). Dok su brojne studije ukazale na povezanost između PD-L1 ekspresije i negativnih prognostičkih parametara (86-90), pojedine su istakle njenu snažnu udruženost sa visokom gustom TIL kao nezavisnim povoljnim prognostičkim faktorom kod karcinoma dojke (70, 91-93), a rezultati pojedinih kliničkih studija doveli su u pitanje prediktivnu vrijednost PD-L1 ekspresije u selekciji kandidatkinja za terapiju inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka kod TNBC (56, 85).

Uzimajući u obzir i da se odgovor na imunoterapiju može razlikovati kod tumora sa drugačijim obrascima ekspresije PD-L1 (konsitutivnim i inducibilnim), mnogi autori smatraju da je neophodna optimizacija upotrebe PD-L1 kao biomarkera u karcinomu dojke (56, 94, 95). Naročito je rasprostranjen stav da ekspresiju PD-L1 treba analizirati u

kontekstu sTIL (56, 94-96), za čiju kvantifikaciju postoje međunarodnim konsenzusom utvrđene smjernice iako klinički značajna granična vrijednost ovog parametra još uvijek nije poznata (23).

Dalje, kako su i fokusu naučnih istraživanja gotovo isključivo bili lokalno uznapredovali i metastatski karcinomi dojke trostruko negativnog fenotipa, podaci o PD-L1 ekspresiji i karakteristikama intratumorskog inflamatornog infiltrata u drugim molekularnim podtipovima, a naročito kada je u pitanju rani karcinom dojke, još uvijek su insuficijentni u naučnoj literaturi (88).

Predmetnim istraživanjem, po prvi put u crnogorskoj populaciji pacijentkinja, ispitane su karakteristike intra i peritumorskih limfoidnih infiltrata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke, kao i njihova povezanost sa PD-L1 ekspresijom u ovim tumorima.

Analizom obrasca PD-L1 ekspresije u našem uzorku od 95 tumora, utvrđena je pozitivnost u imunološkim ćelijama tumorske strome u 20 slučajeva, od čega je kod tri karcinoma dojke trostruko negativnog fenotipa istovremeno uočena i slaba do umjerena pozitivna reakcija u tumorskim ćelijama. Ovakav tip reakcije u tumorskim ćelijama opisan je od strane proizvođača primijenjenog antitijela (*Monoclonal Rabbit Anti-Human PD-L1, Clone SP142, Roche/Ventana medical systems, Tucson, Arizona, United States*) (109), a zbog već navedenih karakteristika imunohistohemijskog bojenja u tumorskim ćelijama, uz istovremenu jasnu pozitivnu reakciju u imunološkim ćelijama tumorske strome, i kod ova tri slučaja se (kao i kod ostalih 17 PD-L1 pozitivnih slučajeva) radilo o inducibilnom tipu ekspresije. Pregledom literature nailazi se na molekularne studije u kojima su opisani regulatorni mehanizmi koji se nalaze u osnovi inducibilne kao i konstitutivne ekspresije PD-L1 proteina u karcinomu dojke (110), ali ne i njihova očekivana distribucija. Prema raspoloživim podacima u naučnoj literaturi, u našoj studiji je po prvi put izvršena identifikacija obrasca PD-L1 ekspresije u ranom karcinomu dojke na osnovu interpretacije imunohistohemijskog bojenja. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je inducibilni obrazac PD-L1 ekspresije dominantan u odnosu na konstitutivni u ranom karcinomu dojke, što bi mogao biti jedan od argumenata za primjenu imunološke terapije u ranijim stadijumima ove bolesti (111).

Na osnovu imunohistohemijske analize PD-L1 ekspresije u imunološkim ćelijama tumorske mikrookoline u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke, u našoj studiji utvrđena je pozitivnost u 21,2% slučajeva. Prilikom upoređivanja dobijenih rezultata sa prethodno publikovanim, moraju se imati u vidu velike razlike u eksperimentalnom dizajnu, koje se ogledaju prvenstveno u primjeni različite metodologije za evaluaciju PD-L1 ekspresije od strane različitih autora, ali i uzorka na kom su analize vršene. U manjem broju studija prisustvo PD-L1 ekspresije utvrđeno je primjenom molekularnih tehnika, dok se većina autora služila imunohistohemijom, primjenjujući pri tome širok spektar različitih antitijela i drugačije sisteme skorovanja (uključujući procjenu PD-L1 ekspresije u različitim ćelijskim populacijama), kao i različite granične vrijednosti pri kojima je ekspresija ovog markera smatrana pozitivnom. Pojedini autori su prisustvo PD-L1 ekspresije analizirali na ćelijskim kulturama, čime je u potpunosti zanemaren značaj ekspresije ovog proteina u ćelijama tumorske mikrookoline. U našoj studiji korišćen je imunohistohemijski Ventana PD-L1 (SP142) esej, dizajniran kao „*companion diagnostics*“ test za procjenu kliničkog benefita od primjene atezolizumaba u lokalno uznapredovalom i metastatskom TNBC, a interpretacija rezultata vršena je prema uputstvima iz zvaničnog pratećeg vodiča, što se može smatrati dobrim preduslovom za dobijanje validnih i relevantnih rezultata (112).

S druge strane, imajući u vidu intratumorsku heterogenost i činjenicu da je PD-L1 ekspresija u karcinomu dojke rijetko difuznog karaktera, pojedini autori doveli su u pitanje pouzdanost imunohistohemijske analize ekspresije ovog markera na TMA, sugerišući da bi ista mogla rezultirati lažno nižim procentom PD-L1 tumora u ispitivanim uzorcima (113, 114). Pregledom literature izdvajamo studiju u kojoj upoređivanjem PD-L1 statusa kod karcinoma dojke određenog na TMA i na isječcima sa hirurški dobijenog materijala nije utvrđeno značajno odstupanje u dobijenim rezultatima (87), ali i na jednu studiju u kojoj je za čak polovinu PD-L1 negativnih slučajeva koji su inicijalno analizirani na TMA utvrđeno da se radilo o lažno negativnom rezultatu nakon naknadne analize na originalnim isječcima sa operativnog materijala (114). Ovaj problem pokušali smo da prevaziđemo ciljanim odabirom intratumorskih lokusa za izradu dva TMA prečnika 3 mm po pacijentkinji, nakon prethodne analize hirurški dobijenih isječaka na standardnim HE obojenim rezovima, fokusirajući se na invazivni front tumora gdje je uočena veća gustina TIL. Uprkos preduzetim mjerama, neophodno je imati u vidu da bi stvarni procenat PD-

L1 pozitivnih tumora u našem uzorku mogao biti nešto viši da je imunohistohemijska analiza vršena na isječcima sa operativnog materijala.

Uzimajući sve navedeno u obzir, dobijeni rezultat je komparabilan sa rezultatima koje su publikovali *Muenst* i saradnici, u čijem je uzorku od 650 slučajeva karcinoma dojke 23% bilo PD-L1 pozitivno (87), kao i *Sabatier* i saradnici, koji su na velikom uzorku od 5.454 karcinoma dojke identifikovali PD-L1 ekspresiju u 20% slučajeva (89). Veći procenat PD-L1 pozitivnih tumora, čak 50% u uzorku od 44 karcinoma dojke, detektovali su *Ghebeh* i saradnici (86), dok su značajno manji broj pozitivnih slučajeva prijavili *Mitendorf* i saradnici, sa svega 19% slučajeva pozitivne PD-L1 ekspresije u ispitanih 105 TNBC (u poređenju sa 42,1% pozitivnih TNBC u našem uzorku) (61). Iako su i ovi autori PD-L1 ekspresiju analizirali upotrebom imunohistohemije, varijacije u zastupljenosti PD-L1 pozitivnih tumora između opisanih uzoraka najvjerovatnije su uslovljene prethodno opisanim razlikama u metodologiji. Načelno, najveći procenat PD-L1 pozitivnih tumora u ispitivanim uzorcima registrovan je u studijama gdje je ekspresija ovog gena procjenjivana na osnovu ekspresije specifične informacione RNK (iRNK). Na primjer, *Schalper* i saradnici su na uzorku od 636 karcinoma dojke detektovali prisustvo PD-L1 ekspresije u čak 58% slučajeva (115). Međutim, viša učestalost PD-L1 ekspresije u ovim studijama, u poređenju sa studijama koje su se prilikom analize oslanjale na imunohistohemiju, može se objasniti činjenicom da ekspresija iRNK često ne korelira sa stvarnom ekspresijom njome kodiranog proteina (87).

Nasuprot rezultatima najvećeg broja studija, u kojima je prisustvo PD-L1 ekspresije bilo statistički značajno udruženo sa TNBC (66, 67, 70, 88, 89), slično nalazu *Muenst* i saradnika (87), u našoj studiji ova povezanost nije dostigla statistički značaj ($p = 0,07$) iako je najveći broj PD-L1 pozitivnih slučajeva registrovan upravo među ovim tumorima. Iako se razlog za ovu diskrepancu može tražiti u relativno maloj veličini ispitivanog uzorka u našoj studiji, ponovo je neophodan osvrt na razlike u eksperimentalnom dizajnu našeg i pomenutih istraživanja. Naime, ispitivanje prisustva PD-L1 ekspresije isključivo u populaciji tumorskih ćelija, kao što je slučaj u studiji koju su sproveli *Ali* i saradnici, moglo bi rezultirati lažno većim procentom pozitivnih slučajeva među TNBC, što u određenoj mjeri nagovještavaju i naši rezultati, gdje je PD-L1 ekspresija od strane tumorskih ćelija registrovana samo u tumorima trostruko negativnog fenotipa. Ovakvog stava su i *Stovgaard* i saradnici, koji su ustanovili da bi se analizom ekspresije ovog

markera u imunološkim ćelijama tumorske mikrookoline veći procenat PD-L1 pozitivnih tumora registrovao među drugim molekularnim podtipovima karcinoma dojke, a naročito u neluminalnom HER-2 pozitivnom podtipu (56). Takođe, novija istraživanja pokazala su da se imunogenost karcinoma dojke kroz proces imunološke selekcije smanjuje sa progresijom bolesti (99). Iz ovog razloga, diskrepanca između naših i prethodno publikovanih rezultata mogla bi se pripisati odabiru ranog karcinoma dojke za analizu ekspresije PD-L1 proteina, gdje se veća gustina sTIL češće može uočiti i među tumorima ostalih molekularnih podtipova (mimo TNBC) (100).

Mogućnost postojanja razlike i u prediktivnoj vrijednosti PD-L1 kao biomarkera za selekciju pacijentkinja podobnih za imunoterapiju između ranog i uznapređovalog karcinoma dojke sugerisana je od strane pojedinih autora (85), prvenstveno na osnovu rezultata najvećih kliničkih studija koje su se bavile ispitivanjem efekata ove terapije u TNBC. Naime, prema rezultatima Impassion031 kliničke studije, neoadjuvantnom primjenom atezolizumaba uz standardnu hemioterapiju u ranom TNBC postignut je veći procenat patološkog kompletnog odgovora (pCR), kako u ukupnoj ispitivanoj (*intention to treat* – ITT) populaciji tako i u PD-L1 pozitivnoj grupi pacijentkinja, bez obzira na PD-L1 status testiran Ventaninim SP142 esejom (116). Takođe, u Keynote-522 studiji, neoadjuvantnim tretmanom pembrolizumabom u kombinaciji sa hemioterapijom, nasuprot primjeni standardnog hemioterapijskog režima, postignut je viši procenat pCR kod pacijentkinja sa ranim TNBC, nezavisno od PD-L1 CPS (22C3) statusa (117). Međutim, u Impassion131 studiji nijesu postignuti bolji ishodi u liječenju PD-L1 pozitivnog uznapređovalog/metastatskog TNBC kod pacijentkinja koje su uz hemioterapiju primale i atezolizumab (84). Zbog toga je prepoznata potreba za dodatnim istraživanjima s ciljem definisanja potencijalnih specifičnosti i razlika u primjeni PD-L1 kao biomarkera u ranom i uznapređovalom karcinomu dojke, kao i njegovoj optimizaciji u rutinskoj primjeni (85).

Prisustvo i gustina TIL smatraju se snažnim prognostičkim i prediktivnim biomarkerom, uprkos kompleksnosti i nepotpunom razumijevanju mehanizama uključenih u antitumorski imunološki odgovor u karcinomu dojke (22), a značaj rutinske kvantifikacije TIL u TNBC i neluminalnom HER-2 pozitivnom karcinomu dojke sugerisan je i od strane Svjetske zdravstvene organizacije u petom izdanju Klasifikacije tumora dojke (8). U

našoj studiji, prilikom upoređivanja gustine sTIL, izražene na semikvantitativan način, između različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike ($p = 0,03$). Dodatnim analizama utvrđeno je značajno češće prisustvo oskudnog sTIL kod karcinoma Luminal A podtipa u odnosu na TNBC, uz ravnomjernu distribuciju među ostalim molekularnim podtipovima, dok statistički značajna razlika u distribuciji umjerenih i difuznih sTIL nije registrovana. Poređenjem prosječne gustine sTIL izražene kao kontinuirane varijable (u procentima) kod različitih molekularnih podtipova karcinoma dojke, pored tumora Luminal A podtipa, pokazano je da i Luminal B HER-2 negativni tumori imaju statistički značajno manju gustinu sTIL u odnosu na TNBC.

Analizom PD-L1 ekspresije u odnosu na gustinu sTIL u našoj studiji utvrđena je jaka pozitivna korelacija između navedenih parametara, u smislu statistički visoko značajno češće pojave PD-L1 ekspresije kod tumora sa difuznim sTIL u odnosu na umjerene i oskudne ($p < 0,001$), kao i statistički značajno većom prosječnom gustinom sTIL u PD-L1 pozitivnim tumorima ($p = 0,01$). Prema našim saznanjima, a na osnovu informacija dostupnih u literaturi, u našoj studiji je po prvi put statističkim metodama utvrđena granična vrijednost gustine sTIL (53%), iznad koje se sa visokom dijagnostičkom tačnošću može predvidjeti postojanje PD-L1 ekspresije u ranom karcinomu dojke.

Kada je u pitanju gustina sTIL u različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke, naši rezultati se u velikoj mjeri podudaraju s rezultatima velikog broja studija koje su izdvojile TNBC kao molekularni podtip s najvećom gustinom sTIL (91-94, 113, 114). To je, uz visok stepen mutacijskog opterećenja i ranije pomenut veći procenat detektovane PD-L1 ekspresije, bio dodatni argument da se TNBC proglasi najimunogenijim podtipom karcinoma dojke (100). O prognostičkoj ulozi sTIL u ranom TNBC je već bilo riječi, a kada je u pitanju njihov značaj u predikciji odgovora na imunoterapiju, posljednjih godina se u literaturi nailazi na veliki broj studija kako kod ranog tako i kod metastatskog karcinoma dojke. Najinteresantnija opservacija odnosila se upravo na razlike u tumorskoj mikrookolini između ranog i uznapredovalog/metastatskog TNBC, gdje je uočena deplecija efektorskih imunoloških ćelija, s manjom gustinom sTIL u kasnijim stadijumima TNBC (78).

Korelacija između PD-L1 statusa i gustine sTIL je pokazana i u IMpassion130 studiji kod metastatskog TNBC, pri čemu sama gustina sTIL nije pokazala udruženu s boljim ukupnim preživljavanjem (*overall survival* – OS) i dužinom preživljavanja bez progresije bolesti (*progression-free survival* – PFS) u kontrolnoj grupi PD-L1 pozitivnih pacijentkinja koje uz nab-paklitaksel nijesu primale atezolizumab (78). S druge strane, gustina sTIL pokazala se kao dobar prediktor povoljnog odgovora na imunoterapiju, kao i boljeg kliničkog ishoda kod pacijentkinja sa PD-L1 pozitivnim tumorima (78), što je u skladu i sa rezultataima analize ovih biomarkera u sklopu KEYNOTE-086 i KEYNOTE-119 studije, gdje je pembrolizumab korišćen kao monoterapija u metastatskom TNBC (118, 119).

Kada je u pitanju rani TNBC, uloga sTIL u predikciji odgovora na inhibitore imunoloških kontrolnih tačaka još uvijek nije u potpunosti rasvijetljena (100). Na primjer, u II fazi GeparNuevo kliničke studije veća gustina sTIL dovedena je u vezu sa pCR, kako u eksperimentalnoj grupi koja je uz hemioterapiju primala i durvalumab tako i u kontrolnoj grupi koja je uz hemioterapiju dobijala placebo. Multivarijantnom analizom utvrđeno je da je porast u TIL tokom terapije pokazao povezanost sa pCR u eksperimentalnoj grupi, ali ne i u kontrolnoj grupi (120, 121). Slično ovim rezultatima, u Ib fazi KEYNOTE-173 studije i II fazi randomizovane I-SPY2 kliničke studije, koje su procjenjivale efekat neoadjuvantne primjene pembrolizumaba uz hemioterapiju kod ranog TNBC i HER-2 negativnog karcinoma dojke, ustanovljena je povezanost između veće inicijalne gustine sTIL i pCR (122, 123). Iako rezultati navedenih studija ukazuju na to da bi sTIL mogli biti prediktor dobrog kliničkog odgovora na imunoterapiju, neophodno ih je interpretirati sa oprezom. Naime, većina analiza ovih biomarkera bila je eksplorativnog karaktera i sTIL nijesu bili uključeni u stratifikacione faktore, izuzev GeparNuevo studije, u kojoj gustina sTIL nije pokazala specifičnu povezanost sa odgovorom na durvalumab. Iz tog razloga pojedini autori smatraju da značaj prognostičke i prediktivne uloge sTIL zahtijeva nezavisnu prospektivnu validaciju u randomizovanim kliničkim studijama (100).

Ispitujući prognostičku ulogu TIL u ranom HER-2 pozitivnom karcinomu dojke, slično kao i kod TNBC, brojne studije su utvrdile pozitivnu korelaciju između gustine sTIL i povoljnog odgovora na neoadjuvantnu terapiju (124-126), a dokazan je i njihov značaj u adjuvantnom liječenju gdje je veća gustina sTIL pokazala povezanost sa boljim odgovorom i na anti-HER-2 terapiju (trastuzumab) i na hemioterapiju (22, 127-129).

Međutim, pregledom dostupne literature ne nailazi se na studije u kojima je ispitivana prognostička i prediktivna vrijednost PD-L1 statusa u ranom HER-2 pozitivnom karcinomu dojke.

Prognostička i prediktivna uloga TIL u uznapredovalim stadijumima HER-2 pozitivnog karcinoma dojke manje su jasne. U CLEOPATRA studiji, *Luen* i saradnici ustanovili su da je prosječna dužina preživljavanja (OS) pacijentkinja sa gušćim sTIL (>20%) u tumorskoj mikrookolini bila značajno veća nezavisno od toga da li su liječene prvom linijom terapije (trastuzumab uz docetaksel) sa ili bez dodatka pertuzumaba. Ovakav nalaz objašnjen je mogućnošću potencijacije pojedinih efekata anti-HER-2 terapije od strane funkcionalnog antitumorskog odgovora efektorskih T limfocita (130). S druge strane, analizom rezultata III faze MA.31 studije, slična asocijacija sTIL sa terapijskim odgovorom i prognozom nije uočena, mada je granična vrijednost sTIL iznad koje je gustina intratumorskog inflamatornog infiltrata smatrana visokom u ovoj studiji bila značajno niža (5%) (131). Iako naizgled oprečni, rezultati ovih studija označili su početak ispitivanja imunogenosti HER-2 pozitivnog karcinoma dojke, kao i mogućnosti primjene inhibitora imunoloških kontrolnih tačaka u liječenju ovog molekularnog podtipa tumora (100). Efekti kombinacije pembrolizumaba i trastuzumaba u liječenju pacijentkinja sa metastatskim HER-2 pozitivnim karcinomom dojke koje su imale progresiju bolesti na trastuzumab, ispitivani su u sklopu PANACEA studije, čiji su rezultati pokazali bolji terapijski odgovor kod pacijentkinja sa PD-L1 pozitivnim tumorima, pri čemu su tumori iz ove grupe imali načelno veću gustinu sTIL (132). Rezultati PANACEA studije ukazali su na to da bi pacijentkinje sa HER-2 pozitivnim karcinomima dojke, koji eksprimiraju PD-L1 ili imaju gust sTIL, mogle imati benefit od kombinacije imunološke i anti-HER-2 ciljane terapije. Međutim, u KATE2 studiji nijesu postignuti bolji ishodi u liječenju kod pacijentkinja sa PD-L1 pozitivnim tumorima koje su uz trastuzumab emtansin (T-DM1) primale atezolizumab. S druge strane, PFS i OS bili su statistički značajno duži kod pacijentkinja čiji su tumori sadržali veću količinu sTIL ($\geq 5\%$), ukoliko je u terapiji korišćen atezolizumab, u odnosu na pacijentkinje koje su primale placebo (133). Iako je upoređivanje rezultata ovih studija u velikoj mjeri otežano razlikama u metodološkom pristupu (različite prethodne terapijske linije, upotreba drugačijih uzoraka za morfološku i imunohistohemijsku analizu, različite granične vrijednosti sTIL i sl.), većina autora smatra da su do sada postignuti ishodi u liječenju uznapredovalog HER-2

pozitivnog karcinoma dojke imunološkom terapijom nezadovoljavajući (132-134), te da bi, uz istraživanja koja će biti usmjerena na resvjetljavanje kompleksnih interakcija imunoloških ćelija u mikrookolini HER-2 pozitivnog karcinoma dojke, u narednim fazama kliničkih studija neophodna bila stratifikacija PD-L1 pozitivnih pacijentkinja prema konsenzusom definisanoj vrijednosti gustine sTIL (100).

Steroidni hormon-pozitivni HER-2 negativni (HR+/HER2-) karcinomi dojke smatraju se najmanje imunogenim podtipovima ovih tumora (100). Istraživanja su pokazala njihovu udruženost s manjom gustinom TIL kao i manjim mutacijskim opterećenjem, što se objašnjava uticajem ekspresije ER na supresiju signalizacije posredovane IFN- γ , nižu ekspresiju MHC molekula klase II na tumorskim ćelijama, kao i smanjenje citolitičke funkcije CD8 T limfocita (135-137). Međutim, u posljednje vrijeme sve više pažnje posvećuje se ispitivanju heterogenosti imunoloških ćelija u mikrookolini ovih tumora, jer bi identifikacija veoma malog procenta imunogenih slučajeva među njima mogla imati značajan uticaj na kliničku praksu, imajući u vidu činjenicu da se radi o najprevalentnijim podtipovima karcinoma dojke (100).

U okviru velikih retrospektivnih studija koje su se bavile procjenom prognostičke uloge TIL u ranom HR+/HER2- karcinomu dojke dobijeni su različiti rezultati. Dok su pojedini autori došli do zaključka da gustina sTIL nema prognostički značaj u ovim podtipovima ranog karcinoma dojke (138, 139), drugi su ustanovili povezanost veće gustine sTIL sa nepovoljnom prognozom u smislu većeg rizika od recidiva i lošijeg ukupnog preživljavanja (140, 141). Potencijalni razlozi za ove nepodudarnosti su brojni, a prvenstveno se mogu tražiti u metodološkim razlikama, poput velike heterogenosti testiranih uzoraka, kao i načinu procjene i kvantifikacije sTIL.

Prognostička vrijednost sTIL u odgovoru na neoadjuvantnu hemioterapiju kod pacijentkinja sa HR+/HER2- ranim karcinomom dojke ispitivana je u preglednoj studiji kojom su obuhvaćene 832 pacijentkinje, kao i u okviru meta-analize četiri studije sa ukupno 2836 pacijentkinja. U prvoj studiji, koju je sprovedla njemačka istraživačka grupa za karcinom dojke, veća gustina sTIL u HR+/HER2- tumorima bila je statistički značajno udružena sa kraćim ukupnim preživljavanjem (124), što su potvrdili Gao i saradnici u svojoj metaanalizi (142). Nijedna od ove dvije grupe autora u svojim studijama nije identifikovala povezanost između sTIL i dužine preživljavanja bez bolesti (*disease-free*

survival - DFS) (124, 142). Prediktivna uloga sTIL kod neoadjuvantne hemioterapije, u smislu postizanja pCR, ovih tumora je takođe kontroverzna. Naime, njemačka grupa istraživača je u svojoj objedinjenoj studiji pokazala statistički visoko značajnu povezanost ($p < 0,001$) između gustine sTIL i pCR, koji je postignut kod 6% pacijentkinja sa niskim sTIL (0-10%), 11% pacijentkinja sa sTIL umjerene gustine (11-59%) i 28% pacijentkinja sa visokom gustinom sTIL (60-100%) (124), međutim Gao i saradnici nijesu potvrdili postojanje ove povezanosti u svojoj meta-analizi (142).

U naučnoj zajednici trenutno preovladava mišljenje da rutinska procjena sTIL u ranom HR+/HER2- karcinomu dojke nema prognostički značaj, niti se može koristiti kao prediktivni biomarker (135). Uzimajući u obzir da su terminom „HR+/HER-2- karcinom dojke“ obuhvaćena dva molekularna podtipa tumora, luminal A i luminal B HER-2 negativni karcinom dojke, koji se međusobno razlikuju po stepenu zavisnosti od endokrine signalizacije (143, 144) kao i po cjelokupnoj prognozi, prepoznata je potreba daljih istraživanja u smislu rasvjetljavanja eventualnog postojanja inverznog prognostičkog značaja sTIL u ovim tumorima, na koji su ukazale navedene studije. Većina autora saglasna je da HR+/HER-2- tumore ne treba posmatrati kao cjelinu, već ih dalje stratifikovati prema molekularnom podtipu, pa potom ispitati eventualno postojanje varijacija u njihovoj imunološkoj mikrookolini, s posebnim osvrtom na razlike u zastupljenosti imuno-supresivnih i imuno-aktivišućih subpopulacija ćelija u njoj (100).

Peritumorski limfoidni agregati ili tercijarne limfoidne strukture (TLS) odnedavno su prepoznati kao još jedan biomarker aktivnog antitumorskog imunološkog odgovora (94). Bez obzira da li se radi o fokalnim nakupinama limfocita ili jasno formiranim folikulima s vidljivim germinativnim centrima, unutar ovih struktura, pored T limfocita, nalazi se i značajan broj B limfocita (94) čija je uloga u imunološkom odgovoru na prisustvo tumora postala predmet velikog broja istraživanja. Načelno, studije su pokazale udruženost TLS na granici između tumora i okolnog tkiva sa dobrom prognozom i povoljnim odgovorom na terapiju inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka, čak i kod tumora sa niskim mutacijskim opterećenjem (145). Iako je povezanost TLS sa povoljnom prognozom kod karcinoma dojke identifikovana u više studija (94, 146-149), pregledom dostupne literature nailazi se samo na jednu studiju američke grupe autora (*Cimino-Mathews* i saradnici) u kojoj su ispitivane karakteristike TLS u odnosu na imunofenotip karcinoma dojke i prisustvo PD-L1 ekspresije.

U našoj studiji analizirali smo karakteristike peritumorskih limfoidnih agregata u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke, kao i njihovu udruženost sa PD-L1 ekspresijom. Statističkom analizom otkrivena je umjerena pozitivna korelacija između molekularnog podtipa karcinoma dojke i vrste limfoidnog agregata, a daljim analizama je utvrđeno da se umjereno razvijeni limfoidni agregati statistički značajno češće javljaju kod TNBC, dok su fokalni najzastupljeniji u tumorima luminal A molekularnog podtipa. Uprkos razlikama u metodološkom pristupu, ovi rezultati su djelimično komparabilni s rezultatima koje su objavili *Cimino-Mathews* i saradnici, gdje su odsutni/fokalni agregati identifikovani kao dominantni tip TLS kod luminalnih molekularnih podtipova, dok je distribucija različitih tipova TLS bila relativno uniformna među HER-2 pozitivnim i basal-like tumorima (94).

Analizom udruženosti PD-L1 ekspresije sa prisustvom i karakteristikama peritumorskih limfoidnih agregata u ranom karcinomu dojke u našoj studiji, ustanovili smo da se PD-L1 pozitivnost značajno češće javlja u tumorima sa većom gustinom peritumorskih infiltrata. Do sličnog zaključka došli su i *Cimino-Mathews* i saradnici u svojoj studiji, nakon što su registrovali prisustvo peritumorskih limfoidnih agregata u 59% PD-L1 pozitivnih tumora u svom uzorku (94). Međutim, interesantna je opservacija da, uprkos većeg procenta PD-L1 ekspresije u tumorima sa umjereno razvijenim agregatima u odnosu na dobro razvijene u našem uzorku, ova razlika nije bila statistički značajna. Jedinu razliku između ova dva tipa limfoidnih agregata predstavlja prisustvo jasno formiranih limfnih folikula u dobro razvijenim agregatima, što govori u prilog veće procentualne zastupljenosti B limfocita unutar njih. Pretragom trenutno dostupne literature nijesmo uspjeli da pronađemo studije koje su se bavile analizom ekspresije B limfocita u peritumorskim limfoidnim agregatima u kontekstu PD-L1 ekspresije, ali vjerujemo da će ona biti predmet brojnih istraživanja u budućnosti.

Mehanizmi koji se nalaze u osnovi antitumorskog imuniteta još uvijek nijesu kompletno razjašnjeni (54). TIL, kao jedan od najpoznatijih surogat biomarkera antitumorskog imunološkog odgovora u karcinomu dojke, razlikuju se po svojoj prostornoj distribuciji, kao i imunofenotipu i biološkoj funkciji (100). Citotoksični (CD8) T limfociti su generalno prepoznati kao ključna subpopulacija T ćelija koja kontroliše efektivnost antitumorskog imunološkog odgovora (27, 115, 150), dok je uloga CD4 T limfocita i njihovih subpopulacija u antitumorskom odgovoru i progresiji tumora mnogo

kompleksnija i dinamičnija (27). U tom smislu, unutar populacije citotoksičnih T limfocita moguće je izdvojiti posebnu subpopulaciju CD8 pozitivnih rezidentnih memorijskih T ćelija (TRM), dok se *helper* T limfociti mogu detektovati u obliku CD4 pozitivnih Th1, Th2 i Th17 ćelija, regulatornih T ćelija (Treg, koji se karakterišu ekspresijom Forkhead Box P3 proteina – FoxP3), kao i folikularnih T *helper* ćelija (Tfh) (151). Međutim, klinički značaj sastava TIL u različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke i njegov uticaj na evoluciju bolesti još uvijek nije u cjelosti rasvijetljen (23, 151), a podaci o dinamičnim promjenama u distribuciji i zastupljenosti različitih subpopulacija T limfocita u tumorskoj mikrookolini tokom progresije karcinoma dojke prilično su insuficijentni u naučnoj literaturi.

Pojedini autori ukazali su na mogućnost da CD4 i CD8 T limfociti imaju oprečnu ulogu u progresiji karcinoma dojke, kao i različit uticaj na ishod bolesti. Naime, *Huang* i saradnici ustanovili su da Th1 ćelije predstavljaju dominantnu subpopulaciju CD4 T limfocita u stromalnom infiltratu ranog karcinoma dojke, a da porast ukupne količine CD4 limfocita u inflamatornom infiltratu, uz predominaciju Th17 i FoxP3 regulatorne subpopulacije T limfocita, predstavlja indikator progresije bolesti (98). Ista grupa autora u svojoj studiji pokazala je postojanje pozitivne korelacije između apsolutnog broja CD4 T limfocita u stromalnom infiltratu i uznapređovalog stadijuma bolesti (98).

Analizom sastava sTIL u ranom karcinomu dojke, u našoj studiji identifikovane su razlike u apsolutnom broju CD4 T limfocita u inflamatornom infiltratu između pojedinih molekularnih podtipova. Naime, svi molekularni podtipovi ranog karcinoma dojke, izuzev Luminal B HER-2 negativnog, u stromi su sadržali značajno veći broj CD4 pozitivnih T limfocita u odnosu na Luminal A molekularni podtip, a apsolutni broj CD4 limfocita u stromalnom infiltratu bio je statistički značajno veći kod TNBC i Luminal B HER-2 pozitivni u odnosu na Luminal B HER-2 negativni molekularni podtip karcinoma dojke. Nasuprot tome, nije uočena statistički značajna razlika u srednjoj vrijednosti apsolutnog broja CD8 T limfocita po jedinici površine u stromalnom inflamatornom infiltratu između različitih molekularnih podtipova karcinoma dojke. Sličnu opservaciju imali su i *Cimino-Mathews* i saradnici, u čijem je uzorku apsolutni broj CD4 pozitivnih T ćelija po jedinici površine bio značajno veći kod HER-2 pozitivnih i basal-like TNBC u odnosu na luminalne podtipove, dok značajna razlika u broju CD8 T limfocita nije registrovana (94). S druge strane, *Huang* i saradnici u svojoj studiji uočili su statistički

značajnu povezanost između većeg apsolutnog broja CD4 T limfocita u stromalnom infiltratu i prekomjerne ekspresije HER-2 proteina, ali se u njihovom uzorku nalazio izvjestan procenat karcinoma dojke uznapredovalog stadijuma (98).

Nakon stratifikacije našeg uzorka prema dominantnoj subpopulaciji T limfocita u stromalnom inflamatornom infiltratu, izraženoj kroz CD4/CD8 odnos, statistička analiza pokazala je da se isti značajno razlikuje između pojedinih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke. Tako je među TNBC i Luminal B HER-2 pozitivnim karcinomima dojke uočen statistički značajno veći broj tumora sa CD4/CD8 odnosom većim od 1 (odnosno predominacija CD4 T limfocita u stromalnom infiltratu), dok su karcinomi luminal A molekularnog podtipa izdvojeni kao tumori sa značajno većom zastupljenošću CD8 T limfocita u stromalnom infiltratu (CD4/CD8 odnos manji od 1). Na osnovu dostupnih podataka u naučnoj literaturi, u našoj studiji je ovakva analiza stromalnog infiltrata po prvi put izvršena u različitim molekularnim podtipovima ranog karcinoma dojke. *Huang* i saradnici u već pomenutoj retrospektivnoj studiji nijesu identifikovali značajnu povezanost između CD4/CD8 odnosa i imunofenotipa tumora (statusa ER i HER-2), ali su na osnovu podataka iz onkološkog kartona pacijentkinja ustanovili povezanost CD4/CD8 odnosa većeg od 1,2 sa lošom prognozom (98). U tom kontekstu, naši rezultati su u duhu zaključaka meta-analize koju su *Prat* i saradnici sprovedi na 1.834 uzorka karcinoma dojke, a u kojima su tumori luminal A i TNBC molekularnog podtipa izdvojeni kao oni sa najboljom, odnosno najlošijom prognozom (kada se u obzir uzme primjena svih dostupnih terapijskih modaliteta) (152). Interesantan je nalaz višeg CD4/CD8 odnosa u tumorima luminal B HER-2+ molekularnog podtipa u našem uzorku, za koji je objašnjenje potrebno tražiti u kliničkom praćenju ovih pacijentkinja tokom perioda ne kraćeg od 5 godina.

Imajući u vidu kompleksnost i dinamičnost antitumorskog imunološkog odgovora, kao i primijećene nedostatke rutinske upotrebe PD-L1 kao prediktivnog biomarkera za primjenu imunoterapije, pojavilo se mišljenje da bi, pored gustine sTIL, ćelijski sastav intratumorskog inflamatornog infiltrata mogao imati odlučujuću ulogu prilikom selekcije PD-L1 pozitivnih pacijentkinja koje će zaista imati benefit od terapije inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (56, 94-96). Naime, u III fazi IMpassion130 studije, pokazan je benefit od terapije atezolizumabom uz nab-paklitaksel, u smislu ukupnog preživljavanja i dužine preživljavanja bez progresije bolesti kod pacijentkinja sa PD-L1

pozitivnim tumorima i predominacijom CD8 T limfocita u tumorskoj stromi u odnosu na PD-L1 pozitivne slučajeve sa redukovanom populacijom CD8 T limfocita. Interesantno je da se klinički ishod nije razlikovao između pacijentkinja sa različitim brojem CD8 T limfocita u tumorskoj stromi ukoliko istovremeno u obzir nije uzet PD-L1 status (78).

Slično rezultatima koje su publikovali *Mittendorf* i saradnici (61), *Muenst* i saradnici (87) kao i *Sabatier* i saradnici (89), i u našoj studiji identifikovana je povezanost između većeg apsolutnog broja CD8 T limfocita u stromalnom infiltratu karcinoma dojke i PD-L1 ekspresije. Međutim, za razliku od pomenutih istraživanja, u našoj studiji se ista opservacija odnosila i na apsolutni broj CD4 T limfocita, čija je prosječna vrijednost takođe bila značajno veća kod PD-L1 pozitivnih u odnosu na PD-L1 negativne tumore.

S druge strane, analizom našeg uzorka nijesmo identifikovali statistički značajnu predominaciju jedne subpopulacije T limfocita u odnosu na drugu (CD8 u odnosu na CD4) u stromalnom infiltratu PD-L1 pozitivnih tumora. Razlog za ovakav nalaz može se tražiti u našem odabiru ranog karcinoma dojke za ispitivani uzorak, naročito ako se imaju u vidu rezultati studija koje su pokazale da CD4 T limfociti brže prožimaju tumorsko tkivo u odnosu na CD8 T limfocite sa progresijom bolesti, što ih čini dominantnom limfocitnom subpopulacijom u stromalnom infiltratu uznapredovalog karcinoma dojke (98). Uzimajući u obzir dinamične promjene u sastavu intratumorskog limfocitnog infiltrata (predominantno unutar populacije CD4 T limfocita) u toku razvoja malignih tumora dojke, u kontekstu optimizacije PD-L1 ekspresije kao biomarkera u karcinomu dojke u budućim istraživanjima bilo bi interesantno analizirati ekspresiju pojedinih subpopulacija CD4 T limfocita u inflamatornom infiltratu, a naročito FoxP3 pozitivnih regulatornih T limfocita čije se prisustvo smatra glavnom preprekom u postizanju efektivnog antitumorskog imuniteta ili/i dobrog odgovora na imunoterapiju (98).

Ispitujući povezanost PD-L1 ekspresije sa standardnim kliničko-patološkim prognostičkim parametrima u ranom karcinomu dojke, u našoj studiji identifikovali smo povezanost ekspresije ovog markera sa visokim histološkim gradusom, kao i višom mitotskom aktivnošću tumora, što je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima (86-90).

S druge strane, za razliku od drugih autora nijesmo ustanovili povezanost između PD-L1 ekspresije i veličine tumora, odnosno pT stadijuma (86, 87, 89), kao ni češćeg prisustva

sekundarnih depozita u aksilarnim limfnim čvorovima (87, 90). Međutim, prilikom komparacije navedenih rezultata, potrebno je imati u vidu da su u svim ovim studijama analize vršene na uzorku koji se sastoji od pacijentkinja u različitim stadijumima bolesti, uključujući uznapredovali karcinom dojke, dok se naš uzorak sastojao isključivo od pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke, što je i najvjerojatniji razlog za diskrepancu u rezultatima. U prilog ovoj pretpostavci govori i publikacija *Kitano* i saradnika, koji u svojoj studiji na ranom karcinomu dojke, kao ni mi, nijesu detektovali povezanost između PD-L1 ekspresije i veličine tumora, statusa regionalnih limfnih čvorova i kliničkog stadijuma bolesti (88).

Uzimajući u obzir da je standardizacija uzorka u našoj studiji vršena u odnosu na starosnu dob pacijentkinja u svakoj od pet ispitivanih grupa, može se reći da je dobijeni rezultat odsustva značajne povezanosti PD-L1 ekspresije sa starosnom dobi pacijentkinja bio očekivan. Međutim, do istih rezultata došli su brojni drugi autori (86, 88, 89) u čijim uzorcima distribucija ispitanica u odnosu na starosnu dob nije bila toliko uniformna. Izuzetak su rezultati koje su publikovali *Muenst* i saradnici, u čijem su uzorku pacijentkinje sa PD-L1 pozitivnim tumorima bile statistički značajno mlađe u odnosu na pacijentkinje kod kojih ekspresija ovog proteina nije bila prisutna (87).

Na najveća odstupanja u odnosu na prethodno publikovane rezultate naišli smo prilikom ispitivanja povezanosti PD-L1 ekspresije sa ekspresijom steroidnih receptora i HER-2 proteina. U najvećem broju objavljenih studija detektovana je statistički značajna povezanost PD-L1 ekspresije i pozitivnog HER-2 statusa, kao i odsustva ekspresije receptora steroidnih hormona (86, 89, 90), dok u našoj studiji nije detektovana bilo kakva udruženost između ekspresije PR, HER-2 proteina i PD-L1 statusa. Nalaz je bio nešto drugačiji kada je u pitanju ekspresija ER, jer je među PD-L1 pozitivnim slučajevima ranog karcinoma dojke uočen značajno veći procenat ER negativnih u odnosu na ER pozitivne ($p < 0,05$). U svijetlu nalaza odsustva korelacije između PD-L1 ekspresije i molekularnog podtipa karcinoma dojke u našem uzorku, ovakvi rezultati nijesu iznenađujući, a pored relativno malog uzorka mogu se objasniti činjenicom da se uzorak sastojao isključivo od slučajeva ranog karcinoma dojke, o čemu je već bilo riječi. S druge strane, potrebno je imati u vidu da je u većini pomenutih studija PD-L1 status procenjivan na populaciji tumorskih ćelija, a u studiji koju su sproveli *Ghebeh* i saradnici korelacija

između ekspresije steroidnih receptora HER-2 i PD-L1 statusa bila je odsutna u istom uzorku kada je PD-L1 status bio procjenjivan u populaciji TIL (86).

U dostupnoj naučnoj literaturi postoji veoma mali broj studija u kojima je ispitivana povezanost između PD-L1 ekspresije i histološkog tipa karcinoma dojke. U uzorku koji su obradili *Sabatier* i saradnici statistički značajno veći broj PD-L1 pozitivnih tumora registrovan je među invazivnim duktalnim karcinomima (NST) u odnosu na druge histološke tipove (89). U našoj studiji utvrdili smo marginalnu korelaciju između PD-L1 ekspresije i histološkog tipa karcinoma dojke (invazivnog karcinoma dojke, NST) iako analize nijesu pokazale statistički značajnu povezanost između ovih varijabli ($p = 0,09$). Razlog za izostanak statistički značajne korelacije može se tražiti u načinu na koji smo stratifikovali uzorak. Naime, prema 5. izdanju WHO klasifikacija tumora dojke (8), medularni karcinom više nije poseban entitet, već se tumori sa morfološkim karakteristikama medularnog karcinoma opisuju u sklopu spektra morfoloških varijacija invazivnog karcinoma dojke, NST. Međutim, kako je osnovna karakteristika medularnog karcinoma upravo prisustvo gustog, difuznog limfocitnog infiltrata u stromi, što bi moglo povećati vjerovatnoću da se među ovim tumorima nađe veći broj PD-L1 pozitivnih, odlučili smo se da ga prilikom statističke obrade izdvojimo kao poseban entitet. U našem uzorku nalazila su se dva tumora sa navedenim morfološkim karakteristikama i oba su bila PD-L1 pozitivna. *Sabatier* i saradnici u svojoj studiji registrovali su PD-L1 ekspresiju u skoro 50% medularnih karcinoma dojke (89), a na visoku zastupljenost ekspresije ovog markera u medularnom tipu karcinoma dojke ukazali su i *Dill* i saradnici, u čijem je uzorku 54% medularnih karcinoma pokazalo PD-L1 pozitivnost (153). U istoj studiji, PD-L1 pozitivnost notirana je u 40% metaplastičnih karcinoma dojke (153), dok je u našoj studiji jedan od dva metaplastična karcinoma ispoljio PD-L1 ekspresiju. Uzimajući u obzir da je ova problematika do danas obrađivana u svega dvije studije, u kojima je procjena PD-L1 ekspresije vršena različitim metodama (mRNK i imunohistohemija) i na različitim ćelijskim populacijama, može se reći da su za rasvjetljavanje učestalosti i značaja PD-L1 ekspresije u specijalnim tipovima karcinoma dojke, koji su sami po sebi rijetki (8), neophodne studije sa ciljanim formiranjem većih uzoraka i standardizovanom metodologijom za evaluaciju PD-L1 statusa.

Rezultati do kojih smo došli u okviru prezentovanog doktorskog istraživanja ukazuju na to da je distribucija PD-L1 ekspresije među različitim molekularnim podtipovima veoma

heterogena, a da je dominantno uslovljena većom gustinom intra i peritumorskog limfocitnog infiltrata. Pored gustine sTIL, veći apsolutni broj CD4 i CD8 T limfocita u stromalnom infiltratu PD-L1 pozitivnih tumora predstavlja dodatni argument za interpretaciju ekspresije PD-L1 u kontekstu gustine i sastava inflamatornog infiltrata tumorske mikrookoline, umjesto kao izolovanog biomarkera kao što to aktuelni vodiči nalažu.

Jedno od najvećih ograničenja naše studije bila je veličina uzorka, koja je direktno uslovljena strogim kriterijumima selekcije (terapijski „naivne”, hirurški liječene pacijentkinje sa ranim karcinomom dojke), te dostupnošću i suficijentnošću arhiviranih FFPE uzoraka za neophodne dalje analize i, konačno, činjenicom da se radi o crnogorskoj populaciji koja broji relativno malo stanovnika. Nažalost, nijesmo bili u mogućnosti da studiju dopunimo podacima o toku bolesti i preživljavanju, jer za najveći procenat pacijentkinja uključenih u studiju nije prošlo dovoljno vremena od postavljanja dijagnoze za ovakvu vrstu analiza.

U zaključku, za optimizaciju PD-L1 ekspresije kao biomarkera u karcinomu dojke neophodne su studije na velikim uzorcima, koje će unaprijediti razumijevanje dinamičnih promjena u gustini i udjelu različitih subpopulacija T i B limfocita u intra i peritumorskom inflamatornom infiltratu PD-L1 pozitivnih tumora nezavisno od pripadnosti određenom molekularnom podtipu, i razjasniti njihov uticaj na tok bolesti i preživljavanje pacijentkinja. Kao što je već nagoviješteno skorašnjim studijama o imunogenosti karcinoma dojke, rezultati budućih studija u ovoj oblasti mogli bi dovesti do otklona od paradigme ekskluzivne primjene imunološke terapije u liječenju uznapredovalog i metastatskog TNBC, te proširenja indikacija za njenu upotrebu u drugim molekularnim podtipovima i ranijim fazama bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. PD-L1 ekspresija detektovana je u 21,2% slučajeva ranog karcinoma dojke u ispitivanom uzorku.
2. Dominantni obrazac ekspresije PD-L1 proteina u ranom karcinomu dojke je imunohistohemijski konzistentan sa inducibilnim tipom ekspresije i nezavisan je od molekularnog podtipa tumora.
3. Ekspresija PD-L1 na površini tumorskih ćelija se statistički značajno češće sreće kod TNBC u odnosu na ostale molekularne podtipove ranog karcinoma dojke.
4. Gustina sTIL kod TNBC je statistički značajno veća u odnosu na tumore Luminal B HER-2 negativnog i Luminal A molekularnog podtipa.
5. Apsolutni broj CD4 T limfocita po jedinici površine u stromalnom inflamatornom infiltratu je statistički značajno veći kod TNBC i Luminal B HER-2 pozitivnog u odnosu na Luminal B HER-2 negativni molekularni podtip karcinoma dojke, dok svi molekularni podtipovi, izuzev Luminal B HER-2 negativnog, u stromi sadrže veći broj CD4 T limfocita u odnosu na Luminal A molekularni podtip ranog karcinoma dojke.
6. Apsolutni broj CD8 T limfocita po jedinici površine u stromalnom inflamatornom infiltratu ne razlikuje se značajno kod različitih molekularnih podtipova ranog karcinoma dojke.
7. Predominacija CD4 T limfocita u stromalnom inflamatornom infiltratu statistički se značajno češće uočava kod TNBC i karcinoma dojke Luminal B HER-2 pozitivnog molekularnog podtipa, dok CD8 limfociti čine dominantnu subpopulaciju T limfocita u karcinomima dojke Luminal A molekularnog podtipa.
8. Umjereno razvijeni peritumorski limfoidni agregati se statistički značajno češće javljaju kod TNBC, a fokalni kod karcinoma dojke Luminal A molekularnog podtipa.
9. PD-L1 se statistički značajno češće eksprimira u ranom karcinomu dojke sa većom gustinom sTIL i umjereno razvijenim peritumorskim limfoidnim agregatima, bez obzira na molekularni podtip tumora.
10. Granična vrijednost gustine sTIL u ranom karcinomu dojke iznad koje se PD-L1 ekspresija može predvidjeti sa odličnom dijagnostičkom tačnošću iznosi 53%.

11. PD-L1 pozitivni tumori u stromalnom inflamatornom infiltratu sadrže više CD4 i CD8 T limfocita (bez značajne predominacije određene subpopulacije T limfocita) u odnosu na PD-L1 negativne tumore, bez obzira na molekularni podtip ranog karcinoma dojke.
12. U ranom karcinomu dojke, PD-L1 ekspresija pokazuje statistički značajnu povezanost sa lošom diferencijacijom i većom proliferativnom aktivnošću tumora, ali ne i njegovim dimenzijama niti prisustvom sekundarnih depozita u limfnim čvorovima aksile, odnosno stadijumom bolesti u vrijeme postavljanja dijagnoze.
13. Ekspresija PD-L1 proteina u ranom karcinomu dojke je statistički značajno češća kod ER negativnih tumora, ali ne pokazuje značajnu povezanost sa ekspresijom PR i HER-2 statusom.

7. REFERENCE

1. Javed A, Lteif A. Development of the human breast. In: Seminars in plastic surgery. Thieme Medical Publishers. 2013 Feb;27(01):5-12.
2. Rančić G, Nikolić IR. Razviće kože. In: Nikolić IR, editor. Embriologija čoveka. 3rd ed. Beograd: Datastatus; 2007. p. 229–233.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Ženski reproduktivni sistem. In Lačković V, Todorović V, editors. Osnovi histologije. 11th ed. Beograd: Datastatus; 2005. p. 452-455.
4. Young B, Heath JW. Female reproductive system. In: Burkitt HG, Young B, Heath JW, editors. Wheater's functional histology. 4th ed. London: Churchill Livingstone; 2000. p. 368-371.
5. Agarwal I, Blanco L. Histology. PathologyOutlines.com [Internet] [Michigan (USA): Pathology Outlines; 2022] [reviewed 2022 May 9; cited 2023 Feb 10]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastnormal.html>
6. BIOPHOTO ASSOCIATES/SCIENCE PHOTO LIBRARY. Lactating breast (LM) - stock image - C014/4302 [Internet] [London (UK): Science Photo Library; 2022 [cited 2023 Feb 10]. Available from: <https://www.sciencephoto.com/media/478895/view/lactating-breast-lm->
7. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021 Feb;71(3):209-249.
8. International Agency for Research on Cancer. WHO classification of breast tumours: WHO classification of tumours, 5th ed. Who Classification of Tumours Editorial Board, editor. IARC; 2019. p. 82-161.
9. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Female genital system and breast. In: Robbins basic pathology. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. p. 736-747.
10. Strahinja R. Maligne neoplazme u Crnoj Gori 2013. Podgorica: Institut za javno zdravlje Crne Gore, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih bolesti, Registar malignih neoplazmi Crne Gore; 2018.
11. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. Int J Biol Sci. 2017 Nov;13(11):1387.

12. Scoccianti C, Lauby-Secretan B, Bello PY, Chajes V, Romieu I. Female breast cancer and alcohol consumption: a review of the literature. *Am J Prev Med.* 2014 Mar;46(3):16-25.
13. Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Res.* 2017 Nov;19(1):1-14.
14. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology.* 2010 Aug;57(2):171-192.
15. Sørli T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Jun;100(14):8418-8423.
16. Ellis IO, Lee AHS, Pinder SE, Rakha EA. Tumors of the breast. In Fletcher CDM, editor. *Diagnostic Histopathology of Tumors. Volume 2.* 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2013. p. 1057-1145.
17. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. *TNM classification of malignant tumours.* 8th ed. Nashville, TN: John Wiley & Sons; 2016. p. 151-8.
18. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019 Aug;30(8):1194-1220.
19. Planes-Laine G, Rochigneux P, Bertucci F, Chrétien AS, Viens P, Sabatier R, et al. PD-1/PD-L1 targeting in breast cancer: the first clinical evidences are emerging—a literature review. *Cancers.* 2019 Jul;11(7):1033.
20. Underwood JC. Lymphoreticular infiltration in human tumours: prognostic and biological implications: a review. *Br J Cancer.* 1974 Dec;30(6):538-48.
21. Sistrunk WE, Maccarty WC. Life expectancy following radical amputation for carcinoma of the breast: a clinical and pathologic study of 218 cases. *Ann Surg.* 1922 Jan;75(1):61-9.
22. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016 Apr;13(4):228-41.

23. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol.* 2015 Feb;26(2):259-271.
24. Tzoras E, Zerdes I, Tsiknakis N, Manikis GC, Mezheyeuski A, Bergh J, Matikas A, Foukakis T. Dissecting Tumor-Immune Microenvironment in Breast Cancer at a Spatial and Multiplex Resolution. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 14;14(8):1999.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646-674.
26. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct;6(10), 715-727.
27. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M., Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci*, 2017 Oct;75(4):689-713.
28. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(21):9543-9553.
29. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol.* 2016 Dec;7:550.
30. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev.* 2003 Apr;192:161–80.
31. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995 Nov;3(5):541–7.
32. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992 Nov;11(11):3887–95.
33. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996 May;8(5):765–72.

34. Sharpe AH and Freeman GJ: The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol.* 2002 Feb;2:116-126.
35. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol.* 2008 Nov;181(10):6738–46.
36. Chinai J M, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 2015 Sep;36(9): 587-595.
37. Appleman LJ, van Puijenbroek AA, Shu KM, Nadler LM, Boussiotis VA. CD28 costimulation mediates down-regulation of p27^{kip1} and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells. *J Immunol.* 2002 Mar;168(6):2729–36.
38. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol.* 1999 Aug;1(4):193–9.
39. Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis VA. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal.* 2012 Jun;5(230):ra46.
40. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008 May;133(5):775–87.
41. Frauwirth KA, Thompson CB. Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol.* 2004 Apr;172(8):4661–5.
42. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB Jr, Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell.* 2013 Jun;153(6):1239–51.
43. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun.* 2015 Mar;6:6692.
44. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Dual Faces of IFN γ in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the

- Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res.* 2016 May;22:232934.
45. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Sep;99(19), 12293-12297.
 46. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem.* 2006 May;108(1):19–24.
 47. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Feb;104(9):3360–5.
 48. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Dec;56(8):1173–82.
 49. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr;13(7):2151–7.
 50. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer.* 2010 Feb;116(7):1757–66.
 51. Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med.* 2016 Nov;213(13), 2835-2840.
 52. Miller RA, Miller TN, Cagle PT. PD-1/PD-L1, Only a Piece of the Puzzle. *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Jul;140(11):1187-1188.
 53. Uhercik M, Sanders AJ, Owen S, Davies EL, Sharma AK, Jiang WG, et al. Clinical significance of PD1 and PDL1 in human breast cancer. *Anticancer Res.* 2017 Aug;37(8):4249-4254.

54. Escors D, Gato-Cañas M, Zuazo M, Arasanz H, García-Granda MJ, Vera R, et al. The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Signal Transduct Target Ther.* 2018 Sep;3(1), 1-9.
55. Thunnissen E, de Langen AJ, Smit EF. PD-L1 IHC in NSCLC with a global and methodological perspective. *Lung Cancer.* 2017 Nov;113, 102-105.
56. Stovgaard ES, Dyhl-Polk A, Roslind A, Balslev E, Nielsen D. PD-L1 expression in breast cancer: expression in subtypes and prognostic significance: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Jan;174(3), 571-584.
57. Postow MA, Chesney AC, Pavlick C, Robert K, Grossmann D, McDermott GP, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372:2006–2017.
58. Ribas AO, Hamid A, Daud FS, Hodi JD, Wolchok R, Kefford AM, et al. Joshua, A. Patnaik, W.J. Hwu, J.S. Weber, et al. 2016. Association of Pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. *JAMA.* 315:1600–1609.
59. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* (2014) 515(7528):563–7.
60. Zerdes I, Wallerius M, Sifakis EG, Wallmann T, Betts S, Bartish M, et al. STAT3 activity promotes programmed-death ligand 1 expression and suppresses immune responses in breast cancer. *Cancers.* 2019 Aug;11(10), 1479.
61. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol. Res.* 2014 Apr;2(4), 361-370.
62. Azadi S, Aboulkheyr Es H, Razavi Bazaz S, Thiery JP, Asadnia M, Ebrahimi Warkiani M. Upregulation of PD-L1 expression in breast cancer cells through the formation of 3D multicellular cancer aggregates under different chemical and mechanical conditions. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2019 Dec;1866(12):118526.
63. Maeda T, Hiraki M, Jin C, Rajabi H, Tagde A, Alam M, et al. MUC1-C Induces PD-L1 and Immune Evasion in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 2018 Jan 1;78(1):205-215.

64. Almozyan S, Colak D, Mansour F, Alaiya A, Al-Harazi O, Qattan A, et al. PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. *Int. J. Cancer*. 2017 Jun;141(7), 1402-1412.
65. Yang L, Huang F, Mei J, Wang X, Zhang Q, Wang H, Xi M, You Z. Posttranscriptional Control of PD-L1 Expression by 17 β -Estradiol via PI3K/Akt Signaling Pathway in ER α -Positive Cancer Cell Lines. *Int J Gynecol Cancer*. 2017 Feb;27(2):196-205.
66. Vranic S, Cyprian FS, Gatalica Z, Palazzo J. PD-L1 status in breast cancer: Current view and perspectives. *Semin. Cancer Biol*. 2021 Jul;72:146-154.
67. Barrett MT, Anderson KS, Lenkiewicz E, Andreozzi M, Cunliffe HE, Klassen CL, et al. Genomic amplification of 9p24. 1 targeting JAK2, PD-L1, and PD-L2 is enriched in high-risk triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2015 Jun;6(28), 26483.
68. Gil Del Alcazar CR, Huh SJ, Ekram MB, Trinh A, Liu LL, Beca F, et al. Immune escape in breast cancer during in situ to invasive carcinoma transition. *Cancer Discov*. 2017 Oct;7(10), 1098-1115.
69. Chen M, Pockaj B, Andreozzi M, Barrett MT, Krishna S, Eaton S, et al. JAK2 and PD-L1 amplification enhance the dynamic expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer. *Clin. Breast Cancer*. 2018 Oct;18(5), e1205-e1215.
70. Ali HR, Glont SE, Blows FM, Provenzano E, Dawson SJ, Liu B, et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. *Ann. Oncol*. 2015 Jul;26(7), 1488-1493.
71. Balko JM, Schwarz LJ, Luo N, Estrada MV, Giltane JM, Dávila-González D, et al. Triple-negative breast cancers with amplification of JAK2 at the 9p24 locus demonstrate JAK2-specific dependence. *Sci. Transl. Med*. 2016 May;8(334), 334ra53-334ra53.
72. Márquez-Garbán DC, Deng G, Comin-Anduix B, Garcia AJ, Xing Y, Chen HW, et al. Antiestrogens in combination with immune checkpoint inhibitors in breast cancer immunotherapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol. J*. 2019 Oct;193:105415.
73. Chaganty BK, Qiu S, Gest A, Lu Y, Ivan C, Calin GA, et al. Trastuzumab upregulates PD-L1 as a potential mechanism of trastuzumab resistance through

- engagement of immune effector cells and stimulation of IFN γ secretion. *Cancer Lett.* 2018 Aug;430:47-56.
74. Jiao S, Xia W, Yamaguchi H, Wei Y, Chen MK, Hsu JM, et al. PARP Inhibitor Upregulates PD-L1 Expression and Enhances Cancer-Associated Immunosuppression. *Clin. Cancer Res.* 2017 Jul;23(14):3711-3720.
75. Saleh R, Taha RZ, Sasidharan Nair V, Alajez NM, Elkord E. PD-L1 blockade by atezolizumab downregulates signaling pathways associated with tumor growth, metastasis, and hypoxia in human triple negative breast cancer. *Cancers.* 2019 Jul;11(8), 1050.
76. Mohan N, Hosain S, Zhao J, Shen Y, Luo X, Jiang J, et al. Atezolizumab potentiates Tcell-mediated cytotoxicity and coordinates with FAK to suppress cell invasion and motility in PD-L1+ triple negative breast cancer cells. *Oncoimmunology.* 2019 Jun;8(9), e1624128.
77. Loizides S, Constantinidou A. Triple negative breast cancer: Immunogenicity, tumor microenvironment, and immunotherapy. *Front Genet.* 2023 Jan 12;13:1095839.
78. Emens LA, Adams S, Barrios CH, Dieras VC, Iwata H, Loi S, et al. LBA16 IMpassion130: Final OS analysis from the pivotal phase III study of atezolizumab + nab-paclitaxel vs placebo + nab-paclitaxel in previously untreated locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2020 Sep;31:S1148.
79. Thomas R, Al-Khadairi G, Decock J. Immune checkpoint inhibitors in triple negative breast cancer treatment: promising future prospects. *Front.* 2021 Feb;10:600573.
80. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, et al; KEYNOTE-355 Investigators. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet.* 2020 Dec 5;396(10265):1817-1828.
81. Badve SS, Penault-Llorca F, Reis-Filho JS, Deurloo R, Siziopikou KP, D'Arrigo C, et al. Determining PD-L1 Status in Patients with Triple-Negative Breast

- Cancer: Lessons Learned from IMpassion130. *J Natl Cancer Inst.* 2022 May 9;114(5):664-675.
82. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual – Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). Agilent.com [Internet] [Agilent Technologies, Inc (USA); 2022] [reviewed 2022 Nov 16; cited 2023 Oct 28]. Available from: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29389_22c3_pharmdx_tnbc_interpretation_manual_kn355.pdf
83. Naidoo J, Page DB, Li BT, Connell LC, Schindler K, Lacouture ME, Postow MA, Wolchok JD. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann. Oncol.* 2015 Dec;26(12):2375-91.
84. Noske A, Wagner DC, Schwamborn K, Foersch S, Steiger K, Kiechle M, et al. Interassay and interobserver comparability study of four programmed death-ligand 1 (PD-L1) immunohistochemistry assays in triple-negative breast cancer. *Breast.* 2021 Dec;60:238-244.
85. Miles D, Gligorov J, André F, Cameron D, Schneeweiss A, Barrios C, et al. 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 Aug;32(8):994-1004.
86. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia.* 2006 Mar;8(3):190-8.
87. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Däster S, Trella E, Droeser RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 May;146(1):15-24.
88. Kitano A, Ono M, Yoshida M, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, et al. K. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO open.* 2017 May;2(2):e000150.
89. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget.* 2015 Mar 10;6(7):5449-64.

90. Guo Y, Yu P, Liu Z, Maimaiti Y, Wang S, Yin X, et al. Prognostic and Clinicopathological Value of Programmed Death Ligand-1 in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 May 26;11(5):e0156323.
91. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jan;28(1):105-113.
92. Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer*. 2020 Mar;20(1):1-15.
93. Wang ZQ, Milne K, Derocher H, Webb JR, Nelson BH, Watson PH. PD-L1 and intratumoral immune response in breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Aug;8(31):51641.
94. Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, et al. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2016 Jan;47(1):52-63.3.
95. 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 Mar;9(1):1-7.
96. Erber R, Hartmann A. Understanding PD-L1 Testing in Breast Cancer: A Practical Approach. *Breast Care*. 2020 Oct;15(5):1-10.
97. Kos Z, Roblin E, Kim RS, Michiels S, Gallas BD, Chen W, et al. International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2020 May 12;6:17
98. Huang Y, Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015 Jul;6(19):17462.
99. Franzoi MA, Romano E, Piccart M. Immunotherapy for early breast cancer: too soon, too superficial, or just right? *Ann Oncol*. 2021 Mar;32(3):323-336.
100. Valenza C, Taurelli Salimbeni B, Santoro C, Trapani D, Antonarelli G, Curigliano G. Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes:

- Current Issues for Biomarker Assessment. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 26;15(3):767.
101. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jan 1;25(1):118-45.
 102. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med*. 2001 Feb 22;344(8):539-48.
 103. McCart Reed AE, Kalita-De Croft P, Kutasovic JR, Saunus JM, Lakhani SR. Recent advances in breast cancer research impacting clinical diagnostic practice. *J. Pathol*. 2019 Nov;247(5):552-562.
 104. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem*. 2016;60(3):275-301.
 105. Anagastou VK, Brahmer JR. Cancer immunotherapy: a future paradigm shift in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):976-984.
 106. Doroshov DB, Sanmamed MF, Hastings K, Politi K, Rimm DL, Chen L et al. Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2019 Aug 1;25(15):4592-4602.
 107. Polk A, Svane IM, Andersson M, Nielsen D. Checkpoint inhibitors in breast cancer—current status. *Cancer Treat. Rev*. 2018 Feb;63:122-134.
 108. Adams S, Gatti-Mays ME, Kalinsky K, Korde LA, Sharon E, Amiri-Kordestani L, et al. Current landscape of immunotherapy in breast cancer: a review. *JAMA Oncol*. 2019 Apr;5(8):1205-1214.
 109. VENTANA PD-L1 (SP142) Assay for Triple-Negative Breast Carcinoma. Roche.com. [Internet] Ventana Medical Systems, Inc. and Roche Diagnostics International, Inc. 2020. [reviewed 2022 Nov 16; cited 2023 Oct 28]. Available from:
<https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/us/en/products/v/ventana-pd-l1-sp142-assay/VENTANA-PD-L1-SP142-Assay-TNBC-IG.pdf>

110. Ju X, Zhang H, Zhou Z, Wang Q. Regulation of PD-L1 expression in cancer and clinical implications in immunotherapy. *Am J Cancer Res.* 2020 Jan 1;10(1):1-11.
111. Debien V, De Caluwé A, Wang X, Piccart-Gebhart M, Tuohy VK, Romano E, Buisseret L. Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives. *NPJ Breast Cancer.* 2023 Feb 13;9(1):7.
112. Peg V, López-García MÁ, Comerma L, Peiro G, Garcia-Caballero T, Lopez AC, et al. PD-L1 testing based on the SP142 antibody in metastatic triple-negative breast cancer: summary of an expert round-table discussion. *Future Oncol.* 2020 Dec;17(10):1209-1218.
113. Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, Madore J, Wilmott JS, Harvey K. et al. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology.* 2016 Jul;69(1):25-34.
114. Sobral-Leite M, Van de Vijver K, Michaut M, van der Linden R, Hooijer GKJ, Horlings HM. et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, *BRCA1*-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Oncoimmunology.* 2018 Sep 11;7(12):e1509820.
115. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L. et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014 May 15;20(10):2773-82.
116. Mittendorf EA, Zhang H, Barrios CH, Saji S, Jung KH, Hegg R. et al. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet.* 2020 Oct 10;396(10257):1090-1100.
117. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J. et al.; KEYNOTE-522 Investigators. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2020 Feb 27;382(9):810-821.
118. Winer EP, Lipatov O, Im SA, Goncalves A, Muñoz-Couselo E, Lee KS, et al.; KEYNOTE-119 investigators. Pembrolizumab versus investigator-choice

- chemotherapy for metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-119): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2021 Apr;22(4):499-511.
119. Adams S, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol.* 2019 Mar 1;30(3):397-404.
120. Loibl S, Schneeweiss A, Huober JB, Braun M, Rey J, Blohmer JU, et al. Durvalumab Improves Long-Term Outcome in TNBC: Results from the Phase II Randomized GeparNUEVO Study Investigating Neoadjuvant Durvalumab in Addition to an Anthracycline/Taxane Based Neoadjuvant Chemotherapy in Early Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). *J Clin Oncol.* 2021 May 28;39(15):506.
121. Loibl S, Untch M, Burchardi N, Huober J, Sinn BV, Blohmer JU, et al. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. *Ann Oncol.* 2019 Aug 1;30(8):1279-1288.
122. Schmid P, Salgado R, Park YH, Muñoz-Couselo E, Kim SB, Sohn J, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy as neoadjuvant treatment of high-risk, early-stage triple-negative breast cancer: results from the phase 1b open-label, multicohort KEYNOTE-173 study. *Ann Oncol.* 2020 May;31(5):569-581.
123. Campbell MJ, Yau C, Bolen J, Vandenberg S, Hoyt C, Brown-Swigart L, et al. Abstract CT003: Analysis of Immune Cell Infiltrates as Predictors of Response to the Checkpoint Inhibitor Pembrolizumab in the Neoadjuvant I-SPY 2 TRIAL. *Cancer Res.* 2019 Jul 1; 79:CT003.
124. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018 Jan;19(1):40-50.
125. Ochi T, Bianchini G, Ando M, Nozaki F, Kobayashi D, Criscitiello C, et al. Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer. *Eur J Cancer.* 2019 Sep;118:41-48.

126. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, et al. 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 Mar 20;33(9):983-91.
127. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. 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 Aug;25(8):1544-50.
128. Kim RS, Song N, Gavin PG, Salgado R, Bandos H, Kos Z, et al. Stromal Tumor-infiltrating Lymphocytes in NRG Oncology/NSABP B-31 Adjuvant Trial for Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2019 Aug 1;111(8):867-871
129. Shang M, Chi Y, Zhang J, Chang J, Yang H, Yin S, et al. The Therapeutic Effectiveness of Neoadjuvant Trastuzumab Plus Chemotherapy for HER2-Positive Breast Cancer Can Be Predicted by Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression. *Front Oncol*. 2022 Jan 5;11:706606.
130. Luen SJ, Salgado R, Fox S, Savas P, Eng-Wong J, Clark E, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and docetaxel: a retrospective analysis of the CLEOPATRA study. *Lancet Oncol*. 2017 Jan;18(1):52-62.
131. Liu S, Chen B, Burugu S, Leung S, Gao D, Virk S, et al. Role of Cytotoxic Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Predicting Outcomes in Metastatic HER2-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2017 Nov 9;3(11):e172085.
132. Loi S, Giobbie-Hurder A, Gombos A, Bachelot T, Hui R, Curigliano G, et al; 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 Mar;20(3):371-382.
133. Emens LA, Esteva FJ, Beresford M, Saura C, De Laurentiis M, Kim SB, et al. Trastuzumab emtansine plus atezolizumab versus trastuzumab emtansine plus placebo in previously treated, HER2-positive advanced breast cancer (KATE2): a

- phase 2, multicentre, randomised, double-blind trial. *Lancet Oncol.* 2020 Oct;21(10):1283-1295.
134. Dirix LY, Takacs I, Jerusalem G, Nikolinakos P, Arkenau HT, Forero-Torres A, et al. Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Feb;167(3):671-686.
135. El Bairi K, Haynes HR, Blackley E, Fineberg S, Shear J, Turner S, et al.; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *NPJ Breast Cancer.* 2021 Dec 1;7(1):150.
136. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol.* 2016 Oct 1;2(10):1354-1360.
137. Criscitiello C, Vingiani A, Maisonneuve P, Viale G, Viale G, Curigliano G. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2- breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2020 Sep;183(2):347-354.
138. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol.* 2014 Aug;25(8):1536-43.
139. Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V, Conte P, Delaloge S, Andre F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol.* 2015 Aug;26(8):1698-704.
140. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eeno F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* 2013 Mar 1;31(7):860-7.
141. Sobral-Leite M, Salomon I, Opdam M, Kruger DT, Beelen KJ, van der Noort V, et al. Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res.* 2019 Aug 7;21(1):90.

142. Gao ZH, Li CX, Liu M, Jiang JY. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020 Nov 25;20(1):1150.
143. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, et al. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 1;32(25):2794-803.
144. Metzger-Filho O, Sun Z, Viale G, Price KN, Crivellari D, Snyder RD, et al. Patterns of Recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: results from international breast cancer study group trials VIII and IX. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 1;31(25):3083-90.
145. Fridman WH, Petitprez F, Meylan M, Chen TW, Sun CM, Roumenina LT, et al. B cells and cancer: To B or not to B? *J Exp Med*. 2021 Jan 4;218(1):e20200851.
146. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(2):545-53.
147. Shen M, Wang J, Ren X. New Insights into Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Breast Cancer: Clinical Impacts and Regulatory Mechanisms. *Front Immunol*. 2018 Mar 8;9:470.
148. Lam BM, Verrill C. Clinical Significance of Tumour-Infiltrating B Lymphocytes (TIL-Bs) in Breast Cancer: A Systematic Literature Review. *Cancers (Basel)*. 2023 Feb 11;15(4):1164.
149. Wortman JC, He TF, Solomon S, Zhang RZ, Rosario A, Wang R, et al. Spatial distribution of B cells and lymphocyte clusters as a predictor of triple-negative breast cancer outcome. *NPJ Breast Cancer*. 2021 Jul 1;7(1):84.
150. Wang K, Shen T, Siegal GP, Wei S. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2017 Nov;69:110-117.
151. Paijens ST, Vledder A, de Bruyn M, Nijman HW. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol*. 2021 Apr;18(4):842-859.

152. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015 Nov;24 Suppl 2:S26-35.
153. Dill EA, Gru AA, Atkins KA, Friedman LA, Moore ME, Bullock TN, et al. PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across Breast Cancer Subtypes and Stages: An Assessment of 245 Primary and 40 Metastatic Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2017 Mar;41(3):334-342.