

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Marina Bakula

ZNAČAJ LIGANDA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI
PD-L1 U KORELACIJI S VEGF U ODGOVORU NA
NEOADJUVANTNO LIJEČENJE RAKA DOJKE

Doktorski rad

Osijek, 2026.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Marina Bakula

ZNAČAJ LIGANDA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI
PD-L1 U KORELACIJI S VEGF U ODGOVORU NA
NEOADJUVANTNO LIJEČENJE RAKA DOJKE

Doktorski rad

Osijek, 2026.

Doktorski rad predložen je Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske studije u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti na Doktorskom studiju Molekularne bioznanosti – modul biomedicina.

Osijek, 2026.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja u Osijeku

Doktorski rad

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

ZNAČAJ LIGANDA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI PD-L1 U KORELACIJI S VEGF U ODGOVORU NA NEOADJUVANTNO LIJEČENJE RAKA DOJKE

Marina Bakula

Doktorski rad je izrađen u : KBC Osijek ,Klinički zavod za patologiju i sudsku medicinu u laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i imunohistokemiju, Osijek, Hrvatska

Mentorica: doc. dr. sc. Jasmina Rajc, dr. med.

Kratki sažetak doktorskog rada:

Ovo istraživanje usmjereno je na analizu izražaja biomarkera PD-L1 i VEGF u karcinomu dojke te njihovu povezanost s tumorskim infiltrirajućim limfocitima (TIL). Analiza je provedena na uparenim uzorcima karcinoma dojke, uključujući inicijalne biopsije (core biopsije) i kirurške reseksijske preparate, nakon neoadjuvantne (NAT) terapije. Ispitana je povezanost ovih biomarkera s prisutnošću TIL-ova kao pokazatelja imunološke aktivnosti tumora s ostalim kliničkopatološkim i imunofenotipskim karakteristikama tumora. Istraživanje je provedeno na luminalnim B, luminalnim B/HER2 pozitivnim i trostruko negativnim karcinomima dojke. Učinci biomarkera istraženi su na proteinskoj razini. Dobiveni rezultati mogu biti važni za daljnje istraživanje prognostičkih i terapijskih biomarkera u karcinomu dojke.

Broj stranica: 142

Broj slika: 18

Broj tablica: 27

Broj literaturnih navoda: 158

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: ligand programirane stanične smrti 1 (PD-L1), luminalni B HER2 pozitivan karcinom dojke, luminalni B karcinom dojke, molekularni podtip, neoadjuvantna terapija (NAT), rezidualni tumor (RCB), tumor infiltrirajući limfociti (TIL), trostruko negativan karcinom dojke, ukupno preživljenje, vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

1. prof. dr. sc. Šimun Andelinović, dr. med.
2. doc. dr. sc. Anamaria Brozović
3. doc. dr. sc. Ilijan Tomaš, dr. med.
4. doc. dr. sc. Marija Perić, dr. med.

Doktorski rad pohranjen je u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

Ocjena rada
u tisku

BASIC DOCUMENTATION CARD**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****PhD thesis****University of Dubrovnik****Ruder Bošković Institute****University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences****Scientific Area:** Interdisciplinary Area of Science**Scientific Fields:** Biology and Basic medical sciences**SIGNIFICANCE OF PROGRAMMED CELL DEATH PDL1 IN CORRELATION WITH
RESPONSE TO NEOADJUVANT TREATMENT OF BREAST CANCER**

Marina Bakula

Thesis performed at: University Hospital Osijek (Department of Pathology and forensic medicine in laboratory for molecular diagnostic and immunohistochemistry), Osijek**Supervisors:** doc. dr.sc. Jasmina Rajc, MD, PhD**Short abstract:**

This study focuses on the analysis of PD-L1 and VEGF biomarker expression in breast cancer and their association with tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). The analysis was performed on paired breast cancer samples, including initial core needle biopsies and surgical resection specimens obtained after neoadjuvant therapy (NAT). The association of these biomarkers and TILs with other clinicopathological and immunophenotypic tumor characteristics was also investigated. The study included Luminal B, Luminal B/HER2-positive, and triple-negative breast cancer subtypes. The effects of these biomarkers were analyzed at the protein level. The obtained results may contribute to a better understanding of the prognostic and therapeutic significance of biomarkers in breast cancer.

Number of pages: 142**Number of figures:** 18**Number of tables:** 27**Number of references:** 158**Original in:** Croatian language**Keywords:** luminal B breast cancer, luminal B/HER2-positive breast cancer, molecular subtype, neoadjuvant therapy (NAT), overall survival, programmed death-ligand 1 (PD-L1), residual cancer burden (RCB), triple-negative breast cancer, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), vascular endothelial growth factor (VEGF)**Date of the thesis defense:****Reviewers:**

1. prof. dr. sc. Šimun Anđelinović, dr. med.
2. doc. dr. sc. Anamaria Brozović
3. doc. dr. sc. Ilijan Tomaš, dr. med.
4. doc. dr. sc. Marija Perić, dr. med.

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

Ocjena rada
u tisku

ZAHVALA

Zahvalna sam svojoj mentorici doc. dr. sc. Jasmini Rajc, dr. med. na vodstvu, vrijednim savjetima i velikoj potpori tijekom svih faza izrade ove disertacije. Njezino znanje, iskustvo, motivacija i poticaj bili su mi od velike važnosti za uspješnu realizaciju ovog istraživanja.

Zahvaljujem svojim kolegama Nedeljku Bašiću (Relji) i Miji Galić na pomoći pri prikupljanju uzoraka iz arhivske građe. Bez njihove pomoći put bi mi bio puno teži.

Hvala vam na velikoj pomoći.

Marina

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Klinička klasifikacija raka dojke prema stadiju bolesti	5
1.2. TNM Klasifikacija	5
1.3 Histološka klasifikacija karcinoma dojke	7
1.4. Molekularna klasifikacija raka dojke – imunohistokemijsko procjenjivanje	10
2. Biološka uloga PD-L1 u karcinomu dojke	11
2.1. Molekularna regulacija PD-L1	12
2.2. Mehanizmi inducirane ekspresije PD-L1 i funkcionalne posljedice.....	15
2.3 Onkološki značaj PD-L1	17
3. Biologija VEGF-a i njegovih receptora	21
3.1. Mehanizmi proliferacije VEGF-a u tumorima dojke	23
4. Biološki utjecaj tumorskih infiltrirajućih limfocita (TIL) u neoadjuvantnom liječenju karcinoma dojke.....	29
4.1. Prognostički i prediktivni značaj TIL-a.....	33
4.2. Vrste TIL-a	33
5. HIPOPTEZA	34
6. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	34
7. MATERIJALI I METODE	35
7.1. Core biopsije tumora tkiva dojke	35
7.2. Resektat dojke / mastektomija nakon neoadjuvantnog liječenja.....	36
7.3. Patohistološka dijagnostika, obrada i evaluacija na hematoxilin – eozin bojanju (HE).....	37
7.4. Procjena TIL-a	39
8. Imunohistokemijska (IHK) evaluacija prognostičkih i prediktivnih biomarkera u tumorima dojke	42
8.1. IHK evaluacija PD-L1 CPS, klon 22C3.....	42
8.2. IHK evaluacija biomarkera vaskularnog endotalnog faktora rasta (VEGF).....	46
8.3. IHK evaluacija estrogenskog (ER) receptora	48
8.4. IHK evaluacija progesteronskog (PR) receptora	50
8.5. IHK evaluacija proliferativnog indeksa Ki 67.....	52
8.6. IHK evaluacija HER2 proteina u tumoru dojke	53
8.7. Dual ISH metoda detekcije gena HER2 na kromosomu 17.....	55
9. STATISTIČKE METODE	59
10. REZULTATI – Statist. obrada podataka kliničko–patoloških i bioloških obilježja tumora .	60
11. RASPRAVA.....	102
11.1. Usporedba PD-L1 i VEGF u tumorskom tkivu karcinoma dojke prije i nakon NAT	106

11.2. Procjena razlike izražaja PD-L1 i VEGF u pojedinim podtipovima karcinoma dojke.....	108
11.3. Povezanost izražaja PD-L1 i VEGF s imunofenotipskim karakteristikama tumora.....	109
11.4. Povezanost izražaja VEGF i PD-L1 s TIL	111
11.5. Usporedba izražaja PD-L1 i VEGF s ostalim kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata i tumora	112
11.6. Kvantificirani izražaj PD-L1 i VEGF prije i nakon NAT	113
11.7. Uspoređeni izražaj PD-L1 i VEGF s verificiranim RCB scorom.....	114
11.8. Odnos između izražaja PD-L1 i VEGF prije i nakon NAT u rezidualnom tumoru u odnosu na ukupan ishod liječenja	115
11.9. Konceptualni okvir istraživanja.....	117
12. Sažeti protokol NAT prema molekularnom podtipu	119
12.1. Luminal B (HER2 negativni) karcinom dojke.....	119
12.2. Luminal B / HER2 pozitivni karcinom dojke	120
12.3. Trostruko negativni karcinom dojke (TNBC)	120
13. ZAKLJUČCI	122
14. SAŽETAK.....	124
15. SUMMARY	125
16. LITERATURA	127
17. ŽIVOTOPIS.....	141
18. POPIS PUBLIKACIJA.....	141

POPIS KRATICA

3'UTR – 3' neprevedena regija (*3' untranslated region*)

AKT – serin/treonin protein kinaza AKT (*serine/threonine protein kinase AKT*)

ALK – anaplastična limfom kinaza (*anaplastic lymphoma kinase*)

B7-H1 (CD274) – gen koji kodira PD-L1 (*gene encoding PD-L1*)

BRCA1 – gen osjetljivosti na karcinom dojke 1 (*breast cancer susceptibility gene 1*)

BRCA2 – gen osjetljivosti na karcinom dojke 2 (*breast cancer susceptibility gene 2*)

CAFs – tumorski pridruženi fibroblasti (*cancer-associated fibroblasts*)

CD4 – CD4 pozitivni T limfociti (*CD4-positive T lymphocytes*)

CD8 – CD8 pozitivni T limfociti (*CD8-positive T lymphocytes*)

CD19 – B limfocitni marker CD19 (*B-cell marker CD19*)

CD39 – ektonukleotidaza CD39 (*ectonucleotidase CD39*)

CD73 – ekto-5'-nukleotidaza CD73 (*ecto-5'-nucleotidase CD73*)

CHEK2 – kontrolna kinaza 2 (*checkpoint kinase 2*)

CPS – kombinirani pozitivni skor (*combined positive score*)

CR – potpuni odgovor na terapiju (*complete response*)

CTLA-4 – citotoksični T-limfocitni antigen 4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)

CTL – citotoksični T limfociti (*cytotoxic T lymphocytes*)

DAB – 3,3'-diaminobenzidin (*3,3'-diaminobenzidine*)

DC – dendritičke stanice (*dendritic cells*)

DCIS – duktalni karcinom in situ (*ductal carcinoma in situ*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (*deoxyribonucleic acid*)

Dual ISH – dvostruka in situ hibridizacija (*dual in situ hybridization*)

EMT – epitelno-mezenhimska tranzicija (*epithelial-mesenchymal transition*)

ER – estrogenski receptor (*estrogen receptor*)

ERK – ekstracelularno signalno regulirana kinaza (*extracellular signal-regulated kinase*)

FFPE – formalinom fiksirano i u parafin uklopljeno tkivo (*formalin-fixed paraffin-embedded tissue*)

FLT1 (VEGFR-1) – receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta 1 (*vascular endothelial growth factor receptor 1*)

FOXP3 – transkripcijski faktor FOXP3 (*forkhead box P3*)

HDAC – histon deacetilaza (*histone deacetylase*)

HE – hematoksilin i eozin (*hematoxylin and eosin*)

HER2 – humani epidermalni receptor čimbenika rasta 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)

HIF-1 α – čimbenik induciran hipoksijom 1-alfa (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*)

HLA – humani leukocitni antigeni (*human leukocyte antigens*)

IFN- γ – interferon gama (*interferon gamma*)

IHK – imunohistokemija (*immunohistochemistry*)

IL – interleukin (*interleukin*)

IL-2 – interleukin 2 (*interleukin 2*)

IL-6 – interleukin 6 (*interleukin 6*)

IL-8 – interleukin 8 (*interleukin 8*)

IL-12 – interleukin 12 (*interleukin 12*)

ISH – in situ hibridizacija (*in situ hybridization*)

IVD – in vitro dijagnostika (*in vitro diagnostics*)

JAK – Janus kinaza (*Janus kinase*)

Ki-67 – proliferacijski indeks Ki-67 (*Ki-67 proliferation index*)

LCIS – lobularni karcinom in situ (*lobular carcinoma in situ*)

LOX – lizil oksidaza (*lysyl oxidase*)

MAP – mikroasocirani protein (*microtubule-associated protein*)

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza (*mitogen-activated protein kinase*)

MDSC – mijeloidne supresorske stanice (*myeloid-derived suppressor cells*)

MEK – MAPK/ERK kinaza (*MAPK/ERK kinase*)

MHC – glavni kompleks histokompatibilnosti (*major histocompatibility complex*)

miRNA – mikroRNA (*microRNA*)

MLH1 – Mutl homolog, uključen u sustav popravka DNA 1 (*Mutl homolog 1*)

MMP – matriksne metaloproteinaze (*matrix metalloproteinases*)

MMP-2 – matriksna metaloproteinaza 2 (*matrix metalloproteinase 2*)

MMP-9 – matriksna metaloproteinaza 9 (*matrix metalloproteinase 9*)

MSH2 – Muts homolog 2, gen za popravak insercija i delecija (*Muts homolog 2*)

mTOR – mehanistička meta rapamicina (*mechanistic target of rapamycin*)

MYC – protoonkogen MYC (*MYC proto-oncogene*)

N – status limfnih čvorova (*nodes*)

NAT – neoadjuvantna terapija (*neoadjuvant therapy*)

NF- κ B – nuklearni faktor kapa B (*nuclear factor kappa B*)

NK stanice – prirodne ubojice (*natural killer cells*)

NOS – nespecificirani histološki podtip (*not otherwise specified*)

NP-1 (NRP1) – neuropilin-1 (*neuropilin-1*)

PAI-1 – inhibitor aktivatora plazminogena 1 (*plasminogen activator inhibitor-1*)

PALB2 – partner i lokalizator BRCA2 (*partner and localizer of BRCA2*)

pCR – potpuni patološki odgovor (*pathological complete response*)

PD-1 – protein programirane stanične smrti 1 (*programmed cell death protein 1*)

PD-L1 – ligand programirane stanične smrti 1 (*programmed death-ligand 1*)

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinaza (*phosphoinositide 3-kinase*)

PLGF – placentarni čimbenik rasta (*placental growth factor*)

PR – progesteronski receptor (*progesterone receptor*)

PTEN – homolog fosfataze i tenzina (*phosphatase and tensin homolog*)

RAF – serin/treonin protein kinaza RAF (*RAF serine/threonine kinase*)

RAS – protoonkogen RAS (*RAS proto-oncogene*)

RCB – rezidualno tumorsko opterećenje (*residual cancer burden*)

RTK – receptorska tirozin kinaza (*receptor tyrosine kinase*)

RTU – spremno za uporabu (*ready to use*)

SHP-2 – tirozin fosfataza SHP-2 (*SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2*)

STAT3 – prijenosnik signala i aktivator transkripcije 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)

T – primarni tumor (*tumor*)

TCR – T-stanični receptor (*T-cell receptor*)

TGF- β – transformirajući čimbenik rasta beta (*transforming growth factor beta*)

TIL – tumorski infiltrirajući limfociti (*tumor-infiltrating lymphocytes*)

TNBC – trostruko negativni karcinom dojke (*triple-negative breast cancer*)

TNF- α – tumor nekrotizirajući čimbenik alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

TNM – klasifikacija proširenosti malignih tumora (*tumor, nodes, metastasis*)

TP53 – tumor supresorski gen p53 (*tumor protein p53*)

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (*vascular endothelial growth factor*)

VEGFR – receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (*vascular endothelial growth factor receptor*)

ypTN – patohistološki stadij tumora i limfnih čvorova nakon neoadjuvantne terapije (*post-therapy pathological TN staging*)

1. UVOD

Rak dojke najčešće je sijelo zloćudne bolesti u žena u Republici Hrvatskoj te čini približno četvrtinu svih novootkrivenih karcinoma u žena. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) u 2023. godini zabilježeno je 3293 novih slučajeva raka dojke (incidencija 165/100 000), dok je prema izvješću o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2023. godini od raka dojke umrlo 707 žena (stopa 35/100 000). Istodobno, na globalnoj razini opterećenje ove bolesti ostaje izrazito visoko, prema studiji Globalnog opterećenja bolešću za 2019. godinu zabilježeno je više od 2 milijuna novih slučajeva raka dojke te više od 700 000 smrti (podaci iz hrvatskog epidemiološkog registra za rak, objavljeni 19. prosinca 2024.). Zabrinjavajući porast obolijevanja od raka dojke zahtjeva metode liječenja na više razina koji zahtijevaju različite terapijske režime što ovisi o molekularnom i histološkom podtipu raka. Heterogenost raka dojke potrebno je usmjeriti na molekularno testiranje koje će pomoći u preciznoj dijagnozi i poboljšanju preživljenja. Iz toga proizlazi kako odabir liječenja u velikoj mjeri ovisi o molekularnim i histološkim značajkama tumora, što naglašava potrebu za preciznom patohistološkom, imunohistokemijskom i prema indikaciji molekularnom dijagnostikom kao temeljem personalizirane onkološke skrbi.

Opći čimbenici koji su najčešći uzrok nastanka karcinoma dojke:

- rana menstruacija, menopauza poslije 55 godine života, kasna prva trudnoća, žene koje nisu dojile
- pretilost
- > 60 godine života
- postojeće lezije u dojci koje pokazuju atipije
- nadomjesna hormonska terapija u menopauzi

Genetski čimbenici koji utječu na nastanak karcinoma dojke su:

- pozitivna obiteljska anamneza
- prisutne genske nasljedne mutacije visokorizičnih gena BRCA 1, BRCA 2, PTEN, TP 53, MLH1, MSH2, ATM, CHEK2, PALB

U kliničkoj praksi tumori dojke se, u osnovi razvrstavaju prema statusu hormonskih receptora i HER2 receptora te proliferacijskom indeksu pri čemu se razlikuju:

- rak dojke koji eksplicira hormonski receptor estrogen (ER +)
- rak dojke koji eksplicira progesteronski receptor (PR+)
- rak dojke koji eksplicira ljudski epidermalni receptor (HER 2+)
- trostruko negativni rak dojke (TNBC) u kojemu nedostaju navedena tri faktora (1).

U ovom radu analizirana su tri podtipa: luminalni B, luminalni B HER 2-pozitivan i TNBC (trostruko negativni karcinom dojke). Luminalni B karcinomi tipično imaju relativno nižu ekspresiju hormonskih receptora uz viši proliferacijski indeks (Ki 67) i agresivnije kliničko ponašanje u odnosu na luminalni A podtip. U luminalnom B HER2 – pozitivnom podtipu uz kemoterapiju u terapijski pristup uključuje se anti-HER2 terapija. Nasuprot tome, TNBC često pokazuje visoku osjetljivost na neoadjuvantno liječenje, uz veće stope potpunog patološkog odgovora, međutim, izostanak potpunog odgovora u TNBC povezan je s nepovoljnom prognozom i većim rizikom ranog relapsa.

NAT (neoadjuvantna terapija) predstavlja standardni terapijski pristup kod većine bolesnica s TNBC-om. Izostanak potpunog patološkog odgovora u ovom podtipu povezan je s nepovoljnom prognozom i povećanim rizikom ranog relapsa. Razlike među molekularnim podtipovima raka dojke jasno određuju indikaciju, intenzitet i očekivani učinak NAT. Dok je cilj neoadjuvantne terapije kod agresivnih podtipova, poput HER2 pozitivnih i TNBC tumora, postizanje kompletnog patološkog odgovora kao surogatnog markera preživljenja, kod luminalnih podtipova naglasak je na individualizaciji terapije i očuvanja kvalitete života. Stoga molekularna klasifikacija predstavlja temelj personaliziranog pristupa liječenju raka dojke i nezaobilazan alat u suvremenoj onkološkoj praksi.

Neoadjuvantno liječenje karcinoma dojke podrazumijeva primjenu sistemske terapije prije operativnog zahvata nakon verificirane patohistološke dijagnoze karcinoma. Cilj neoadjuvantne terapije prije samog operativnog zahvata je smanjenje tumorske mase kako bi se nakon smanjenja tumora predvidio pošteđan kirurški zahvat, poboljšanje ishoda operativnog zahvata, umanjiti rizik od recidiva. Neoadjuvantna terapija može uništiti stanice raka koje su mikrometastazirale, takav pristup može umanjiti rizik i od metastaziranja u budućnosti. Nakon neoadjuvantne terapije na temelju patohistološkog verificiranja moguće je procijeniti osjetljivosti tumora na terapiju, što može pomoći onkologu na odabir liječenja nakon operativnog zahvata (1, 2).

Kod nekih pacijentica neoadjuvantna terapija može rezultirati smanjenjem zahvaćenosti limfnih čvorova što u konačnici uklanja potrebu za opsežnom resekcijom limfnih čvorova. Odluku o neoadjuvantnom načinu liječenja donose multidisciplinarni timovi smatrajući kako takav oblik terapije može poboljšati ishode liječenja i ukupnog preživljenja. Patološka evaluacija nakon neoadjuvantne terapije je od suštinskog značaja za stratifikaciju bolesnica i donošenja novih odluka o daljnjem liječenju. Sistemske klasifikacije poput RBC i pCR najbitnije su u procjeni učinkovitosti NAT, procjeni prognoze i personalizaciji terapijskih postupaka.

Neoadjuvantno liječenje uključuje kemoterapiju, radioterapiju, hormonsku terapiju kao i druge vrste terapije uzimajući u obzir biološke karakteristike tumora. Odabir NAT ovisi o čimbenicima uključujući vrstu i stadij raka dojke te osobne preferencije svake pacijentice (3).

Neoadjuvantna terapija povećava šanse za uspješnu operaciju zbog smanjenja tumorske mase, pruža jedinstvenu priliku za procjenu tumorskog odgovora na liječenje, što je značajno za daljnje terapijske odluke nakon operativnog zahvata (4). U strategiju jačanja imunološkog odgovora protiv tumora dojke mogla bi biti farmakološka blokada molekula koje imaju nadzor na imunološkim kontrolnim točkama kao što je protein 1 programirane stanične smrti (PD-1) i ligand programirane stanične smrti PD-L1 uz pomoć monoklonskih protutijela inhibitora imunološke kontrolne točke. Strategija jačanja imunološkog odgovora protiv tumora dojke može uključivati farmakološku blokadu molekula imunoloških kontrolnih točaka, kao što su PD-1 (protein programirane stanične smrti 1) i PD-L1 (ligand programirane stanične smrti), uporabom monoklonskih protutijela inhibitora imunoloških kontrolnih točaka. Primjena inhibitora imunološke kontrolne točke vodila bi k razvoju novih terapijskih postupaka usmjerenih prema točno određenom biomarkeru PD-L1 (3).

Dva ključna biomarkera koja imaju važnu ulogu u imunološkoj regulaciji i angiogenezi kod karcinoma i u budućnosti pristupa neoadjuvantnom liječenju su PD-L1 (ligand programirane stanične smrti) te VEGF (vaskularni endotelni faktor rasta).

Identifikacijom ovih biomarkera u samom tumoru mogao bi se predvidjeti odgovor na neoadjuvantnu terapiju koja dosadašnjim istraživanjima mjerenjem rezidualnog opterećenja karcinomom nije pokazala najuspješnije rezultate (5).

Rak dojke je imunološki heterogena bolest, a stupanj njegove imunogenosti ovisi o tumorskom mikrookruženju i aktivaciji imunoloških signalnih puteva, koji se razlikuju među molekularnim

podtipovima raka dojke, ali i unutar istog podtipa tijekom razvoja bolesti i neoadjuvantnog liječenja.

Imunogenost raka dojke proizlazi iz dinamične interakcije tumorskih stanica i imunološkog sustava domaćina. Ta interakcija omogućuje stvaranje tumorskih antigena i neoantigena, njihovu prezentaciju putem HLA/MHC, (humani leukocitni antigen) sustava, regrutaciju i aktivaciju efektorskih imunoloških stanica kao i paralelnu aktivaciju imunosupresivnih mehanizama koji omogućuju tumorski bijeg od imunološke kontrole. U ovom kontekstu tumorsko mikrookruženje predstavlja ključnu platformu u kojoj se istodobno odvijaju protutumorski i protumorski imunološki procesi. Središnju ulogu u imunološkoj regulaciji raka dojke imaju signalni ligandi koji djeluju kroz jasno definirane imunološke osi. Među njima ističu se ligandi imunoloških kontrolnih točaka, proangiogeni i hipoksijom inducirani čimbenici, citokini sa stimulacijskim i supresivnim djelovanjem te kemokini koji oblikuju sastav tumorske infiltracije. Ovi ligandi ne djeluju izolirano, već tvore međusobno povezanu mrežu signala koja određuje hoće li tumorsko mikrookruženje poprimiti obilježja imunološki „vrućeg“ ili „hladnog“ tumora (6).

Posebno je naglašena uloga liganda PD-L1 koja predstavlja ključni mehanizam adaptivne imunološke rezistencije u raku dojke. Njegova ekspresija često je inducirana aktivnom antitumorskom imunosti, ali i hipoksijom te proangiogenim signalima, čime se uspostavlja povratna sprega između upale, vaskularne disfunkcije i imunološke supresije.

Uz PD-L1 i VEGF sve više se prepoznaje kao središnji imunomodulator koji, osim angiogeneze, aktivno oblikuje imunosupresivno mikrookruženje inhibicijom dendritičnih stanica, poticanjem regulatornih T-limfocita i smanjenjem infiltracije efektorskih T-stanica (7).

Imunološki pejzaž raka dojke dodatno je definiran djelovanjem citokina poput interferona γ , transformirajućeg čimbenika rasta beta i IL-10 koji moduliraju antigensku prezentaciju, diferencijaciju imunoloških stanica i ekspresiju imunoloških kontrolnih točaka.

Istodobno kemokinski signali usmjeravaju regrutaciju TIL-ova, čija je prisutnost prepoznata kao jedan od najvažnijih morfoloških pokazatelja aktivne antitumorske imunosti i povoljnog terapijskog odgovora, osobito u trostruko negativnom karcinomu dojke (8).

U kontekstu neoadjuvantnog liječenja imunološki signalni putevi prolaze dodatne promjene. Terapijski inducirani stres i selekcijski pritisak mogu različito djelovati na održivost tumorskog imunološkog mikrokruženja (6).

Neoantigeni koji nastaju zbog somatskih mutacija povećavaju vjerojatnost da T-limfociti prepoznaju tumor kao „stran“. U dojci je općenito tumorsko imunološko mikrokruženje nešto oskudnije u odnosu na melanom ili karcinom pluća.

Defekti homolognog popravka mogu povećati imunološku vidljivost tumora kroz akumulaciju oštećenja DNA i posljedično jaču aktivaciju antitumorske imunosti. Tumor može smanjiti prezentaciju antigena, remodelirati svoje okruženje, pojačati svoje inhibicijske točke i regrutirati svoje imunosupresivne stanice.

1.1. Klinička klasifikacija raka dojke prema stadiju bolesti

Ova klasifikacija omogućava precizniji izbor terapije i predviđanje tijeka bolesti.

- Stadij 0 – karcinom in situ DCIS - duktalni karcinom in situ, LCIS – lobularni karcinom in situ
- Stadij I – lokalizirani tumor bez metastaza u limfnim čvorovima
- Stadij II – zahvaćenost aksilarnih limfnih čvorova
- Stadij III – lokalno uznapredovali tumor s većim zahvaćanjem limfnih čvorova
- Stadij IV – tumor s uznapredovalim udaljenim metastazama

1.2. TNM Klasifikacija

TNM klasifikacija temelji se na veličini tumora (T), statusu limfnih čvorova (N) i prisustvu metastaza (M).

- Tis – (*carcinoma in situ*) – tumor ograničen na epitel, nije probio bazalnu membranu
- T1 – karcinom dojke
- T1a - > 1 mm do < od 5mm
- T1b – karcinom dojke > 0,5 cm – 1 cm
- T1c – karcinom dojke > 1 cm – 2 cm
- T2 – karcinom dojke > 2 cm – 5 cm

- T3 – karcinom dojke veći od 5 cm
- T4 – prisutnost plućnih metastaza
- T4 a – karcinom dojke koji se širi na stijenku toraksa
- T4 b – karcinom dojke koji zahvaća kožu, edem kože, ulceracije
- T4 c – T4 a + T4 b
- T4 d – karcinom dojke s upalnim promjenama
- N1 – povećani aksilarni limfni čvorovi
- pN1 – postoperativni nalaz, povećani aksilarni limfni čvorovi
- pN1a – postoperativni nalaz, mikrometastaze
- pN1b – postoperativni nalaz, makrometastaze, 1 – 3 čvora $> 0,2 - < 2$ cm, ili ≥ 4 limfna čvora $> 0,2 - < 2$ cm ili zahvaćena kapsula limfnih čvorova < 2 cm ili limfni čvorovi ≥ 2 cm
- N2 – fiksirani aksilarni limfni čvorovi
- pN2 – postoperativni nalaz, fiksirani aksilarni limfni čvorovi,
- N3 – opsežno zahvaćeni limfni čvorovi
- pN3 – postoperativno tumačenje opsežno zahvaćenih limfnih čvorova
- M – udaljene metastaze

Histološki odgovor tumora na terapiju procjenjuje se analizom operacijskog materijala nakon masektomije ili kvadratektomije, nakon završene neoadjuvantne terapije. Ovisno o stupnju odgovora podjela spada u slijedeće kategorije:

pCR (*pathological complete response*), označava potpuni patološki odgovor tumora na neoadjuvantno liječenje.

RCB (*residual cancer burden*), indeks opisuje veličinu rezidualnog tumora u dojci, postotak vitalnih tumorskih stanica, broj zahvaćenih limfnih čvorova. RCB se klasificira u četiri stupnja:

- RCB-0 – potpuni patološki odgovor
- RCB-I – minimalna rezidualnost tumora
- RCB-II – umjereni rezidualni tumor
- RCB-III – velika rezidualna bolest, slab odgovor na neoadjuvantno liječenje

Oznaka y dodaje se ispred TNM stadija, time se označava da je pacijentica dobila neoadjuvantnu terapiju. Korištenjem oznake „yp“ označava se patohistološki stadij nakon terapije.

- ypTN0 – nema rezidualnog tumora, potpuni patološki odgovor
- ypT1N0 – rezidualni tumor < 2 cm bez metastaza u limfnim čvorovima
- ypT2N1 – tumor veličine 2 -5 cm, s metastazama u 1 – 3 limfna čvora
- ypTN3N2 – rezidualni tumor > 5 cm s metastazama u 4 – 9 limfnih čvorova

N0 u rasponu do N3 – ukazuje na status pozitivnih limfnih čvorova u axilli, (pazušnoj jami).

M0 u rasponu do M1 – ukazuje na prisutnost udaljenih metastaza.

1.3 Histološka klasifikacija karcinoma dojke

Histološka klasifikacija tumora dojke zasnovana je na morfološkim karakteristikama tumorskog tkiva. Svi tipovi karcinoma dojke po molekularnim i histološkim razlikama imaju specifične karakteristike koje utječu na klinički tijek bolesti, onkološki pristup liječenju i konačno zahtijevaju različitu patohistološku i molekularnu dijagnostiku koja je ključna u liječenju. Putevi patofiziologije raka dojke su jasno definirani genskim i epigenetskim promjenama koje dovode do nekontrolirane proliferacije stanica kao što su molekularni mehanizmi, hormonski i mehanizmi imunološke mikrookoline.

Mutacije protoonkogena kao što su HER2 i MYC, inaktivacija tumor supresorskih gena TP53, BRCA1 i BRCA2 rezultiraju smanjenu sposobnost popravka DNA. Poticanje rasta i preživljavanja tumorskih stanica je rezultat poremećaja signalnih puteva PI3K/AKT/mTOR/RAS/MEK/. Angiogenezni faktor VEGF omogućuje stvaranje novih krvnih žila koje potiču rast i razvijanje tumora (9).

Uloga hormona u patofiziologiji raka dojke ima značajnu ulogu. Estrogen i progesteron imaju izuzetno veliku ulogu u progresiji raka ukoliko je tumor hormonski ovisan putem aktivacije nuklearnih receptora ER i PR. Hormonski ovisni tumori su osjetljivi na hormonsku terapiju koja se daje u prvoj liniji liječenja u kombinaciji s kemoterapijom i zračenjem.

TIL-ovi mogu djelovati protutumorski i protumorski ovisno o njihovu fenotipu, funkcionalnom stanju i tumorskom mikrookolišu, tumor aktivno „preodgaja“ TIL-ove.

Pojavnost PD-L1u tumoru dojke povezana je s imunosupresijom i slabijim imunološkim odgovorom na tumor. Makrofagi povezani s tumorom, TAM makrofagi, često podržavaju rast i metastaziranje, ključna su populacija stanica u tumorskom okruženju s izrazito dvojnog ulogom. Tumorski makrofagi regrutirani su iz monocita periferne krvi u tumorsko tkivo gdje ih tumor „programira“.

Histološka i molekularna klasifikacija omogućuju personalizirani pristup liječenju. TNM klasifikacija određuje stadij bolesti i terapijske strategije. Molekularni podtipovi određuju osjetljivost na hormonsku terapiju, HER2 inhibitore i imunoterapiju. Rak dojke je vrlo heterogena bolest s različitim biološkim i kliničkim svojstvima.

Razumijevanje epidemioloških faktora, molekularne patofiziologije i klasifikacije omogućuje precizne dijagnostičke i terapijske postupke. Personalizirana terapija temelji se na molekularnoj klasifikaciji što poboljšava ishode liječenja i benefite terapije (10).

Ciljanje staničnog sastava tumorskog mikrookruženja za liječenje raka dojke do danas je provedeno po endokrinim i HER2 pozitivnim karcinomima. U molekularnom podtipu trostruko negativnog karcinoma dojke testira se i imunološko mikrookruženje. U budućnosti će biti potrebno utvrditi učinke različitih staničnih sustava oko tumora na preživljavanje i prognozu bolesnika. Kombinacija konvencionalnih terapija prvih i drugih linija liječenja koje bi ciljale stanice u tumorskom okruženju obećavalo bi pristup postizanju boljih terapijskih postupaka i usmjeravalo na buduća istraživanja. Precizno liječenje bi se trebalo postići remodeliranjem tumorskog okruženja i poticanjem antitumorske funkcije stanica koje potiču rast tumora dojke.

Histološka klasifikacija karcinoma dojke (*WHO Classification of Breast Tumor, 5th edition, 2019.*)

Invazivni karcinomi dojke

- Invazivni karcinom bez posebnog tipa – NOS (nespecifičan histološki podtip) je najčešći tip.

- Specijalni histološki tipovi invazivnog karcinoma:
 - Invazivni lobularni karcinom (ILC)
 - Tubularni karcinom
 - Kribriformni karcinom
 - Mucinozni (koloidni) karcinom
 - Medularni karcinom / karcinom s medularnim obilježjima
 - Papilarni karcinom
 - Mikropapilarni karcinom
 - Metaplastični karcinom
 - Apokrini karcinom
 - Sekretorni karcinom
 - Adenoidno-cistični karcinom
 - Acinar cell karcinom
 - Karcinom s neuroendokrinom diferencijacijom
- Neinvazivni (in situ) karcinomi
- Duktalni karcinom in situ (DCIS)
- Podtipovi prema arhitekturi:
 - komedo
 - kribriformni
 - papilarni
 - mikropapilarni
 - solidni
- Lobularni karcinom in situ (LCIS)
 - klasični LCIS
 - pleomorfni LCIS
 - floridni LCIS

1.4. Molekularna klasifikacija raka dojke – imunohistokemijsko procjenjivanje

Molekularna klasifikacija karcinoma dojke predstavlja temelj personaliziranog pristupa liječenju prema imunohistokemijskoj procjeni. Hormonski ovisni tumori (ER/PR pozitivni) liječe se hormonskom terapijom (tamoksifen, inhibitori aromataze), često dugotrajno, dok se HER2-pozitivni liječe ciljanim anti-HER2 lijekovima u kombinaciji s kemoterapijom. TNBC zahtjeva najčešće samo kemoterapiju, u zadnje vrijeme koristi se i imunoterapija. Danas se liječenje raka dojke temelji na patohistološkoj, imunohistokemijskoj i molekularnoj dijagnostici, bez tih podataka nema pravilne terapijske odluke.

Molekularni podtip – procjenjuje se imunohistokemijski	ER / PR status	HER2 status	Ki-67	Biološke i kliničke karakteristike	Prognoza i terapijski odgovor
Luminalni A	ER+ PR+	HER2–	Nizak (<20%)	Dobro diferencirani tumori, spor rast, nizak stupanj proliferacije	Najbolja prognoza; dobar odgovor na hormonsku terapiju; kemoterapija često nije potrebna
Luminalni B (HER2–)	ER+ PR+	HER2–	Visok (≥ 20%)	Viša proliferacija, agresivniji od luminalnog A	Lošija prognoza od luminalnog A; hormonska terapija + često kemoterapija
Luminalni B (HER2+)	ER+ PR+	HER2+	Visok	Kombinira hormonsku ovisnost i HER2 signalizaciju	Terapija uključuje hormonsku + anti-HER2 + kemoterapiju
HER2-pozitivan	ER– PR–	HER2+	Visok	Visoko proliferativni tumori, agresivni biološki profil	Značajno poboljšana prognoza uz anti-HER2 terapiju (trastuzumab, pertuzumab)
Trostruko negativni (TNBC)	ER– PR–	HER2–	Visok	Visoka heterogenost, česti TIL, povezanost s BRCA mutacijama	Lošija prognoza; osjetljivost na kemoterapiju; imunoterapija kod PD-L1+ tumora

Tablica 1. Molekularni podtipovi raka dojke i njihove karakteristike

2. Biološka uloga PD-L1 u karcinomu dojke

PD-L1 je transmembranski glikoprotein tipa I od približno 290 aminokiselina koje uključuju dvije izvanstanične domenama sličnim IgV i IgC, transmembranskim segmentom te kratkom citoplazmatskom domenom. PD-L1 se može eksprimirati na različitim staničnim populacijama, uključujući antigen prezentirajuće stanice, T i B limfocite, monocite/makrofage te epitelne stanice, u tumorskom kontekstu na imunim tumorskim stanicama. Fiziološka uloga PD-1/PD-L1 je održavanje periferne tolerancije i ograničavanje prekomjerne upale. Međutim u malignim bolestima pojačana ekspresija PD-L1 predstavlja ključni mehanizam imunološkog izbjegavanja, jer vezanjem na PD-1 receptor na aktivnim T limfocitima dovodi do funkcionalne inhibicije, smanjenja citotoksične aktivnosti i razvoja stanične iscrpljenosti, čime se slabi antitumorski odgovor oboljelog. U raku dojke, PD-L1 ekspresija često prati prisutnost TIL-ova što održava dinamičnu ravnotežu između antitumorske imunosti i adaptivne imunološke rezistencije tumora.

Inhibicijski proteini kontrolnih imunoloških regulacijskih točaka uključujući i PD-L1 potiskuju antitumorske T- stanične odgovore (11). Što je više povećana ekspresija PD-L1 u tumorskom tkivu, tumori koriste puteve kao ključne mehanizme za deaktivaciju CTL-a te na taj način izbjegavaju antitumorske odgovore domaćina što ih čini progresivnijima i otvara im put metastaziranja.

PD-L1 je ligand pojačan u različitim vrstama tumora, između ostalog to je i jedan od razloga brzog rasapa bolesti, veže se na PD-1 receptor na T limfocitima, time inhibira njihovu aktivaciju, te omogućuje tumoru da izbjegne imunološki odgovor domaćina (12).

Što je veća ekspresija PD-L1 u karcinomu dojke tumor je više agresivan, povećava se broj tumorskih infiltrirajućih limfocita (TIL-s). Ekspresija PD -L1 na površini imunoloških stanica je relativno konstantna dok je na površini tumorskih stanica dosta dinamična. Na ekspresiju PD-L1 kod neoadjuvantnog liječenja karcinoma dojke utječe kemoterapija, zračenje kao i drugi čimbenici u onkološkoj terapiji (13). Temeljem obećavajućih terapijskih ishoda terapije anti-PD-1/PD-L1 postao je ključni protein u imunoonkologiji, njegove funkcije i mehanizmi se sve više istražuju. Poznato je kako je ekspresija PD-L1 konfuzno regulirana raznim imunološkim procesima poput transkripcije gena i posttranskripcijskih modifikacija, kao i egzosomalnog transporta. Jako je važno proširiti razumijevanje regulacije ekspresije aberativnih signalnih puteva i genomske mutacije koje u prvom redu potiču sam nastanak tumora. Prilikom samog

nastajanja staničnih mutacija, transformacija i tumorigeneze dolazi do pojačane regulacije PD-L1 koja posredstvom ovih puteva slabi aktivnost imunoloških stanica, dopuštajući mutagenim stanicama izbjegavanje imunološkog nadzora domaćina te na taj način pojačavaju svoj metastatski potencijal. Takvim mehanizmom rak izbjegava imunološki odgovor (14).

2.1. Molekularna regulacija PD-L1

PD-L1 kodiran je na genu CD274 smješten na komosomu 9p24.1, opisan je kao treći član obitelji B7 proteina, sastavljen od sedam eksona. Kodiran je unutar sedam eksona (15). Spada u tip 1 transmembranskog proteina, njegove ekstracelularne domene slične su IgV i IgC hidrofobnog transmembranskog dijela koji se sastoji od 30 aminokiselina kako je gore opisano. Epigenetski faktori poput metilacije i acetilacije histona utječu na pojačanu ekspresiju PD-L1 (14, 15).

Pokretači tumorigeneze kao transkripcijski faktori u onkogenim putevima djeluju stimulirajuće u povećanju izražajnosti PD-L1 u tumorskim stanicama. U transkripcijskim putevima sudjeluje i MYC gen kao značajno eksprimiran u tumorima, u većini tumora korelira sa izražajnošću PD-L1 (16).

U brojnim tumorima aktivacija onkogenih i proliferacijskih putova povećava transkripciju PD-L1, najčešće transkripcijske regulacije su PI3K/AKT/m TOR i to najčešće povezani s gubitkom/inaktivacijom PTEN. RAS/MEK/ERK/RAF (MAPK) su česti onkogeni i signalni putevi u transkripciji PD-L1. Hipoksijom inducirani faktori, osobito HIF- α induciraju PD-L1 u hipoksičkim dijelovima tumora.

Epigenetske promjene kao metilacija DNA i modifikacije histona mogu modulirati dostupnost promotorskih i regulatornih puteva PD-L1 te posljedično razinu ekspresije u tumorskim i stromalnim stanicama.

PTEN u funkciji puteva kao serin-treonin fosfataza ima antagonističko djelovanje prema PI3K signalnog puta dok mu je aktivnost značajno povećava prilikom aktivacije PD-L1 posredovanjem CK2. Kod signalnog puta MEK/ERK/MAP ligacija PDL1 inhibira fosfolipazu. Ovi signalni putevi rezultiraju slabijim djelovanjem transkripcijskih faktora, dovode do smanjene citokinske produkcije i citotoksičnih sposobnosti aktiviranih T stanica (17).

Kod raka dojke mutacija PIK 3 signalnog puta, osobito kod TNBC aktivira puteve mTOR te na taj način potiče transkripciju PD-L1, to je jedan od načina gdje tumorske stanice izbjegnu imunološki nadzor domaćina te same proizvode svoju imunološku regulacijsku točku.

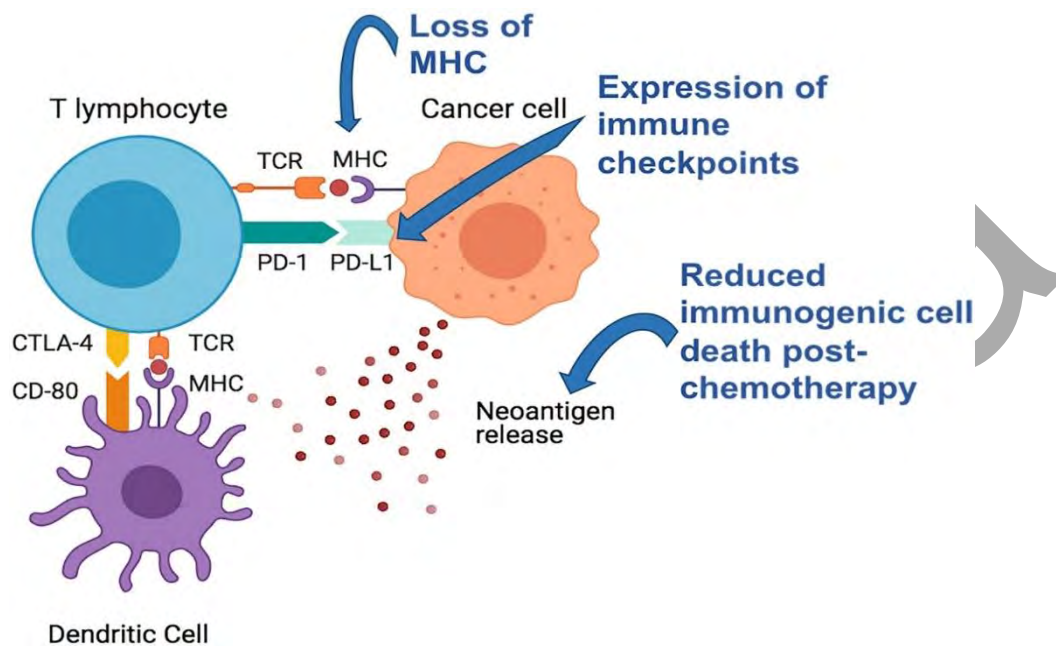
Kako je ekspresija PD-L1 u jezgri povećana to dovodi do kemorezistencije kao i inhibicije apoptoze tumorskih stanica. U posttranskripcijskoj i posttranslacijskoj regulaciji ekspresija PD-L1 dodatno se kontrolira putem mikroRNA, stabilnosti mRNA kao i posttranskripcijskih modifikacija kao ubikvitinacija koje često utječu na stabilnost proteina i njegovu lokalizaciju (18).

Tumorske stanice na samom početku rasta stječu mehanizme imunološke supresije kao i druga pro-tumorska svojstva u svom mikrookolišu odabirući sebi stanice za preživljavanje. Može postojati značajna heterogenost tumorskih stanica u samom tumoru, posebno tijekom metastaziranja kada različiti klonovi tumorskih stanica mogu razviti različite mehanizme preživljavanja na imunološkoj razini koju stvaraju u svom mikrookolišu (19).

Tumori nastaju nakupljanjem mutacija DNA i epigenetskih modifikacija koje omogućavaju stanicama da upravo zaobiđu imunološki odgovor domaćina kao i kontrolne mehanizme koji reguliraju stanične procese uključujući metabolizam, proliferaciju, preživljavanje i invaziju. Po ovim činjenicama je potpuno jasno kako imunološki sustav ima složenu ulogu u razvoju tumora (20).

Regulacijski mehanizmi kod genske mutacije 3'UTR od PD-L1 dolazi do prekida 3' UTR PD-L1. Kod acetilacije histona HDAC (histon deacetilaze), inhibitori pojačavaju acetilaciju histona time i ekspresiju PD-L1. Acetilacija histona kritična je za povezanost BET proteina s promotorom PD-L1 (21).

Prilikom transkripcije i disregulacijom onkogenih gena aberantni onkogeni put pojačava ekspresiju PD-L1 uključujući MYC, ALK, HIF1- α te PTEN/PI3K put. Kod svih navedenih i već dobro poznatih regulacijskih mehanizama u tumorskom mikrookolišu potencijalne terapijske strategije bi mogle biti supresija PD-L1 i drugih inhibitora imunoloških kontrolnih točaka (22).



Slika 1. Putevi imunološke rezistencije na antitumorski odgovor.

Preuzeto: Ashleigh i sur., 2021.

Nakon apoptoze tumorskih stanica dolazi do oslobađanja tumorskih antigena koje prezentiraju antigen-prezentirajuće stanice putem glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC). Time se aktiviraju citotoksični T limfociti koji mogu prepoznati i uništavati tumorske stanice. Međutim, tumor razvija mehanizme izbjegavanja imunološkog odgovora stvaranjem imunosupresivnog mikrookruženja, povećanom ekspresijom kontrolnih točaka kao što su PD-1/PD-L1 i CTLA-4 te djelovanjem makrofaga povezanih s tumorom (TAM). Ovi mehanizmi inhibiraju aktivaciju i funkciju T limfocita te omogućuju tumorskim stanicama izbjegavanje protutumorskog imunološkog odgovora.

Promjene u specifičnim genima mogu uzrokovati poremećaje aktivacije T stanica. Neke tumore prati delecija PTEN-a zato što molekularni mehanizmi uključuju genske mutacije i delecije, gubitak kromatina, gubitak heterozigotnosti i epigenetskih promjena kao što su transkripcijske pogreške koje nastaju kao posljedica hipermetilacije. U takvim situacijama PTEN utječe na regulaciju PIK3/AKT put i smanjuje nastanak PD-L1. Smanjena infiltracija T stanica u tumorskom okolišu može dovesti i do rezistencije na lijekove i kemoterapeutike. Lučenje IL-6 potiče migraciju neutrofila povezanih s tumorom u tumorska tkiva te inhibira ulazak CD4⁺ i CD8⁺ T stanica u tumorsko okruženje.

Delecija PTEN-a uzrokovana različitim molekularnim mehanizmima pojačava ekspresiju VEGF-a što za posljedicu ima poticanje tumorske angiogeneze što slijedom dovodi do smanjene perfuzije i infiltracije CD8+ T stanica.

Kod nekih solidnih tumora T stanicama je teško proći kroz imunosupresivnu T stromu, što rezultira otpornošću na blokadu PD-L1. U karcinogenezi PD-L1 obično prekomjerno eksprimiran kao rezultat svih onkogenih „događaja“ koji potiču njegovo djelovanje. Mutacije receptora epidermalnog faktora rasta pozitivno koreliraju s ekspresijom PD-L1 u puno karcinoma, pri čemu inhibitori epidermalnog faktora rasta djeluju kao represori transkripcije PD-L1.

Imunohistokemijska analiza detekcije PD-L1 svih klonova može biti ograničena predanalitičkom i analitičkom varijabilnosti, uključujući heterogenost klonova antitijela, metodologiju bodovanja (očitanja), kao i biološke varijacije u ekspresiji zbog vrste analiziranog uzorka (kirurška resekcija, biopsija, primarni tumor, metastaza). Analiza skupova podataka kod raka dojke potvrdila je sekvenciranjem RNA iz tumora kako prekomjerna ekspresija PD-L1 mRNA povezuje niz nepovoljnih prognostičkih čimbenika kao što su negativan status hormonskih receptora, HER 2 pozitivan status te viši proliferativni indeks tumora. U tim podacima uočeno je kako dio trostruko negativnih karcinoma dojke imaju nešto veći pozitivitet PD-L1 u odnosu na druge molekularne podskupine raka dojke kao rezultat konstitutivne transkripcijske aktivacije gubitka PTEN-a. Trostruko negativni karcinomi dojke s prekomjernom ekspresijom PD-L1 molekularno je i karakterističan obilnim infiltratom citotoksičnih T stanica i višim stopama potpunog odgovora na neoadjuvantnu kemoterapiju (23).

2.2. Mehanizmi inducirane ekspresije PD-L1 i funkcionalne posljedice

Ekspresija PD-L1 u tumoru regulirana je na više nivoa, uključujući transkripciju, posttranskripciju kao i posttranslacijske modifikacije. Inducirana je različitim faktorima uključujući i citokine kao što su i interferon gama, TNF- α i interleukin – 10. Regulacija ekspresije ovisi i o mutacijama u tumorskim stanicama poput amplifikacije gena ili amplifikacije signalnih puteva kao što su PI3/K, AKT, mTOR, amplifikacije ovih puteva dovode do značajno povećane ekspresije PD-L1 (24,25).

Adaptivna, imunološki regulirana ekspresija najčešće je zbog odgovora na prisutnost aktivne antitumorske imunosti, osobito putem citokina. Konstitutivna ili tumor-intrinzična nastaje zbog promjena PI3K/AKT/MAP, što može biti prisutno uz slabiju imunološku infiltraciju (26).

CPS (*Combined Positive Score*) u ovom radu je semikvantitativno izračunat kao PD-L1 22C3, metodom kvantifikacije ekspresije PD-L1 u tumoru dojke, izražava se u postocima, računa se na minimalno 100 održivih tumorskih stanica imunohistokemijskih obojanih na PDL – 1.

$$CPS = \frac{\text{broj PDL1 pozitivnih stanica}}{\text{ukupan broj stanica PDL1 pozitivnih} + \text{PDL1negativnih stanica}} \times 100$$

Mehanizam djelovanja PD-1 uključuje i aktivaciju proteinsku tirozin fosfatazu (SHP2) u citoplazmatsku domenu PD-1 gdje fosforilira proksimalne signalne molekule na mjestu receptora T stanica i CD 28. Imunološka inhibicija ne dogodi se ukoliko se signali T stanica i PD-L1 isporučuju na različitim mjestima tumorskog okruženja. Upravo to govori kako je mehanizam djelovanja PD-L1 uvjetovan prethodnom angažiranošću PD-1 u neposrednoj blizini signala T stanica i CD 28 kako bi lokalizirao aktivnost proteinske tirozin fosfataze na to mjesto. Egzosomi mogu djelovati između stanica spajanjem s ciljnom stanicom prenoseći joj signale. U tom smislu CD 274 DNA koja kodira PD-L1 pronađena je u egzosomima tumora što znači kako egzosomi mogu prenositi razne mikroRNA enzime i druge molekule između stanica te samim time utjecati na staničnu aktivnost, ovo se odnosi na egzosome koji ekspimiraju PD-L1 na svojoj površini te ih može blokirati anti PD-L1 imunološka terapija (27).

IL-6 svojom aktivnošću u posredovanju tumorskog mikrookruženja oslobađa imunološke i neimunološke stanice kao što su T i B limfociti, endotelne stanice, monociti, fibroblasti i adipociti. Aberantna ekspresija IL-6 prisutna je u većini tumora i povezana s lošijim kliničkim ishodima i bržim metastaziranjima. Dvije molekule uključene su u molekularnu i biološku aktivnost IL-6, najbitnije su CD 126 i CD 130. Njegov važan signalni mehanizam uključuje aktivaciju transkripcijskog STAT3. IL-6 aktivira JAK (janus kinazu), fosforilaciju nakon čega slijedi i fosforilacija STAT3 koja se translocira u jezgru stanice kako bi aktivirala transkripciju cijelog gena.

Signalni put IL-6 često se aktivira kod raka dojke, može potaknuti rast tumorskih stanica te istovremeno suzbiti imunološki odgovor. STAT3 je prekomjerno eksprimiran kod trostruko negativnog karcinoma dojke te je vjerojatno povezan i s početkom bolesti i njenom progresijom. Studije povezuju visoku ekspresiju STAT3 u stromi povezanoj s tumorom sa značajno nižim preživljenjem, osobito kod pacijentica s trostruko negativnim karcinomom dojke. Podatci iz više studija povezuju sinergiju STAT3 i IL6 kao potencijalne mete u liječenju trostruko negativnog karcinoma dojke kao signalnih puteva iz jezgre prema površini stanica u pomaganju pojavnosti PD-L1 na površini tumorskih stanica (28).

Ovim saznanjima jasno je kako rak dojke ima složenost imunogenih mehanizama koji potiču progresiju raka, to se posebno odnosi na trostruko negativni rak dojke. Trenutne mogućnosti liječenja ostaju uglavnom ograničene na kombinaciju inhibitora imunoloških kontrolnih točaka s imunoterapijom. No postaje i jasnije kako nije samo dovoljna identifikacija novih biomarkera već i blokade sinergijskih puteva u samoj stanici koja se odnosi na signalne puteve i sinergiju pojedinih imunogenih značajki (29).

PD-L1 je centralni ligand imunološke supresije u raku dojke. Svojim vezanjem na ligand PD-1 koji se nalazi na limfocitima dovodi do smanjenja funkcionalne energije i iscrpljenja limfocita. Induciran je hipoksijom, IFN- γ i razvojem vaskularizacije direktno u tumoru, aktivni je signal tumorske adaptacije.

2.3 Onkološki značaj PD-L1

PD-L1 ima veliko značenje kod neoadjuvantnog pristupa liječenju za pacijentice oboljele od karcinoma dojke zbog personaliziranog pristupa liječenja u onkologiji. Koristio bi se kod pacijentica koje imaju ekspresiju tog biomarkera, u tumorskom tkivu.

Više opisanih dokaza opisuje kako je postojeći antitumorski imunološki odgovor bitan, a vidljivo je kako apsolutno nije dovoljan za učinkovitost terapija usmjerenih na PD-1/PDL-1 (30). Smatra se kako bi popisi svih imunoloških gena koji održavaju mikrookruženje tumora bilo karakterizirano signaliziranjem IFN- γ citotoksičnim stanicama, aktivnom inhibicijom antigena kao i citokinima T stanica mogli bi imati prediktivnu ulogu na odgovor za imunološku (ICI) terapiju. Dobro opisani takav genski popis bio je prikazan kao profil ekspresije gena upale T stanica, sadržavao je gene koji reagiraju na IFN- γ koji su bili povezani s ekspresijom

kemokina, citotoksičnom aktivnosti i imunološkom farmakološkom terapijom permolizumaba (31).

Uvođenjem imunoterapije u neoadjuvantnu shemu liječenja povećavalo bi šanse za potpuni nestanak tumora što do sada nije postignuto, poseban značaj bi bio kod pacijentica s trostruko negativnim karcinomom dojke. Neke studije su pokazale kako je benefit imunoterapije kod PD-L1 pozitivnih bolesnica bio izraženiji nego kod pacijentica koje su imale negativan PD-L1. Osim pacijentica s TNBC kandidatkinje za imunoterapiju bi bile pacijentice s pozitivnim tumorom na PD-L1 >1%. Pacijentice s visokorizičnim HER2 negativnim karcinomom dojke bi također imale velike benefite ovim testiranjem (32, 33).

Poznato je kako su genske mutacije u rasponu od supstitucija jedne baze do translokacija kromosoma kamen temeljac razvoja neoplastičnih lezija. Isto tako se zna da individualnim mutacijama treba nekada i dugi niz godina do transformacije u displastične i na kraju u neoplastične tumorske stanice. Ove mutacije su inducirane raznim vanjskim utjecajima.

Upravo ovaj proces oblikuje i sastav imunološkog mikrokruženja kroz različite mehanizme sukladno njegovom nastajanju (34).

Među bitnim ključnim komponentama imunološkog mikrokoliša raka dojke su tri tipa limfocita T. CD8⁺ je citotoksični T limfocit (CTLs) koji osigurava efikasan imunološki sustav protiv tumora, samim time njegova pojavnost u što većem broju povezana je s boljim odgovorom na terapiju. CD4⁺ je pomoćni T limfocit, uloga mu je u moduliranju imunološkog i protuupalnog odgovora. Regulatorni T limfocit (Tregs) potiskuje antitumorski imunitet, što znatno otežava učinke terapije (35).

Visoka razina TILs-a povezana je s visokim odgovorom na neoadjuvantnu kemoterapiju osobito kod TNBC i HER2 pozitivnog raka dojke. Makrofagi povezani s tumorom (TAMs) su M1 i M2 makrofagi. M1 makrofagi djeluju protuupalno, stimulirajući imunološki odgovor protiv tumora, dok su M2 imunosupresivni, potiču angiogenezu i rast tumora. NK stanice su prirodne ubojice, imaju ulogu prepoznavanja i eliminacije tumorskih stanica. Njihova aktivnost u raku dojke je često smanjena upravo zbog imunosupresivnih čimbenika mikrokoline (36).

Mijeloidne supresorske stanice (MDSCs) pojačavaju i podupiru rast tumora potiskivanjem funkcije T i NK (prirodne ubojice) stanica. Njihovo prisustvo često korelira s rezistencijom na terapiju i lošijom prognozom ishoda bolesti.

Uloga B limfocita u tumoru dojke do sada nije u potpunosti razjašnjena. Imunološke stanice u tumorskom mikrokruženju raka dojke utječu na odgovor na kemoterapiju, bilo na neoadjuvantnu ili postoperacijsku terapiju. Neoadjuvantna kemoterapija novodijagnosticiranog raka dojke u kojem je napravljena kompletna patohistološka verifikacija i molekularna tipizacija tumora pruža priliku i za proučavanje osnovnih imunoloških parametara koji su povezani s odgovorom na liječenje kao i za procjenu promjena u imunološkom mikrokruženju koje je nastalo nakon liječenja u resektatu dojke. Nekoliko studija do sada je radilo istraživanje i izvijestilo kako je broj TIL bitan u smislu većeg broja i boljeg odgovora na neoadjuvantnu (35, 36).

Vjerojatnost je potpunog patološkog odgovora na prijeoperativnu kemoterapiju kod svih podtipova raka dojke podjednaka. Međutim doprinos različitih podtipova limfocita i imunoloških stanica u određivanju odgovora na neoadjuvantno liječenje ostaje do danas točno nedefiniran i nepoznat. Do danas je malo studija ispitivalo imunološke promjene u mikrokruženju tumora dojke nakon kemoterapije jer se smatralo kako je karcinom dojke potpuno neimunogen u odnosu na većinu karcinoma drugih sijela. Bolje razumijevanje imunoloških funkcija koje utječu na vjerojatnost potpunog patološkog odgovora na preoperativnu kemoterapiju moglo bi regulirati nove imunološke terapijske strategije za poboljšanje učinkovitosti kemoterapije (37).

Metastatski trostruko negativni rak dojke je najproblematičniji u onkologiji zbog sužene palete terapije dok se do sada smatra najimunogenijim podtipom. Na temelju navedenoga može se pretpostaviti da će imunoterapija imati važnu ulogu u liječenju trostruko negativnog raka dojke. Postizanje potpunog patološkog odgovora nakon neoadjuvantne terapije značajno je povezano s boljim dugoročnim ishodima. Premda sama pojavnost imunoloških stanica nije univerzalno prognostički povoljan čimbenik, u neoadjuvantnom okruženju ona identificira skupinu bolesnika s većom vjerojatnošću terapijskog uspjeha osobito kada se koristi udio PD-L1 + TIL.

PD-L1 kao biomarker imunološke aktivnosti terapijskog odgovora selektira bolesnike na imunoterapiju. Njegova ekspresija održava adaptivnu imunološku rezistenciju tumora, istodobno označava tumore s većim potencijalom odgovora na neoadjuvantnu imunoterapiju na način da se promijeni imunološki profil tumora prije operativnog zahvata kao i modificira sustav imunološkog infiltrata (38).

U ključnim regulacijskim putevima PD-L1 ima klasični imunološki induciran put posredovanjem $\text{INF} - \gamma$ iz aktivnih T stanica koji inducira PD-L1 na principu adaptivne rezistencije.

U agresivnijim tumorima hipoksija potiče i stvara PD-L1 ekspresiju uz pomoć $\text{TNF-}\alpha$, često ide zajedno s VEGF dominantnim i imunosupresivnim okruženjem tumora. Signalni putevi PIK3/AKT/m TOR, najčešće je tu uključen i gubitak PTEN kao i deregulacija PIK3.

Nadalje, STAT je često povezan s imunosupresivnim fenotipom kao i citokinski signali. Neka istraživanja su na putu zaključaka kako u praksi pozitivnost PD-L1 može moguće biti samo adaptivna ($\text{IFN-}\gamma$ / TIL), ili „konstitutivna“ (onkogeni, hipoksija), smatra se kako ta razlika upravo objašnjava zašto ponekad odgovor na neoadjuvantnu terapiju nije potpun (39).

U onkološkom značaju PD-L1 ima prognostičku i prediktivnu vrijednost. Prognostički značaj nije univerzalan, ovisi o tipu tumora dojke, staničnoj lokalizaciji, (imunološke ili tumorske stanice), kao i o stupnju imunološke infiltracije. U mnogim solidnim tumorima visoka ekspresija PD-L1 povezuje se s agresivnijim fenotipom i lošijim ukupnim preživljenjem i to u više imunogenim tumorima dojke, za sada se smatra da je TNBC kao najimunogeniji molekularni podtip raka dojke. PD-L1 pozitivnost može održavati postojanje aktivnog ali i inhibitornog antitumorskog imunološkog odgovora (40).

Prediktivni onkološki značaj PD-L1 do danas je korištenje upravo tog biomarkera za odgovor na terapiju inhibitorima imunoloških kontrolnih točaka (anti-PD-L1/anti PD-1). Njegova prediktivna vrijednost temelji se na selekciji bolesnika na imunoterapiju, stratifikaciju terapijskih režima, procjeni vjerojatnosti odgovora na terapiju (41).

U kliničkoj praksi PD-L1 se primjenjuje na tumorskim i imunološkim stanicama. Ne djeluje izolirano, dio je složenog imunosupresivnog sustava koji uključuje T- regulatorne stanice, M2 makrofage, supresivne citokine ($\text{TGF-}\beta$, IL-10) a u velikoj mjeri se pokazalo i angiogene faktore (42).

U onkologiji PD-L1 je ključni biomarker na sjecištu tumorske biologije, imunologije i kliničke onkologije. Njegova uloga nadilazi jednostavnu predikciju terapijskog odgovora te pruža uvod u dinamiku interakcije tumora i imunološkog sustava. Iako ima značajna ograničenja, (različiti klonovi, platforme rada, cut-off vrijednosti), PD-L1 ostaje za sada temeljni biomarker u personaliziranom pristupu liječenju malignih bolesti, osobito u imunoterapiji (43).

3. Biologija VEGF-a i njegovih receptora

Tumorske stanice imaju visoke mitotičke i metaboličke stope rasta i razvoja stoga im je nužna visoka razina kisika i hranjivih tvari kako bi održale svoj opstanak i rast. Vaskularna mreža temeljna je za razvoj tumora.

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), regulator je angiogeneze od same embriogeneze (44). Aktivno je uključen u patološku angiogenezu kod svih vrsta tumora.

Biološki učinci VEGF-a potpomognuti su dvjema receptorskim kinazama (RTK), VEGFR-1 i VEGFR-2 koje se značajno razlikuju po svojim svojstvima i djelovanjem (45). VEGF ima svoje podtipove kao što su VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF PIGF (*Placental Growth Factor*). Najviše proučavan je VEGF-A, on se veže za receptore VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (KDR/Flk-1), pri čemu VEGFR-2 ima ključnu ulogu u angiogenezi tumora (46).

VEGF potiče angiogenezu na više načina, jedan od najvažnijih mehanizama jest proliferacija endotelne stanice, na način da potiče diobu i rast. VEGF potiče migraciju endotelne stanice prema područjima gdje je potrebna nova vaskularizacija, to se osobito odnosi na vaskularizaciju i prokrvljenost tumora, gdje sam tumor organizira vlastitu vaskularizaciju (47). VEGF povećava propusnost krvnih žila što omogućava prolazak proteina i drugih molekula kroz zidove krvnih žila (48).

Ekspresija VEGF u karcinomima dojke svih podtipova je dokazana i povezana s agresivnosti tumora.

VEGFR-1 i VEGFR-2 mRNA identificirana je u staničnim linijama raka dojke te je uočeno kako veća ekspresija VEGF u tumorima dojke aktivira signalne puteve preko PIK3CA (fosfatidilinozitol 3-kinaza), osobito kod TNBC (49, 50).

VEGF nema samo izravan utjecaj na invaziju i metastaziranje raka dojke, već je aktivan kao faktor preživljavanja metastatskih stanica karcinoma dojke u prijenosu nutrijenata i u biokemijskim procesima okoline tumora (51).

Smanjena ekspresija VEGF inducira apoptozu u stanicama. Uz potvrdu kako VEGF ima glavnu ulogu u angiogenezi unutar tumora dizajnirane su različite anti-VEGF strategije za inhibiciju rasta tumora i angiogeneze.

Monoklonska protutijela usmjerena selektivno protiv VEGF-a trenutno su u fazi ispitivanja (52). Inhibitori tirozin kinaze koji su usmjereni na VEGF receptore obećavaju boljem ishodu terapije (53).

Studije koje su koristile ribozime koji ciljaju inhibiciju VEGF mRNA ušle su u klinička ispitivanja (54). Uspjeh ovih anti-VEGF metodologija i istraživanja mogla bi biti put prema otkrivanju autokrine signalizacije u samim tumorskim stanicama (55).

Vjerojatno je kako VEGF nastaje iz samih tumorskih stanica kao i stromalnih stanica unutar tumora koji se povezuje na svoje receptore, na taj način tumorske stanice posreduju u vlastitom preživljavanju, invazivnosti i migraciji putem VEGF puteva (56).

Razvoj anti-VEGF strategije u cilju suzbijanja tumorske angiogeneze trebao bi se pokazati učinkovitim u sprečavanju progresije mnogih tipova tumora dojke. Međutim, s mnogim drugim proangiogenim čimbenicima rasta kao što je osnovni faktor rasta fibroblasta (BFGH) i transformirajući faktor rasta beta (TGF β) koji koreliraju s VEGF unutar tumora, nije vjerojatno da će se blokada samog VEGF-a pokazati kao učinkovita (57).

Mehanizam djelovanja VEGF-a je da poticanjem angiogeneze omogući tumoru stvaranje vlastite krvne mrežu te na taj način osigura rast i opstanak (58).

Povišena ekspresija VEGF-a povezana je s hipoksijom u tumorskom mikrookruženju, otpornošću na terapiju te lošijim odgovorom na neoadjuvantnu kemoterapiju. Tumorske krvne žile pokazuju aberantne fenotipove, dio kojih su nezrela arhitekturna hijerarhija, heterogeno mikrookruženje, visoka propusnost s proširenim porama na lumenima krvnih žila (59).

TNBC i HER2 pozitivni tumori dojke imaju najvišu ekspresiju VEGF-a što ih čini potencijalnim kandidatima za antiangiogenoznu terapiju. Kod hormonski pozitivnih tumora VEGF može doprinijeti otpornost na endokrinu terapiju (60). Anti-VEGF monoklonska antitijela u kombinaciji s kemoterapijom poboljšavaju stopu odgovora na neoadjuvantnu terapiju, ali njegova dugoročna korist još uvijek u potpunosti nije potvrđena (61).

VEGF ne samo da stimulira angiogenezu, već ima i imunosupresivni učinak, smanjujući aktivnost T-stanica u tumorskom mikrookruženju.

Kombinacija anti-VEGF i anti-PD-L1 terapije pokazala bi moguću sinergistički učinak pojačavajući imunološki odgovor i istovremeno smanjujući angiogenezu (62).

3.1. Mehanizmi proliferacije VEGF-a u tumorima dojke

Hipoksija i HIF- α aktivacija nastaje kada tumori često rastu brže nego što ih postojeće krvne žile mogu opskrbiti kisikom. Tada niska razina kisika (hipoksija) aktivira inducirani faktor – 1 alpha (HIF-1alpha) koji povećava ekspresiju VEGF-a. Taj mehanizam potiče angiogenezu, stvaranje novih krvnih žila koje hrane tumor i omogućavaju njegov rast (63).

Tumorsko mikrokruženje sadrži makrofage i fibroblaste koji luče TNF-alpha, IL-6 i IL-8 potičući na taj način VEGF ekspresiju. Prvo vezanje angiogenih liganada za receptore dovodi do aktivacije specifične endotelne stanice, koja postaje vodeća stanica, ova stanica slijedi hemotaktični put te upravlja projekcijom slijedećih stanica u okoliš. U vaskulogenezi tumora poznato je kako tumori postaju nekrotični ili apoptotični bez dovoljne cirkulacije krvi ili vaskularne potpore. Metastatska kaskada započinje kada se tumorske stanice podijele od primarnog tumora i prodru u krvne i limfne žile stvarajući na taj način diseminaciju bolesti. Na sekundarnoj lokaciji, metastatske stanice razvijaju okruženje pogodno za angiogenezu, što ih čini neosjetljivim na liječenje. Takav proces najbolje govori kako rast tumora i metastaze jako dobro koreliraju s angiogenezom (64).

Mutacije kao i aktivacija onkogeni i njihovih signalnih puteva poput HER2, RAS i PI3K/AKT potiču VEGF ekspresiju.

HER2 pozitivni tumori dojke – često imaju povećanu angiogenezu zbog jače izražene aktivacije VEGF-a (65).

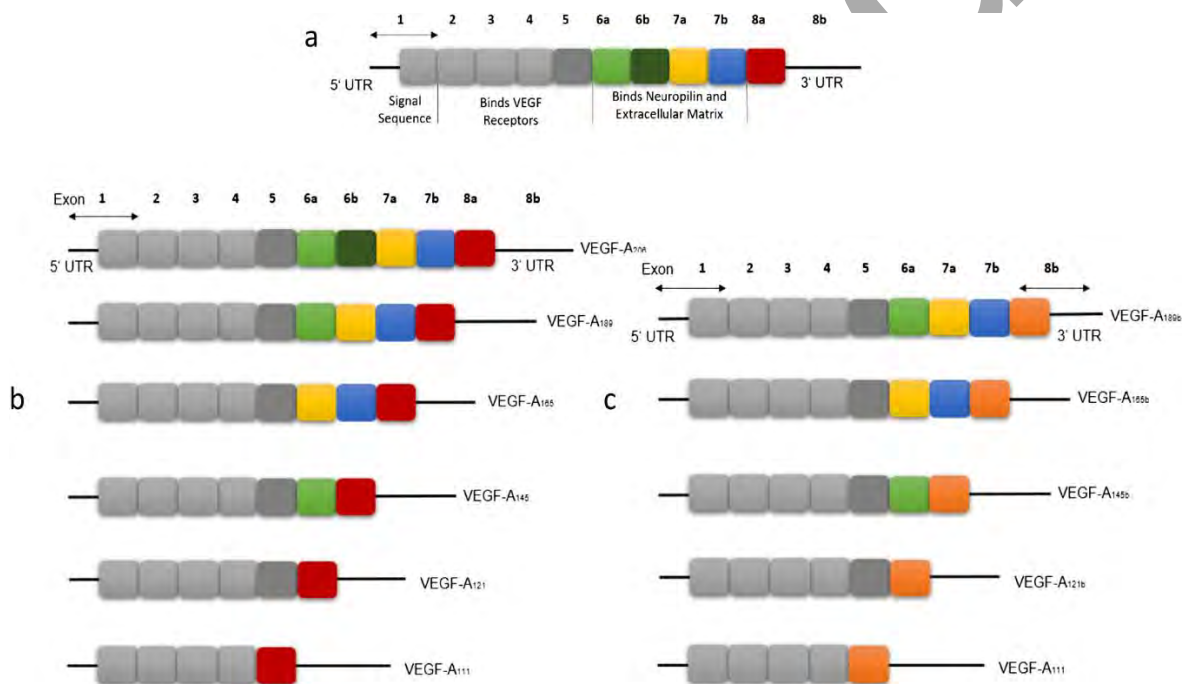
Metaloproteinaze (MMP-2 i MMP-9) razgrađuju ekstracelularni matriks omogućujući oslobađanje VEGF-A i olakšavajući širenje tumorskih stanica u okolno tkivo (66).

Ektopeptidaza kao što su neuropilin-1 i heparin-sulfat su proteoglikani koji pojačavaju vezanje VEGF-a na svoj receptor na taj način pojačavaju i angiogene signalne puteve i čine ih dostupnijim (67).

VEGF potiče epitelno mezenhimalnu tranziciju kao proces kojim tumorske stanice postaju invazivne i otporne na terapiju, takav mehanizam omogućuje širenje tumora putem limfnih i krvnih žila do udaljenih organa (68).

Tumorske stanice oslobađaju ekstracelularne vezikule, egzosome bogate VEGF-om omogućavajući na taj način angiogenezu i pripremu unaprijed udaljenih sjela za metastaze (69).

VEGF tumoru osigurava hranjive tvari omogućujući mu da preživi hipoksične uvjete, potiče invazivnost i proliferaciju te doprinosi na rezistenciji anti – VEGF terapije (44).



Slika 2. Shematski prikaz gena VEGF-a smještenog na kromosomu 6p21.1.

Preuzeto: HivinAl Kawas i sur. 2022.

Gen VEGF strukturiran je sa osam egzona koji su odvojeni intronima. Međusobnim spajanjem organiziraju se tako da stvaraju alternativne molekularne puteve. Prilikom uklanjanja intronskih regija dolazi do spajanja specifičnih regija različitih izoformi VEGF-a.

Ključni receptor koji je uključen u VEGF signalizaciju je neuropilin -1 (NP-1), izrazito je eksprimiran u svim tipovima karcinoma dojke. Što je veća ekspresija NP-1 u karcinomu dojke blokirana je apoptoza u hipoksiji (69, 70).

Ovo upućuje na ulogu NP-1 kao posrednika VEGF signalizacije u karcinomu dojke. Budući da ovom receptoru nedostaju intrinzične signalne funkcije, pretpostavlja se da djeluje sinergistički s drugim receptorima koji još nisu u potpunosti identificirani (71).

VEGF je homodimerni glikoprotein s molekularnom težinom od prilike približno 45Kda, njegov rast pojačavaju različiti čimbenici najčešći su faktor rasta fibroblasta, epidermalni faktor rasta, faktor nekroze tumora, transformirajući faktor rasta i interleukini. Važan induktor VEGF je hipoksija, osobito kod naglog rasta i proliferacije tumora (72).

Tumori bi ostali neaktivni u avaskularnoj fazi, održavajući stabilno stanje između proliferacije stanica i apoptoze prije nego se pretvori u angiogeni fenotip. Ova pretvorba poznata je kao angiogeni prekidač, posljedica je promjene u ravnoteži inhibitornih i stimulirajućih čimbenika zbog stimulacije rasta. VEGF djeluje kao središnji medijator tumorske angiogeneze, stimulirajući rast novih krvnih žila iz obližnjih kapilara te na taj način omogućuje tumorima dovod kisika i hranjivim tvarima za opstanak. Kako tumori rastu stanice unutar rastuće mase postaju hipnotične zbog sve veće udaljenosti od krvnih žila (73). Upravo ovakav način distribucije VEGF u skladu je s hipotezama kako tumorska angiogeneza može biti inducirana hipoksijom.

VEGF sudjeluje i u lučenju i aktivaciji enzima uključenih u razgradnju izvanstaničnog matriksa poput aktivatora plazminogena. Za razliku od strukture normalne vaskularizacije, vaskulatura tumora je nepravilnog oblika, proširena i vijugava sa slijepim završecima.

Krvne žile tumora imaju znatno veću propusnost i intersticijski tlak, pod utjecajem VEGF-a fizički su abnormalne. Kao rezultat takve poremećene arhitekture protok krvi kroz tumor često je i suboptimalan s područjima stagnacije zbog slijepih završetaka. Ovakvo stanje je predispozicija za hipoksiju uz dodatno stimuliranje VEGF-a koji stvara daljnju neorganiziranu vaskularnu strukturu. Poznato je kako hipoksija povezuje PD-L1 i VEGF, u takvim uvjetima dolazi do stabilizacije transkripcijskog faktora HIF- α koji se veže na hipoksijske odgovore u promotorima ciljnih gena. Takvo stanje dovodi do izravnog induciranja transkripcije VEGF potičući angiogenezu, doprinosi stvaranju imunosupresivnog okoliša u raku dojke, osobito u trostruko negativnom raku dojke. Ovakvi uvjeti ograničavaju učinkovitost onkološke terapije u tumorsko tkivo te potiču selekciju terapijski otpornijih tumorskih klonova čime VEGF posredno smanjuje učinkovitost neoadjuvantne kemoterapije. Iako rezultati u potpunosti nisu

jednoznačni, smatra se kako VEGF može imati prediktivnu vrijednost u neoadjuvantnom liječenju raka dojke (74).

Tumori s nižom ekspresijom VEGF češće postižu bolji odgovor na standardnu kemoterapiju, dok tumori s višom ekspresijom VEGF pokazuju izražajniju terapijsku rezistenciju. Posebno je naglašena uloga VEGF u agresivnijim podtipovima raka dojke uključujući trostruko negativne karcinome dojke i HER2 pozitivne u kojima je angiogeneza aktivnija. Osim izravnog angiogenog učinka VEGF oblikuje i imunosupresivno tumorsko okruženje.

Povišene razine VEGF povezuju se sa smanjenom infiltracijom efektorskih T limfocita, povećanjem regulatornih T limfocita, slabijim imunološkim odgovorom na kemoterapiju. Razumijevanje uloge VEGF u tumorima dojke vodi k razvoju personaliziranih terapijskih strategija i optimizaciji neoadjuvantnog pristupa liječenju raka dojke.

VEGF 165 dominantna je i biološki najaktivnija izoforma. Funkcionalni je najvažnija izoforma VEGF-A u karcinomu dojke. Zbog prisutnosti heparin vezajućeg domena VEGF 165 ima optimalnu ravnotežu između difuzibilnosti i lokalne akumulacije u tumorskom mikrookolišu (75).

Ključne značajke VEGF165 karakteriziraju snažnu aktivaciju VEGFR-2, specifično vezanje za neuropilin-1 koji pojačava angiogeni signal, što potiče indukciju nezrelih, strukturno abnormalnih krvnih žila.

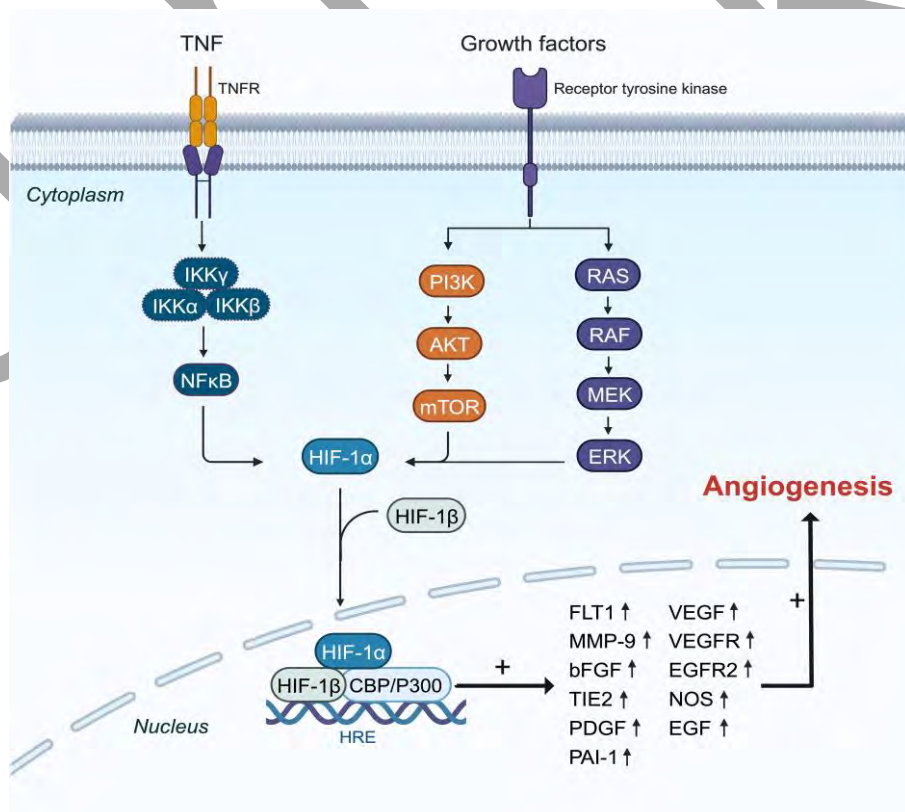
U raku dojke povišena ekspresija VEGF165 povezana je s visokim histološkim gradusom, povećanjem proliferacije tumorskih stanica te lošijom prognozom bolesti. VEGF165 također ima važnu ulogu u imunosupresiji tumorskog mikrookoliša inhibirajući sazrijevanje dendritičnih stanica i smanjujući infiltraciju citotoksičnih T limfocita. U karcinomu dojke dolazi do selektivnog porasta VEGF165, poremećaja ravnoteže VEGF izoformi, stvaranja pozitivne povratne sprege između hipoksije i abnormalne angiogeneze. Takva vaskularna mreža je funkcionalno neefikasna, što dodatno pogoršava hipoksiju i potiče progresiju tumora.

Biološki i klinički značaj VEGF izoformi u raku dojke je zajedničko oblikovanje angiogenog fenotipa tumora. VEGF165 ima središnju ulogu zbog svoje najjače signalne aktivnosti i povezanosti s imunosupresijom. Disbalans VEGF izoformi, osobito dominacija VEGF165 važan je mehanizam tumorske progresije (76).

VEGF je jedan od najvažnijih imunomodulatornih liganda, daleko iznad same angiogeneze. Poznato je kako inhibira maturaciju dendritičnih stanica, povećava MDSC populacije. Značajno smanjuje infiltraciju efektorskih CD8⁺ stanica, inducira direktno i indirektno PD-L1 ekspresiju. Povezuje se i sa imunosupresivnim citokinom TGF- β , vrlo aktivnim ligandom u raku dojke zbog toga što inhibira CD8⁺ stanice.

Novija istraživanja naglašavaju kako VEGF-A i VEGF-R signalizacije u raku dojke djeluju na dvije povezane osi, angiogenezu i abnormalnu vaskulaturu (jako propusne krvne žile), slabi antitumorski imunitet oboljelog (77).

Ključna točka u obrani bi bila vaskularna normalizacija tumora, smatra se kako umjerena inhibicija VEGF može stabilizirati krvne žile, smanjiti hipoksiju i poboljšati učinak imunoterapije. Sve više se spominje VEGF kao imunoregulatorni faktor koji koči maturaciju i funkciju dendritičnih stanica u vidu slabije prezentacije antigena, potiče dominaciju imunosupresivnih populacija kao MDSC i protumorskog MDSC, TAM/M2. Nadalje, održava T staničnu disfunkciju kroz hipoksično upalni tumorski okoliš te posredno slabi odgovor na imunoterapiju (78).



Slika 3. Hypoxia – induced factors in breast cancer: role and therapeutic targets in breast cancer treatment. Preuzeto: Shijiao Zhi and all., 2024.

Slika pokazuje mehanizme i puteve učinka prekomjerne ekspresije HIF- α na indukciju gena angiogeneze. Translacija HIF- α pojačana je putevima PIK3, RAS i NF- κ B u citoplazmi nakon čega prelazi u jezgru pomoću P300 kao transkripcijskim faktorom te pojačava ekspresiju esencijalnih gena angiogeneze poput FLT1, MMP9, VEGF, VEGFR i PAI-1 u procesu angiogeneze.

U onkološkom smislu i značenju VEGF je ključni pokretač angiogeneze, strukturno i funkcionalno osigurava razvoj vaskularizacije u tumoru. Osigurava dotok kisika i nutrijenata potrebnih za rast tumora iznad 1 – 2 mm³ (79).

Bez VEGF posredovane angiogeneze većina solidnih tumora ne može progresirati. Povećava permeabilnost krvnih žila unutar tumora olakšavajući intravazaciju tumorskih stanica. VEGF sudjeluje u stvaranju pre-metastatske mreže (osobito VEGF-A i VEGF-C). Potiče limfangiogenezu povezanu s limfnim metastazama. Nadalje, inhibira maturaciju dendritičnih stanica, potiče akumulaciju Treg stanica i MDSC-a (80).

U okolini tumora sudjeluje u smanjenju infiltracije i funkcionalnosti CD8⁺ T- limfocita. Za VEGF se danas može kazati kako je most između angiogeneze i imunološke evazije tumora. Danas još nije točno definirano da li promjene ekspresije VEGF –a tijekom neoadjuvantne terapije održavaju adaptaciju tumora, u tom kontekstu bi VEGF mogao reflektirati i rezidualnu agresivnost tumora. Smatra se kako je važna sinergija anti – VEGF terapije i imunoterapije jer blokada VEGF-a bi mogla „otključati“ imunološki odgovor osobito u kontekstu neoadjuvantnog liječenja (81).

Zbog svega navedenog VEGF je regulator tumorskog okoliša, sudjeluje i u rezistenciji na terapiju, povezuje hipoksiju, imunološku inhibiciju i metastaziranje. Predstavlja idealnu metu za kombinaciju ciljanih terapijskih strategija u budućnosti (82).

4. Biološki utjecaj tumorskih infiltrirajućih limfocita (TIL) u neoadjuvantnom liječenju karcinoma dojke

Limfociti koji infiltriraju tumor (TIL) mononuklearne su imunološke stanice, opisuju se u većini solidnih tumora. Kod karcinoma dojke većina TIL-ova smještena je najviše u stromi tumora. To su limfociti koji se uglavnom sastoje od citotoksičnih CD8 pozitivnih T stanica, uz njih se nalazi i dobar udio pomoćnih CD4-T, CD19- B stanica (8).

U podtipovima TNBC i HER 2 pozitivnih karcinoma dojke TIL-ovi su više eksprimirani u odnosu na luminalne tumore. Specifični sastav imunoloških stanica kao i njihova distribucija u tumorskom okruženju važna je informacija u odnosu na jednostavnu kvantifikaciju infiltriranih imunoloških stanica (83).

Nove studije pokazuju kako limfociti koji infiltriraju tumor (TIL) prije neoadjuvantnog liječenja mogu predvidjeti odgovor na terapiju i poboljšati prognozu (84).

Količina limfocitne infiltracije određuje klinički ishod bolesti kao i prognostički i prediktivni faktor u NAT dojke (85).

TIL predstavljaju heterogenu skupinu imunoloških stanica uključujući T-limfocite, B-limfocite i prirodne stanice ubojice (NK) koje infiltriraju tumorsko tkivo (86). Njihova prisutnost i aktivnost održavaju imunološki odgovor organizma na tumor (87).

Tumor infiltrirajući limfociti prepoznaju tumorske antigene putem T staničnih receptora (TCR) i MHC molekula na površini tumorskih stanica (88).

Nakon prepoznavanja tumora TIL se aktiviraju i proliferiraju oslobađajući citokine (IFN- γ , TNF – alfa) koji potiču imunološki odgovor (89). Citotoksični TIL (CD8 i T stanice) uništavaju tumorske stanice putem perforina (90).

Imunosupresija – tumor može izbjeći imunološki odgovor putem imunoloških kontrolnih točaka (PD-1/PD-L1, CTLA4) i imunosupresivnih citokina (TGF-beta, IL-10) (91).

Tumor infiltrirajući limfociti imaju veliki terapijski potencijal u smislu izolacije iz samog tumora gdje su i nastali, proširiti ih ex vivo i ponovno implicirati u pacijenticu kao oblik imunoterapije (92).

Interes za TIL u onkologiji raste zbog njihovog potencijala u imunoterapiji i kao biomarkera za predviđanje odgovora na terapiju (93).

Netumorske stanice u tumorskom okruženju raka dojke uključuju imunološke i stromalne stanice, dok imunološke stanice uključuju T, B i plazma stanice. U znatnom broju tu su i NK stanice, makrofazi, dendritične stanice i neutrofili. Stromalne stanice uključuju endotelne stanice, fibroblaste i adipocite. Ove stanice mogu neizravno održavati imunološki status tumorskih stanica, utjecati na razvoj tumora kao i na patološki odgovor nakon NAT.

Stanice s pozitivnim prediktivnim terapijskim učincima su CD8 T stanice. NK stanice luče citokine i imaju izravne citotoksične učinke na tumor. Makrofagi (M1) povezani s tumorom uključeni su u urođene i adaptivne imunološke odgovore. Makrofazi mogu lizirati tumorske stanice dok njihova sposobnost prezentacije antigena može potaknuti citotoksičnost drugih imunoloških stanica (1).

Dendritične stanice imaju važnu ulogu u pokretanju i aktiviranju adaptivnog imunološkog odgovora stvaranjem antigena i proizvodnjom specifičnih antigena. Povezani su s T limfocitima te koordiniraju aktivaciju T stanica. Dendritične zrele stanice migriraju u limfoidne organe, interrekcija između CD 40 na površini dendritičnih stanica i CD 40 na T stanicama šalje antigene nezrelim T stanicama u limfnim čvorovima i aktivira CD4 pomoćničke T stanice i stanični imunitet povezan s CD 8.

Makrofage (M2, protumorski), stimuliraju citokini (IL-4, IL-10, IL-13), oslobađanjem citokina potiče se invazija i metastaze.

Mnoge kliničke studije pokazale su kako je pretilost povezana s visokom incidencijom i lošijim preživljavanjem raka dojke, što ukazuje na činjenicu kako adipociti sudjeluju u progresiji raka dojke. Interrekcija adipocita koji su povezani s rakom dojke mogu lučiti IL-6, TNF- α i VEGF kako bi potaknuli invaziju i metastaziranje raka dojke. IL-6 može aktivirati PIK3CA i HIF α kako bi povećao proizvodnju metabolizma glukoze što dovodi do metaboličkog reprogramiranja stanica raka dojke (94).

Sama prisutnost i inicijalna aktivacija TIL-ova ukazuje na imunogeni potencijal tumora, koji se temelji na prepoznavanju tumorskih antigena nastalih usljed genomske nestabilnosti, somatskih mutacija i aberantne ekspresije proteina. Ključni su rani signali koji uključuju i aktivaciju dendritičnih stanica, prezentaciju antigena putem MHC i aktivaciju T-limfocita kroz TCR

kompleks. Kvaliteta TIL-ova važnija je od same kvantitete, na to utječu TCR klonalnost i funkcionalna raznolikost (95).

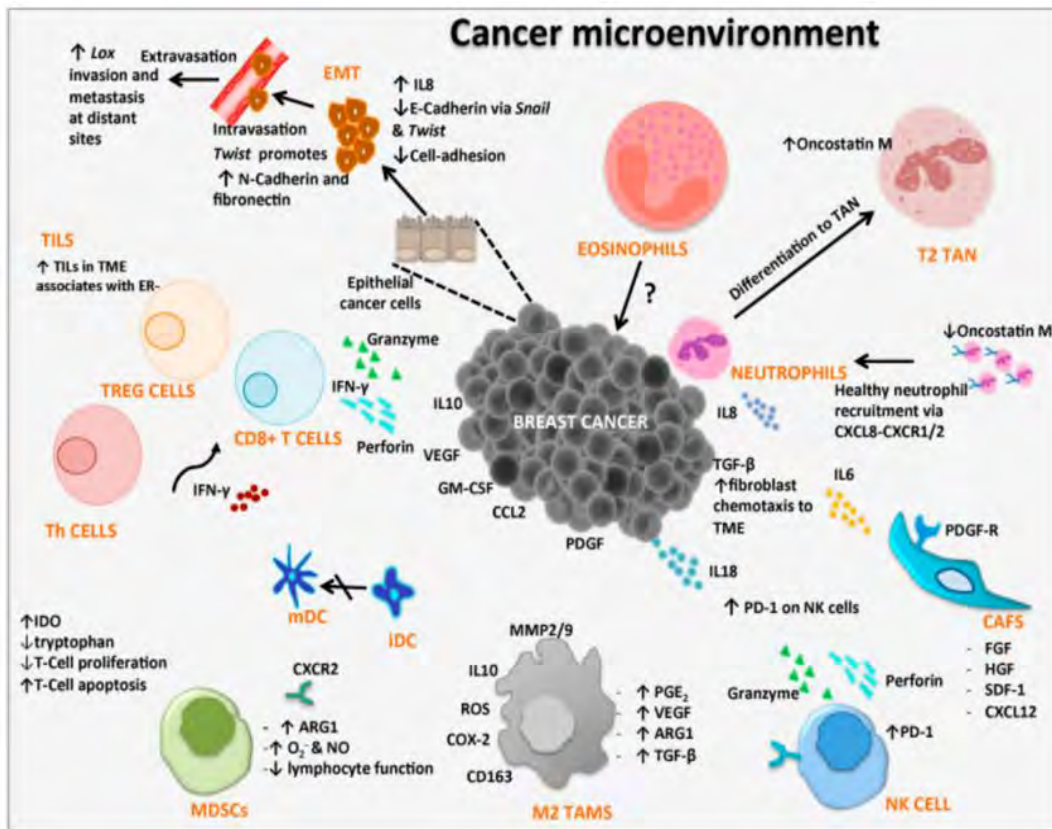
Migracija i zadržavanje TIL-ova unutar tumora regulirana je kemokinima koje proizvode tumorske stanice, stromalne stanice i endotel. Signalni putevi opstanka TIL-ova ovise o ravnoteži aktivacije i iscrpljenosti. Nakon infiltracije, TIL-ovi ulaze u nepovoljan metabolički i imunološki okoliš. Njihov opstanak ovisi o balansu između aktivacijskih i inhibitorskih signala.

PD-1/PD-L1 – kronična stimulacija dovodi do aktivacije SHP-2 fosfataze, inhibicije PIK3-AKT-m TOR puta te do funkcionalne iscrpljenosti. Hipoksija inducira ekspresiju PD-L1, VEGF, CD39/CD73, gdje dolazi do povećane proizvodnje adenzina, nakon čega se javlja upravo supresija T-stanične funkcije. Paradoks je to što hipoksija istovremeno privlači TIL – ove ali im onemogućuje citotoksično djelovanje (96).

Metaboličko programiranje i djelovanje TIL-ova je paradigma gdje se tumorske stanice kao i TIL-ovi istodobno bore za glukozu, glutamin i masne kiseline. Tumor preferira aerobnu glikolizu, dok TIL-ovi u tumorskom okolišu prelaze u energetski neefikasan metabolizam i u stanje funkcionalne energije. Najnovija istraživanja govore kako su CD8+ TIL-ovi sa očuvanom mitohondrijskom biogenezom povezani s boljim terapijskim odgovorom neovisno o njihovom broju (97).

Neoadjuvantna terapija inducira imunogenu staničnu smrt dok istovremeno selekcionira tumore s imunosupresivnim fenotipom u rezidualnom tumoru. Nije rijetkost da rezidualni tumori često imaju povećan PD-L1 kao i VEGF, u znatnoj mjeri i M2 makrofage.

TIL-ovi su dinamična populacija stanica, ne statički biomarker. Njihova aktivnost više ovisi o funkcionalnom stanju nego o broju (98).



Slika 4. Tumor microenvironment of human breast cancer, and feline mammary carcinoma as a potential study model: Catarina Nascimento & Fernando Ferreira 2021.

Biomedicina et Biophysica

Shema prikazuje tumorski mikrookoliš u karcinomu dojke. Međustanične reakcije između tumorskih stanica raka dojke i staničnih komponenti iz tumorskog mikrookoliša. Tumorske epitelne stanice induciraju epitelno–mezenhimalnu tranziciju putem hipoksije i protuupalnih citokina, uz smanjenje ekspresije E–cadherina te povećane ekspresije N-cadherina i fibronektina što pogoduje metastaziranju. U mikrookolišu su prisutni i TIL uključujući CD8+ i citotoksične T stanice, koje posreduju antitumorski odgovor lučenjem interferona γ . Njihova aktivnost može biti inhibirana imunosupresivnim mehanizmima uključujući ekspresiju PD-1/PD-L1, IL-10 i VEGF. Mijeloidne supresorske stanice i tumorom povezani makrofazi luče imunosupresivne i proangiogene molekule poput VEGF-a, TGF β , (transformirajući čimbenik rasta beta) te potiču remodeliranje izvanstaničnog matriksa, angiogenezu i progresiju tumora. Neutrofili i eozinofili sudjeluju u modulaciji upalnog odgovora i pokušavaju izmijeniti tumorsko okruženje. S druge strane fibroblasti povezani s tumorom (CAFs) luče čimbenike rasta koji dodatno podržavaju rast tumora i imunosupresiju. Sveukupno, slika ilustrira

dinamičnu i dvosmjernu komunikaciju između tumora i imunološkog mikrookoliša koja ima važnu ulogu u progresiji raka dojke i može predstavljati metu terapijskih strategija.

4.1. Prognostički i prediktivni značaj TIL-a

Brojna istraživanja ukazuju na povezanost visoke razine TIL-a s povoljnim ishodom neoadjuvantne terapije osobito kod TNBC i HER2 pozitivnog raka dojke (99).

Smatra se kako pacijentice s trostruko negativnim karcinomom dojke koje su pokazale visoku razinu TIL-a u tumoru imaju veću vjerojatnost postizanja potpune patološke remisije nakon neoadjuvantne terapije te poboljšanje ukupne stope preživljenja (100).

HER2 pozitivan karcinom dojke s povećanom infiltracijom TIL-a povezana je s boljim odgovorom na terapiju anti-HER2 lijekovima.

U luminalnim podtipovima karcinoma dojke TIL nisu toliko izraženi (101).

4.2. Vrste TIL-a

STROMALNI TILs (sTILs) – nalaze se u stromi tumora, van tumorskih stanica.

INTRATUMORSKI TILs (iTILs) – direktno infiltriraju tumorske stanice (102).

TIL-ovi predstavljaju dio imunološkog odgovora organizma na karcinom dojke. Njihova manja izraženost može značiti da je imunološki sustav manje aktivan u borbi protiv tumora. Ovakav nalaz može ukazati na lošiju prognozu bolesti jer tumori s više TIL-ova obično imaju bolji odgovor na neoadjuvantnu terapiju (103).

Povećana ekspresija imunosupresivnih molekula u tumoru (PDL-1, TGF-beta, FOXP3 + T-stanice) donosi smanjenju TIL-ova.

Studije su pokazale kako pacijentice s visokim TIL-ovima prije neoadjuvantne terapije često imaju veću šansu za potpunu patološku remisiju u odnosu na pacijentice koje nakon terapije i dalje imaju rezidualni tumor sa niskim TIL-ovima, to može govoriti o nepotpunom odgovoru na neoadjuvantnu terapiju (104).

5. HIPOTEZA

Povišeni izražaj vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i liganda programirane stanične smrti 1 (PD-L1), u tumorskom tkivu bolesnika s karcinomom dojke prije početka neoadjuvantnog liječenja (NAT), povezana je s lošijim odgovorom na terapiju, znatno nižom stopom potpunog patološkog odgovora kao i nepovoljnim dugoročnim ishodima bolesti.

Izražaj oba biomarkera značajno se smanjuje u uzorcima tumora nakon primjene neoadjuvantne kemoterapije te pozitivno korelira s količinom tumor infiltrirajućih limfocita (TIL).

6. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je procijeniti i usporediti izražaj PD-L1 i VEGF u tumorskom tkivu karcinoma dojke dobivenog iglenom biopsijom prije neoadjuvantnog liječenja te u kirurškim resektatima tumora nakon neoadjuvantnog liječenja u rezidualnom tumoru.

Specifični ciljevi:

1. Procijeniti razliku izražaja PD-L1 i VEGF u različitim podtipovima karcinoma dojke.
2. Utvrditi povezanost izražaja PD-L1 i VEGF s drugim imunofenotipskim karakteristikama tumora.
3. Odrediti povezanost izražaja VEGF i PDL-1 s tumor infiltrirajućim limfocitima (TIL).
4. Usporediti izražaj PD-L1 i VEGF s ostalim kliničko-patološkim karakteristikama pacijenta i tumora.
5. Kvantificirati izražaj PD-L1 i VEGF prije i nakon neoadjuvantne terapije.
6. Usporediti izražaj PD-L1 i VEGF s patohistološki verificiranim RCB scorom, indeksom rezidualnog opterećenja tumorom, engl. (*residual cancer burden*), koji je klasificiran I – III, kao odgovorom na neoadjuvantnu terapiju.
7. Povezati odnos između izražaja PD-L1 i VEGF prije i nakon neoadjuvantne terapije u rezidualnom tumoru u odnosu na ukupan ishod liječenja.

7. MATERIJALI I METODE

7.1. Core biopsije tumora tkiva dojke

U ovu studiju uključena su 102 uzorka tumorskog tkiva dobivenih core engl. (*core needle biopsy*) biopsijom dojke prije započinjanja neoadjuvantnog liječenja te 102 uzorka rezidualnog tumora dobivena kirurškom resekcijom (mastektomije, kvadratektomije, resekcije tumora), karcinoma dojke TNBC, luminalnog B i luminalnog B HER2 pozitivnih karcinoma nakon završetka neoadjuvantne terapije od istih pacijentica.

Analiza je provedena kao uparena analiza, čime je omogućena izravna usporedba imunohistokemijskih, morfoloških, i histoloških obilježja prije i nakon terapije na razini pojedinog bolesnika. Core biopsija je zlatni standard u prijeoperativnoj dijagnostici karcinoma dojke. Riječ je o minimalno invazivnoj metodi kojom se dobivaju cilindrični uzorci tkiva dovoljne veličine i očuvanosti za cjelovitu patohistološku i imunohistokemijsku analizu. Core biopsija omogućuje procjenu arhitekture tkiva, razlikovanje *in situ* od invazivnih lezija, histološkog tipa i gradusa tumora kao i pouzdanu procjenu prediktivnih i prognostičkih biomarkera. U ovom radu koriste se uzorci dobiveni punkcijskom iglom promjera 16 G. Prilikom punkcije obično se uzima 3 – 6 cilindričnih uzoraka. Za ovo istraživanje koristio se reprezentativan uzorak sa najvećim postotkom tumorskih stanica. Na temelju core biopsije postavljena je patohistološka dijagnoza, vaskularna i limfna invazija, molekularni podtip karcinoma, IHK evaluacija, (ER, PR, Ki67, HER2, PD-L1, VEGF, Dual ISH ukoliko je HER2 neodređen). Procijenjen je broj TIL-a i morfološke karakteristike tumora.

Core biopsija fiksirana je 24 sata u 10% puferiranom formalinu proizvođača BioGnost Hrvatska, Zagreb LOT FNB10-137-2-/25, namijenjen za IVD dijagnostiku.

Core biopsije procesuirane su po programu od niza alkohola rastućih koncentracija (70%, 96%, 100%), od niže prema većoj koncentraciji zbog dehidracije. U svakoj koncentraciji alkohola tkivo je dehidrirano dva puta po četrdeset i pet minuta. Alkoholi su proizvođača BioGnost namijenjeni za IVD. Nakon dehidracije, tkiva su bistrena u otopini ksilena dva puta po četrdeset i pet minuta proizvođača Claro-Prom, LOT 2510042, namijenjen za histologiju, IVD. Bistrenje je važan korak ksilenom kao intermedijem alkohola i parafina. Nakon bistrenja tkiva su prožeta u dvije parafinske kupelji na temperaturi od 58° C, dva puta po četrdeset i pet minuta. Parafin

je od proizvođača BioGnost, tališta 54° – 57° C, naziva BioWax Plus 56/58, namijenjen za IVD. Uzorci su procesuirani u histokinetu Tissue-Tek Vip Sakura.

Nakon parafinskih kupelji uzorci su uklopljeni u parafinske blokove na uklapaču Leica proizveden u Njemačkoj, u firmi Leica Biosystems u gradu Nusslochu.

7.2. Resektat dojke / mastektomija nakon neoadjuvantnog liječenja

Nakon završenog neoadjuvantnog liječenja bolesnici su podvrgnuti kirurškom zahvatu u vidu mastektomije ili resekciji okolnog ležišta tumora. Na kakvom uzorku nakon NAT je rađeno istraživanje, ovisi o početnom stadiju bolesti, odgovoru na terapiju i kliničko– radiološkoj procjeni. Istodobno u istraživanje su uključeni i limfni čvorovi, limfni čvor „čuvar“ ili disekcija aksilarnih limfnih čvorova prema važećim kliničkim smjernicama.

Limfni čvorovi analizirani su HE metodom zbog histološke procjene zahvaćenosti čvorova tumorom. Kirurški odstranjen materijal dostavljen je u patohistološki laboratorij neposredno nakon operacije uz označenu orijentaciju ležišta tumora. Makroskopski pregled uključio je mjerenje ukupne veličine preparata, identifikaciju područja prethodnog tumora, prisutnost makroskopski vidljive lezije, te procjenu udaljenosti tumora od resekcijskih kirurških rubova. Za ovo istraživanje obrađen je reprezentativni uzorak s najrelevantnijim histološkim podacima korišteni u ovom radu.

Tumor dojke i limfni čvorovi fiksirani su u 10% puferiranom formalinu proizvođača BioGnost Hrvatska, Zagreb u vremenu 24 – 48 sati ovisno o veličini preuzetog tumora od interesa.

Tkiva tumora dojki procesuirana su u histokinetu Tissue-Tek VIP 6 Sakura, proizveden u firmi Sakura Finetek u Japanu, Tokyo.

Kirurški odstranjeni tumori procesuirani su u istom histokinetu, po istom protokolu dehidracije rastućih koncentracija alkohola na način da su uzorci u 70% alkoholu dehidrirani dva puta po sto dvadeset minuta, 96% alkoholu dva puta po devedeset minuta, 100% alkoholu dva puta po sedamdeset minuta. Bistrenje u ksilenu procesuirano je dva puta po devedeset minuta. U parafinskoj kupelji preparati su prožeti dva puta po devedeset minuta. Nakon završetka parafinske kupelji uzorci tumora uklopljeni su na istom uklapaču u parafinske blokove.

Svi parafinski blokovi s tkivnim uzorcima rezani su na mikrotomu Leica SM201R proizveden u Njemačkoj u firmi Leica Biosystems u gradu Nussloch. Parafinski blokovi rezani su debljine četiri mikrona. Nakon rezanja sušeni su na sobnoj temperaturi dvadeset i četiri sata.

7.3. Patohistološka dijagnostika, obrada i evaluacija na hematoksilin – eozin bojanju (HE)

Svi uzorci (igli i operativni), najprije su bojani HE metodom, temeljnom histološkom tehnikom bojenja koja je kombinacija kisele i lužnate boje. Hematoksilin je lužnata boja koja boji jezgru stanice (kisele stanični dio). Eozin je kiselna boja koja boja citoplazmu i citoplazmatske strukture, (lužnati stanični dio). Hematoksilin i eozin su boje proizvođača BioGnost, dok je bojanje rađeno na automatskom bojaču TissueTek Sakura. Prije samog bojanja preparati su deparafinirani u ksilenu, rehidrirani u nizu alkohola od veće koncentracije prema nižoj, (100%, 96% i 70%), nakon čega su isprani u destiliranoj vodi.

Nakon ispiranja bojani su u hematoksilinu deset minuta, ispirani destiliranom vodom, potom bojani 1% vodenom eozinu pet minuta. Nakon eozina isprani su destiliranom vodom, dehidrirani nizom alkohola, bistreni u ksilenu te pokriveni u tkivnom automatskom pokrivaču Sakura trajnim filmom za pokrivanje.

HE tehnikom u ovom radu postavljena je patohistološka dijagnoza core biopsije tumora sljedećih patohistoloških parametara:

- Limfovaskularna invazija, (prisutnost tumorskih stanica unutar lumena limfnih ili krvnih žila), – klasificira se kao DA/NE
- Prisutnost tumorskih stanica unutar lumena limfnih i / ili krvnih žila, izvan glavne tumorske mase, obično u peritumorskom području. Klasificira se kao DA/NE.
- Histološki gradus tumora klasificiran kao: G1 – dobro diferenciran tumor, (sporiji rast, bolja prognoza), G2 – umjereno diferenciran tumor, (umjerena proliferacija, srednja agresivnost), G3 – slabo diferenciran tumor, (vrlo agresivan).
- In situ komponenta tumora, (prisutnost malignih stanica koje su ograničena na mjesto nastanka te nisu probile bazalnu membranu), klasificirana kao prisutna ili ne.

Procjenjuju se morfološki znakovi in situ lezije u smislu ispunjavanja tumorskih stanica unutar duktusa/lobula, intaktnost bazalne membrane. Aktivno se traži mogući prijelaz sa in situ u invaziju kao i prostorni odnos s invazivnom komponentom.

Klasificira se kao mjera diferencijacije i biološke agresivnosti. Gradus se procjenjuje koliko tumor nalikuje normalnom tkivu, koliko je biološki agresivan i koliko brzo proliferira. Određuje se zbrojem 3 morfološka parametra, svaki od njih se boduje 1 – 3.

Procjenjuje se postotak tumora koji tvori žljezdane strukture kao tubularna diferencijacija.

Histološki gradus tumora dojke (Nottingham / Elston–Ellis)			
Kriterij	1 bod	2 boda	3 boda
Tubularna diferencijacija	> 75 % tubula	10 – 75 % tubula	< 10 % tubula
Nuklearni pleomorfizam	Mali, uniformni nuklei	Umjereno varijabilni nuklei	Veliki, pleomorfni, hiperhromni nuklei
Mitotski indeks	Malo mitoz	Umjereno	Puno mitoz
Zbroj bodova	3 – 5	6 – 7	8 – 9
Histološki gradus	G1 (low grade)	G2 (intermediate)	G3 (high grade)

Tablica 2. Histološki gradus tumora dojke

Histološki tip tumora
Invazivni karcinom nespecifičnog tipa (NOS)
Invazivni lobularni karcinom
Invazivni tubularni karcinom
Medularni karcinom
Papilarni karcinom
In situ karcinomi (DCIS, LCIS)

Tablica 3. Histološki tipovi tumora dojke

7.4. Procjena TIL-a

Procjenjuju se stromalni TIL-ovi – limfociti u stromi između tumorskih gnijezda, ne unutar tumorskih stanica. Ne broje se limfociti u nekrotičnim područjima kao i u periduktalnim upalama nevezanim za tumor. Vizualno se procjenjuje koliki je postotak stromalne površine invazivnog tumora ispunjen mononuklearnim limfocitima. Rezultat se izražava u postotku, 0 – 100%.

Postotak TIL (%)	Kategorija
0 %	TIL nisu prisutni
1 – 5 %	Vrlo mali broj TIL
6 – 30 %	Umjereni TIL
> 30 % (npr. 60 %)	Bogata infiltracija TIL

Tablica 4. Procjena tumorskih infiltrirajućih limfocita (TIL)

Stromalni TIL procijenjeni su prema preporukama International TILs Working Group, te izraženi kao postotak stromalne površine invazivnog tumora zahvaćene mononuklearnim upalnim stanicama.

Princip određivanja TIL-a određuje se na HE bojenju na kome se TIL-ovi identificiraju kao mononuklearne upalne stanice, to su uglavnom limfociti s karakterističnim malim okruglim jezgrama, gustim kromatinom i minimalnom citoplazmom. Procjena se temelji na vizualnoj identifikaciji i kvantifikaciji limfocita u tumorskom stromalnom prostoru uz jasno razlikovanje stromalnih i intratumorskih TIL-ova.

Analizira se invazivna komponenta tumora dok se isključuju područja artefakata i zdravog tkiva dojke. Stromalni prostor definira se kao vezivno tkivo između tumorskih gnijezda unutar granica invazivnog tumora. U tom prostoru procjenjuje se udio površine koji zauzimaju mononuklearne upalne stanice. Stromalni TIL-ovi izražavaju se kao postotak (%) stromalne površine infiltrirane limfocitima.

Procjena se provodi kontinuiranom skalom 0-100% bez zaokruživanja u kategorije, čime se omogućuje veća statistička osjetljivost u istraživačkom kontekstu. U procjenu se uključuju limfociti i plazma stanice, mononuklearne stanice unutar tumorske strome, dok se iz procjene

isključuju neutrofile, eozinofile, makrofagi i upalne stanice izvan granica invazivnog tumora. U core biopsijama procjena TIL-ova temelji se na dostupnom stromalnom prostoru unutar uzorka uzimajući u obzir manju površinu tkiva, moguću heterogenost infiltrata. U kontekstu ovog istraživanja HE temeljna procjena TIL-ova omogućila je usporedbu imunološke povezanosti s morfološkim i kliničkim parametrima.

Procjenjuju se stromalni TIL-ovi, limfociti u stromi između tumorskih gnijezda, ne unutar tumorskih stanica. Ne broje se limfociti u nekrotičnim područjima kao i u periduktalnim upalama nevezanim za tumor. Vizualno se procjenjuje koliki je postotak stromalne površine invazivnog tumora ispunjen mononuklearnim limfocitima. Rezultat se izražava u postotku, 0 – 100%.

Stromalni TIL procijenjeni su prema preporukama International TILs Working Group, te izraženi kao postotak stromalne površine invazivnog tumora zahvaćene mononuklearnim upalnim stanicama.

HE tehnikom u ovom radu postavljena je patohistološka dijagnoza rezidualnog tumora slijedećih patohistoloških parametara:

- Klasificiran je stupanj rezidualnog tumora, RCB
- Kvantificirala se količina rezidualnog tumora u dojci i limfnim čvorovima aksile. U izračun ulaze četiri parametra:
 1. Rezidualni invazivni tumor u dojci, duljina (mm), širina (mm), procjenjuje se i tumorsko ležište, ne samo pojedini fokus.
 2. Rezidualna celularnost tumora kao postotak invazivnog karcinoma u tumorskom ležištu.
 3. Postotak in situ komponente.
 4. Status aksilarnih limfnih čvorova, kao i veličina najveće metastaze u limfnom čvoru.
- Numerički izračunat RCB

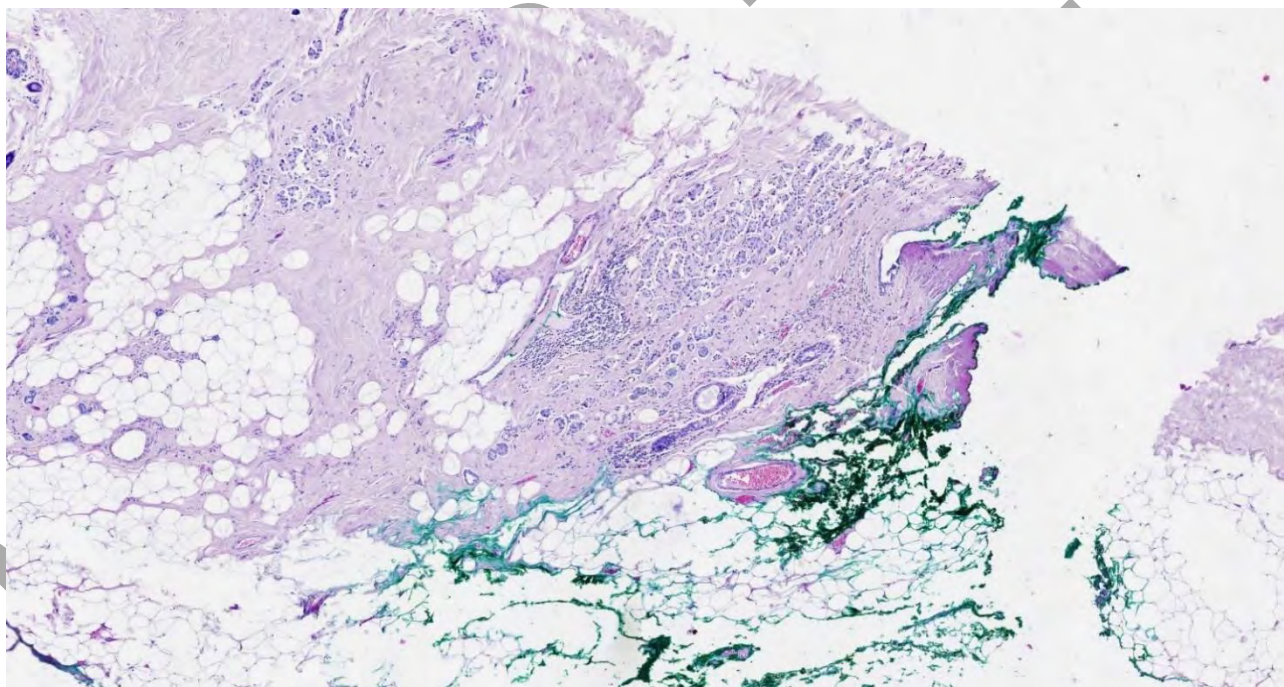
U ovom radu RCB klasificiran je po razredima uz RCB indeks. Rezidualni tumorski teret određen je nakon neoadjuvantne terapije prema MD Anderson Cancer Center metodologiji i to na temelju dimenzija rezidualnog tumora, postotka tumorske celularnosti te statusa aksilarnih limfnih čvorova, te je klasificiran u razrede I. – III.

Klasifikacija RCB-a:

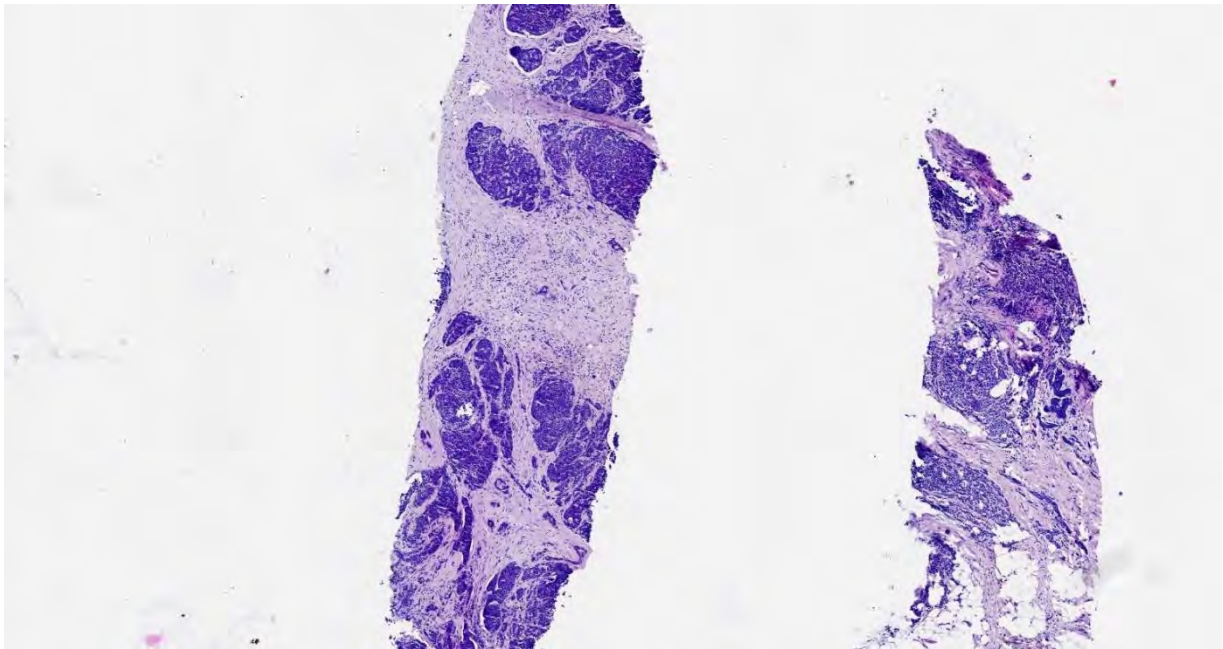
RCB klasa	RCB indeks	Kliničko značenje
RCB-I	$> 0 - \leq 1.36$ cm	Minimalni rezidualni tumor
RCB-II	$> 1.36 - \leq 3.28$ cm	Umjereni rezidualni tumor
RCB-III	> 3.28 cm	Opsežan rezidualni tumor

Tablica 5. Klasifikacija rezidualnog tumorskog opterećenja (RCB)

- Opisan je i pregledan ukupan broj limfnih čvorova u odnosu na broj čvorova zahvaćenih tumorom.



Slika 5. Hematoksilin – eozin obojen Luminalni B HER2 – tumor dojke



Slika 6. Hematoksilin – eozin obojena core biopsija, Luminalni B, HER2-

8. Imunohistokemijska (IHK) evaluacija prognostičkih i prediktivnih biomarkera u tumorima dojke

IHK je poveznica između morfološkog nalaza i kliničke odluke o neoadjuvantnom liječenju raka dojke. Ova metoda omogućuje uvid u biološka svojstva tumora, njegov proliferacijski potencijal diferencijaciju i interakciju s tumorskim mikrookolišem, čime se nadopunjuju klasični histološki kriteriji. Prognostički biomarkeri procijenjeni IHK metodama pružaju informacije o prirodnom tijeku bolesti i vjerojatnosti recidiva, neovisno o primijenjenoj terapiji, dok prediktivni biomarkeri omogućuju procjenu vjerojatnog odgovora tumora na određene terapijske modalitete. Rezultati IHK analiza integrirani su s histološkim tipom, gradusom, i stadijem bolesti te omogućuju stratifikaciju bolesnika u prognostičke i terapijske skupine.

8.1. IHK evaluacija PD-L1 CPS, klon 22C3

Ekspresija proteina PD-L1 22C3 – CPS odrađena je imunohistokemijskom metodom primjenom monoklonskog mišjeg protutijela PD-L1 klona 22C3, izotopa IgG1 za in vitro dijagnostičku upotrebu u imunohistokemiji. LOT protutijela je 11878729, REF GE006, te je RTU (*ready to use*) razrijeđeno po proizvođaču DAKO. Analiza je rađena pomoću kita i otopina

proizvođača DAKO kompatibilnih DAKO Omnis platformi. Rezovi debljine 4 nanometra uloženi su u platformu Omnis s protutijelom i pripadajućim kitom:

1. Sredstvo za deparafinaciju FLEX Omnis Clearify (GC810)
2. Otopina EnVision FLEX target Retrieval solution Low Ph (GV805), razrijeđena u radnu koncentraciju 1:10 s destiliranom vodom
3. Pufer za ispiranje Wash Buffer (GC 807) razrijeđen u radnu koncentraciju 1:10 s destiliranom vodom
4. Negative Control Reagent (GE006)
5. Reagens za blokiranje peroksidaze EnVision FLEX Peroxidase –Blocking reagent (Dako Omnis) šifra GV 800
6. Reagens za vizualizaciju EnVision FLEX Vizualization Reagent Dako Omnis GV800
7. Supstrat pufer En Vision FLEX Substrate pufer (Dako Omnis) GV 800
8. En Vision Flex DAB + Chromogen GV800
9. Amplifikacija, pojačivač signala DAB EnVision Enhancer GC806
10. Hematoksilin Dako GC808
11. Inkubacija primarnog protutijela PD-L1 22C3, LOT 11878729 bila je 45 minuta na sobnoj temperaturi platforme Omnis. Protutijelo je monoklonalno, zečje. Pozitivna kontrola bilo je tkivo posteljice. Protutijelo boja tumorske i imunološke stanice, osjetljivost po proizvođaču mu je jaka. Namijenjeno je i validirano za IVD.

Nakon završenog protokola preparati su dehidrirani u nizu alkohola od manje koncentracije prema većoj (70%,96%, 100%) proizvođača BioGnost, izbistreni u ksilenu, proizvođač Claro–Prom, LOT.2510042 IVD. Preparati su pokriveni Sakura Tissue Tek filmom u automatskom pokrivaču Sakura.

Maksimalna vrijednost CPS je 100. U obzir su dolazili membranski pozitivni signali tumorskih stanica dok se kod imunoloških stanica bilježio citoplazmatski i membranski signal. Nekrotične i degenerativne stanice nisu ulazile u procjenu.

Evaluacija PD-L1(klon 22C3) – CPS provedena je metodom combined Positive score. Izračunava se prema formuli kojom se broj PD-L1 pozitivnih tumorskih stanica, limfocita i makrofaga dijeli cijelim brojem izbrojanih održivih tumorskih stanica i dobiveni kvocijent množi brojem 100.

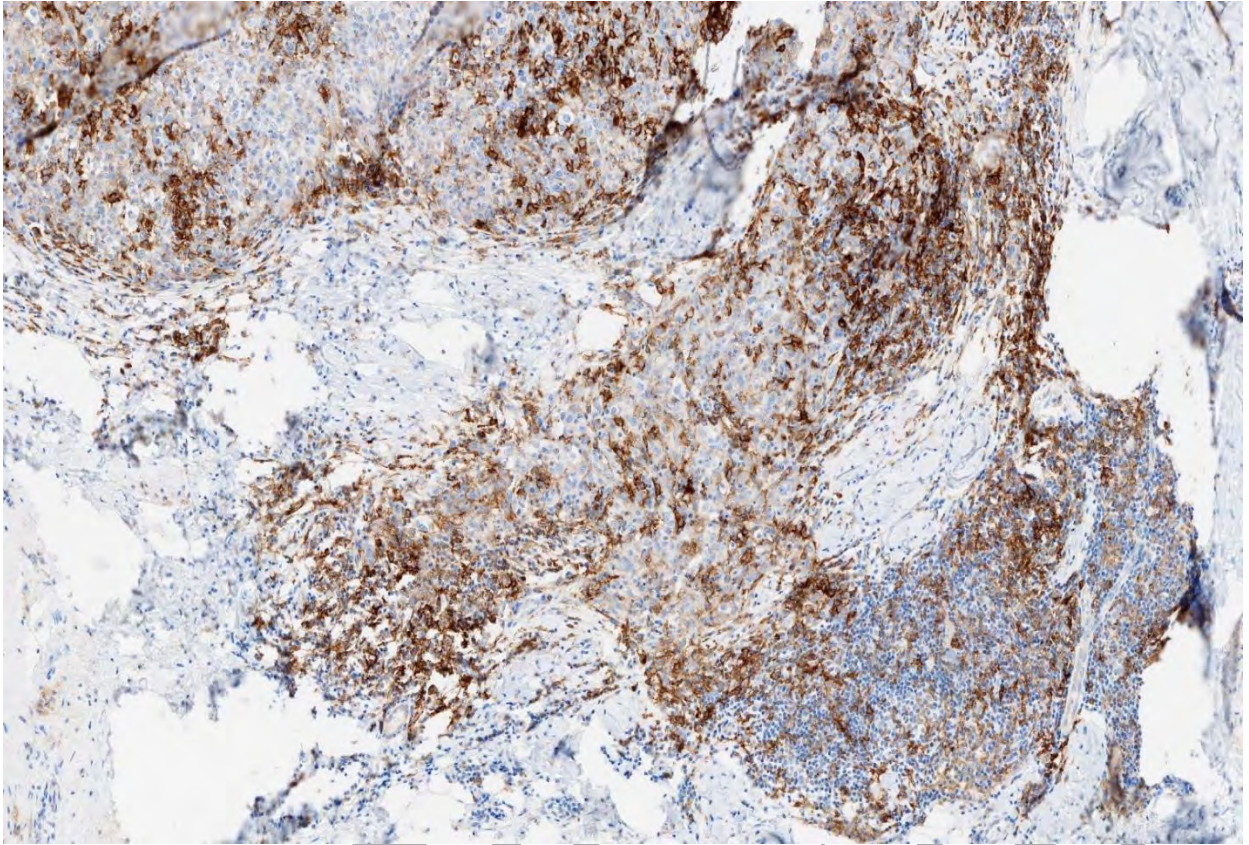
$$\text{CPS} = \frac{\text{PD-L1 positively stained cells (tumor cells, lymphocytes, macrophages)}}{\text{all vital tumor cells}} \times 100$$

Slika:7. Formula izračuna, standardizirana po pharmDx sustavu.

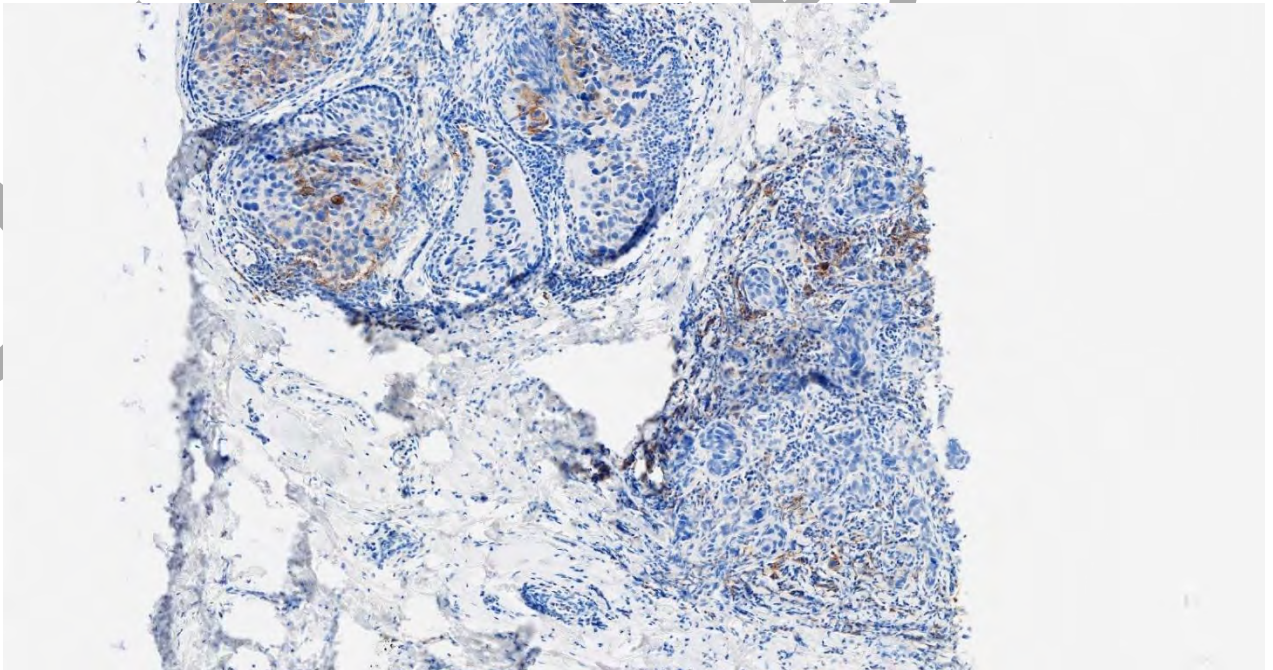
INTERPRETACIJA

U izračun se uključuju membranski pozitivne tumorske stanice, membranski i / ili citoplazmatski pozitivne imunološke stanice (limfociti i makrofagi). Minimalno mora biti 100 održivih tumorskih stanica za valjanu procjenu. Nekrotične, degenerativne stanice ne ulaze u evaluaciju.

- CPS < 10 – NEGATIVAN NALAZ
- CPS ≥ 10 – POZITIVAN NALAZ



Slika 8: IHK obojen PD-L1 22C3 TNBC



Slika 9: IHK obojen PD-L1 22C3 TNBC tumor dojke

8.2. IHK evaluacija biomarkera vaskularnog endotalnog faktora rasta (VEGF)

Imunohistokemijsko bojanje VEGF rađeno je na platformi VentanaBench Mark Ultra proizvođača Roche. VEGF je klon C-1, mišje IgG monoklonalno koncentrirano protutijelo proizvođača Santa Cruz Biotechnology. Rađeno je u razrjeđenju 1:100, razrjeđivano diluentom Dako real Antibody Diluent, LOT 41702954, REF S2022. Inkubacija primarnog protutijela bila je 35 minuta na sobnoj temperaturi unutar platforme Ventana.

Za IHK analizu korišten je ultra View Universal DAB Detection Kit, LOT (10) N15892, Roche 05269806001. U sklopu kita su dispensori otopina validiranih od strane proizvođača i namijenjeni za IVD dijagnostiku:

- Ultra View Universal DAB Inhibitor (3% H₂O₂)
- Ultra View Universal HRP Multimer
- Ultra View Universal DAB Kromogen
- Ultra View DAB Copper

Rezovi debljine 4 mikrona na pozitivno nabijenim Tomo Matsunami stakalcima, LOT 504248n – SP8G, proizvođača Osaka, Japan deparafinirani su u automatiziranom Ventana sustavu otopinom EZ Prep Concentrata Roche LOT (10) N11657, u radnoj otopini u omjeru 1:10.

Za demaskiranje antigena korištena je CC1 (*cell conditioning 1*), visokog, alkalnog Ph 8 – 9, LOT N112029 Roche.

Ispiranje unutar sustava rađeno je s Reaction Buffer Concentrate, razrijeđenim u omjeru 1:10 LOT N10709 Roche.

Ultra LCS je uljna otopina LOT N11566 Roche, korištena nakon završetka procesa rada, uljna otopina čuva preparate od isušivanja.

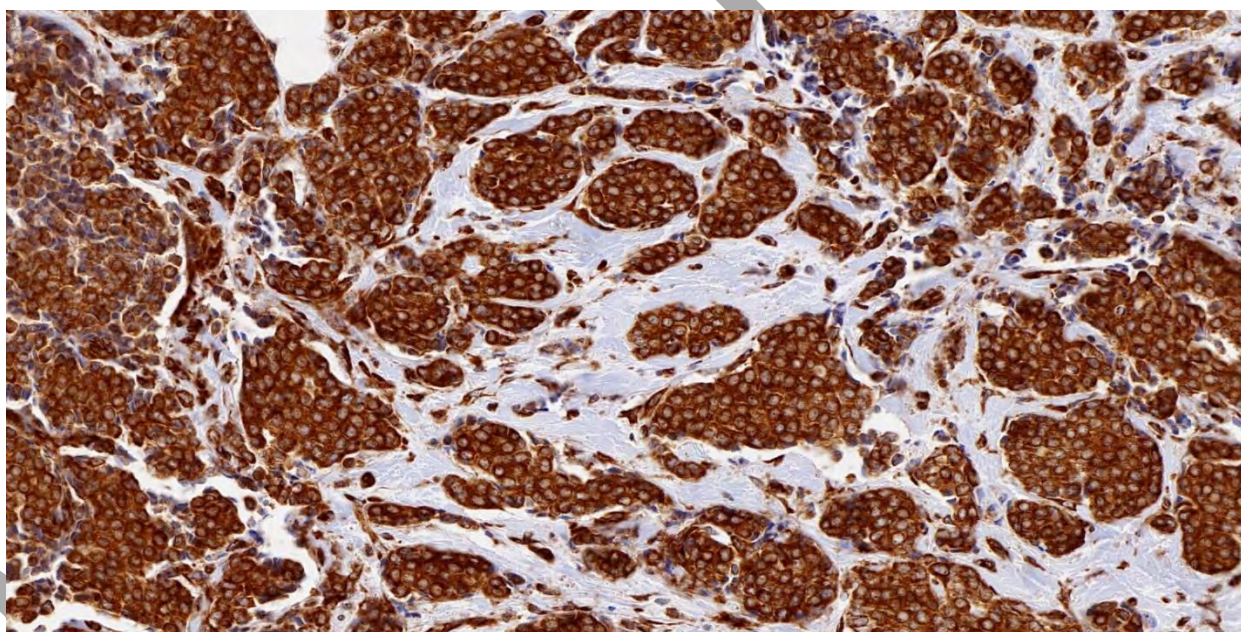
Nakon završetka procesa bojanja preparati su dehidrirani u nizu alkohola od manje koncentracije prema većoj (70%, 96%, 100%), proizvođača BioGnost, bistreni su u ksilenu proizvođača Claro-Prom, LOT: 2510042, te pokriveni filmom za pokrivanje preparata, Tissue Tek Coverslipping Film u pokrivaču Sakura.

Pozitivna proba korišteno je tkivo posteljice. Detekcija je rađena po intenzitetu obojanih citoplazmi unutar tumorskih stanica u najmanje 10% tumorskih stanica.

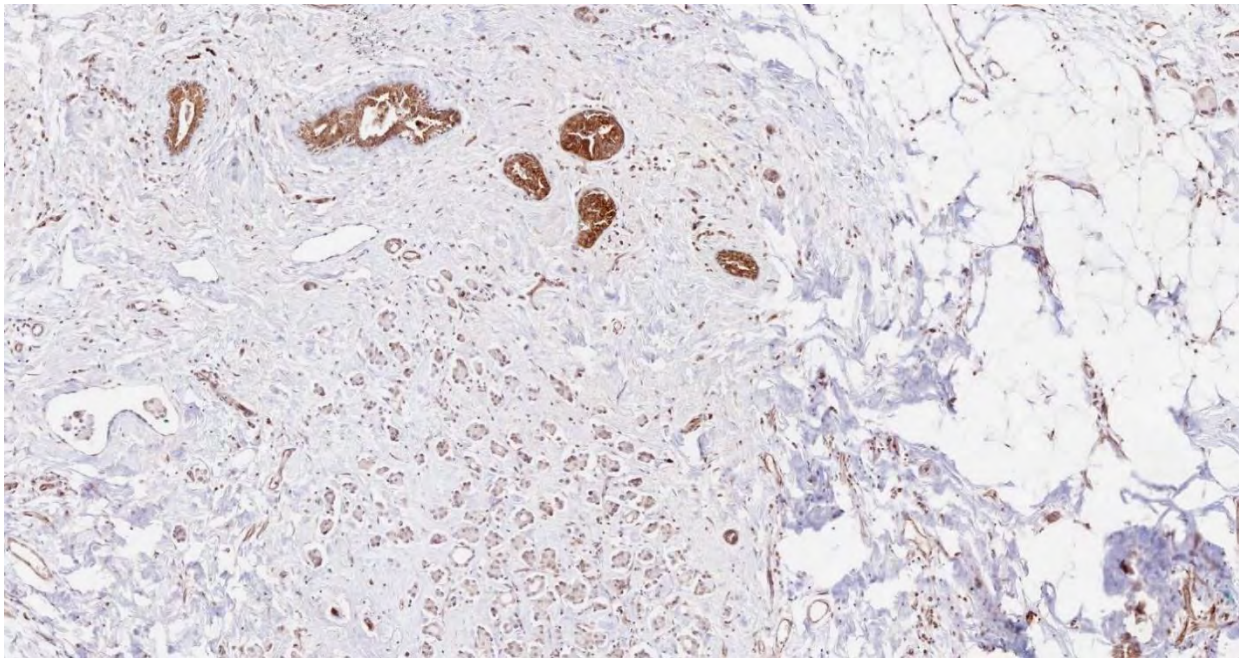
Ekspresija VEGF procjenjivana je polukvantitativno prema intenzitetu citoplazmatskog bojanja tumorskih stanica. Analiza je provedena u najmanje 10% tumorskih stanica.

INTERPRETACIJA

- 0 – bez citoplazmatskog bojanja tumorskih stanica
- 1 – slabo citoplazmatsko obojenje, vidljivo pri povećanju 20x, potvrđeno na 40x
- 2 – umjereno citoplazmatsko bojanje, vidljivo pri povećanju 10x, potvrđeno na 20x
- 3 – jako, intenzivno citoplazmatsko bojanje, vidljivo već pri povećanju 4x



Slika 10. IHK obojen VEGF TNBC tumor dojke



Slika 11. IHK obojen VEGF Luminalni B HER 2+ tumor dojke

8.3. IHK evaluacija estrogenskog (ER) receptora

Imunohistokemijsko bojanje na estrogen rađeno je uz pomoć ER monoklonskog zečjeg antitijela klona SP1, RTU, proizvođača Roche za IVD upotrebu. LOT protutijela je N5 4191. Bojanje je rađeno na rezovima debljine 4 mikrona, rezani su na mikrotomu Leica, osušeni na zraku 24 sata. Deparafinirani su u automatskom bojaču Ventana Bench Mark Ultra pomoću otopine EZ Prep concentrate u razrjeđenju radne otopine 1:10. Ovim bojanjem rađena je detekcija antigena estrogenskog receptora u karcinomu dojke. Estrogen SP1 protutijelo usmjereno je protiv epitopa prisutnih u ljudskom ER alfa proteinu koji se nalazi u jezgri ER pozitivnih stanica, te se očitava kao nuklearno obojenje. Pozitivna kontrola bio je prethodno pozitivan tumor dojke na estrogenske receptore. Bojanje je rađeno uz pomoć:

Ultra View DAB Detection Kit LOT (10) N15892, optimiziranog od strane proizvođača, zatvorenog sustava. U kitu su pripadajući reagensi:

- Inhibitor – 3% H₂O₂
- HRP multimer
- Kromogen DAB
- CuSO₄

Kontrastno bojenje rađeno je Hematoksilinom Roche, LOT N14400 – 8 minuta unutar uređaja. Demaskiranje antigena rađeno je uz pomoć Cell Conditioning (CC1), pH 8,4, LOT N11594, u zatvorenom sustavu uređaja.

Primarno protutijelo inkubirano je 16 minuta na zagrijanim radnim pločicama uređaja na 37°C. Pozitivna kontrola bila je tkivo dojke interne kontrole, prethodno pozitivno na estrogenske receptore u tumoru dojke.

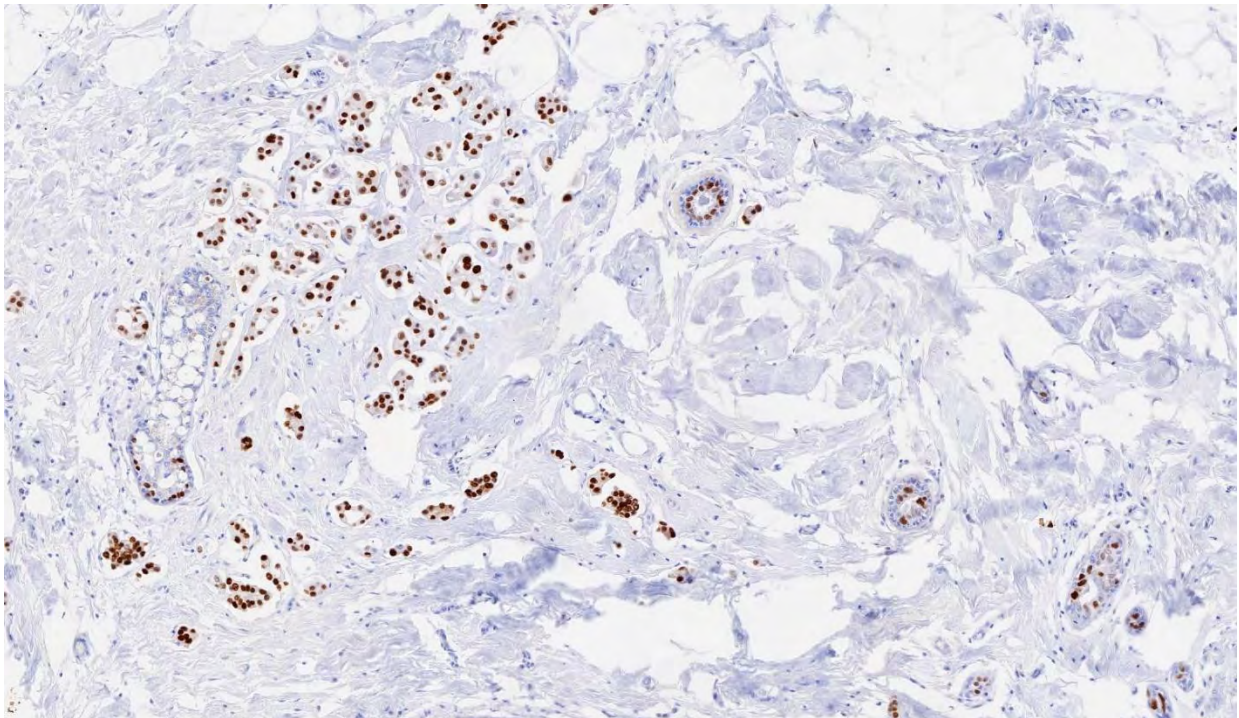
Ispiranja unutar uređaja rađena su Reacion bufferom – Tris puferom pH 7,6 – 7,8, LOT N10709, u razrijeđenju radne otopine 1:10. Nakon završetka bojanja preparati su impregnirani Ultra LCS LOT N10802, uljnom otopinom za sprječavanje isušivanja. Preparati su pokriveni u Sakura pokrivaču automatskim filmom Tissue Tek Coverslipping Film u pokrivaču Tissue Tek Film Sakura.

Ekspresija estrogenskog receptora procjenjivana je kao nuklearno bojanje tumorskih stanica. Evaluiran je postotak tumorskih stanica u jezgri.

Prema ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists) smjernicama:

INTERPRETACIJA

- ER pozitivan - > 1% pozitivnih tumorskih jezgri
- ER negativan- < 1 % pozitivnih tumorskih jezgri



Slika 12. IHK obojeni estrogenski receptori Luminalnog B HER2- raka dojke

8.4. IHK evaluacija progesteronskog (PR) receptora

Imunohistokemijsko bojanje na progesteron bojano je zečjim monoklonalnim protutijelom , klona PR 1E2, RTU (*ready to use*), IVD. Protutijelo je usmjereno protiv epitopa prisutnih u protinu ljudskog progesteronskog receptora koji se nalazi u jezgri tumorskih stanica dojke. Parafinski rezovi debljine 4 mikrona, rezani na mikrotomu Leica SM2010R deparafinirani su unutar zatvorenog sustava platforme Ventana Bench Mark Ultra pomoću razrijeđene otopine 1:10 EZ Prep, LOT (10) N11657. Otkrivanje epitopa rađeno je uz pomoć CC1- Cell Conditioning LOT N11594.

Bojanje je rađeno uz pomoć Ultra View Dab Detection Kit LOT (10) N15892 koji sadrži:

- Inhibitor – 3% H₂O₂
- HRP multimer
- Kromogen DAB
- CuSO₄

Primarno protutijelo inkubirano je 16 minuta na temperaturi radne ploče u uređaju po preporuci proizvođača na 37°C. Pozitivna proba korištena je pozitivno prethodan validirani tumor dojke na progesteronske receptore.

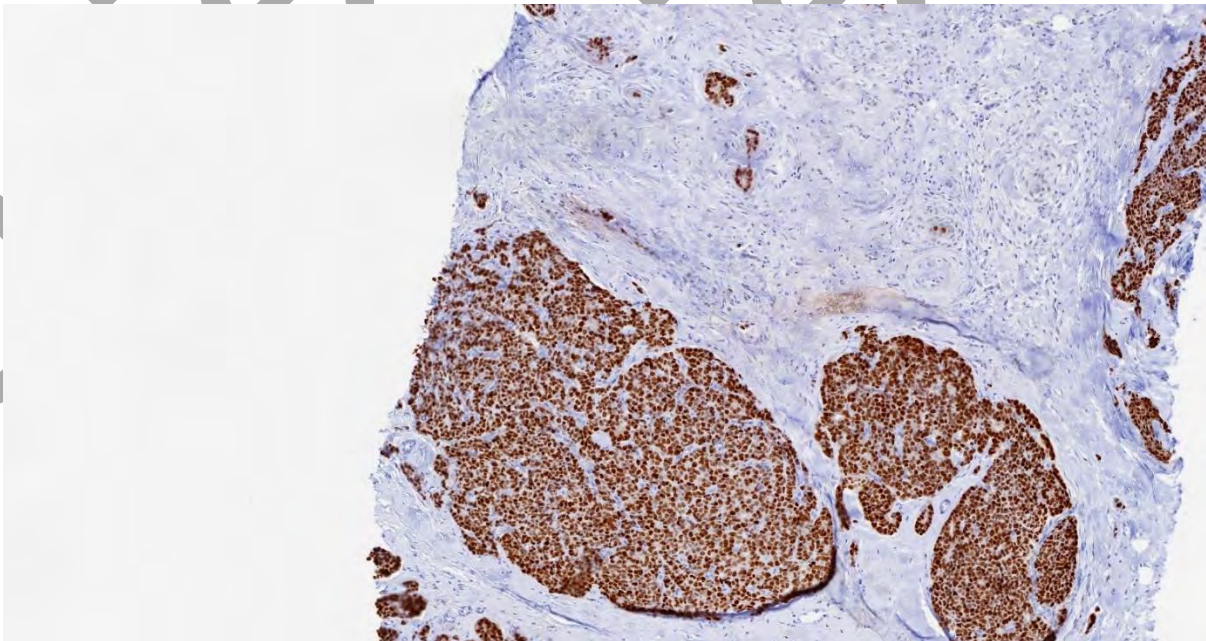
Kontrastno bojanje rađeno je unutar sustava platforme hematoksilinom Roche LOT N14400 8 minuta. Po završetku protokola preparati su impregnirani Ultra LCS uljnom otopinom zbog zaštite od isušivanja, LOT N10802. Preparati su dehidrirani van platforme u nizu alkohola od manje koncentracije prema većoj (70%, 96% i 100%), proizvođača BioGnost, izbistreni u ksilenu proizvođača Claro – Prom, LOT 2510042, pokriveni filmom za pokrivanje preparata, Tissue-Tek Coverslipping Film na automatskom pokrivaču Sakura Tissue Tek Prisma.

Ekspresija progesteronskog receptora očitavana je kao nuklearno obojenje tumorskih stanica. Procijenjen je postotak pozitivnih jezgri.

INTERPRETACIJA

- PR pozitivan - $\geq 1\%$ pozitivnih tumorskih jezgri
- PR negativan - $< 1\%$ pozitivnih tumorskih jezgri

Rezultat je izražen kao postotak pozitivnih tumorskih stanica u jezgrama.



Slika 13. IHK obojen Progesteron Luminalni B HER 2- rak dojke

8.5. IHK evaluacija proliferativnog indeksa Ki 67

Imunohistokemijsko bojanje na monoklonalno zečje protutijelo Ki 67 klona 30 -9, RTU, IVD. rađeno je na platformi Ventana Bench Mark Ultra u zatvorenom automatiziranom sustavu. Pozitivna kontrola za protutijelo bila je tonzila, zbog toga što germinalni centri pokazuju intenzivno nuklearno bojanje dok zona plašta i interfolikularna područja ostaju negativno obojana. Očitava se nuklearni pozitivitet. Ki 67 je marker proliferacije, nuklearni protein koji se eksprimira u proliferirajućim stanicama. Kliničko-patološka svrha mu je procjena biološke aktivnosti tumora, prognostička stratifikaciji bolesnika i odabir terapije.

Preparati za ovu analizu rezani su na mikrotomu Leica, debljine 4 mikrona, montirani su na pozitivno nabijena Tomo Matsunami stakalca, osušeni na sobnoj temperaturi 24 sata nakon rezanja. Deparafinizacija rađena je u platformi Ventana Bench Mark Ultra Roche uz pomoć Ultra View DAB Detection Kita LOT (10)N15892.

U sastavu kita su:

- Inhibitor, 3% H₂O₂
- HRP multimer
- Kromogen DAB
- CuSO₄

Demaskiranje epitopa rađeno je uz pomoć CC1 Roche pufera LOT: N11594, 64 minute na 95°C.

Primarno protutijelo inkubirano je 16 minuta na temperaturi od 37°C, 16 minuta. Kontrastno bojanje rađeno je hematoksilinom Roche LOT N14400 8 minuta. Nakon bojanja preparati su dehidrirani u nizu alkohola (70%, 96%, 100%) proizvođača BioGnost, izbistreni u ksilenu proizvođača Claro-Prom, LOT 2510042, i pokriveni na automatskom pokrivaču Sakura, trajnim filmom Tissue-Tek Coverslipping.

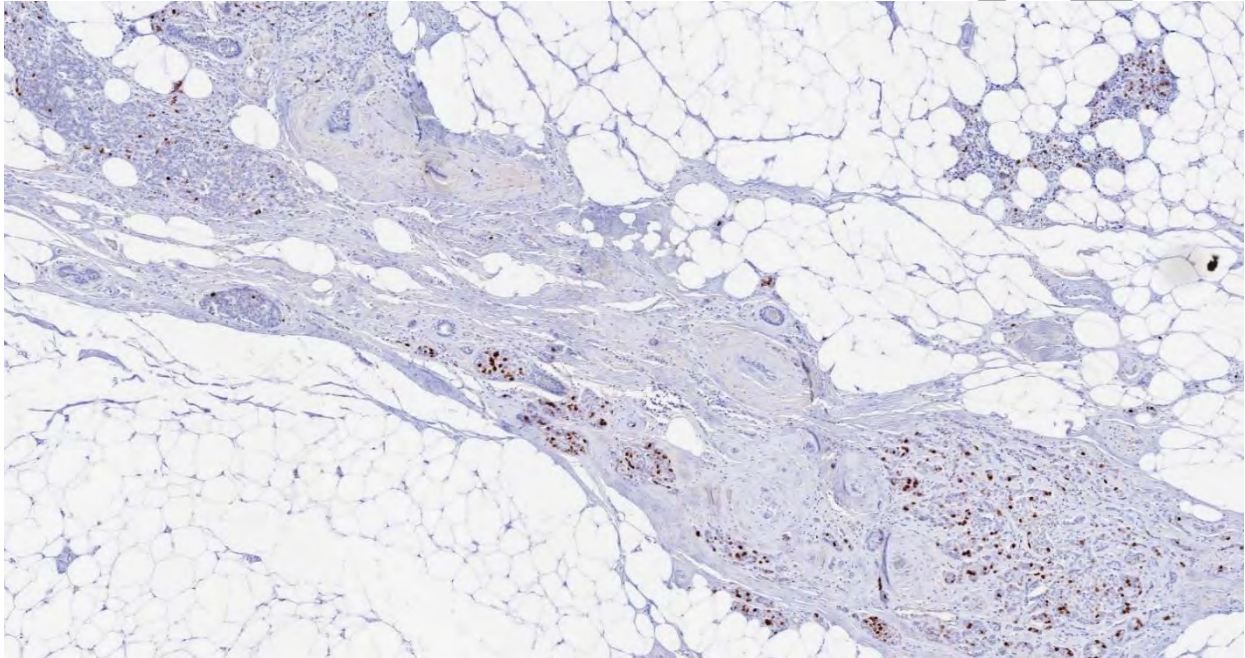
INTERPRETACIJA

Evaluiran je postotak pozitivnih tumorskih jezgri (proliferacijski indeks). Brojanje je provedeno u reprezentativnim područjima invazivnog tumora, izbjegavajući nekrozu i artefakte. Minimalno je analizirano 100 tumorskih stanica. Rezultat je izražen u postocima.

Nizak proliferacijski indeks - <20%

Visok proliferacijski indeks - $\geq 20\%$

U ovom radu proliferacijski indeks bodovan je u rasponu od 1% - 100%.



Slika 14. IHK obojen Ki – 67 Luminalni B HER – rak dojke

8.6. IHK evaluacija HER2 proteina u tumoru dojke

Imunohistokemijsko bojanje na HER 2 protein rađeno je zečjim monoklonalnim HER 2 protutijelom, 4B5 kon IVD, proizvođača Roche, RTU. Protutijelo se veže na unutarnju domenu transmembranskog HER2 receptora u tumorima dojke. Povećana ekspresija ovog proteina na staničnoj membrani pojačava signalnu transdukciju, potiče proliferaciju i diferencijaciju, samim time doprinosi bržem razvoju tumora.

Bojanje je rađeno na Roche platformi Ventana Bench Mark Ultra uz pomoć Ultra View DAB Detection Kita, LOT: (10) N15892 koji sadrži sljedeće:

- Inhibitor – 3% H₂O₂
- HRP multimer
- Kromogen DAB
- CuSO₄

Kontrastno bojanje rađeno je Hematoksilinom Roche unutar platforme LOT: N14400. Inkubacija primarnog protutijela bila je 32 minute na temperaturi pločice 37°C. Pozitivna proba bilo je prethodno pozitivno tkivo dojke na HER2 protein. Parafinski rezovi rezani su debljine 4 mikrona na mikrotomu Leica SM2010R. Deparafinizacija rađena je unutar platforme Ventana uz pomoć EZ Prep Concentrate u razrijeđenju otopine za rad 1:10, LOT N11657. Bojanje je rađeno uz pomoć Ultra View DAB Detection Kita, LOT: (10) N15892., u sastavu kojega su inhibitor peroksidaze, HRP multimer , kromogen DAB i bakar sulfat.

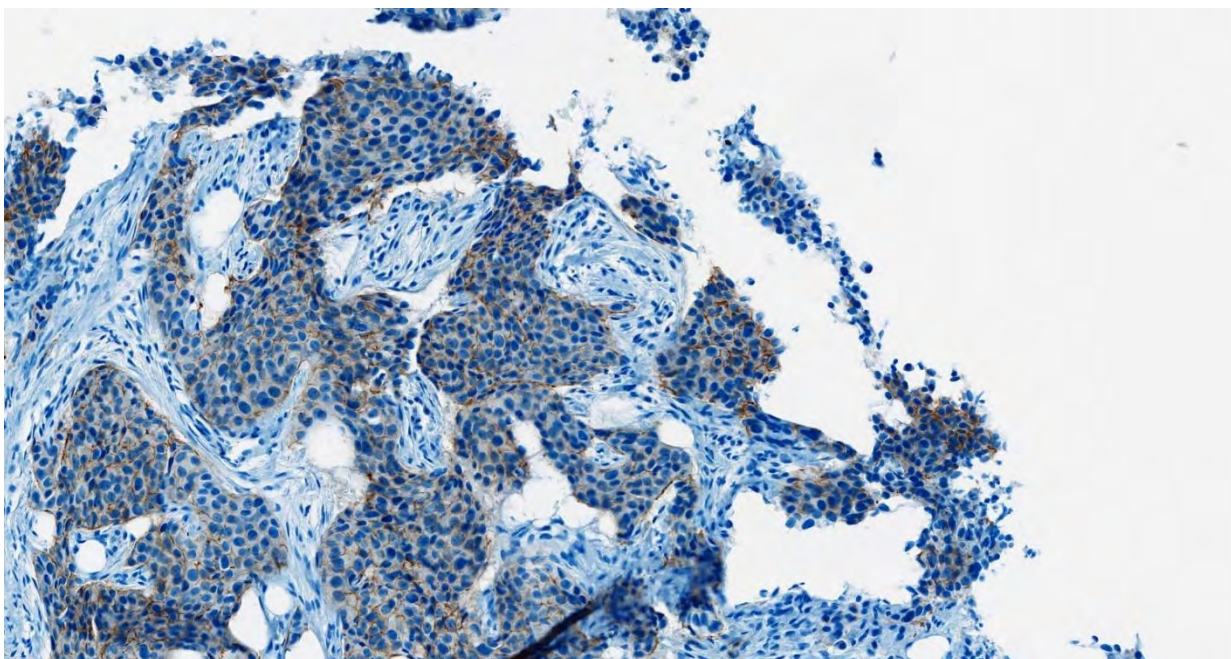
Kontrastno bojanje rađeno je hematoksilinom Roche, LOT: N14400. Demaskiranje epitopa rađeno je Roche puferom CC1, Ph 8,4.LOT N11594. Nakon završenog protokola preparati su pokriveni u automatskom pokrivaču Sakura filmom za pokrivanje.

INTERPRETACIJA HER2

Evaluacija HER2 proteina provedena je prema ASCO/CAP smjernicama.

HER2 očitava se kao membransko bojanje tumorskih stanica .

- 0 – nema membranskog bojenja
- 1+ - slabo, nepotpuno membransko bojenje u > 10% stanica- HER2 = negativan
- 2+ - (granično, neodređeno) – slabo do umjereno kompletno membransko bojenje u > 10% tumorskih stanica – refleksno odrađena Dual ISH in situ hibridizacija
- 3+ - (pozitivno) – intenzivno, kompletno kružno membransko bojanje u više od 10% tumorskih stanica



Slika 15. IHK obojen HER 2 Luminalni B HER2+ rak dojke

8.7. Dual ISH metoda detekcije gena HER2 na kromosomu 17

Dual in situ hibridizacija (Dual ISH) rađena je na platformi Ventana BenchMark Ultra kod karcinoma koji su imali imunohistokemijski neodređeno bojanje na HER2 (HER 2++) kako bi se odredio točan status HER2 gena u tumoru. Za pozitivnu probu korišteno je tkivo dojke koje je bilo HER2+++ na Dual ISH in situ hibridizacijsku metodu. Uz Silver i Red detekcijski kit za ISH analizu koristi se Opti View Dab Kit. Analiza je rađena uz pomoć Opti View DAB Detection kita LOT M28116: koji sadrži:

- Opti View Peroxidase Inhibitor – LOT: M17586
- Opti View Universal Linker – LOT:M17587
- Opti View HRP multimer – LOT: M17588
- Opti View DAB – LOT: M17589
- Opti View Copper – LOT: M 17591
- Amplifikacijski kit LOT. M23984 koji sadrži:
 - Opti View Amplifier – LOT: M05866
 - Opti View Amplification H₂O₂ - LOT: M05868
 - Opti View Amplification Multimer – LOT: M05867

Analiza je rađena s Ventana HER Dual ISH DNA probe Coctail, LOT:NO5925. Obilježene su haptent dinitrofenilnom (DNP) i chromosome 17 probe obilježene haptent digokseninom (DNP). Sonde su dizajnirane za detekciju amplifikacije HER2 gena u karcinomu dojke. Sonda je mješavina oligo-sondi koje ciljano djeluju na HER2 gen koji se nalazi na kromosomu 17 (17q12). Sonda za kromosom 17 je mješavina oligo sondi koje ciljaju sekvencer unutar regija centromera. Kitovi sadrže primarno protutijelo i enzimski označeno sekundarno protutijelo konjugirano s peroksidazom hrena (HRP) i alkalnom fosfatazom (AP) koja se koristi kao kromogeni enzim.

Tijekom Dual in situ hibridizacije (Dual ISH) postupak bojenja DNP i DIG sonde hibridiziraju se na svoje specifične ciljane DNK sekvence unutar staničnih jezgri. Najprije se detektira DNK obilježena HER2 sonda pomoću detekcijskog kita Silver ISH DNP.

Ventana Silver ISH DNP Detection Kit LOT: N05459, u sklopu kojega su:

- Silver ISH DNP – LOT: NO6159
- Silver ISH DNP HRP – LOT: NO6161
- Silver ISH Chromogen A – CH₃COOAg – LOT: NO6162
- Silver ISH Chromogen B – C₆H₆O₂ - LOT:NO6163
- Silver ISH Chromogen C – 2% H₂O₂ - LOT: NO6164
- ISH Protease III: LOT: M26645

Nakon detekcije HER2, DIG – om obilježena sonda za kromosom 17 detektira se pomoću RED ISH detekcijskog kita. Kit uključuje navedene reagense.

- Red ISH DIG Detection Kit: LOT: N05456, u sklopu kojega su:
- Red ISH DIG NP – LOT: NO4762
- RED ISH DIG NP AP – LOT: NO 4763
- RED ISH DIG Ph Enhancer – LOT: NO4765
- Red ISH DIG Naphtol –LOT: NO4765
- Red ISH DIG Fast Red Chromogen – LOT:NO 4766
- Hybready Solution – LOT: M14777

Koktel proba HER 2 za ovu analizu koristila se:

- Dual ISH DNA HER2 Coctail Probe – LOT: NO5925

Rezovi debljine 4 mikrona deparafiniraju se unutar platforme Ventana pomoću EZ Prep razrijeđene otopine u radnom razrjeđenju 1:10. Postupak rada traje oko devet sati. Po završetku analize stakalca su dehidrirana u nizu alkohola od manje koncentracije prema većoj te izbistrena u ksilenu. Stakla su pokrivena na automatskom pokrivaču Sakura, trajnim filmom.

Dual ISH je refleksno testiranje nakon IHC HER2++ ili u situacijama gdje je potrebna potvrda gena. Metoda istovremeno detektira HER2 gen na istom preparatu i kontrolnu metu na kromosomu 17 (CEP 17/ CEN17). Rezultat se iskazuje kao odnos HER2/CEP17 ili prosječan broj kopija /signala po jezgri. Metoda je rađena pomoću Kitova koji sadrže dvije označene probe. Jedna je HER2 sonda označena haptenom dinitrofenilom. Druga je CEP17/CEN17 sonda označena haptenom digokseninom. Nakon hibridizacije na ciljne DNA sekvence u jezgrama tumorskih stanica slijedi kromogena detekcija u dvije boje. HER2 vizualizira se pomoću SILVER ISH detekcijskog sustava koji boja jezgru srebrno-crnim signalom. Centromera kromosoma 17 (CEP17) vizualizira se pomoću RED ISH detekcijskog sustava u jezgri koji rezultira crvenim signalom. Nakon hibridizacije u jezgri se izravno brojao i HER2 i CEP17.

Postupak je u potpunosti automatiziran, na pozitivno nabijeno predmetno staklo montiran je tkivni rez debljine 4 mikrona, te je od deparafinizacije do kromogene detekcije analiza odrađena u sustavu platforme. Probe HER2 i CEP17 hibridiziraju se na komplementarne ciljane sekvence u jezgrama. Nakon analize predmetno stakalce pokriveno je filmom u automatskom pokrivaču Sakura.

Interpretacija signala određuje se na svjetlosnom mikroskopu povećanju 40 x i 60 x na način da se u invazivnoj tumorskoj komponenti broje signali u reprezentativnom broju na dvadeset jezgri koje se zbroje zasebno.

Za ovo istraživanje uzeo se prosječan broj HER2 signala po jezgri kao i prosječan broj CEP17 signala po jezgri, nakon čega se računao omjer HER2 u odnosu na CEP17. Podijelio se ukupan broj HER2 s ukupnim brojem CEP17.

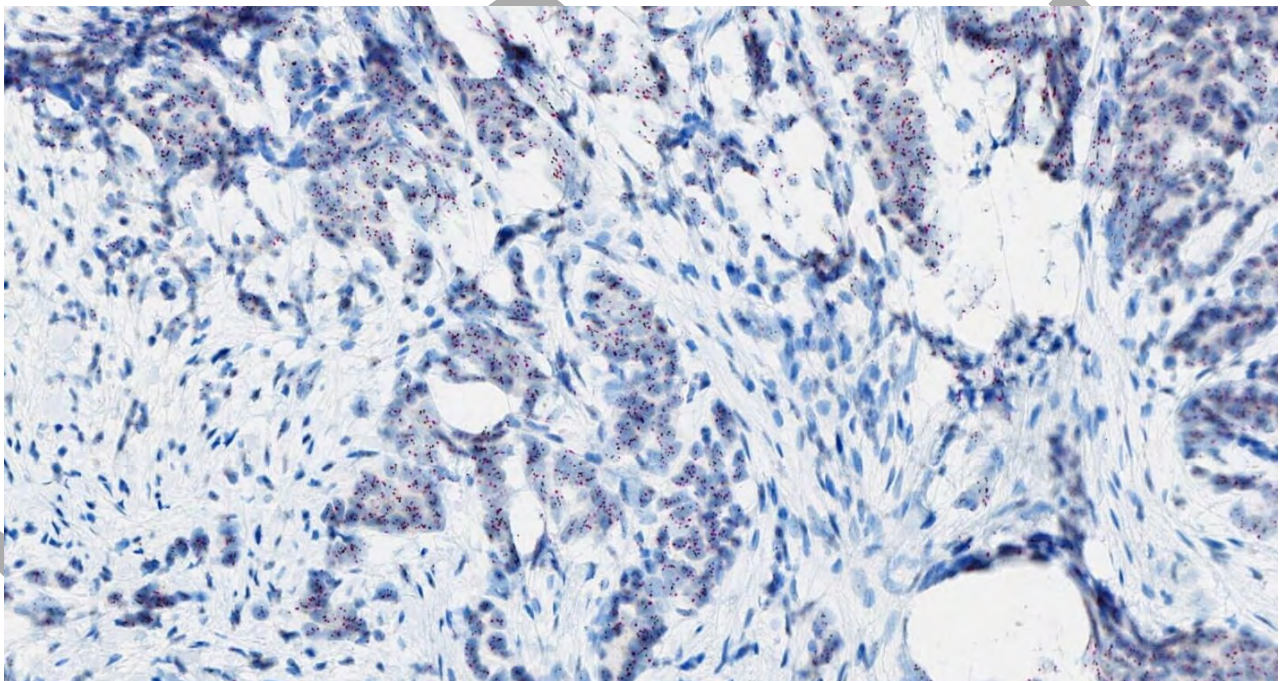
INTERPRETACIJA Dual ISH (HER2 gen)

Rezultati su izraženi kao:

- Prosječan broj HER2 signala u jezgri
- Prosječan broj CEP17 signala u jezgri
- Omjer HER2/CEP17

Brojano je najmanje 20 reprezentativnih invazivnih tumorskih jezgri. Kriteriji interpretacije:

- Amplificiran HER 2 gen – $HER2/CEP17 \geq 2.0$
- Neamplificiran HER 2 gen – $HER2/CEP17 < 2.0$
- Amplificirani uzorci klasificirani su kao HER2 pozitivni (3+).



Slika 16. Dual in situ hibridizacijom obojen HER 2 +++ Luminalni B rak dojke.

9. STATISTIČKE METODE

Kategorijski podaci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike između kategorijskih varijabli testirane su χ^2 testom, a prema potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Razlike između dva povezana mjerenja kategorijskih varijabli analizirane su McNemar–Bowkerovim testom, odnosno testom marginalne homogenosti kada kontingencijske tablice nisu bile dimenzija $n \times n$. Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli procijenjena je Shapiro–Wilkovim testom. Kontinuirani podaci prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlike kontinuiranih varijabli između dva povezana mjerenja testirane su Wilcoxonovim testom uz Hodges–Lehmannovu procjenu razlike medijana i pripadni 95 % interval pouzdanosti. Razlike kontinuiranih varijabli između triju nezavisnih skupina analizirane su Kruskal-Wallisovim testom uz post hoc Conoverov test. Povezanost varijabli procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho). Bivarijatnom logističkom regresijom procijenjena je povezanost preterapijskih varijabli s odgovorom na neoadjuvantnu terapiju (1.2) ROC (engl. *Receiver Operating Characteristic*) analiza primijenjena je za određivanje optimalne granične vrijednosti (engl. *cut-off*), površine ispod ROC krivulje (AUC), osjetljivosti i specifičnosti veličine tumora (određene ultrazvučno) u predikciji lošeg odgovora na neoadjuvantnu terapiju. (3).

Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$. S obzirom na sekundarni karakter analiza, korekcija na višestruka testiranja nije primijenjena, a rezultati se interpretiraju uz oprez. Za statističku analizu koristio se statistički paket MedCalc® Statistical Software version 23.4.8 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2026). Izvješće o provedenom istraživanju načinjeno je u skladu sa smjernicama (EQUATOR Network) za izvještavanje rezultata istraživanja u biomedicini i zdravstvu (4).

Literatura:

1. Daniel W.W. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. John Wiley & Sons, Inc. 2012.
2. Armitage P, Perry G. Statistical methods in medical research. Wiley-Blackwell. 2001
3. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. BMJ: British Medical Journal. 1994 Jul 16;309(6948):188.
4. EQUATOR Network. Enhancing the QUALity and Transparency Of Health Research [Internet]. [citirano 11. veljače 2026.]. Dostupno na: <https://www.equator-network.org/>

10. REZULTATI – Statistička obrada podataka kliničko-patoloških i bioloških obilježja tumora

Istraživanje je obuhvatilo 102 bolesnika, od kojih je po 34 (33,3 %) imalo Luminal B podtip, 34 Luminal B/HER2 pozitivni podtip i 34 trostruko negativni karcinom.

Od ukupno 102 ispitanika, 2 (2 %) bili su muškarci, a 100 (98 %) žene. U skupini trostruko negativnih tumora veći udio bolesnika bio je u dobi do 50 godina, 16 (47 %), u usporedbi s luminalnim B i luminalnim B/HER2-pozitivnim podtipom (χ^2 test, $P = 0,034$).

Prilikom inicijalne core biopsije limfovaskularna invazija bilježi se kod 6 (5,9 %) bolesnika. Značajno je više tumora Gradusa III zabilježeno u trostruko negativnih tumora, u odnosu na ostale tipove tumora, dok je u luminalnom B i luminalno B/HER2-pozitivnom podtipu značajno češći bio gradus II (χ^2 test, $P = 0,004$).

Tablica 10.1.

Kliničko patološka obilježja bolesnika prema molekularnom podtipu tumora određena na uzorcima inicijalne core biopsije

Inicijalna core biopsija	Broj (%) bolesnika				P*
	Luminalni B (n = 34)	Luminalni B/HER2-pozitivni (n = 34)	Trostruko negativni (n = 34)	Ukupno (n = 102)	
Spol					
Muškarci	2 (6)	0	0	2 (2)	0,327 [†]
Žene	32 (94)	34 (100)	34 (100)	100 (98)	
Dob					
do 50 godina	8 (24)	7 (21)	16 (47)	31 (30)	0,034
50 i više godina	26 (76)	27 (79)	18 (53)	71 (70)	
Limfovaskularna invazija	0	3 (8,8)	3 (8,8)	6 (5,9)	0,241
Histološki gradus					
gradus I – dobro diferenciran	6 (17,6)	7 (21)	0	13 (12,7)	0,004[†]
gradus II – umjereno diferenciran	20 (58,8)	20 (59)	16 (47)	56 (54,9)	
gradus III – slabo diferenciran tumor	8 (23,6)	7 (21)	18 (53)	33 (32,4)	
HER2					
0	20 (59)	0	27 (79)	47 (46)	<0,001[†]
1	10 (29)	0	2 (6)	12 (12)	
2	4 (12)	7 (21)	5 (15)	16 (16)	
3	0	27 (79)	0	27 (26)	
HER2 nakon DISH ISH (n = 17)					
Negativno	4 / 4	0	6 / 6	10 / 17	<0,001[†]
Pozitivno (3)	0	7 / 7	0	7 / 17	

* χ^2 test; [†]Fisherov egzaktni test. Podebljana P vrijednost je statistički značajna.

Tablica 10.1.

U Tablici 10.1. prikazana su kliničko-patološka obilježja bolesnika prema molekularnom podtipu tumora određena na uzorcima inicijalne core biopsije. U ispitivanoj skupini (n = 102)

većinu su činile žene (98 %), dok su muškarci bili zastupljeni u 2 % slučajeva, bez statistički značajne razlike između molekularnih podtipova ($P = 0,327$).

S obzirom na dob bolesnika, utvrđena je statistički značajna razlika između podtipova ($P = 0,034$). Bolesnici mlađi od 50 godina bili su češće zastupljeni u trostruko negativnom podtipu (47 %) u odnosu na luminalni B (24 %) i luminalni B/HER2-pozitivni podtip (21 %).

Limfovaskularna invazija zabilježena je u 5,9 % ukupnih slučajeva, bez statistički značajne razlike između podtipova ($P = 0,241$).

Statistički značajna razlika između podtipova utvrđena je u raspodjeli histološkog gradusa ($P = 0,004$). Tumori gradusa III bili su znatno češći u trostruko negativnom podtipu (53 %) u odnosu na luminalni B (23,6 %) i luminalni B/HER2-pozitivni podtip (21 %). S druge strane, gradus I nije bio prisutan u trostruko negativnim tumorima, dok je bio zastupljen u luminalnim podtipovima.

Veća zastupljenost mlađih bolesnica u trostruko negativnom podtipu, (47% bolesnica mlađih od 50 godina), u skladu je s literaturom koja opisuje taj podtip kao češći u mlađoj populaciji te povezan s agresivnijim kliničkim tijekom i nepovoljnijim prognostičkim obilježjima (105). Suprotno tome, luminalni B/HER2-pozitivni tumori češće su zabilježeni u starijih bolesnica, (79% bolesnica starijih od 50 godina), što može odražavati drugačiji hormonski i biološki milje u nastanku tumora.

Značajna razlika u histološkom graduu dodatno potvrđuje različitu biološku agresivnost podtipova. Dominacija gradusa III u trostruko negativnom podtipu upućuje na visoku proliferativnu aktivnost i slabiju diferencijaciju stanica, što je karakteristično za ovu skupinu tumora. Izostanak gradusa I u trostruko negativnim tumorima dodatno podupire njihovu inherentnu agresivnost. S druge strane, luminalni podtipovi pokazali su veći udio nižih gradusa, što je u skladu s njihovim relativno povoljnijim prognostičkim profilom u usporedbi s trostruko negativnim tumorima (106).

Razlike u izražaju HER2 očekivano su statistički značajne, budući da je HER2 status sastavni dio definicije molekularnih podtipova. Potvrda amplifikacije HER2 gena metodom Dual ISH bila je u svim HER/2+ slučajevima unutar luminalnog B/HER2-pozitivnog podtipa (7 pacijentica).

Iako limfovaskularna invazija nije pokazala statistički značajnu razliku između podtipova, njezina prisutnost u agresivnijim podtipovima (TNBC i Luminal B/HER2+), može imati prognostičku vrijednost u individualnoj procjeni rizika.

Ukupno gledano, rezultati inicijalne core biopsije potvrđuju da se molekularni podtipovi već u dijagnostičkoj fazi razlikuju prema dobi bolesnika, stupnju diferencijacije i hormonskom statusu, što odražava njihovu temeljnu biološku različitost i ima potencijalni utjecaj na terapijsko odlučivanje i predviđanje odgovora na neoadjuvantno liječenje (107).

Tablica 10.2.

Razlike u kontinuiranim kliničko-patološkim varijablama prema molekularnom podtipu tumora pri inicijalnoj core biopsiji

S obzirom na dob bolesnika, značajno su stariji bolesnici s luminal B/HER2 pozitivnim tumorom u odnosu na trostruko negativne (Kruskal-Wallisov test, $P = 0,015$). Proliferacijski indeks Ki-67 i vrijednost PD-L1 razlikovali su se između podtipova tumora, najviši medijan zabilježen je u obje vrijednosti u trostruko negativnom podtipu (Kruskal-Wallisov test, $P < 0,001$).

Veličina tumora (cm) i udio tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) nisu se razlikovali značajno kod inicijalne core biopsije s obzirom između podtipova (Tablica 10.2.).

Inicijalna core biopsija	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	Luminalni B (n = 34)	Luminalni B/HER2-pozitivni (n = 34)	Trostruko negativni (n = 34)	
	(1)	(2)	(3)	
Dob (godine)	57 (51 – 65)	66 (53 – 73)	51 (44 – 63)	0,015[†]
Estrogenski receptori	95 (90 – 100)	92,5 (70 – 100)	0 (0 – 0)	<0,001[‡]
Progesteronski receptori	70 (45 – 90,5)	52,5 (15 – 90)	0 (0 – 0)	<0,001[‡]
Ki-67	37 (25 – 50)	47,5 (30 – 78,5)	70 (57,8 – 90)	<0,001[§]
Veličina tumora (cm) (UZV)	2,5 (1,7 – 3,3)	2,5 (2,1 – 3)	2,3 (2 – 3,2)	0,965
PD-L1	1,5 (0 – 10)	0 (0 – 10)	10 (8,8 – 25)	<0,001[‡]
TIL - tumor infiltrirajući limfociti	10 (10 – 40)	15 (10 – 42,5)	20 (8,8 – 60)	0,923

*Kruskal-Wallisov test (post hoc test Conover); P vrijednost je statistički značajna.

†na razini $P < 0,05$ značajne su razlike: (2) vs. (3)

‡na razini $P < 0,05$ značajne su razlike: (3) vs. (1, 2)

§na razini $P < 0,05$ značajne su razlike: (1) vs. (2, 3); (2) vs. (3)

Tablica 10.2.

U Tablici 10.2. prikazane su razlike u kontinuiranim kliničko-patološkim varijablama između triju molekularnih podtipova karcinoma dojke (luminalni B, luminalni B/HER2-pozitivni i trostruko negativni) određenih na uzorcima inicijalne core biopsije. Vrijednosti su izražene kao medijan i interkvartilni raspon, a za usporedbu skupina korišten je Kruskal-Wallisov test uz Conover post hoc analizu.

Dob bolesnica statistički se značajno razlikovala među podtipovima ($P = 0,015$). Najviši medijan dobi zabilježen je u skupini luminalni B/HER2-pozitivni (66 godina), dok su bolesnice s trostruko negativnim tumorima bile mlađe (medijan 51 godina). Post hoc analizom utvrđena je značajna razlika između skupina (2) i (3), što upućuje na to da se luminalni B/HER2-pozitivni tumori češće javljaju u starijoj populaciji u odnosu na trostruko negativne tumore.

Proliferacijski indeks Ki-67 također se značajno razlikovao između skupina ($P < 0,001$). Najviši medijan zabilježen je u trostruko negativnim tumorima (70 %), dok je najniži bio u luminalnom B podtipu (37 %).

Veličina tumora mjerena ultrazvučno nije se značajno razlikovala između podtipova ($P = 0,965$), što upućuje na to da u trenutku inicijalne dijagnostike tumorsko opterećenje, izraženo promjerom lezije, nije bilo povezano s molekularnim podtipom.

Izražaj PD-L1 pokazao je statistički značajne razlike ($P < 0,001$), pri čemu su trostruko negativni tumori imali najviši medijan (10 %), uz značajnu razliku u odnosu na obje luminalne skupine.

Udio tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) nije se značajno razlikovao među podtipovima ($P = 0,923$), iako je numerički viši medijan zabilježen u trostruko negativnoj skupini.

Zaključno, među analiziranim kontinuiranim varijablama značajne razlike između molekularnih podtipova utvrđene su za dob, hormonske receptore, Ki-67 i PD-L1, dok veličina tumora i udio TIL-ova nisu pokazali statistički značajne razlike pri inicijalnoj core biopsiji. Ovi

rezultati potvrđuju biološke razlike između podtipova karcinoma dojke već u početnoj dijagnostičkoj fazi.

Tablica 10.3.

Razlike u raspodjeli bolesnika u patohistološkim obilježjima tumora prema molekularnom podtipu pri inicijalnoj core biopsiji

Skupina s luminalnim B/HER2 pozitivnim podtipom tumora ima značajnije više pozitivne limfne čvorove (N1) u odnosu na ostale skupine (χ^2 test, $P = 0,008$). Intenzitet VEGF ekspresije razlikovao se značajno između podtipova, najslabiji intenzitet zabilježen je značajno češće u luminal B/HER2-pozitivnom podtipu, dok su umjereni i najjači intenzitet bili češći u luminalnom B i trostruko negativnom podtipu (χ^2 test, $P = 0,008$). NOS invazivni histološki tip tumora nalazi se značajno manje u skupini s luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu tumora (χ^2 test, $P = 0,028$) u odnosu na ostale skupine.

U T klasifikaciji prevladavala je veličina T2 kod 67 (71 %) bolesnika. Negativni status limfnih čvorova imalo je 43 (54 %) bolesnika, a prema histološkom tipu 84 (89 %) bolesnika imalo je NOS invazivni tip tumora, bez značajne razlike između podtipova (Tablica 10.3.).

Broj (%) bolesnika					
Inicijalna core biopsija	Luminalni B (n = 34)	Luminalni B/HER2-pozitivni (n = 34)	Trostruko negativni (n = 34)	Ukupno (n = 102)	P*
Veličina tumora - T klasifikacija					
T1	0	0	1 (3)	1 (1)	0,183 [†]
T1b	1 (3)	0	1 (3)	2 (2)	
T1c	9 (26)	8 (24)	4 (12)	21 (21)	
T2	23 (68)	26 (76)	24 (71)	73 (72)	
T3	1 (3)	0	4 (12)	5 (5)	
Status limfnih čvorova - N klasifikacija (n = 87)					
N0 - negativni	19 (61)	11 (34)	15 (63)	45 (52)	0,047
N1 - pozitivni	12 (39)	21 (66)	9 (38)	42 (48)	
Fokálnost tumora					
Unifokalni tumor (jedno tumorsko žarište)	30 (88)	32 (94)	33 (97)	95 (93)	0,496 [†]
Multifokalni tumor (dva ili više tumorskih žarišta)	4 (12)	2 (6)	1 (3)	7 (7)	
Histološki tip tumora					
NOS invazivni	31 (91,2)	27 (79,4)	33 (97)	91 (89,2)	0,028[†]
Ostali tipovi	3 (8,8)	7 (20,6)	1 (3)	11 (10,8)	
VEGF					
Najslabiji intenzitet	10 (29)	12 (36)	2 (6)	24 (24)	0,008
Umjeren intenzitet	16 (47)	16 (49)	16 (47)	48 (48)	
Najjači intenzitet	8 (24)	5 (15)	16 (47)	29 (29)	

* χ^2 test; [†]Fisherov egzaktni test. Podebljana P vrijednost je statistički značajna.

Tablica 10.3.

U Tablici 10.3. prikazane su razlike u raspodjeli bolesnika prema patohistološkim obilježjima tumora s obzirom na molekularni podtip, određen na uzorcima inicijalne core biopsije. Analiza je obuhvatila T klasifikaciju, status limfnih čvorova, fokálnost tumora te histološki tip, a statistička značajnost procijenjena je odgovarajućim testovima.

Prema T klasifikaciji, u svim molekularnim podtipovima dominirali su tumori veličine T2. U luminalnom B podtipu T2 tumori činili su 68 %, u luminalnom B/HER2-pozitivnom 76 %, a u trostruko negativnom 71 % slučajeva. Manji udio bolesnika imao je T1c tumore (26 %, 24 % i 12 %), dok su T3 tumori bili rijetki, ali nešto češći u trostruko negativnoj skupini (12 %) u odnosu na ostale podtipove. Razlike u raspodjeli T stadija između skupina nisu bile statistički značajne ($P = 0,183$), što upućuje na sličnu distribuciju primarne tumorske veličine među molekularnim podtipovima u trenutku postavljanja dijagnoze.

Status limfnih čvorova (N klasifikacija), analiziran kod 87 bolesnika, pokazao je statistički značajnu razliku među podtipovima ($P = 0,047$). Najveći udio pozitivnih limfnih čvorova (N1) zabilježen je u luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu (66 %), dok je u luminalnom B i trostruko negativnom podtipu taj udio iznosio 39 % odnosno 38 %. Posljedično, negativni status limfnih čvorova (N0) bio je najčešći u luminalnom B (61 %) i trostruko negativnom podtipu (63 %), a najrjeđi u luminalnom B/HER2-pozitivnom (34 %).

Analiza fokalnosti tumora nije pokazala statistički značajne razlike među podtipovima ($P = 0,496$). Unifokalni tumori bili su dominantni u svim skupinama (88 % u luminalnom B, 94 % u luminalnom B/HER2-pozitivnom i 97 % u trostruko negativnom podtipu), dok su multifokalni tumori bili rijetki, s nešto većim udjelom u luminalnom B podtipu (12 %).

Zaključno, među analiziranim patohistološkim obilježjima pri inicijalnoj core biopsiji statistički značajna razlika između molekularnih podtipova utvrđena je jedino za status limfnih čvorova, dok su raspodjela T stadija i fokalnost tumora bile usporedive među skupinama. Ovi rezultati upućuju na postojanje razlika u obrascu regionalnog širenja bolesti ovisno o molekularnom podtipu, dok veličina i fokalnost primarnog tumora u početnoj dijagnostičkoj fazi ne pokazuju značajne varijacije.

Tablica 10.4.

Razlike u patohistološkim obilježjima tumora prema molekularnom podtipu pri resekciji

T klasifikacija tumora razlikovala se značajno između podtipova, pri čemu je viši T stadiji bio značajno više prisutan u trostruko negativnom podtipu (Fisherov egzaktni test, $P = 0,014$), kao i negativan status limfnih čvorova (χ^2 test, $P = 0,047$). Gradus III bio značajno zastupljeniji u trostruko negativnom podtipu u odnosu na ostale podtipove (χ^2 test, $P = 0,027$).

Limfovaskularna invazija pri resekciji je bila češće prisutna u trostruko negativnom podtipu (χ^2 test, $P = 0,029$) u odnosu na ostale podtipove.

Pri resekciji	Broj (%) bolesnika				P^*
	Luminalni B (n = 34)	Luminalni B/HER2-pozitivni (n = 34)	Trostruko negativni (n = 34)	Ukupno (n = 102)	
Veličina tumora - T klasifikacija					
T1	1 (3)	0	4 (12)	5 (5)	0,014[†]
T1a	6 (18)	5 (15)	1 (3)	12 (12)	
T1b	14 (41)	16 (47)	9 (26)	39 (38)	
T1c	12 (35)	6 (18)	14 (41)	32 (31)	
T2	0	2 (6)	4 (12)	6 (6)	
T3	1 (3)	5 (15)	2 (6)	8 (8)	
Status limfnih čvorova - N klasifikacija (n = 100)					
N0 - negativni	19 (56)	12 (38)	23 (68)	54 (54)	0,047
N1 - pozitivni	15 (44)	20 (63)	11 (32)	46 (46)	
Fokalnost tumora					
Unifokalni tumor (jedno tumorsko žarište)	27 (79)	30 (88)	31 (91)	88 (86)	0,224 [†]
Multifokalni tumor (dva ili više tumorskih žarišta)	7 (21)	4 (12)	2 (6)	13 (13)	
Multicentrični tumor (žarišta u različitim kvadrantima)	0	0	1 (3)	1 (1)	
Histološki gradus					
gradus I – dobro diferenciran	9 (26)	5 (15)	4 (12)	18 (18)	0,027
gradus II – umjereno diferenciran	21 (62)	19 (56)	14 (41)	54 (53)	
gradus III – slabo diferenciran tumor	4 (12)	10 (29)	16 (47)	30 (29)	
Limfovaskularna invazija kod resekcije	3 (9)	10 (29)	12 (35)	25 (25)	0,029
VEGF kod resekcije					
Najslabiji intenzitet	8 (24)	7 (20,5)	4 (12)	18 (18)	0,682
Umjeren intenzitet	12 (35)	12 (35,3)	14 (41)	38 (37)	
Najjači intenzitet	14 (41)	15 (44,1)	16 (47)	45 (44)	

* χ^2 test; [†]Fisherov egzakti test. Poveđljana P vrijednost je statistički značajna.

Tablica 10.4.

U Tablici 10.4. prikazane su razlike u patohistološkim obilježjima tumora prema molekularnom podtipu nakon provedenog neoadjuvantnog liječenja, analizirane na uzorcima kirurške resekcije. Uspoređivani su T stadij, status limfnih čvorova, fokalnost, histološki gradus, limfovaskularna invazija te intenzitet ekspresije VEGF-a. Statistička analiza provedena je χ^2 testom i Fisherovim egzaktnim testom.

Raspodjela T (veličina tumora), klasifikacije pri resekciji pokazala je statistički značajne razlike među podtipovima ($P = 0,014$). Najbolji patološki odgovor u dojci najčešće je zabilježen u trostruko negativnom podtipu (12 %), dok je u luminalnom B podtipu iznosio 3 %, a u luminalnom B/HER2-pozitivnom nije zabilježen. Tumori T1b bili su najčešći u svim skupinama, osobito u luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu (47 %). Viši stadiji (T2 i T3) bili su relativno rijetki, ali su se nešto češće pojavljivali u luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu (T3 – 15 %) i trostruko negativnom podtipu (T2 – 12 %). Ovi nalazi upućuju na različit obrazac tumorskog odgovora na terapiju ovisno o molekularnom podtipu.

Status limfnih čvorova također je pokazao statistički značajnu razliku ($P = 0,047$). Najveći udio pozitivnih limfnih čvorova (N1) zabilježen je u luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu (63 %), dok je trostruko negativni podtip imao najveći udio bolesnika bez zahvaćenih limfnih čvorova (N0 – 68 %). Luminalni B podtip pokazao je gotovo podjednaku raspodjelu između N0 i N1 stadija. Ovi rezultati ukazuju na izraženiju sklonost regionalnom širenju u luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu i potencijalno bolji nodalni odgovor u trostruko negativnom podtipu.

Fokalnost tumora pri resekciji nije se značajno razlikovala među skupinama ($P = 0,224$). Unifokalni tumori bili su dominantni u svim podtipovima (79 – 91 %), dok su multifokalni i multicentrični tumori bili rijetki.

Histološki gradus pokazao je statistički značajne razlike među molekularnim podtipovima ($P = 0,027$). Gradus III bio je najčešći u trostruko negativnom podtipu (47 %), dok je u luminalnom B podtipu prevladavao gradus II (62 %) uz veći udio dobro diferenciranih tumora (gradus I – 26 %). Luminalni B/HER2-pozitivni podtip pokazao je intermedijalnu raspodjelu, ali s većim udjelom slabo diferenciranih tumora (29 %) u odnosu na luminalni B. Ovi nalazi potvrđuju agresivniji biološki potencijal trostruko negativnih tumora.

Limfovaskularna invazija pri resekciji bila je značajno češća u trostruko negativnom (35 %) i luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu (29 %) u odnosu na luminalni B (9 %) ($P = 0,029$), što dodatno upućuje na izraženiju invazivnost navedenih podtipova.

Za razliku od navedenih obilježja, intenzitet ekspresije VEGF-a pri resekciji nije pokazao statistički značajne razlike među podtipovima ($P = 0,682$). U svim skupinama najčešće je zabilježen umjeren ili jak intenzitet ekspresije, što upućuje na sličan angiogeni potencijal rezidualnog tumorskog tkiva bez obzira na molekularni podtip.

Zaključno, pri resekciji su statistički značajne razlike među molekularnim podtipovima utvrđene za T stadij, status limfnih čvorova, histološki gradus i limfovaskularnu invaziju, dok fokalnost tumora i intenzitet VEGF ekspresije nisu pokazali značajne razlike. Ovi rezultati potvrđuju da molekularni podtip ostaje važan pokazatelj biološkog ponašanja tumora i nakon provedenog neoadjuvantnog liječenja.

Tablica 10.5.

Razlike u patohistološkim varijablama prema molekularnom podtipu tumora pri resekciji

Broj odstranjenih limfnih čvorova značajno je veći u luminal B/HER2-pozitivnom podtipu, a najniži u trostruko negativnom podtipu tumora (medijan 9 vs. 4 limfna čvora) (Kruskal-Wallisov test, $P = 0,001$).

Broj pozitivnih limfnih čvorova, veličina tumora, vrijednosti PD-L1 i udio tumor infiltrirajućih limfocita nisu se značajno razlikovali između podtipova.

Rezidualno tumorsko opterećenje nakon neoadjuvantne terapije (RCB) bilo je usporedivo između podtipova, odnosno medijani su bili slični u svim skupinama. Također, rezidualna celularnost nije se razlikovala između podtipova (Tablica 10.5.).

Pri resekcije	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	Luminalni B (n = 34)	Luminalni B/HER2-pozitivni (n = 34)	Trostruko negativni (n = 34)	
	(1)	(2)	(3)	
Broj izvađenih limfnih čvorova	7 (3,8 – 9,3)	9 (4,3 – 11,8)	4 (2 – 5)	0,001 [†]
Broj pozitivnih limfnih čvorova	0 (0 – 2,3)	1 (0 – 2)	0 (0 – 1)	0,141
Veličina tumora (cm)	1,7 (1,3 – 2,4)	1,5 (1 – 2,1)	2,1 (1,2 – 2,5)	0,167
PD-L1	0 (0 – 10)	2,5 (0 – 20)	5 (0 – 10)	0,344
TIL - tumor infiltrirajući limfociti	10 (0 – 10)	10 (0 – 20)	7,5 (0 – 10)	0,667
Rezidualno tumorsko opterećenje nakon neoadjuvantne terapije (RCB)	2,2 (1,7 – 3,2)	2,16 (1,85 – 3,24)	2 (1,8 – 3,3)	0,869
Rezidualna celularnost (%)	30 (15 – 41)	50 (14 – 70)	40 (20 – 56)	0,576

*Kruskal-Wallisov test (post hoc test Conover); Podedbljana P vrijednost je statistički značajna.

[†]na razini P < 0,05 značajne su razlike: (3) vs. (1, 2)

Tablica 10.5.

U Tablici 10.5. prikazane su razlike u kontinuiranim patohistološkim varijablama prema molekularnom podtipu tumora pri kirurškoj resekciji, analizirane Kruskal-Wallisovim testom uz post hoc Conoverovu analizu.

Statistički značajna razlika utvrđena je u broju izvađenih limfnih čvorova (P = 0,001). Najveći medijan broja izvađenih limfnih čvorova zabilježen je u skupini luminalnih B/HER2-pozitivnih tumora, zatim u luminalnih B tumora, dok je najmanji broj izvađenih limfnih čvorova bio u skupini trostruko negativnih tumora. Analizom je potvrđeno je da se trostruko negativni podtip statistički značajno razlikuje u odnosu na oba luminalna podtipa.

U broju pozitivnih limfnih čvorova nije utvrđena statistički značajna razlika između podtipova (P = 0,141), iako je medijan bio nešto viši u luminalnih B/HER2-pozitivnih tumora u usporedbi s ostalim skupinama.

Veličina rezidualnog tumora nakon neoadjuvantne terapije nije se značajno razlikovala među podtipovima (P = 0,167). Trostruko negativni tumori imali su nešto veći medijan veličine u odnosu na luminalne B i luminalne B/HER2-pozitivne tumore, no bez statističke značajnosti.

Ekspresija PD-L1 također nije pokazala značajne razlike među podtipovima ($P = 0,344$). Iako je medijan bio viši u luminalnih B/HER2-pozitivnih (2,5; 0 – 20) i trostruko negativnih tumora (5; 0 – 10) u odnosu na luminalne B (0; 0 – 10), te razlike nisu dosegnule razinu statističke značajnosti.

Slično tome, udio tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) nije se značajno razlikovao između skupina ($P = 0,667$). Medijani su bili usporedivi, s nešto širim interkvartilnim rasponom u luminalnih B/HER2-pozitivnih tumora.

Rezidualno tumorsko opterećenje (RCB) nakon neoadjuvantne terapije nije pokazalo značajne razlike među molekularnim podtipovima ($P = 0,869$), uz vrlo slične medijane u sve tri skupine. Također, postotak rezidualne celularnosti tumora nije se značajno razlikovao ($P = 0,576$), iako je najviši medijan zabilježen u luminalnih B/HER2-pozitivnih tumora (50%; 14 – 70).

Zaključno, pri resekciji je jedina statistički značajna razlika među molekularnim podtipovima utvrđena u broju izvađenih limfnih čvorova, u luminalnom B/HER2+ podtipu, dok se ostale analizirane patohistološke varijable, uključujući veličinu tumora, PD-L1, TIL, RCB i rezidualnu celularnost, nisu značajno razlikovale između skupina.

Tablica 10.6.

Odgovor na neoadjuvantnu terapiju i ishod liječenja prema molekularnom podtipu tumora

Unatoč razlikama u molekularnom podtipu, stupanj patološkog odgovora prema RCB klasifikaciji bio je usporediv među skupinama, bez značajne razlike. U svim podtipovima najčešće je zabilježen umjeren odgovor (RCB-II), kod 67 (66 %) bolesnika, dok je slab odgovor (RCB-III) bio zastupljen kod 24 (24 %) bolesnika.

Smrtni ishod liječenja bio je značajno češći u trostruko negativnom podtipu, dok je najveći udio živih bolesnika zabilježen u luminal B/HER2-pozitivnom podtipu (χ^2 test, $P = 0,012$) (Tablica 10.6.).

	Broj (%) bolesnika				P*
	Luminalni B (n = 34)	Luminalni B/HER2-pozitivni (n = 34)	Trostruko negativni (n = 34)	Ukupno (n = 102)	
Odgovor na neoadjuvantnu terapiju (RCB)					
Jak odgovor (RCB-I)	1 (3)	5 (15)	5 (15)	11 (11)	0,369 [†]
Umjeren odgovor (RCB-II)	26 (76)	21 (62)	20 (59)	67 (66)	
Slab odgovor (RCB-III)	7 (21)	8 (24)	9 (26)	24 (24)	
Ishod liječenja					
Živi	24 (71)	29 (88)	18 (55)	71 (71)	0,012
Umrli	10 (29)	4 (12)	15 (45)	29 (29)	

* χ^2 test; [†]Fisherov egzakti test. Povećana P vrijednost je statistički značajna

Tablica 10.6.

U Tablici 10.6. prikazana je raspodjela odgovora na neoadjuvantnu terapiju, procijenjenog prema RCB klasifikaciji, te ishod liječenja u odnosu na molekularni podtip tumora.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u odgovoru na neoadjuvantnu terapiju između molekularnih podtipova ($P = 0,369$; Fisherov egzakti test). Jak odgovor (RCB-I) zabilježen je u malom udjelu bolesnika, najrijeđe u luminalnom B podtipu (1; 3%), dok je u luminalnom B/HER2-pozitivnom i trostruko negativnom podtipu postignut u po 5 bolesnika (15%). Umjeren odgovor (RCB-II) bio je najčešći u svim skupinama, osobito u luminalnom B podtipu (76%), dok je slab odgovor (RCB-III) bio podjednako zastupljen u sve tri skupine (21–26%). Ovi rezultati upućuju na sličan obrazac terapijskog odgovora među podtipovima, bez statistički značajnih razlika.

Za razliku od terapijskog odgovora, ishod liječenja pokazao je statistički značajnu razliku među molekularnim podtipovima ($P = 0,012$; χ^2 test). Najpovoljniji ishod zabilježen je u skupini luminalnih B/HER2-pozitivnih tumora, gdje je 88% bolesnika bilo živo, a 12% umrlo. U luminalnom B podtipu živih je bilo 71%, dok je 29% bolesnika umrlo. Najnepovoljniji ishod zabilježen je u trostruko negativnom podtipu, gdje je preživjelo 55% bolesnika, dok je 45% umrlo.

Zaključno, iako odgovor na neoadjuvantnu terapiju nije pokazao značajne razlike među molekularnim podtipovima, ishod liječenja značajno se razlikovao, pri čemu je trostruko

negativni podtip bio povezan s lošijim preživljenjem, dok je luminalni B/HER2-pozitivni podtip imao najpovoljniji ishod. Ovi nalazi upućuju na važnost bioloških obilježja tumora u dugoročnom kliničkom ishodu, neovisno o inicijalnom stupnju patološkog odgovora.

Tablica 10.7.

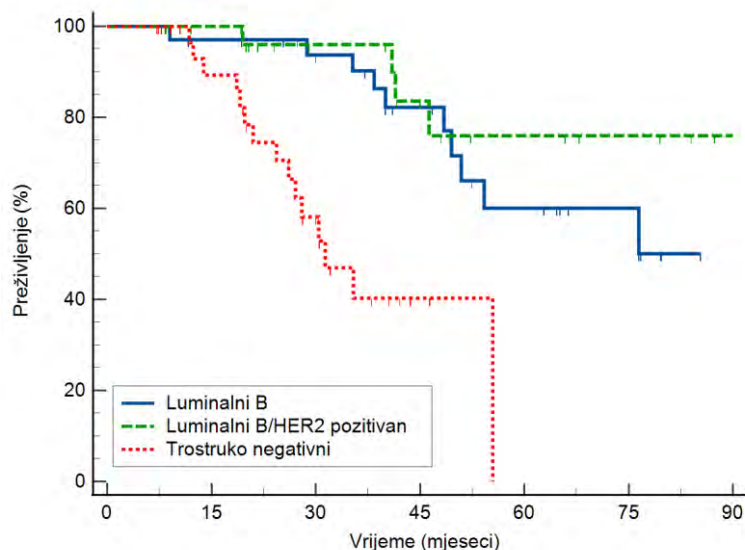
Ukupno preživljenje prema molekularnom podtipu tumora

Najviša stopa preživljenja zabilježena je u luminal B/HER2-pozitivnom podtipu (76 %), zatim u luminalnom B podtipu (50 %), dok je u trostruko negativnom podtipu zabilježena značajno najniža stopa preživljenja (0 %) (log-rank test, $P < 0,001$).

Medijan preživljenja u trostruko negativnom podtipu iznosio je 31 mjesec, dok u ostalim podtipovima medijan nije dosegnut (Tablica 10.7., Slika 5.1).

	Umrli	Živi	Preživljenje (%)	Medijan	95% raspon pouzdanosti	Log-rank test
Ukupno preživljenje (OS)	29	71	48 %	76	50 - 76	-
Ukupno preživljenje (OS) prema tipu tumora						
Luminalni B	10	24	50 %	-	-	<0,001
Luminalni B/HER2-pozitivni	4	29	76 %	-	-	
Trostruko negativni	15	18	0 %	31	24 - 55	

Tablica 10.7.



Slika 6. Kaplan–Meierove krivulje ukupnog preživljenja prema molekularnom podtipu tumora (log-rank test, $P < 0,00$)

U Tablici 10.7. i na Slici 6 prikazano je ukupno preživljenje, bolesnica prema molekularnom podtipu tumora, analizirano Kaplan–Meierovom metodom uz usporedbu krivulja log-rank testom.

Ukupno je zabilježeno 29 smrtnih ishoda, dok je 71 bolesnica bila živa u trenutku završetka praćenja. Ukupna stopa preživljenja iznosila je 48 %, uz medijan preživljenja od 76 mjeseci (95 % CI: 50 – 76).

Analizom prema molekularnom podtipu utvrđena je statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju (log-rank test, $P < 0,001$). Najviša stopa preživljenja zabilježena je u luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu (76 %), uz samo 4 smrtna ishoda i 29 živih bolesnica. U luminalnom B podtipu stopa preživljenja iznosila je 50 % (10 umrlih i 24 živih). Najnepovoljniji ishod zabilježen je u trostruko negativnom podtipu, gdje je stopa preživljenja iznosila 0 %, uz 15 smrtnih ishoda i medijan preživljenja od 31 mjesec (95 % CI: 24 – 55). U luminalnim podtipovima medijan preživljenja nije dosegnut tijekom razdoblja praćenja, što upućuje na dulje preživljenje u tim skupinama.

Kaplan–Meierove krivulje jasno prikazuju razdvajanje preživljenja između molekularnih podtipova, pri čemu trostruko negativni podtip pokazuje najbrži pad krivulje i najkraće preživljenje. Dobiveni rezultati potvrđuju značajan prognostički utjecaj molekularnog podtipa

na ukupno preživljenje bolesnica, s najnepovoljnijom prognozom u trostruko negativnom podtipu te najpovoljnijom u luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu.

Promjene kliničko-patoloških obilježja prije i nakon neoadjuvantne terapije

Fokalnost tumora razlikovala se između core biopsije i resekcije, na način da su multifokalni tumori bili češće zabilježeni pri resekciji (Test marginalne homogenosti, $P = 0,011$). Limfovaskularna invazija bila je značajno češće prisutna u resekcijskom preparatu u odnosu na core biopsiju (McNemar-Bowkerov test, $P < 0,001$). Raspodjela intenziteta VEGF ekspresije razlikovala se između uzoraka (McNemar-Bowkerov test, $P = 0,033$), pri čemu je najjači intenzitet bio češće zabilježen pri resekciji. T klasifikacija, status limfnih čvorova i histološki gradus nisu se razlikovali između core biopsije i resekcije (Tablica 10.8.).

Veličina tumora bila je značajno manja (Wilcoxon test, $P < 0,001$), vrijednosti PD-L1 značajno niže (Wilcoxon test, $P = 0,039$), a udio tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) također je bio značajno niži u resekcijskom preparatu u odnosu na core biopsiju (Wilcoxon test, $P < 0,001$) (Tablica 10.9.).

Tablica 10.8.

Razlike u raspodjeli svih bolesnika prema patohistološkim obilježjima između core biopsije i resekcije

Svi bolesnici	Broj (%) bolesnika		P*
	Core biopsija	Resekcija	
Veličina tumora - T klasifikacija			
T1	1 (1)	5 (4,9)	0,772 [†]
T1a	0	8 (7,8)	
T1b	2 (2)	12 (11,8)	
T1c	21 (20,6)	39 (38,2)	
T2	73 (71,6)	32 (31,4)	
T3	5 (4,9)	6 (5,9)	
Status limfnih čvorova - N klasifikacija			
N0 – negativni	44 (51,2)	44 (51,2)	> 0,99
N1 – pozitivni	42 (48,8)	42 (48,8)	
Fokalnost tumora			
Unifokalni tumor (jedno tumorsko žarište)	87 (91,6)	88 (86,3)	0,011[†]
Multifokalni tumor (dva ili više tumorskih žarišta)	8 (8,4)	13 (12,7)	
Multicentrični tumor (žarišta u različitim kvadrantima)	0	1 (1)	
Histološki gradus			
gradus I – dobro diferenciran	13 (12,7)	18 (17,6)	0,670
gradus II – umjeren diferenciran	56 (54,9)	54 (52,9)	
gradus III – slabo diferenciran tumor	33 (32,4)	30 (29,4)	
Limfovaskularna invazija	6 (5,9)	25 (24,5)	0,003
VEGF			
Najslabiji intenzitet	24 (23,8)	19 (18,8)	0,031[†]
Umjeren intenzitet	48 (47,5)	38 (37,6)	
Najjači intenzitet	29 (28,7)	44 (43,6)	

*McNemar-Bowkerov test; [†]Test marginalne homogenosti.
Podebljana P vrijednost je statistički značajna.

Tablica 10.8.

Tablici 10.8. prikazana je usporedba raspodjele patohistoloških obilježja tumora između inicijalne core biopsije i kirurške resekcije kod svih bolesnica, analizirana McNemar-Bowkerovim testom i testom marginalne homogenosti.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u T klasifikaciji između core biopsije i resekcije ($P = 0,772$). Ipak, vidljiv je pomak prema manjim T kategorijama pri resekciji, uz porast udjela T1 tumora (osobito T1c) te smanjenje udjela T2 tumora u odnosu na inicijalnu biopsiju, što je očekivano s obzirom na učinak neoadjuvantne terapije.

Status limfnih čvorova (N klasifikacija) nije se razlikovao između dviju metoda ($P > 0,99$), pri čemu je jednak broj bolesnica imao negativne (51,2 %) i pozitivne (48,8 %) limfne čvorove u obje faze analize.

Statistički značajna razlika utvrđena je u fokalnosti tumora ($P = 0,011$). Nakon resekcije zabilježen je veći udio multifokalnih (12,7 %) i multicentričnih tumora (1 %) u odnosu na core biopsiju, gdje su gotovo svi tumori bili opisani kao unifokalni (91,6 %). Ovaj nalaz odražava ograničenja uzorka dobivenog biopsijom, koja ne mora u potpunosti prikazati prostornu distribuciju tumorskih žarišta.

Histološki gradus nije pokazao značajne razlike između core biopsije i resekcije ($P = 0,670$), uz sličnu raspodjelu dobro, umjereno i slabo diferenciranih tumora u obje analize.

Limfovaskularna invazija bila je značajno češće utvrđena u uzorcima resekcije (24,5 %) u usporedbi s core biopsijom (5,9 %) ($P = 0,003$). Ovaj rezultat potvrđuje veću dijagnostičku osjetljivost operativnog preparata za detekciju tumorske invazije u limfne i krvne žile kao i pitanje utjecaja NAT na razvoj bolesti.

Također je zabilježena statistički značajna razlika u intenzitetu ekspresije VEGF-a između core biopsije i resekcije ($P = 0,031$). Nakon resekcije povećan je udio tumora s najjačim intenzitetom ekspresije (43,6 % u odnosu na 28,7 % pri biopsiji), dok je udio tumora sa slabijim intenzitetom smanjen.

Zaključno, iako većina patohistoloških parametara nije pokazala značajne razlike između core biopsije i resekcije, značajne promjene utvrđene su u fokalnosti tumora, prisutnosti limfovaskularne invazije i intenzitetu VEGF ekspresije, što naglašava važnost cjelovitog patohistološkog pregleda operativnog preparata u procjeni bioloških obilježja tumora nakon neoadjuvantne terapije.

Tablica 10.9.

Razlike u veličini tumora, PD-L1 i TIL između core biopsije i resekcije u skupini svih bolesnika

	Medijan (interkvartilni raspon)		†Procjena razlike medijana	95 % raspon pouzdanosti	P*
	CORE biopsija	Resekcija			
Veličina tumora (cm)	2,5 (2,0 – 3,1)	1,7 (1,1 – 2,3)	-0,7	-0,9 do -0,5	<0,001
PD-L1	6 (4 – 10)	5 (0 – 10)	0	-5 do 0	0,039
TIL	15 (10 – 40)	10 (0 – 10)	-15	-20 do -10	<0,001

*Wilcoxon test; †Hodges-Lehmannova procjena razlike medijana

Tablica 10.9.

U Tablici 10.9. prikazane su razlike u veličini tumora, ekspresiji PD-L1 i udjelu tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) između uzoraka dobivenih inicijalnom core biopsijom i kirurškom resekcijom kod svih bolesnika. Analiza je provedena Wilcoxonovim testom za zavisne uzorke, uz Hodges-Lehmannovu procjenu razlike medijana.

Utvrđena je statistički značajna redukcija veličine tumora nakon neoadjuvantne terapije ($P < 0,001$). Medijan veličine tumora smanjio se s 2,5 cm (2,0 – 3,1) na core biopsiji na 1,7 cm (1,1 – 2,3) u resekcijskom preparatu. Procjena razlike medijana iznosila je -0,7 cm (95 % CI: -0,9 do -0,5), što potvrđuje klinički i statistički značajno smanjenje tumorske mase.

Kod PD-L1 ekspresije zabilježena je također statistički značajna razlika ($P = 0,039$), iako je procjena razlike medijana iznosila 0 (95 % CI: -5 do 0). Medijan PD-L1 bio je 6 (4 – 10) u core biopsiji te 5 (0 – 10) u resekciji, što upućuje na blago smanjenje ekspresije nakon terapije, ali s relativno širokim rasponom vrijednosti.

Najizraženija promjena zabilježena je u udjelu TIL-ova ($P < 0,001$). Medijan TIL-a smanjio se s 15 (10 – 40) u core biopsiji na 10 (0 – 10) u resekcijskom uzorku. Procjena razlike medijana iznosila je -15 (95 % CI: -20 do -10), što ukazuje na značajno smanjenje imunološke infiltracije tumora nakon provedene terapije.

Zaključno, rezultati pokazuju da je neoadjuvantna terapija dovela do značajnog smanjenja veličine tumora i udjela TIL-ova, dok je promjena PD-L1 ekspresije bila statistički značajna, ali kvantitativno skromnija. Ovi nalazi potvrđuju terapijski učinak na tumorsku masu, ali i na imunološki mikrookoliš tumora.

Tablica 10.10.
Bolesnici s Luminal B podtipom tumora

U skupini bolesnika s luminal B podtipom tumora nema značajnih razlika u raspodjeli prema patohistološkim obilježjima između core biopsije i resekcije (Tablica 10.10.).

Luminalni B	Broj (%) bolesnika		P*
	CORE biopsija	Resekcija	
Veličina tumora – T klasifikacija			
T1	0	1 (2,9)	0,235 [†]
T1a	0	1 (2,9)	
T1b	1 (2,9)	6 (17,6)	
T1c	9 (26,5)	14 (41,2)	
T2	23 (67,6)	12 (35,3)	
T3	1 (2,9)	0	
Status limfnih čvorova – N klasifikacija			
N0 – negativni	19 (61,3)	17 (54,8)	0,727
N1 – pozitivni	12 (38,7)	14 (45,2)	
Fokalnost tumora			
Unifokalni tumor (jedno tumorsko žarište)	30 (88,2)	27 (79,4)	0,375
Multifokalni tumor (dva ili više tumorskih žarišta)	4 (11,8)	7 (20,6)	
Multicentrični tumor (žarišta u različitim kvadrantima)	0	0	
Histološki gradus			
gradus I – dobro diferenciran	6 (11,7)	9 (26,5)	0,212
gradus II – umjereno diferenciran	20 (58,8)	21 (61,8)	
gradus III – slabo diferenciran tumor	8 (23,5)	4 (11,8)	
Limfovaskularna invazija	0	3 (8,8)	0,083 [†]
VEGF			
Najslabiji intenzitet	10 (29,4)	8 (24,2)	0,367
Umjeren intenzitet	16 (47,1)	11 (33,3)	
Najjači intenzitet	8 (23,5)	14 (42,4)	

*McNemar-Bowkerov test; [†]Test marginalne homogenosti

Tablica 10.10.

U Tablici 10.10. prikazana je usporedba patohistoloških obilježja između inicijalne core biopsije i kirurške resekcije u skupini bolesnica s luminalnim B podtipom tumora. Analiza je provedena McNemar-Bowkerovim testom i testom marginalne homogenosti.

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u T klasifikaciji između core biopsije i resekcije ($P = 0,235$). Iako je vidljiv pomak prema manjim T kategorijama nakon neoadjuvantne terapije – uz porast udjela T1 tumora (osobito T1c) i smanjenje T2 tumora – te promjene nisu dosegnule razinu statističke značajnosti.

Status limfnih čvorova (N klasifikacija) nije se značajno razlikovao između dviju analiza ($P = 0,727$). Blago povećanje udjela N1 pozitivnih bolesnica u resekcijskom uzorku (45,2 % u odnosu na 38,7 %) nije bilo statistički značajno.

U pogledu fokalnosti tumora nije zabilježena značajna razlika ($P = 0,375$), iako je u resekcijskom materijalu zabilježen nešto veći udio multifokalnih tumora (20,6 % u odnosu na 11,8 % pri biopsiji), što može odražavati opsežniji uvid u tumorsku arhitekturu nakon operacije.

Histološki gradus nije pokazao statistički značajne promjene ($P = 0,212$). Ipak, primjetan je trend smanjenja udjela gradusa III i povećanja udjela gradusa I u resekcijskom uzorku, što može upućivati na terapijski učinak, ali bez statističke potvrde.

Limfovaskularna invazija bila je prisutna samo u resekcijskim uzorcima (8,8 %), dok u core biopsiji nije zabilježena, no razlika nije bila statistički značajna ($P = 0,083$), iako pokazuje trend prema češćem otkrivanju u operativnom materijalu.

Ekspresija VEGF-a nije pokazala značajnu razliku između biopsije i resekcije ($P = 0,367$). Međutim, vidljiv je porast udjela tumora s najjačim intenzitetom ekspresije u resekciji (42,4 % u odnosu na 23,5 %), uz smanjenje udjela tumora s umjerenim intenzitetom.

Zaključno, u skupini bolesnica s luminalnim B podtipom tumora nisu utvrđene statistički značajne razlike u analiziranim patohistološkim obilježjima između core biopsije i resekcije, iako su uočene određene značajke koji mogu odražavati terapijski učinak i veću dijagnostičku reprezentativnost operativnog preparata.

Tablica 10.11.**Razlike u veličini tumora, PD-L1 i TIL između core biopsije i resekcije u skupini bolesnika s luminal B podtipom tumora**

U skupini bolesnika s luminal B podtipom, veličina tumora bila je značajno manja (Wilcoxon test, $P = 0,003$), a udio tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) značajno niži pri resekciji u odnosu na core biopsiju (Wilcoxon test, $P < 0,001$).

Nisu uočene značajne razlike u vrijednosti PD-L1 pri resekciji u odnosu na core biopsiju kod bolesnika s luminal B podtipom tumora (Tablica 10.11.).

Tablica 10.11. Razlike u veličini tumora, PD-L1 i TIL između core biopsije i resekcije u skupini bolesnika s luminal B podtipom tumora

Luminalni B	Medijan (interkvartilni raspon)		†Procjena razlike medijana	95 % raspon pouzdanosti	P*
	CORE biopsija	Resekcija			
Veličina tumora (cm)	2,5 (1,8 - 3,2)	1,7 (1,4 - 2,3)	-0,6	-1,1 do -0,3	0,003
PD-L1	0 (0 - 10)	0 (0 - 10)	0	-5 do 0	0,145
TIL	10 (10 - 40)	10 (0 - 10)	-15	-23 do -10	<0,001

*Wilcoxon test; †Hodges-Lehmannova procjena razlike medijana

Tablica 10.11.

U Tablici 10.11. prikazane su promjene u veličini tumora, ekspresiji PD-L1 i udjelu tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) između inicijalne core biopsije i kirurške resekcije u skupini bolesnika s luminalnim B podtipom tumora. Analiza je provedena Wilcoxonovim testom za zavisne uzorke, uz Hodges–Lehmannovu procjenu razlike medijana.

Veličina tumora bila je statistički značajno manja u resekcijskom uzorku u odnosu na core biopsiju ($P = 0,003$). Medijan veličine tumora smanjio se s 2,5 cm (1,8 – 3,2) na 1,7 cm (1,4 – 2,3), uz procjenu razlike medijana od -0,6 cm (95 % CI: -1,1 do -0,3). Ovaj nalaz potvrđuje značajan terapijski učinak neoadjuvantnog liječenja na smanjenje tumorske mase u luminalnom B podtipu.

Ekspresija PD-L1 nije pokazala statistički značajnu razliku između dviju točaka mjerenja ($P = 0,145$). Medijan je u oba uzorka iznosio 0 (0 – 10), a procjena razlike medijana bila je 0 (95 % CI: -5 do 0), što upućuje na stabilnost PD-L1 ekspresije tijekom terapije u ovom podtipu.

S druge strane, udio TIL-ova bio je značajno niži u resekcijskom preparatu ($P < 0,001$). Iako je medijan iznosio 10 u oba uzorka, interkvartilni raspon bio je znatno uži u resekciji (0 – 10) u odnosu na core biopsiju (10 – 40). Procjena razlike medijana iznosila je -15 (95 % CI: -23 do -10), što ukazuje na značajno smanjenje imunološke infiltracije nakon provedene terapije.

Zaključno, u luminalnom B podtipu zabilježeno je značajno smanjenje veličine tumora i udjela TIL-ova nakon neoadjuvantne terapije, dok se ekspresija PD-L1 nije značajno mijenjala, što može upućivati na različitu dinamiku promjena tumorske mase i imunološkog mikrookoliša u ovom molekularnom podtipu.

Tablica 10.12.

Razlike u raspodjeli bolesnika s Luminal B/HER 2 + podtipom tumora prema patohistološkim obilježjima između core biopsije i resekcije

U skupini bolesnika s luminal B/HER2 pozitivnim podtipom tumora nema značajnih razlika u raspodjeli prema patohistološkim obilježjima između core biopsije i resekcije, osim u limfovaskularnoj invaziji, koja je značajno više prisutna pri resekciji (McNemar-Bowkerov test, $P = 0,039$) (Tablica 10.12.).

U skupini bolesnika s luminal B/HER2 pozitivnim podtipom, veličina tumora bila je značajno manja (Wilcoxon test, $P < 0,001$), a udio tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) značajno niži pri resekciji u odnosu na core biopsiju (Wilcoxon test, $P < 0,001$). Nisu uočene značajne razlike u vrijednosti PD-L1 pri resekciji u odnosu na core biopsiju kod bolesnika s luminal B/HER2 pozitivnim podtipom tumora.

Luminal B/HER2 pozitivan	Broj (%) bolesnika		P*
	CORE biopsija	Resekcija	
Veličina tumora - T klasifikacija			
T1	0	0	0,277†
T1a	0	5 (14,7)	
T1b	0	5 (14,7)	
T1c	8 (23,5)	16 (47,1)	
T2	26 (76,5)	6 (17,6)	
T3	0	2 (5,9)	
Status limfnih čvorova - N klasifikacija			
N0 – negativni	10 (32,3)	12 (38,7)	0,727
N1 – pozitivni	21 (67,7)	19 (61,3)	
Fokalnost tumora			
Unifokalni tumor (jedno tumorsko žarište)	32 (94,1)	30 (88,2)	0,500
Multifokalni tumor (dva ili više tumorskih žarišta)	2 (5,9)	4 (11,8)	
Multicentrični tumor (žarišta u različitim kvadrantima)	0	0	
Histološki gradus			
gradus I – dobro diferenciran	7 (20,6)	5 (14,7)	0,637
gradus II – umjereno diferenciran	20 (58,8)	19 (55,9)	
gradus III – slabo diferenciran tumor	7 (20,6)	10 (29,4)	
Limfovaskularna invazija	3 (8,8)	10 (29,4)	0,039
VEGF			
Najslabiji intenzitet	12 (36,4)	6 (18,2)	0,572
Umjeren intenzitet	16 (48,5)	12 (36,4)	
Najjači intenzitet	5 (15,2)	14 (42,4)	

*McNemar-Bowkerov test; †Test marginalne homogenosti

Tablica 10.12.

U skupini bolesnica s luminalnim B/HER2-pozitivnim podtipom tumora analizirane su razlike u patohistološkim obilježjima između inicijalne core biopsije i kirurške resekcije (Tablica 10.12.).

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u T klasifikaciji ($P = 0,277$), iako je vidljiv izražen pomak prema nižim T kategorijama nakon neoadjuvantne terapije. U resekcijskim uzorcima povećan je udio T1 tumora (osobito T1c), dok je udio T2 tumora smanjen u odnosu na core biopsiju, što upućuje na terapijski učinak, ali bez statističke potvrde.

Status limfnih čvorova (N klasifikacija) nije se značajno razlikovao između dviju metoda ($P = 0,727$). Blaga redistribucija između N0 i N1 kategorija nije dosegla razinu statističke značajnosti.

U pogledu fokalnosti tumora također nisu zabilježene značajne razlike ($P = 0,500$), premda je u resekcijskom materijalu uočen nešto veći udio multifokalnih tumora. Histološki gradus ostao je stabilan između biopsije i resekcije ($P = 0,637$), bez značajnih promjena u raspodjeli stupnja diferencijacije.

Statistički značajna razlika utvrđena je u prisutnosti limfovaskularne invazije ($P = 0,039$). U resekcijskim uzorcima limfovaskularna invazija bila je znatno češće prisutna (29,4 %) nego u uzorcima core biopsije (8,8 %), što potvrđuje veću osjetljivost operativnog preparata u detekciji invazivnih obilježja tumora.

Izražaj VEGF-a nije pokazao statistički značajnu razliku između biopsije i resekcije ($P = 0,572$), iako je zabilježen porast udjela tumora s najjačim intenzitetom ekspresije u resekcijskom uzorku.

U skladu s analizom kontinuiranih varijabli (Tablica 10.13.), veličina tumora bila je statistički značajno manja u resekciji u odnosu na core biopsiju (Wilcoxon test, $P < 0,001$), što potvrđuje učinkovitost neoadjuvantne terapije u smanjenju tumorske mase. Također je zabilježeno značajno smanjenje udjela tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) nakon terapije ($P < 0,001$), što upućuje na promjene u imunološkom mikrookolišu tumora.

S druge strane, vrijednosti PD-L1 nisu pokazale statistički značajnu razliku između core biopsije i resekcije u ovoj skupini bolesnica, što sugerira relativnu stabilnost ekspresije ovog biomarkera tijekom terapije.

Zaključno, u luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu značajne promjene između biopsije i resekcije utvrđene su u limfovaskularnoj invaziji te u smanjenju veličine tumora i udjela TIL-ova, dok ostala analizirana patohistološka obilježja nisu pokazala statistički značajne razlike.

Tablica 10.13.

Razlike u veličini tumora, PD-L1 i TIL između core biopsije i resekcije u skupini bolesnika s luminal B/HER2 pozitivnim podtipom tumora

Luminal B/HER2 pozitivan	Medijan (interkvartilni raspon)		†Procjena razlike medijana	95 % raspon pouzdanosti	P*
	CORE biopsija	Resekcija			
Veličina tumora (cm)	2,5 (2,1 – 3,0)	1,5 (0,9 – 1,8)	-1	-1,3 do -0,7	<0,001
PD-L1	0 (0 – 10)	2,5 (0 – 20)	0	0 do 5	0,163
TIL	15 (10 – 40)	10 (0 – 10)	-10	-20 do -5	<0,001

*Wilcoxon test; †Hodges-Lehmannova procjena razlike medijana

Tablica 10.13.

U Tablici 10.13. prikazane su promjene u veličini tumora, ekspresiji PD-L1 i udjelu tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) između inicijalne core biopsije i kirurške resekcije u skupini bolesnika s luminalnim B/HER2-pozitivnim podtipom tumora. Analiza je provedena Wilcoxonovim testom za zavisne uzorke, uz Hodges–Lehmannovu procjenu razlike medijana.

Veličina tumora bila je statistički značajno manja u resekcijskom uzorku u odnosu na core biopsiju ($P < 0,001$). Medijan veličine tumora smanjio se s 2,5 cm (2,1 – 3,0) na 1,5 cm (0,9 – 1,8), uz procjenu razlike medijana od -1 cm (95 % CI: -1,3 do -0,7). Ovaj nalaz upućuje na izražen terapijski učinak neoadjuvantnog liječenja u ovoj skupini bolesnika.

Ekspresija PD-L1 nije pokazala statistički značajnu razliku između core biopsije i resekcije ($P = 0,163$). Iako je medijan porastao s 0 (0 – 10) na 2,5 (0 – 20), procjena razlike medijana iznosila je 0 (95 % CI: 0 do 5), što upućuje na varijabilnost vrijednosti bez jasne statistički potvrđene promjene.

Udio TIL-ova bio je značajno niži u resekcijskom uzorku u usporedbi s biopsijom ($P < 0,001$). Medijan se smanjio s 15 (10 – 40) na 10 (0 – 10), uz procjenu razlike medijana od -10 (95 % CI: -20 do -5), što potvrđuje značajno smanjenje imunološke infiltracije tumora nakon terapije.

Zaključno, u luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu zabilježeno je značajno smanjenje veličine tumora i udjela TIL-ova nakon neoadjuvantne terapije, dok promjene u ekspresiji PD-L1 nisu bile statistički značajne, što ukazuje na različitu dinamiku terapijskog učinka na tumorsku masu i imunološki mikrookoliš.

Tablica 10.14.

Razlike u raspodjeli bolesnika s trostruko negativnim podtipom tumora prema patohistološkim obilježjima između core biopsije i resekcije

U bolesnika s trostruko negativnim podtipom tumora, limfovaskularna invazija bila je značajno češće prisutna pri resekciji u odnosu na core biopsiju (McNemar-Bowkerov test, $P = 0,004$), dok se u ostalim patohistološkim obilježjima nisu uočile značajne razlike (Tablica 10.14.).

Trostruko negativan	Broj (%) bolesnika		P*
	CORE biopsija	Resekcija	
Veličina tumora – T klasifikacija			
T1	1 (2,9)	4 (11,8)	> 0,99 [†]
T1a	0	2 (5,9)	
T1b	1 (2,9)	1 (2,9)	
T1c	4 (11,8)	9 (26,5)	
T2	24 (70,6)	14 (41,2)	
T3	4 (11,8)	4 (11,8)	
Status limfnih čvorova – N klasifikacija			
N0 – negativni	15 (62,5)	15 (62,5)	> 0,99
N1 – pozitivni	9 (37,5)	9 (37,5)	
Fokalnost tumora			
Unifokalni tumor (jedno tumorsko žarište)	33 (97,1)	31 (91,2)	0,083 [†]
Multifokalni tumor (dva ili više tumorskih žarišta)	1 (2,9)	2 (5,9)	
Multicentrični tumor (žarišta u različitim kvadrantima)	0	1 (2,9)	
Histološki gradus			
Gradus I – dobro diferenciran	0	4 (11,8)	0,109 [†]
Gradus II – umjereno diferenciran	16 (47,1)	14 (41,2)	
Gradus III – slabo diferenciran tumor	18 (52,9)	16 (47,1)	
Limfovaskularna invazija	3 (8,8)	12 (35,3)	0,004
VEGF kod resekcije			
Najslabiji intenzitet	2 (5,8)	4 (11,7)	0,572
Umjeren intenzitet	16 (47,1)	14 (41,2)	
Najjači intenzitet	16 (47,1)	16 (47,1)	

* McNemar-Bowkerov test; [†]Test marginalne homogenosti. Podebljana P vrijednost je statistički značajna.

Tablica 10.14.

U skupini bolesnica s trostruko negativnim podtipom tumora analizirane su razlike u patohistološkim obilježjima između inicijalne core biopsije i kirurške resekcije (Tablica 10.14.).

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u T klasifikaciji između biopsije i resekcije ($P > 0,99$). Iako je vidljiv pomak prema nižim T kategorijama nakon neoadjuvantne terapije, uz povećanje udjela T1 tumora te smanjenje T2 tumora, te promjene nisu dosegnule razinu statističke značajnosti.

Status limfnih čvorova (N klasifikacija) ostao je identičan u obje analize ($P > 0,99$), pri čemu je 62,5 % bolesnica imalo negativne, a 37,5 % pozitivne limfne čvorove.

U pogledu fokalnosti tumora nije zabilježena statistički značajna razlika ($P = 0,083$), iako je u resekcijskom uzorku zabilježen blagi porast multifokalnih i multicentričnih tumora. Histološki gradus također nije pokazao značajne promjene ($P = 0,109$), premda je u resekciji zabilježen manji udio gradusa III i pojava gradusa I, što može upućivati na terapijski učinak bez statističke potvrde.

Statistički značajna razlika utvrđena je u prisutnosti limfovaskularne invazije ($P = 0,004$). U resekcijskim uzorcima limfovaskularna invazija bila je prisutna u 35,3 % bolesnica, dok je u core biopsiji zabilježena u svega 8,8 %. Ovaj nalaz potvrđuje veću dijagnostičku osjetljivost operativnog preparata u detekciji invazivnih obilježja tumora te može imati prognostičko značenje u ovoj biološki agresivnoj skupini.

Ekspresija VEGF-a nije pokazala statistički značajne razlike između biopsije i resekcije ($P = 0,572$), uz stabilnu raspodjelu intenziteta ekspresije, osobito u kategoriji najjačeg intenziteta.

Zaključno, u trostruko negativnom podtipu jedina statistički značajna promjena između core biopsije i resekcije odnosi se na limfovaskularnu invaziju, koja je znatno češće detektirana u resekcijskim uzorcima, dok ostala patohistološka obilježja nisu pokazala značajne razlike.

Tablica 10.15.**Razlike u veličini tumora, PD-L1 i TIL između core biopsije i resekcije u skupini bolesnika s trostruko negativnim podtipom tumora**

Veličina tumora bila je značajno manja (Wilcoxon test, $P = 0,02$), vrijednosti PD-L1 značajno niže (Wilcoxon test, $P = 0,003$), a udio tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) također je bio značajno niži pri resekciji u odnosu na core biopsiju (Wilcoxon test, $P < 0,001$), kod bolesnika s trostruko negativnim podtipom tumora (Tablica 10.15.).

Trostruko negativan	Medijan (interkvartilni raspon)		†Procjena razlike medijana	95 % raspon pouzdanosti	P*
	CORE biopsija	Resekcija			
Veličina tumora (cm)	2,3 (2,0 - 3,2)	2,0 (1,2 - 2,5)	-0,5	-0,9 do -0,1	0,02
PD-L1	10 (10 - 20)	5 (0 - 10)	-8	-15 do -3	0,003
TIL	20 (10 - 60)	8 (0 - 10)	-15	-25 do -5	<0,001

*Wilcoxon test; †Hodges-Lehmannova procjena razlike medijana

Tablica 10.15.

U Tablici 10.15. prikazane su promjene u veličini tumora, ekspresiji PD-L1 i udjelu tumor infiltrirajućih limfocita (TIL) između inicijalne core biopsije i kirurške resekcije u skupini bolesnika s trostruko negativnim podtipom tumora. Analiza je provedena Wilcoxonovim testom za zavisne uzorke, uz Hodges–Lehmannovu procjenu razlike medijana.

Veličina tumora bila je statistički značajno manja u resekcijskom uzorku u odnosu na core biopsiju ($P = 0,02$). Medijan se smanjio s 2,3 cm (2,0 – 3,2) na 2,0 cm (1,2 – 2,5), uz procjenu razlike medijana od -0,5 cm (95 % CI: -0,9 do -0,1). Iako je smanjenje umjerenog intenziteta, ono potvrđuje terapijski učinak neoadjuvantnog liječenja i u ovoj biološki agresivnoj skupini.

Ekspresija PD-L1 bila je značajno niža pri resekciji u usporedbi s core biopsijom ($P = 0,003$). Medijan se smanjio s 10 (10 – 20) na 5 (0 – 10), uz procjenu razlike medijana od -8 (95 % CI: -15 do -3), što ukazuje na izraženu redukciju imunološke signalizacije povezane s PD-L1 nakon terapije.

Udio TIL-ova također je bio značajno niži u resekcijskom uzorku ($P < 0,001$). Medijan se smanjio s 20 (10 – 60) na 8 (0 – 10), uz procjenu razlike medijana od -15 (95 % CI: -25 do -5). Ovaj nalaz upućuje na značajne promjene u tumorskom imunološkom mikrookolišu nakon neoadjuvantne terapije.

Zaključno, u trostruko negativnom podtipu zabilježeno je značajno smanjenje veličine tumora, ekspresije PD-L1 i udjela TIL-ova nakon terapije, što ukazuje na izražen terapijski učinak ne samo na tumorsku masu, nego i na imunološku komponentu tumorskog mikrookoliša u ovoj skupini bolesnica.

Povezanost kliničko-patoloških i bioloških obilježja s odgovorom na neoadjuvantnu terapiju

Tablica 10.16.

Spearmanova korelacija kliničko patoloških i bioloških varijabli prije neoadjuvantne terapije s odgovorom na terapiju (RCB) i rezidualnom celularnošću

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenila se povezanost kliničko patoloških i bioloških obilježja s odgovorom na neoadjuvantnu terapiju.

U ukupnoj skupini bolesnika veličina tumora ($Rho = 0,326$) i T status ($Rho = 0,223$) pokazali su pozitivnu i značajnu povezanost s rezidualnom celularnošću.

Testiranje povezanosti po molekularnim podtipovima pokazalo je da su u luminalnom B podtipu veličina tumora ($Rho = 0,378$) i T status ($Rho = 0,420$) pozitivno povezani s rezidualnom celularnošću, dok je VEGF pokazao značajnu i negativnu vezu s rezidualnom celularnošću ($Rho = -0,444$).

Kod trostruko negativnog podtipa veličina tumora u značajnoj je i pozitivnoj vezi s rezidualnom celularnošću ($Rho = 0,567$).

U luminal B/HER2-pozitivnom podtipu nije utvrđena značajna korelacija između analiziranih varijabli i RCB-a niti rezidualne celularnosti.

Nije utvrđena značajna korelacija analiziranih varijabli s odgovorom na terapiju prema RCB klasifikaciji ni u ukupnoj skupini bolesnika niti unutar pojedinih podtipova (Tablica 10.16.)

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)	
	Odgovor na terapije RCB	Rezidualna celularnost
Svi bolesnici		
Veličina tumora	0,192 (0,06)	0,326 (<0,001)
T status	0,009 (0,93)	0,223 (0,02)
Ki-67	0,026 (0,79)	0,064 (0,52)
PD-L1	-0,022 (0,82)	-0,078 (0,44)
TIL	0,139 (0,16)	0,111 (0,27)
VEGF	-0,074 (0,46)	-0,009 (0,93)
Luminalni B		
Veličina tumora	0,153 (0,39)	0,378 (0,03)
T status	0,026 (0,88)	0,420 (0,01)
Ki-67	-0,182 (0,30)	-0,188 (0,29)
PD-L1	-0,140 (0,43)	-0,100 (0,57)
TIL	0,164 (0,36)	0,254 (0,15)
VEGF	-0,138 (0,44)	-0,444 (0,01)
Luminalni B/HER2 pozitivni		
Veličina tumora	0,101 (0,57)	0,056 (0,76)
T status	-0,049 (0,78)	-0,021 (0,90)
Ki-67	0,136 (0,44)	0,076 (0,67)
PD-L1	0,086 (0,63)	-0,165 (0,35)
TIL	0,318 (0,07)	0,001 (>0,99)
VEGF	-0,029 (0,87)	0,220 (0,22)
Trostruko negativni		
Veličina tumora	0,295 (0,095)	0,567 (0,001)
T status	0,099 (0,578)	0,247 (0,159)
Ki-67	0,218 (0,215)	0,132 (0,458)
PD-L1	0,123 (0,488)	0,052 (0,771)
TIL	0,019 (0,915)	0,075 (0,674)
VEGF	-0,050 (0,777)	0,083 (0,643)

Tablica 10.16.

Spearmanovim koeficijentom korelacije analizirana je povezanost kliničko-patoloških i bioloških varijabli prije započinjanja neoadjuvantne terapije s terapijskim odgovorom, procijenjenim prema RCB klasifikaciji te s rezidualnom celularnošću tumora (Tablica 10.16.).

U ukupnoj skupini bolesnica nije utvrđena statistički značajna povezanost analiziranih varijabli s odgovorom na terapiju prema RCB klasifikaciji. Međutim, veličina tumora pokazala je pozitivnu, granično neznačajnu povezanost s RCB-om ($Rho = 0,192$; $P = 0,06$). S druge strane, veličina tumora ($Rho = 0,326$; $P < 0,001$) i T status ($Rho = 0,223$; $P = 0,02$) pokazali su statistički značajnu, pozitivnu povezanost s rezidualnom celularnošću, što upućuje da su veći tumori i viši T stadij povezani s većim udjelom rezidualnih tumorskih stanica nakon terapije.

U podskupini bolesnica s luminalnim B podtipom nije utvrđena značajna povezanost varijabli s RCB-om. Međutim, veličina tumora ($Rho = 0,378$; $P = 0,03$) i T status ($Rho = 0,420$; $P = 0,01$) bili su značajno i pozitivno povezani s rezidualnom celularnošću. Također, VEGF je pokazao značajnu i negativnu povezanost s rezidualnom celularnošću ($Rho = -0,444$; $P = 0,01$), što može upućivati na složen odnos angiogene aktivnosti i terapijskog odgovora u ovom podtipu.

U luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu nije utvrđena statistički značajna korelacija između analiziranih varijabli i RCB-a niti rezidualne celularnosti, iako je TIL pokazao trend pozitivne povezanosti s RCB-om ($Rho = 0,318$; $P = 0,07$), bez dosezanja statističke značajnosti.

U trostruko negativnom podtipu veličina tumora pokazala je značajnu i umjereno jaku pozitivnu povezanost s rezidualnom celularnošću ($Rho = 0,567$; $P = 0,001$), što sugerira da veći inicijalni tumori u ovoj skupini ostavljaju veći rezidualni tumorski udio nakon terapije. Niti jedna druga analizirana varijabla nije pokazala statistički značajnu povezanost s RCB-om ili rezidualnom celularnošću.

Zaključno, iako analizirane varijable nisu pokazale značajnu povezanost s odgovorom na terapiju prema RCB klasifikaciji, veličina tumora i T status pokazali su konzistentnu pozitivnu povezanost s rezidualnom celularnošću, osobito u luminalnom B i trostruko negativnom podtipu. Ovi nalazi potvrđuju važnost početne tumorske mase kao prediktora opsega rezidualne bolesti nakon neoadjuvantne terapije.

Na razini cijele skupine bolesnika veličina tumora pri core biopsiji razlikovala se značajno između RCB skupina (Kruskal-Wallisov test, $P = 0,022$), pri čemu je najviši medijan zabilježen u skupini sa slabim odgovorom (RCB-III). Proliferacijski indeks Ki-67 značajno je niži u skupini s umjerenim odgovorom (RCB-II) u odnosu na jak i slab odgovor (Kruskal-Wallisov test, $P = 0,022$).

Tablica 10.17.

Predterapijska (core biopsija) obilježja tumora prema odgovoru na neoadjuvantnu terapiju (RCB)

Unutar pojedinih molekularnih podtipova nisu utvrđene statistički značajne razlike varijabli pri core biopsiji prema RCB klasifikaciji. Vrijednosti PD-L1 i udio tumor infiltrirajućih limfocita nisu se razlikovali također između RCB skupina (Tablica 10.17.).

	Medijan (interkvartilni raspon) prema odgovoru na neoadjuvantnu terapiju (RCB)			P*
	Jak odgovor (RCB-I)	Umjeren odgovor (RCB-II)	Slab odgovor (RCB-III)	
	(1)	(2)	(3)	
Svi bolesnici	n = 11	n = 67	n = 24	
Veličina tumora	2,1 (1,4 – 2,5)	2,5 (2 – 3)	3 (2,1 – 3,7)	0,022[†]
Ki-67	65 (38 – 90)	45 (30 – 65)	67,5 (39 – 85)	0,022[‡]
PD-L1	10 (5 – 10)	5 (0 – 10)	10 (0 – 17,5)	0,384
TIL	20 (10 – 40)	10 (10 – 40)	30 (10 – 60)	0,134
Luminalni B	n = 1	n = 26	n = 7	
Veličina tumora	1,2 (n = 1)	2,5 (1,7 – 2,8)	3,5 (2,7 – 4,1)	0,087
Ki-67	28 (n = 1)	37 (28 – 45)	37 (23 – 65)	0,744
PD-L1	40 (n = 1)	0 (0 – 10)	5 (0 – 10)	0,257
TIL	90 (n = 1)	10 (5,8 – 40)	30 (10 – 40)	0,175
Luminalni B/HER2 pozitivni	n = 5	n = 21	n = 8	
Veličina tumora	2,5 (2,2 – 2,55)	2,5 (1,9 – 3)	2,6 (1,9 – 3,1)	0,947
Ki-67	65 (46,5 – 84)	35 (26 – 57,5)	53 (44 – 84)	0,080
PD-L1	5 (0 – 12,5)	0 (0 – 10)	7,5 (0 – 17,5)	0,457
TIL	20 (10 – 45)	10 (7,5 – 35)	40 (10 – 82,5)	0,122
Trostruko negativni	n = 5	n = 20	n = 9	
Veličina tumora	1,8 (1,4 – 2,1)	2,5 (2,1 – 3,0)	3,2 (1,9 – 4,1)	0,058
Ki-67	80 (58 – 90)	65 (51 – 78)	85 (78 – 90)	0,133
PD-L1	10 (10 – 10)	10 (5 – 40)	10 (10 – 25)	0,725
TIL	10 (0 – 25)	20 (10 – 50)	20 (9 – 63)	0,432

*Kruskal-Wallisov test (post hoc test Conover); podebljana P vrijednost je statistički značajna.

[†]na razini P < 0,05 značajne su razlike: (1) vs. (3)

[‡]na razini P < 0,05 značajne su razlike: (2) vs. (1, 3)

Tablica 10.17.

U Tablici 10.17. prikazana su preterapijska obilježja tumora (core biopsija) u odnosu na odgovor na neoadjuvantnu terapiju, procijenjen prema RCB klasifikaciji.

Na razini cijele skupine bolesnica veličina tumora pri core biopsiji razlikovala se statistički značajno između RCB skupina ($P = 0,022$). Najniži medijan zabilježen je u skupini s jakim odgovorom (RCB-I) – 2,1 cm (1,4 – 2,5), dok je najviši medijan zabilježen u skupini sa slabim odgovorom (RCB-III) – 3 cm (2,1 – 3,7). Post hoc analizom potvrđena je značajna razlika između skupina RCB-I i RCB-III, što upućuje na to da su veći tumori povezani sa slabijim terapijskim odgovorom.

Proliferacijski indeks Ki-67 također se značajno razlikovao između skupina ($P = 0,022$). Najniži medijan zabilježen je u skupini s umjerenim odgovorom (RCB-II) – 45 % (30 – 65), dok su u skupinama s jakim i slabim odgovorom vrijednosti bile više (65 % i 67,5 %). Post hoc analizom utvrđena je značajna razlika između skupine RCB-II i skupina RCB-I i RCB-III, što sugerira nelinearan odnos proliferacijske aktivnosti i terapijskog odgovora.

Vrijednosti PD-L1 ($P = 0,384$) i udio TIL-ova ($P = 0,134$) nisu se značajno razlikovali između RCB skupina u ukupnoj populaciji bolesnica.

Unutar pojedinih molekularnih podtipova nisu utvrđene statistički značajne razlike analiziranih varijabli prema RCB klasifikaciji. U luminalnom B podtipu uočen je trend većih tumora u skupini sa slabim odgovorom ($P = 0,087$), ali bez statističke značajnosti. U luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu niti jedna varijabla nije pokazala značajnu povezanost s RCB-om, iako je Ki-67 pokazao graničnu vrijednost značajnosti ($P = 0,080$). U trostruko negativnom podtipu veličina tumora pokazala je trend prema razlikama između skupina ($P = 0,058$), uz najviši medijan u skupini sa slabim odgovorom, no bez statističke potvrde.

Zaključno, u ukupnoj skupini bolesnica veća početna veličina tumora povezana je sa slabijim terapijskim odgovorom, dok je Ki-67 pokazao specifičan obrazac raspodjele s najnižim vrijednostima u skupini s umjerenim odgovorom. Unutar pojedinih molekularnih podtipova nisu potvrđene statistički značajne razlike preterapijskih varijabli prema RCB klasifikaciji, što može biti posljedica manjeg broja bolesnica unutar podskupina.

S obzirom na raspodjelu T klasifikacije i intenziteta VEGF ekspresije prema stupnju odgovora na neoadjuvantnu terapiju (RCB), u ukupnoj skupini i prema molekularnim podtipovima, uočava se da na razini cijele skupine nije utvrđena razlika u raspodjeli T klasifikacije niti VEGF

ekspresije između RCB skupina. U svim skupinama odgovora najčešće je zabilježen T2 stadij, dok je umjeren intenzitet VEGF ekspresije bio najzastupljeniji.

Tablica 10.18.
Raspodjela T klasifikacije i VEGF ekspresije prema stupnju odgovora na neoadjuvantnu terapiju (RCB)

Unutar pojedinih molekularnih podtipova također nisu utvrđene razlike u raspodjeli T klasifikacije niti VEGF ekspresije prema stupnju odgovora na terapiju (Tablica 10.18.).

	Broj (%) bolesnika prema jačini odgovora na neoadjuvantnu terapiju (RCB)				P*
	Jak odgovor (RCB-I)	Umjeren odgovor (RCB-II)	Slab odgovor (RCB-III)	Ukupno	
SVI BOLESNICI					
Veličina tumora - T klasifikacija					
T1	0	1 (1,5)	0	1 (1)	0,926
T1b	0	1 (1,5)	1 (4,2)	2 (2)	
T1c	2 (18,2)	15 (22,4)	4 (16,7)	21 (20,6)	
T2	9 (81,8)	47 (70,1)	17 (70,8)	73 (71,6)	
T3	0	3 (4,5)	2 (8,3)	5 (4,9)	
VEGF					
Najslabiji intenzitet	2 (18)	15 (25)	6 (29)	23 (25)	0,895
Umjeren intenzitet	6 (55)	30 (49)	8 (38)	44 (47)	
Najjači intenzitet	3 (27)	16 (26)	7 (33)	26 (28)	
LUMINALNI B					
Veličina tumora - T klasifikacija					
T1b	0	1 (3,8)	0	1 (2,9)	0,588
T1c	1 (100)	7 (26,9)	1 (14,3)	9 (26,5)	
T2	0	17 (65,4)	6 (85,7)	22 (67,6)	
T3	0	1 (3,8)	0	1 (2,9)	
VEGF					
Najslabiji intenzitet	0	8 (30,8)	2 (28,6)	10 (29,4)	> 0,99
Umjeren intenzitet	1 (100)	11 (42,3)	4 (57,1)	16 (47,1)	
Najjači intenzitet	0	7 (26,9)	1 (14,3)	8 (23,5)	

	Broj (%) bolesnika prema jačini odgovora na neoadjuvantnu terapiju (RCB)				P*
	Jak odgovor (RCB-I)	Umjeren odgovor (RCB-II)	Slab odgovor (RCB-III)	Ukupno	
LUMINALNI B/HER 2 POZITIVNI					
Veličina tumora - T klasifikacija					
T1c	0	6 (28,6)	2 (25,0)	8 (23,5)	0,449
T2	5 (100)	15 (71,4)	6 (75,0)	26 (76,5)	
VEGF					
Najslabiji intenzitet	2 (40)	7 (33,3)	3 (42,9)	12 (36,4)	0,745
Umjeren intenzitet	3 (60)	11 (52,4)	2 (28,6)	16 (48,5)	
Najjači intenzitet	0	3 (14,3)	1 (28,6)	5 (15,2)	
TROSTRUKO NEGATIVNI					
Veličina tumora - T klasifikacija					
T1	0	1 (5)	0	1 (2,9)	0,719
T1b	0	0	1 (11,1)	1 (2,9)	
T1c	1 (20)	2 (10)	1 (11,1)	4 (11,8)	
T2	4 (80)	15 (75)	5 (55,6)	24 (70,6)	
T3	0	2 (10)	2 (22,2)	4 (11,8)	
VEGF					
Najslabiji intenzitet	0	1 (5)	1 (11,1)	2 (5,9)	0,745
Umjeren intenzitet	2 (40)	11 (55)	3 (33,3)	16 (47,1)	
Najjači intenzitet	3 (60)	8 (40)	5 (55,6)	16 (47,1)	

*Fisherov egzaktni test.

Tablica 10.18.

U Tablici 10.18. prikazana je raspodjela T klasifikacije i intenziteta VEGF ekspresije prema stupnju odgovora na neoadjuvantnu terapiju (RCB) u ukupnoj skupini bolesnika te unutar pojedinih molekularnih podtipova.

Na razini cijele skupine nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli T klasifikacije između RCB skupina ($P = 0,926$). U svim skupinama odgovora najčešće je zabilježen T2 stadij, koji je činio približno 70 % tumora, neovisno o jačini terapijskog odgovora. Slično tome,

intenzitet VEGF ekspresije nije se značajno razlikovao između skupina ($P = 0,895$). U svim RCB kategorijama najzastupljeniji je bio umjeren intenzitet VEGF ekspresije.

Unutar podskupine bolesnica s luminalnim B podtipom također nisu utvrđene značajne razlike u raspodjeli T klasifikacije ($P = 0,588$) niti intenziteta VEGF ekspresije ($P > 0,99$) prema stupnju odgovora na terapiju. U svim RCB skupinama prevladavao je T2 stadij, dok je umjeren intenzitet VEGF ekspresije bio najčešći.

U luminalnom B/HER2-pozitivnom podtipu raspodjela T klasifikacije nije se značajno razlikovala između RCB skupina ($P = 0,449$). Većina tumora u svim skupinama bila je T2 stadija. Intenzitet VEGF ekspresije također nije pokazao značajne razlike ($P = 0,745$), uz dominantan umjeren intenzitet.

U trostruko negativnom podtipu nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli T klasifikacije ($P = 0,719$) niti intenziteta VEGF ekspresije ($P = 0,745$) između RCB skupina. I u ovoj podskupini najčešći je bio T2 stadij, dok su umjeren i najjači intenzitet VEGF ekspresije bili podjednako zastupljeni.

Zaključno, ni T klasifikacija niti intenzitet VEGF ekspresije prije započinjanja neoadjuvantne terapije nisu pokazali značajnu povezanost sa stupnjem terapijskog odgovora prema RCB klasifikaciji, kako u ukupnoj populaciji bolesnica tako ni unutar pojedinih molekularnih podtipova.

Prediktori odgovora na neoadjuvantnu terapiju (logistička regresijska analiza)

Tablica 10.19.

Predviđanje vjerojatnosti lošijeg odgovora na neoadjuvantnu terapiju (RCB II/III) (bivarijatna logistička regresija)

Za procjenu povezanosti kliničko patoloških i bioloških obilježja s odgovorom na neoadjuvantnu terapiju primijenjena je bivarijatna logistička regresija. Zavisna varijabla bila je odgovor na neoadjuvantnu terapiju, pri čemu je dobar odgovor definiran kao RCB 0/I, a loš odgovor kao RCB II/III. U bivarijatnoj logističkoj regresiji, uočava se da je samo veća početna veličina tumora bila značajno povezana s lošim odgovorom na neoadjuvantnu terapiju ($OR = 2,60$). Zbog malog broja bolesnika s dobrim odgovorom i izostanka drugih značajnih

prediktora u bivarijatnoj analizi, multivarijantna logistička regresija nije bila metodološki opravdana (Tablica 10.19.).

	β	<i>P</i> vrijednost	Omjer izgleda (OR)	95% raspon pouzdanosti
Bivarijatna logistička regresija				
Dob (50 i više godina)	0,303	0,649	1,35	0,37 – 5,01
Veličina tumora	0,955	0,038	2,60	1,05 – 6,44
T status (T2 - T3 vs. T1)	-0,300	0,715	0,74	0,15 – 3,69
N status (N1 vs. N0)	0,668	0,455	1,95	0,34 – 11,26
Gradus				
I	-	-	-	-
II	-20,1	0,99	-	-
III	-19,0	0,99	-	-
Fokalnost (multifokalno vs. unifokalno)	-0,348	0,758	0,71	0,08 – 6,47
Limfovaskularna invazija (da)	-0,543	0,636	0,58	0,06 – 5,49
Ki-67	-0,02	0,108	0,98	0,95 – 1,01
PD-L1	0,005	0,798	1,005	0,97 – 1,04
TIL	0,002	0,887	1,002	0,98 – 1,03
VEGF (najslabiji intenzitet)				
Umjeren intenzitet	-0,452	0,598	0,64	0,12 – 3,42
Najjači intenzitet	-0,238	0,803	0,79	0,12 – 5,15

β – regresijski koeficijent; OR - omjer izgleda (engl. *Odds Ratio*). Podebljana *P* vrijednost je statistički značajna.

Tablica 10.19.

Za procjenu povezanosti kliničko-patoloških i bioloških obilježja s odgovorom na neoadjuvantnu terapiju provedena je bivarijatna logistička regresijska analiza (Tablica 10.19.). Zavisna varijabla bila je terapijski odgovor, pri čemu je dobar odgovor definiran kao RCB I, a loš odgovor kao RCB II/III.

Rezultati bivarijatne analize pokazali su da je jedini statistički značajan prediktor lošeg odgovora na terapiju bila početna veličina tumora ($\beta = 0,955$; $P = 0,038$). Omjer izgleda (OR) iznosio je 2,60 (95 % CI: 1,05 – 6,44), što znači da s porastom veličine tumora raste vjerojatnost lošijeg terapijskog odgovora. Drugim riječima, veći tumori pri dijagnozi bili su povezani s većom vjerojatnošću rezidualne bolesti nakon neoadjuvantne terapije.

Dob bolesnica (≥ 50 godina), T status, N status, histološki gradus, fokalnost tumora, limfovaskularna invazija, proliferacijski indeks Ki-67, PD-L1, TIL te intenzitet VEGF ekspresije nisu pokazali statistički značajnu povezanost s terapijskim odgovorom ($P > 0,05$). Kod histološkog gradusa zabilježene su nestabilne procjene (vrlo veliki negativni β koeficijenti), što je vjerojatno posljedica malog broja bolesnica s dobrim odgovorom unutar pojedinih kategorija.

Zaključno, početna veličina tumora pokazala se jedinim značajnim prediktorom lošijeg odgovora na neoadjuvantnu terapiju, dok ostala analizirana kliničko-patološka i biološka obilježja nisu imala neovisnu prediktivnu vrijednost u ovoj skupini bolesnica.

Tablica 10.20.

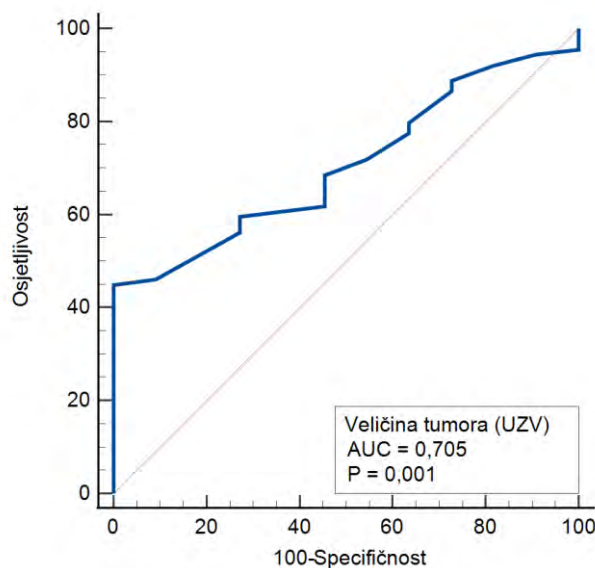
ROC analiza veličine tumora kao prediktora lošeg odgovora na neoadjuvantnu terapiju (RCB II/III)

ROC analizom (engl. *Receiver Operating Characteristic*) utvrđeno je da početna veličina tumora ima umjerenu sposobnost razlikovanja bolesnika s dobrim i lošim odgovorom na neoadjuvantnu terapiju ($AUC = 0,705$; $P = 0,001$). Optimalna granična vrijednost iznosila je $>2,6$ cm, uz osjetljivost od 45 % i specifičnost od 100 % (Tablica 10.20.).

	AUC	95% CI	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)	Točka razlučivanja	Youden indeks	P vrijednost
Veličina tumora (cm)	0,705	0,606 – 0,792	45	100	> 2,6	0,449	0,001

Podebljana P vrijednost je statistički značajna.

Tablica 10.20.



Slika 7. ROC krivulja veličine tumora (UZV) za predikciju lošeg odgovora na terapiju (RCB II/III)

ROC analizom procijenjena je sposobnost početne veličine tumora (u cm) da razlikuje bolesnice s lošim odgovorom na neoadjuvantnu terapiju (RCB II/III) od onih s dobrim odgovorom (RCB 0/I).

Vrijednost AUC iznosila je 0,705 (95 % CI: 0,606 – 0,792; P = 0,001). AUC predstavlja ukupnu diskriminacijsku sposobnost testa kroz sve moguće granične vrijednosti. Vrijednost od 0,705 ukazuje na umjerenu točnost modela. To znači da postoji 70,5 % vjerojatnosti da će bolesnica s lošim odgovorom imati veći početni tumor u usporedbi s bolesnicom s dobrim odgovorom. Budući da je 95 %-tni interval pouzdanosti u cijelosti iznad 0,5, a P vrijednost statistički značajna, može se zaključiti da veličina tumora ima realnu i pouzdanu diskriminacijsku vrijednost, veću od slučajne klasifikacije.

Optimalna točka razlučivanja određena je primjenom Youdenova indeksa, koji identificira prag pri kojem je zbroj osjetljivosti i specifičnosti maksimalan. Utvrđena granična vrijednost iznosi > 2,6 cm.

Pri toj graničnoj vrijednosti:

- Osjetljivost iznosi 45 %, što znači da 45 % bolesnica s lošim odgovorom ima tumor veći od 2,6 cm.

- Specifičnost iznosi 100 %, što znači da nijedna bolesnica s dobrim odgovorom nije imala tumor veći od 2,6 cm.

Klinički gledano, visoka specifičnost implicira da tumor veći od 2,6 cm pouzdano identificira bolesnice s povećanim rizikom lošeg odgovora.

Youdenov indeks od 0,449 potvrđuje umjerenu ukupnu dijagnostičku učinkovitost. Iako je diskriminacija statistički značajna, ona nije dovoljno snažna da bi veličina tumora sama po sebi bila dostatan prediktivni alat.

Ovi rezultati su u skladu s prethodnom logističkom regresijskom analizom, u kojoj je početna veličina tumora bila jedini značajni prediktor lošeg terapijskog odgovora (OR = 2,60).

Zaključno, početna veličina tumora pokazuje statistički značajnu, ali umjerenu sposobnost predviđanja lošeg odgovora na neoadjuvantnu terapiju. Granična vrijednost > 2,6 cm može imati kliničku vrijednost u identifikaciji bolesnica s visokim rizikom rezidualne bolesti, ali zbog ograničene osjetljivosti nužno je integrirati ovaj parametar s drugim kliničko-biološkim obilježjima u okviru složenijih prediktivnih modela.

11. RASPRAVA

Karcinom dojke predstavlja biološki izrazito heterogenu bolest u kojoj molekularna obilježja tumora određuju ne samo morfološke karakteristike, već i terapijski odgovor, obrasce progresije te ukupnu prognozu i ishod liječenja bolesnika (108). Razvoj molekularne klasifikacije omogućio je preciznije razumijevanje tumorske biologije, ali je istodobno ukazao na složenost interakcija između tumorskih stanica i njihovog mikrookoliša. Upravo je tumorski mikrookoliš, sastavljen od stromalnih elemenata, imunoloških stanica, vaskularne mreže i brojnih signalnih molekula, danas prepoznat kao ključni regulator tumorskog rasta i terapijskog odgovora (109).

Uvođenje neoadjuvantne terapije značajno je promijenilo terapijsku strategiju u liječenju lokalno uznapredovalog i biološki agresivnog karcinoma dojke. Osim što omogućuje smanjenje tumorske mase prije kirurškog zahvata i procjenu patološkog odgovora, neoadjuvantni pristup pruža jedinstvenu priliku za analizu bioloških promjena induciranih terapijom. Dinamička procjena biomarkera prije i nakon liječenja omogućuje dublji uvid u adaptivne mehanizme tumora te potencijalne mehanizme rezistencije (110).

U tom kontekstu, VEGF i PD-L1 predstavljaju dva ključna regulatorna čvorišta tumorske biologije. VEGF ima središnju ulogu u angiogenezi, potičući formiranje nove vaskularne mreže nužne za tumorski rast, invaziju i metastaziranje. Njegov izražaj često je povezan s hipoksijom i agresivnijim fenotipom tumora. S druge strane, PD-L1 predstavlja važan mehanizam imunološkog izbjegavanja, omogućujući tumorskim stanicama da moduliraju antitumorski imunološki odgovor putem interakcije s PD-1 receptorom na T-limfocitima. Iako su oba puta intenzivno istraživana, njihova međusobna povezanost u kliničkom kontekstu karcinoma dojke ostaje nedovoljno razjašnjena (111, 112).

Dobiveni rezultati potvrđuju izraženu heterogenost među molekularnim podtipovima te dodatno naglašavaju kompleksnost regulacijskih mehanizama unutar tumorskog mikrookoliša. Analiza odnosa između angiogeneze, imunološke regulacije i terapijskog odgovora ukazuje da interakcija ovih puteva nije linearna niti univerzalna, već ovisi o biološkom kontekstu tumora.

Posebno je važno istaknuti ulogu tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL) kao pokazatelja imunološke aktivnosti unutar tumorskog mikrookoliša. TIL predstavljaju morfološki odraz interakcije između tumora i domaćinova imunološkog sustava te su u suvremenim istraživanjima prepoznati kao prognostički i prediktivni čimbenik, osobito u trostruko negativnom i HER2-pozitivnom podtipu karcinoma dojke (113). U ovom radu razlike u

imunološkoj infiltraciji među podtipovima dodatno potvrđuju da imunološki odgovor nije uniforman, već ovisi o biološkoj prirodi tumora.

Viša razina TIL u TNBC može se tumačiti kao refleksija povećane imunogenosti tumora, ali istodobno i kao pokazatelj dinamične ravnoteže između protutumorskog imunološkog odgovora i mehanizama imunološkog izbjegavanja. Upravo u tom kontekstu dobiva na važnosti analiza PD-L1, budući da njegov izražaj može predstavljati adaptivni odgovor tumora na aktiviranu imunološku infiltraciju (114).

Istodobno, prisutnost angiogenih čimbenika, uključujući VEGF, dodatno modulira mikrookoliš stvarajući uvjete hipoksije i vaskularne disfunkcije, što može utjecati na migraciju i funkciju imunoloških stanica. (115). Međutim, interakcija između imunološke infiltracije, angiogene aktivnosti i molekularnog podtipa nije bila linearna što je vidljivo iz rezultata ovog istraživanja. Temeljem statističkih rezultata potvrđena je kompleksnost tumorske biologije.

Važno je naglasiti da su ispitanici u ovom radu pokazali konzistentnost s poznatim kliničkim obrascima neoadjuvantnog liječenja. Procjena izražaja PD-L1 i VEGF u inicijalnim core biopsijama omogućila je uvid u bazalni biološki status tumora prije terapijskog utjecaja. Takav pristup posebno je važan jer početni molekularni i imunološki profil tumora odražava intrinzičnu biologiju bolesti, neovisno o terapijski induciranim promjenama mikrookoliša.

Izražaj PD-L1 u početnim uzorcima pokazuje jasnu povezanost s molekularnim podtipom, što je u skladu s poznatim biološkim karakteristikama karcinoma dojke. Agresivniji podtipovi, osobito trostruko negativni, karakterizirani su većom imunogenošću, povećanom mutacijskom opterećenošću i izraženijom limfocitnom infiltracijom, što stvara uvjete za aktivaciju adaptivnih mehanizama imunološke regulacije. U tom kontekstu, izražaj PD-L1 može se interpretirati kao odgovor tumora na pojačanu imunološku aktivnost, odnosno kao mehanizam imunološkog izbjegavanja u prisutnosti aktiviranih T-limfocita.

Dodatno, PD-L1 evaluiran je metodom (*Combined Positive Score*) CPS, koja uključuje pojavnost u tumorskim stanicama i pridruženim imunološkim stanicama. Takav način evaluacije odražava kompleksnost tumorskog mikrookoliša i omogućuje cjelovitiju procjenu imunološke dinamike, ali istodobno otežava izravno uspoređivanje s biomarkerima koji su dominantno tumorske prirode (116, 117).

Povezanost između povišenog TIL i većeg izražaja PD-L1 dodatno podupire koncept adaptivne imunološke rezistencije. Aktivirani limfociti luče interferon- γ , koji može inducirati ekspresiju PD-L1 na tumorskim i stromalnim stanicama, čime se uspostavlja povratna regulacijska petlja između imunološkog odgovora i tumorske obrane (118).

Za razliku od PD-L1, VEGF primarno odražava angiogeni potencijal tumora i njegovu sposobnost prilagodbe hipoksičnim uvjetima. Njegov izražaj povezan je s proliferacijskom aktivnošću, metaboličkim zahtjevima tumora i formiranjem patološke vaskularne mreže. Povećana angiogena aktivnost osobito u rezidualnom tumoru očito je doprinijela progresiji bolesti, opstanku tumora ali i stvaranju imunološki nepovoljnog mikrookoliša kroz vaskularnu disfunkciju i hipoksiju (119).

Moguće je da je izražaj PD-L1 primarno vođen imunološkom infiltracijom tumora i citokinskom signalizacijom, dok je VEGF dominantno reguliran hipoksičnim i proliferacijskim podražajima za opstanak tumora i njegovu prilagodbu unatoč provedenoj kemoterapiji. Takva razlika u regulatornim mehanizmima može objasniti odsutnost statističke korelacije, ali istodobno naglašava biološku kompleksnost tumorskog mikrookoliša (120).

Neoadjuvantna terapija ne djeluje isključivo citotoksično na tumorske stanice, već predstavlja snažan biološki pritisak koji remodelira cjelokupni tumorski mikrookoliš. Kemoterapijski agensi, osim izravne citoredukcije, mogu inducirati imunogenu staničnu smrt, promijeniti citokinski profil tumora te modulirati angiogeni i imunološki signalni krajolik (121,122). Slijedom navedenog, analiza izražaja PD-L1, VEGF i razine TIL nakon terapije pruža uvid u adaptivne mehanizme tumora i domaćinova odgovora te daje jasniju sliku zašto tumor u potpunosti nije odgovorio na kemoterapiju (123).

S druge strane, smanjenje tumorske mase i redukcija imunogeno aktivnog tkiva mogu rezultirati padom ukupnog izražaja PD-L1 u rezidualnom tumoru. Pad izražaja PD-L1 nakon terapije, zabilježen u rezultatima ovog rada, upućuje na to da VEGF i PD-L1 ne odražavaju jednostavnu linearnu dinamiku, već predstavljaju ravnotežu između smanjenja tumorskog volumena i aktivacije imunološkog odgovora (124).

Tumor-infiltrirajući limfociti predstavljaju jedan od najvažnijih pokazatelja imunološke reaktivnosti tumora. Neoadjuvantna terapija očigledno je povećala imunološku infiltraciju kroz oslobađanje neoantigena i pojačanu prezentaciju antigena dendritičnim stanicama. U

agresivnijim podtipovima, osobito trostruko negativnom, takva dinamika može biti izraženija, što je u skladu s većom inherentnom imunogenošću tih tumora (125,126).

Angiogeni sustav također je podložan terapijski induciranim promjenama. Smanjenje tumorske mase može reducirati potrebu za intenzivnom angiogenezom, ali istodobno terapijski inducirana hipoksija može potaknuti kompenzatornu aktivaciju angiogenih signalnih puteva, u smislu pojačane ekspresije nakon NAT. Takva adaptivna angiogena reakcija može pridonijeti rezidualnoj bolesti i predstavljati mehanizam terapijske rezistencije (127, 128).

Ovo istraživanje naglašava da angiogena i imunološka adaptacija nisu bile sinkronizirane. Iz rezultata rada može se zaključiti kako je imunološka infiltracija bila potaknuta imunogenom staničnom smrću, angiogeni odgovor bio je primarno reguliran hipoksijom i metaboličkim stresom. Ova djelomična neovisnost regulatornih osovina može objasniti odsutnost dosljedne korelacije između VEGF i PD-L1 nakon terapije (129).

Rezidualni tumor nakon neoadjuvantne terapije predstavlja selektiranu populaciju stanica koje su preživjele terapijski pritisak. Takav tumor često pokazuje promijenjen fenotip, uključujući modifikacije imunološke interakcije i vaskularne arhitekture (130). Dinamika PD-L1, VEGF i TIL u tom kontekstu može odražavati proces biološke selekcije i adaptacije, a ne samo izravni terapijski učinak (131).

Ovo istraživanje potvrđuje da razumijevanje tumorske biologije zahtijeva integraciju morfoloških, imunoloških i molekularnih parametara te dinamičku analizu njihovih promjena tijekom liječenja. Rezultati doprinose boljem razumijevanju adaptivnih mehanizama karcinoma dojke i predstavljaju temelj za buduća istraživanja usmjerena na optimizaciju terapijskih strategija i preciznije definiranje prognostičkih i prediktivnih biomarkera.

Prema rezultatima ovog istraživanja jasno je sljedeće:

- TIL i PD-L1 pokazuju biološku povezanost, osobito u imunogenijim podtipovima.
- VEGF ne slijedi isti obrazac, već odražava primarno hipoksijski i proliferacijski status tumora koji se održao nakon kemoterapije i endokrinološke terapije kod Luminalnih tumora, kao i HER 2 +.
- Izostanak korelacije između VEGF i PD-L1 potvrđuje da imunološka i angiogena osovina ne djeluju kao jedinstveni regulatorni sustav.

Kada se promatraju zajedno, podaci iz tablica sugeriraju da se tumorski mikrookoliš može opisati kroz dva paralelna regulatorna sustava:

1. Imunološki sustav (TIL–PD-L1)
 - povezan s imunogenosti podtipa, (tablica 10.2.) TNBC- $P \leq 0,001$
 - odražava adaptivnu imunološku regulaciju
2. Angiogeni sustav (VEGF)
 - povezan s hipoksijom, proliferacijom i prilagodbom opstanka unatoč terapiji
 - djelomično neovisan o imunološkoj infiltraciji

11.1. Usporedba PD-L1 i VEGF u tumorskom tkivu karcinoma dojke prije i nakon NAT

Glavni cilj ovog istraživanja bio je procijeniti i usporediti izražaj PD-L1 i VEGF u tumorskom tkivu karcinoma dojke prije započinjanja neoadjuvantne terapije i nakon njezina završetka u rezidualnom tumoru, te utvrditi mijenja li se njihov obrazac izražaja pod utjecajem terapijskog pritiska. Rezultati su pokazali da se oba biomarkera ponašaju dinamično, ali ne identično, što potvrđuje da imunološka regulacija i angiogeneza predstavljaju dvije biološki povezane, ali funkcionalno neovisne osi tumorske biologije.

Na razini cijele skupine bolesnica, nakon neoadjuvantne terapije zabilježeno je statistički značajno smanjenje veličine tumora, što potvrđuje terapijski učinak, ali istodobno i značajno smanjenje vrijednosti PD-L1 te izražen pad udjela tumor infiltrirajućih limfocita. Smanjenje PD-L1 nakon terapije, osobito izraženo u trostruko negativnom podtipu, može se tumačiti kao posljedica redukcije tumorske mase i promjene imunološkog mikrookoliša. Budući da je PD-L1 često induciran interferonskim signalima u kontekstu aktivne imunološke infiltracije, njegov pad nakon terapije može odražavati smanjeni imunološki podražaj u rezidualnom tumoru ili selekciju manje imunogeničnih tumorskih subklonova. Time se potvrđuje da PD-L1 nije statičan marker, već dinamična komponenta tumorskog mikrookoliša.

Za razliku od PD-L1, VEGF je pokazao različit obrazac promjene. Iako nije zabilježeno univerzalno smanjenje njegovog izražaja, raspodjela intenziteta VEGF-a značajno se promijenila nakon terapije, uz češći jači intenzitet u resekcijskim preparatima. Ovaj nalaz može odražavati selekcijski učinak neoadjuvantne terapije, pri čemu rezidualni tumor predstavlja

biološki otporniju populaciju stanica, potencijalno obilježenu izraženijom angiogenom aktivnošću. Alternativno, promjena može biti posljedica remodeliranja stromalnog i vaskularnog mikrookoliša u uvjetima terapijom inducirane hipoksije (132).

Kada se promatra ukupna dinamika oba biomarkera prije i nakon terapije, može se zaključiti da neoadjuvantna terapija značajno mijenja imunološki i mikrookolišni profil tumora, ali te promjene nisu uniformne niti linearne. PD-L1 i TIL pokazuju tendenciju padanja nakon terapije. Ovakav obrazac sugerira da imunološka komponenta tumora može biti osjetljivija na citotoksičnu terapiju, dok angiogeni potencijal može ostati očuvan ili čak relativno naglašen u preostalom tumorskom tkivu, što može ukazivati da je tumor ostao „neuništen“ upravo zbog opstanka njegovog vaskularnog sustava (133).

U uparenoj analizi svih bolesnika, nakon NAT dolazi do:

- značajnog smanjenja veličine tumora (Tablica 10.9.; $P < 0,001$),
- značajnog smanjenja PD-L1 (Tablica 10.9.; $P = 0,039$),
- izraženog smanjenja TIL-a (Tablica 10.9.; $P < 0,001$),
- promjene u raspodjeli intenziteta VEGF-a s češćim najjačim intenzitetom u resekciji (Tablica 10.8.; $P = 0,031$)

Kad se analiza razdvoji po podtipovima, vidljivo je da je pad PD-L1 statistički značajan u TNBC-u (Tablica 10.15.; $P = 0,003$), dok u luminalnim podtipovima razlika nije značajna (Tablica 10.11. i 10.13.). To je biološki smisleno: TNBC ima najviše početne PD-L1 vrijednosti pa je prostor promjene veći, a istovremeno je taj podtip i najosjetljiviji na promjene mikrookoliša uzrokovane kemoterapijom rezidualnog tumora.

Promjena VEGF-a u smjeru jačeg intenziteta u resekciji može se interpretirati kao adaptacija na terapijski stres i hipoksiju, odnosno kao selekcija tumorskih klonova koji bolje koriste angiogene mehanizme za opstanak (134). Takav nalaz je posebno važan za raspravu jer pokazuje da NAT ne djeluje samo citotoksično, već remodelira i biološke putove u rezidualnom tumoru koji je „preživio“ kemoterapiju i citostatičke cikluse liječenja.

11.2. Procjena razlike izražaja PD-L1 i VEGF u pojedinim podtipovima karcinoma dojke

U ovoj studiji uočene su jasne i očekivane biološke razlike između molekularnih podtipova već na inicijalnoj core biopsiji, što potvrđuje reprezentativnost uzorka i ispravnost stratifikacije bolesnica. Trostruko negativni (TNBC) podtip pokazao je najviši medijan PD-L1, uz statistički značajnu razliku u odnosu na luminalne podtipove ($P < 0,001$). S druge strane, VEGF (intenzitet) također se razlikovao među podtipovima ($P = 0,008$), pri čemu je najslabiji intenzitet najčešće zabilježen u luminal B/HER2-pozitivnom podtipu, dok su umjereni i najjači intenzitet bili učestaliji u luminalnom B i TNBC podtipu. Ovaj obrazac upućuje na heterogenost angiogenog pogona između bioloških skupina tumora. Dodatno, podtipovi su se značajno razlikovali po proliferacijskoj aktivnosti: Ki-67 je bio najviši u TNBC ($P < 0,001$), što podupire agresivniji biološki profil TNBC-a i daje kontekst povišenom PD-L1 (viši promet tumorskih stanica, veći neoantigenski teret i jači upalni signal).

Zaključno, rezultati pokazuju da se PD-L1 i VEGF ponašaju različito u različitim podtipovima, pri čemu je PD-L1 najizraženiji u TNBC-u, dok VEGF intenzitet pokazuje podtipno specifičan obrazac s relativno slabijim intenzitetom u luminal B/HER2-pozitivnoj skupini. Time se potvrđuje da se imunološka regulacija (PD-L1) i angiogeneza (VEGF) ne moraju paralelno mijenjati unutar istog biološkog okvira, nego mogu predstavljati dvije djelomično neovisne osi tumorske biologije.

U Tablici 10.1. uočava se značajna razlika u histološkom gradusu među podtipovima ($P = 0,004$), pri čemu TNBC češće pokazuje viši gradus (III), što je konzistentno s njegovom agresivnijom morfologijom i većom proliferacijom (Ki-67). Ovaj nalaz je važan jer gradus može biti konfuzor u analizama biomarkera: tumori višeg gradusa češće imaju hipoksiju, nekrozu i remodeliranje strome, što posredno može utjecati na VEGF i imunološku mikrookolinu.

U Tablici 10.3. status limfnih čvorova (N klasifikacija) razlikovao se među podtipovima ($P = 0,047$), pri čemu je luminal B/HER2-pozitivna skupina imala veći udio N1. Ovaj podatak je interpretacijski relevantan u kasnijim analizama prediktora odgovora na neoadjuvantnu terapiju. Pozitivnost limfnih čvorova zahvaćenih tumorom može odražavati veću biološku invazivnost ili dulje trajanje bolesti prije dijagnoze, te utjecati na vjerojatnost postizanja povoljnog terapijskog odgovora neovisno o biomarkerima. Istovremeno, činjenica da se T

klasifikacija nije značajno razlikovala među podtipovima ($P = 0,183$) sugerira da se razlike u N statusu ne mogu jednostavno pripisati većoj primarnoj tumorskoj masi u jednoj skupini.

Histološki tip također pokazuje razliku: NOS invazivni tip (*Not Otherwise Specified*), tip tumora koji ne pripada nekoj specifično definiranoj histološkoj podskupini, bio je rjeđi u luminal B/HER2-pozitivnoj skupini ($P = 0,028$), što može odražavati histološku heterogenost HER2-pozitivnih tumora i potencijalno utjecati na mikrookolinu i izražaj biomarkera, uključujući VEGF. Međutim, u ovoj fazi važno je zadržati oprez, iako su ove razlike statistički značajne, klinička relevantnost ovisi o učestalosti pojedinih tipova i njihovoj raspodjeli po ostalim parametrima (gradus, N status, terapijski protokoli).

11.3. Povezanost izražaja PD-L1 i VEGF s imunofenotipskim karakteristikama tumora

Rezultati ove studije upućuju na snažan imunofenotipski kontekst podtipova: TNBC, očekivano, ima ER/PR = 0, te najviši Ki-67 (Tablica 10.2.), i ujedno najviši PD-L1. Takav “sklop” nalaza u skladu je s konceptom da tumori višeg proliferacijskog indeksa i agresivnijeg fenotipa češće nose izraženije imunološke mehanizme izbjegavanja (npr. PD-L1).

S druge strane, izostanak prognostičke/prediktivne uloge PD-L1 u modelima odgovora na terapiju (Tablice 10.16., 10.19.) naglašava da je imunofenotip tumora višedimenzionalan: mjerenje PD-L1 samo po sebi ne mora odražavati kompleksnost imunološke reaktivnosti niti jamčiti bolji ili lošiji patološki odgovor u svim podtipovima.

U predterapijskim uzorcima (core biopsija) vrijednosti PD-L1 značajno su se razlikovale između podtipova, pri čemu je najviši medijan PD-L1 zabilježen u trostruko negativnom podtipu (Tablica 10.2.; $P < 0,001$). Ovaj nalaz je u skladu s općim biološkim obrascem TNBC-a, koji češće pokazuje izraženiju imunološku aktivnost i imunološke kontrolne mehanizme, dok su luminalni podtipovi u pravilu “imunološki tiši”.

Istodobno, trostruko negativni tumori u ovom istraživanju pokazuju i druga obilježja biološke agresivnosti: češći gradus III (Tablica 10.1.; $P = 0,004$) te viši Ki-67 (Tablica 10.2.; $P < 0,001$). Time PD-L1 u rezultatima stoji uz fenotip koji je proliferativniji i histološki nepovoljniji, iako sam PD-L1 nije pokazao prediktivnost za odgovor na NAT.

Udio TIL-ova nije se razlikovao među podtipovima u predterapijskim uzorcima (Tablica 10.2.; $P = 0,923$), a nije se razlikovao ni nakon resekcije (Tablica 10.5.; $P = 0,667$). Drugim riječima, među ispitanicima ovog rada PD-L1 se razlikuje po podtipovima, dok TIL ne, što upućuje da PD-L1 ovdje ne odražava jednostavno “više limfocita = više PD-L1”, nego je vjerojatnije da je pod utjecajem podtip-specifične biologije tumora i mikrookoliša (npr. intrinzične signalizacije, citokinskih poticaja, hipoksije, heterogenosti uzorka).

U uparenoj analizi svih bolesnika, nakon NAT dolazi do:

- smanjenja veličine tumora,
- značajnog sniženja PD-L1 (Tablica 10.9.; $P = 0,039$),
- značajnog smanjenja TIL (Tablica 10.9.; $P < 0,001$).

Kada se analiza razdvoji po podtipovima, najkonzistentniji obrazac “imunološkog pada” vidi se u trostruko negativnoj skupini, gdje je nakon NAT zabilježeno značajno smanjenje i PD-L1 (Tablica 10.15.; $P = 0,003$) i TIL (Tablica 10.15.; $P < 0,001$), uz očekivano smanjenje tumorske veličine. U luminalnim podtipovima, iako se TIL smanjuje, PD-L1 se ne mijenja značajno (Tablice 10.11. i 10.13.). Ovo je važno naglasiti jer pokazuje da terapija u različitim podtipovima može remodelirati mikrookoliš različitim intenzitetom i u različitim komponentama.

VEGF intenzitet se značajno razlikovao među podtipovima na core biopsiji (Tablica 10.3.; $P = 0,008$). Najuočljiviji obrazac je da je najslabiji VEGF intenzitet bio značajno češći u Luminal B/HER2-pozitivnom podtipu, dok su umjereni i najjači intenzitet bili zastupljeniji u luminalnom B i trostruko negativnom podtipu. Time VEGF u ovim rezultatima također “prati” biološki aktivnije ili barem angiogeno potentnije fenotipove, ali na način koji nije identičan PD-L1 profilu.

U uparenoj analizi svih bolesnika, raspodjela VEGF intenziteta se nakon NAT značajno mijenja (Tablica 10.8.; $P = 0,031/0,033$), uz češću pojavnost najjačeg intenziteta pri resekciji. To je klinički i biološki interpretabilno kao terapijom inducirana selekcija rezidualnih klonova i/ili adaptivni porast angiogenih signala u rezidualnom tumoru i stromi. Premda se VEGF pomiče prema jačem intenzitetu nakon NAT, taj pomak nije nužno prediktivan za RCB, što je u skladu s daljnjim analizama ovog rada.

Kada se imunofenotipski nalazi integriraju s kliničko-patološkim obilježjima, u istraživanju ove populacije oblikuju se dva stabilna zaključka:

1. PD-L1 je podtip-ovisno povišen (najviše u TNBC), paralelno s višim Ki-67 i većim udjelom tumora višeg gradusa, ali nije samostalno povezan s RCB-om. Time PD-L1 u rezultatima više odražava biološki “agresivniji/aktivniji” fenotip, nego prediktivni marker odgovora na standardnu NAT.
2. VEGF pokazuje podtip-specifičnu raspodjelu prije terapije i pomak prema jačem intenzitetu nakon NAT, ali bez jasne povezanosti s RCB-om; jedini konzistentniji “biološki signal” u rezultatima analiza je negativna veza VEGF-a s rezidualnom celularnošću u luminalnom B.

11.4. Povezanost izražaja VEGF i PD-L1 s TIL

Na core biopsiji udio TIL-a nije se značajno razlikovao među podtipovima (Tablica 10.2.; $P = 0,923$), iako je medijan bio najviši u TNBC-u. Ovakav nalaz može biti posljedica velike varijabilnosti TIL-a unutar podtipova, ali i metodoloških čimbenika poput heterogenosti tumora i ograničenja uzorka core biopsije koja je fizički veličine promjera bioptičke igle.

Ključno je da se nakon terapije uočava značajan pad TIL-a u cijeloj skupini (Tablica 10.9.; $P < 0,001$), i to konzistentno i unutar pojedinih podtipova (Tablice 10.11., 10.13., 10.15.; svugdje $P < 0,001$). Takav nalaz je biološki smislen: neoadjuvantna terapija mijenja mikrookoliš, reducira tumorsku masu i može dovesti do “imunološkog smirivanja” rezidualne lezije, odnosno do smanjenja upalnog infiltrata u preostalom tumorskom tkivu. Uz to, rezidualni tumor može predstavljati selektiranu populaciju stanica koja je otpornija i manje imunogena, što dodatno može pridonijeti nižim TIL vrijednostima.

Važan je i podatak da se PD-L1 smanjuje nakon terapije u ukupnoj skupini (Tablica 10.9.; $P = 0,039$), a u TNBC-u posebno (Tablica 10.15.; $P = 0,003$). To indirektno podržava ideju da PD-L1 i TIL, iako konceptualno povezani u okviru tumorske imunobiologije, ne moraju uvijek pokazivati stabilan paralelni obrazac nakon terapijskih intervencija: terapija može istodobno reducirati tumorski antigeni teret, mijenjati citokinski milje i smanjiti potrebu za ekspresijom PD-L1 kao adaptivnog mehanizma

Ovakav obrazac je važan jer pokazuje da se u ispitanicima ove studije povišen PD-L1 ne ponaša kao jednostavan odraz većeg limfocitnog infiltrata, barem kada se TIL kvantificira globalno (stromalni/ukupni TIL) i uspoređuje među podtipovima. Drugim riječima, iako se PD-L1 često interpretira kao marker “imunološki aktivnijeg” mikrookoliša, rezultat upućuje da njegova ekspresija može biti pod snažnim utjecajem intrinzične biologije podtipa i drugih regulatornih čimbenika (npr. citokinski poticaji, interferonska signalizacija, hipoksija, heterogenost tumora), a ne isključivo količine TIL-ova.

U uparenoj analizi svih bolesnika, nakon NAT zabilježeno je:

- značajno sniženje PD-L1 (Tablica 10.9.; $P = 0,039$)
- značajno sniženje TIL (Tablica 10.9.; $P < 0,001$)

U luminalnim podtipovima, iako se TIL nakon terapije smanjuje (Tablice 5.11. i 5.13.; $P < 0,001$), PD-L1 ne pokazuje statistički značajnu promjenu ($P = 0,145$ i $P = 0,163$). To sugerira da se u luminalnim tumorima PD-L1 manje “kreće” s terapijom i manje prati opći pad infiltrata, dok je u TNBC izraženija terapijski inducirana promjena u oba parametra.

TIL u ovom istraživanju ne razlikuju se značajno među podtipovima ni prije ni nakon terapije, dok se VEGF intenzitet mijenja (među podtipovima na core biopsiji) i dodatno se pomiče prema jačem intenzitetu nakon NAT u ukupnoj skupini (Tablica 10.8.; značajna promjena raspodjele VEGF).

Kliničko-biološki, VEGF može se interpretirati kao dio angiogenog i hipoksijskog odgovora koji često ide uz imunosupresivno okruženje, pa se u mnogim modelima očekuje slabija učinkovitost ili funkcionalna kompetencija infiltrata (135). Međutim, ovo istraživanje ne pokazuje jednostavnu kvantitativnu vezu “više VEGF = manje TIL” na razini podtipova (jer TIL ne pokazuje razlike), nego više upućuju da VEGF odražava angiogenu adaptaciju (posebno nakon NAT), dok je TIL dinamički i terapijski osjetljiv, ali ne podtipno diverzificiran.

11.5. Usporedba izražaja PD-L1 i VEGF s ostalim kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata i tumora

Raspodjela kliničko-patoloških obilježja potvrđuje tipične razlike između podtipova: TNBC je češće višeg gradusa (Tablica 10.1.), a luminal B/HER2-pozitivni podtip pokazuje veći udio

pozitivnih limfnih čvorova (N1) već na početnoj procjeni (Tablica 10.3.; $P = 0,047$). Takve razlike su važne jer mogu djelovati kao konfuzori u interpretaciji biomarkera: primjerice, veća nodalna zahvaćenost može biti povezana s većim ukupnim tumorskim opterećenjem ili biološkom invazivnošću, neovisno o PD-L1 ili VEGF.

Usporedba core biopsije i resekcije u cijeloj skupini pokazuje promjene koje su u skladu s očekivanim učincima neoadjuvantne terapije: značajno smanjenje veličine tumora (Tablica 10.9.; $P < 0,001$), uz promjene u patohistološkim obilježjima poput češće zabilježene limfovaskularne invazije u resekcijskom preparatu (Tablica 10.8.). Povećana detekcija LVI u resekciji može odražavati veću reprezentativnost operativnog preparata u odnosu na core biopsiju, ali i definitivno promijenjenu morfologiju rezidualne bolesti nakon terapije koja joj je osigurala opstanak (136).

- PD-L1 se povezuje s biološki agresivnijim podtipom (TNBC), ali nije prediktor terapijskog odgovora niti volumetrijskog opterećenja tumora (137).
- VEGF pokazuje terapijski induciranu adaptaciju (porast intenziteta nakon NAT), ali bez jasne povezanosti s kliničkim ishodom, osim podtip-specifične negativne veze s rezidualnom celularnošću u Luminal B.

11.6. Kvantificirani izražaj PD-L1 i VEGF prije i nakon NAT

Na razini cijele skupine ispitanika nakon neoadjuvantne terapije registrirane su značajne promjene u tumorskom i mikrookolišnom profilu: smanjenje tumorske veličine, smanjenje PD-L1 te značajno smanjenje TIL-a (Tablica 10.9.). U podtipnoj analizi, pad PD-L1 nije bio univerzalan: u luminalnim skupinama promjena PD-L1 nije dosegla statističku značajnost (Tablice 10.11. i 10.13.), dok je u TNBC-u pad bio izražen i značajan (Tablica 10.15.). To je važno interpretacijski jer sugerira da je PD-L1 dinamičniji biomarker u imunogenijem podtipu i da se njegov izražaj može osjetljivije mijenjati nakon terapijskog pritiska.

Za VEGF se u ukupnoj skupini pokazala promjena raspodjele intenziteta prema jačem intenzitetu u resekciji (Tablica 10.8.; $P = 0,031$). Ovo se može tumačiti na nekoliko načina: rezidualni tumor može biti selekcioniran prema fenotipu otpornijem na terapiju, potencijalno s izraženijim angiogenim signalom, ili se radi o promjeni uvjetovanoj remodeliranjem ostatka

tumora i hipoksijskim mikrookolišem u preostaloj leziji. Upravo zato je kod VEGF-a posebno važno interpretirati rezultat u kontekstu rezidualne celularnosti i histoloških obilježja.

11.7. Uspoređeni izražaj PD-L1 i VEGF s verificiranim RCB scorom

U ovoj analizi RCB raspodjela bila je slična među podtipovima (Tablica 10.6.; $P = 0,369$), a najčešći je bio RCB-II. To znači da se “grubi” patološki odgovor u ovom uzorku nije značajno razlikovao po podtipu, što je važno jer smanjuje rizik da su nalazi biomarkera jednostavno refleksi podtipne raspodjele odgovora.

Ključni nalazi vezani uz odgovor na terapiju upućuju na to da je početna veličina tumora najkonzistentniji prediktor lošijeg odgovora:

- u korelacijama je veličina tumora pozitivno povezana s rezidualnom celularnošću (Tablica 10.16.; $Rho = 0,326$; $P < 0,001$),
- u bivarijatnoj logističkoj regresiji veća veličina tumora značajno povećava vjerojatnost lošijeg odgovora (RCB II/III) (Tablica 10.19.; $OR = 2,60$; $P = 0,038$),
- ROC analiza potvrđuje umjerenu diskriminacijsku sposobnost veličine tumora (Tablica 10.20.; $AUC = 0,705$; $P = 0,001$) uz visoku specifičnost (100 %) na točki $> 2,6$ cm, ali uz nižu osjetljivost (45 %), što znači da je veća početna veličina dobar “rule-in” indikator lošijeg odgovora, dok manji tumori ne jamče dobar odgovor.
- Spearmanova korelacija pokazuje da niti jedna od analiziranih varijabli (uključujući PD-L1, TIL i VEGF) nije značajno korelirala s RCB u ukupnoj skupini niti po podtipovima (Tablica 10.16.).
- U analizi varijabli prema RCB skupinama, PD-L1 i TIL nisu se značajno razlikovali između RCB-I/II/III (Tablica 10.17.), niti se raspodjela VEGF intenziteta razlikovala među RCB skupinama (Tablica 10.18.).

Nasuprot tome, PD-L1, TIL i VEGF nisu pokazali značajnu povezanost s RCB klasifikacijom niti u korelacijama (Tablica 10.16.) niti u usporedbi medijana po RCB skupinama (Tablica 10.17.), kao ni u logističkoj regresiji (Tablica 10.19.).

Vrijedan je i podtipno-specifičan nalaz: u luminalnom B podtipu VEGF pokazuje negativnu povezanost s rezidualnom celularnošću (Tablica 10.16.; $Rho = -0,444$; $P = 0,01$). Iako se ovakav

smjer na prvi pogled može činiti kontraintuitivnim (jer VEGF često povezujemo s agresivnošću), on može odražavati činjenicu da VEGF u luminalnim tumorima ne mora biti isključivo marker agresije, nego i indikator stromalno-angiogenog remodeliranja koji je različito povezan s efektom terapije. Upravo zato ovakav nalaz zaslužuje interpretaciju kao potencijalno podtipno-specifičan fenomen.

S druge strane, veličina tumora se pokazala kao najstabilniji i klinički najsmisleniji prediktor: veća preterapijska veličina tumora bila je povezana sa slabijim odgovorom (Tablica 10.17.; $P = 0,022$), značajno je predviđala loš odgovor i u logističkoj regresiji (Tablica 10.19.; $OR = 2,60$; $P = 0,038$), te je ROC analizom pokazala umjerenu diskriminativnu sposobnost ($AUC = 0,705$; granična vrijednost $> 2,6$ cm uz 100% specifičnost, ali nižu osjetljivost) (Tablica 10.20.). Ovaj skup nalaza jasno definira kliničku poruku: u ovom istraživanju, “klasični” morfometrijski parametar (veličina tumora) nadmašuje imunobiološke markere u predikciji RCB-a.

11.8. Odnos između izražaja PD-L1 i VEGF prije i nakon NAT u rezidualnom tumoru u odnosu na ukupan ishod liječenja

Ishod liječenja jasno se razlikovao među podtipovima. Smrtni ishod bio je značajno češći u TNBC skupini (Tablica 10.6.; $P = 0,012$), a analiza ukupnog preživljenja pokazala je izrazito nepovoljnu os u TNBC-u (Tablica 10.7.; log-rank $P < 0,001$), uz medijan preživljenja od 31 mjesec, dok u luminalnim skupinama medijan nije dosegnut. To potvrđuje poznatu kliničku realnost TNBC-a kao podtipa s većim rizikom ranog recidiva i smrtnog ishoda.

U kontekstu biomarkera, u TNBC-u je istodobno zabilježen značajan pad PD-L1 i TIL nakon terapije (Tablica 10.15.). Činjenica da TNBC ima i najvišu početnu PD-L1 vrijednost, ali najlošiji ishod, podržava koncept da PD-L1 u ovoj kohorti vjerojatnije reflektira mehanizam imunološkog izbjegavanja i agresivniju biologiju nego protektivni imunološki fenomen. Slično, promjena VEGF distribucije prema jačem intenzitetu u resekciji (Tablica 10.8.) može biti kompatibilna s idejom rezidualne bolesti kao biološki selektirane, potencijalno otpornije populacije, što bi u širem smislu moglo biti relevantno za dugoročni ishod, ali za čvrst zaključak potreban je model koji izravno povezuje promjene biomarkera s preživljenjem.

Najviša stopa preživljenja zabilježena je u luminal B/HER2-pozitivnom podtipu, dok je trostruko negativni podtip pokazao najnepovoljniji ishod, uz značajno kraći medijan

preživljenja i najviši udio smrtnih ishoda. Log-rank test potvrdio je značajnu razliku u Kaplan–Meierovim krivuljama ukupnog preživljenja među podtipovima ($P < 0,001$), čime se dodatno potvrđuje snažna prognostička vrijednost molekularne klasifikacije karcinoma dojke.

S druge strane, luminal B/HER2-pozitivni podtip pokazao je najbolji ukupni ishod, što je vjerojatno posljedica dostupnosti ciljanog anti-HER2 liječenja i osjetljivosti na sustavnu terapiju. Iako je u toj skupini zabilježena viša učestalost pozitivnosti limfnih čvorova, dugoročni ishod bio je povoljniji nego u ostalim skupinama, što potvrđuje važnost terapijskih mogućnosti u moduliranju prirodnog tijeka bolesti.

Važno je istaknuti da u ovoj kohorti PD-L1 i VEGF nisu pokazali jasnu i statistički značajnu povezanost s ukupnim preživljenjem. Unatoč promjenama u izražaju nakon neoadjuvantne terapije, njihova ekspresija nije se pokazala neovisnim prognostičkim čimbenikom dugoročnog ishoda. Time se potvrđuje da molekularni podtip ostaje dominantni prognostički okvir, dok pojedinačni biomarkeri imunološke regulacije i angiogeneze, barem u ovom uzorku i uz korištenu metodologiju, nemaju samostalnu prognostičku snagu (138).

Usporedba nalaza prije i nakon neoadjuvantne terapije pokazala je da terapijski pritisak značajno mijenja tumorski i mikrookolišni profil (139). Na razini cijele skupine zabilježeno je očekivano smanjenje veličine tumora, ali i značajan pad PD-L1 te izražen pad TIL-a. Ovi rezultati upućuju na to da citotoksična terapija ne djeluje isključivo na tumorsku masu, nego istodobno modulira imunološki mikrookoliš. Smanjenje TIL-a nakon terapije može se objasniti redukcijom antigenskog podražaja, promjenom citokinskog miljea i selekcijom rezidualnih tumorskih klonova koji su manje imunogeni ili otporniji na imunološku eliminaciju (140).

1. PD-L1 je podtipno uvjetovan i najviši u TNBC-u (core biopsija).
2. NAT dovodi do značajnog pada TIL-a i pada PD-L1 (najizraženije u TNBC-u), uz promjenu VEGF distribucije u smjeru jačeg intenziteta u rezidualnom tumoru.
3. PD-L1/VEGF/TIL u preterapijskom uzorku nisu prediktori RCB-a, dok je veličina tumora najkonzistentniji prediktor lošijeg odgovora (OR 2,60; AUC 0,705; cutoff 2,6 cm).
4. Preživljenje je najlošije u TNBC-u, što potvrđuje prognostičku težinu podtipa i daje kontekst za interpretaciju bioloških markera.

11.9. Konceptualni okvir istraživanja

Polazna hipoteza pretpostavljala je kako će povišeni izražaj VEGF-a i PD-L1 prije NAT biti povezan s lošijim terapijskim odgovorom, nižom stopom patološkog odgovora te da će se njihov izražaj smanjiti nakon terapije uz pozitivnu korelaciju s TIL-om. Dobiveni rezultati pokazali su da su PD-L1 i VEGF doista biološki aktivni i terapijski modulirani, ali da njihov odnos s odgovorom na terapiju i s TIL-om nije linearan niti univerzalno prediktivan.

U TNBC podtipu, gdje je smanjenje PD-L1 bilo izraženije, ovaj nalaz može odražavati inicijalno višu imunogenost tumora i veću osjetljivost imunološki aktivnih klonova na terapiju (141).

Za razliku od PD-L1, VEGF nije pokazao uniformno smanjenje, već promjenu raspodjele intenziteta izražaja. To potvrđuje da angiogeneza nije pasivni pratilac tumorske mase, nego relativno autonomni biološki proces (142).

VEGF je centralni medijator angiogeneze, ali i regulator:

- vaskularne permeabilnosti,
- hipoksijskog odgovora,
- interakcije endotela i imunoloških stanica.

Njegova perzistencija u rezidualnom tumoru može značiti:

1. Očuvani angiogeni potencijal preživjelih klonova.
2. Adaptaciju tumora na hipoksične uvjete nakon terapije.
3. Aktivaciju alternativnih proangiogenih putova.
4. Jedan je od bitnih elemenata opstanka biološki otpornog tumora na kemoterapiju.

Zanimljivo je da je TNBC pokazao veći udio jakog VEGF izražaja, ali bez povećane multifokalnosti. To sugerira da angiogeneza u ovom podtipu više doprinosi invazivnosti i potencijalu sistemske diseminacije nego intramamarnoj disperziji.

Unatoč biološkoj logici, povišeni VEGF i PD-L1 prije NAT nisu pokazali snažnu i stabilnu povezanost s lošijim odgovorom (RCB II/III).

TNBC, luminalni B i HER2-pozitivni podtipovi imaju različitu:

- proliferacijsku aktivnost,
- imunogenost,
- angiogeni profil,
- osjetljivost na kemoterapiju.

Biomarker koji ima prediktivnu vrijednost u jednom podtipu ne mora imati istu snagu u drugom.

U smislu intratumorske heterogenosti core biopsija predstavlja ograničeni presjek tumora. Rezidualni tumor nakon NAT može predstavljati selektiranu subpopulaciju stanica s drugačijim biološkim profilom (143, 144).

1. TIL se procjenjuje u stromi, dok se PD-L1 i VEGF procjenjuju u tumorskim stanicama.
2. VEGF može doprinositi imunosupresivnom mikrookruženju.
3. PD-L1 može biti induciran neovisno o ukupnom broju TIL, ovisno o funkcionalnom statusu infiltrata (145).

Drugim riječima, angiogeno-imunološka os postoji, ali njezina manifestacija u kliničkim uzorcima nije jednostavna ni linearna.

Luminalni tumori pokazali su veću multifokalnost, što se može povezati s duljim subkliničkim razvojem i intraduktalnim širenjem, dok TNBC pokazuje brži, kompaktniji rast i raniju sistemsku diseminaciju (146, 147).

Sličan smjer nalaza opisan je u tri studije koje nisu provodile uparenu analizu biomarkera u istih bolesnica prije i nakon neoadjuvantne terapije, ali su ipak pokazale da NAT može značajno modulirati imunološko-angiogeni profil tumora. Pelekanou i sur. (148) su u rezidualnim tumorima nakon neoadjuvantne kemoterapije zabilježili značajno smanjenje ekspresije PD-L1 u tumorskim i imunološkim stanicama, pri čemu promjene PD-L1 nisu bile nužno paralelne promjenama udjela TIL-ova, što upućuje na djelomično neovisnu regulaciju ovih parametara. Grandal i sur. (149) u skupini bolesnica s trostruko negativnim karcinomom dojke (TNBC) opisali su heterogenost PD-L1 nakon NAT; u većine je ekspresija bila snižena u rezidualnoj bolesti, dok je perzistentna PD-L1 pozitivnost bila povezana s agresivnijim obilježjima

rezidualnog tumora. Nadalje, Wang i sur. (150) su pokazali da se VEGF tijekom neoadjuvantne kemoterapije dinamički mijenja; više razine VEGF bile su povezane s lošijim terapijskim odgovorom, što može odražavati pojačanu angiogenu aktivaciju i adaptacijski odgovor rezidualnog tumora. Zajedno, ovi nalazi podupiru interpretaciju da NAT može dovesti do smanjenja PD-L1 u rezidualnoj bolesti, uz zadržavanje biološke heterogenosti, te da angiogeni signalni putovi (npr. VEGF) mogu ostati aktivni ili se reaktivirati, ne nužno u linearnom odnosu s imunološkim infiltratom.

12. Sažeti protokol NAT prema molekularnom podtipu

Ovo je sažeti pregled protokola, najčešće korištenih neoadjuvantnih pristupa u ranom i lokalno uznapređovalom karcinomu dojke. Končni odabir režima ovisi o stadiju bolesti, veličini tumora, statusu limfnih čvorova, dobi, komorbiditetima, menopauzalnom statusu, srčanoj funkciji i procjeni multidisciplinarnog tima (151).

12.1. Luminal B (HER2 negativni) karcinom dojke

Luminal B/HER2 negativni tumori su hormonski receptor pozitivni, uz viši proliferacijski indeks i biološki agresivnije ponašanje od luminal A podtipa. Kod tumora koji zahtijevaju preoperativno smanjenje volumena ili kod kojih se odluka o sustavnom liječenju može donijeti bez dodatnih kirurških podataka, najčešće se primjenjuje neoadjuvantna kemoterapija temeljena na Antraciklinu i Taksanu (151, 152).

Tipični slijed liječenja uključuje 4 ciklusa protokola Adriamycin + Ciklofosamid (citostatici), nakon čega slijedi Taksan (citostatik), tjedno kroz 12 aplikacija ili Docetaksel (citostatik), svaka 3 tjedna kroz 4 ciklusa. Ukupno trajanje je približno 4 – 6 mjeseci (153).

U postmenopauzalnih bolesnica s izrazito hormonski ovisnim tumorima, može se razmotriti neoadjuvantna endokrina terapija aromataznim inhibitorom Letrozol, Anastrozol ili Eksemestan (endokrina terapija), najčešće kroz 4–6 mjeseci (153, 154).

Nakon operacije slijedi adjuvantna endokrina terapija prema hormonskom statusu i ukupnom riziku bolesti (155).

12.2. Luminal B / HER2 pozitivni karcinom dojke

Kod Luminalnog B /HER2 pozitivnog podtipa standard je kombinacija kemoterapije i anti-HER2 terapije u neoadjuvantnom pristupu, osobito kod pozitivnih limfnih čvorova aksile ili visokorizične bolesti negativnih limfnih čvorova (154, 155).

Često korišten režim je Docetaksel (kemoterapeutik) + Karboplatin (platinski citostatik) + Trastuzumab (monoklonsko protutijelo za HER2) + Pertuzumab (monoklonsko protutijelo za HER2), svaka 3 tjedna kroz 6 ciklusa (154, 156).

Anti-HER2 terapija se nakon operacije nastavlja do ukupno jedne godine. Ako je nakon neoadjuvantnog liječenja prisutna rezidualna invazivna bolest, standardni postneoadjuvantni pristup je Trastuzumab koji djeluje selektivno na HER2+ stanice, svaka tri tjedna kroz 14 ciklusa (154, 155, 156).

Budući da je riječ o hormonski receptor pozitivnom tumoru, nakon završetka lokalnog liječenja indicirana je i adjuvantna endokrina terapija (156).

12.3. Trostruko negativni karcinom dojke (TNBC)

TNBC nema pozitivan ER, PR ni HER2 receptor, biološki je agresivniji, ali i osjetljiviji na citotoksičnu terapiju. Kod stadija II–III neoadjuvantna terapija je standardni pristup.

Najčešće se primjenjuje sekvenca Taksan (citostatik) + Platina, a zatim Antraciklin/Ciklofosamid (citostatici), kroz 4 ciklusa. Pembrolizumab (monoklonsko protutijelo protiv PD-1 receptora), kod PD-L1 pozitivnih tumora. (157).

Tablica 27. Terapijski pristupi u neoadjuvantnom (NAT) i adjuvantnom liječenju karcinoma dojke prema molekularnom podtipu

Molekularni podtip	Neoadjuvantni terapijski pristup (NAT)	Standardni terapijski režimi	Adjuvantno liječenje
Luminal B (HER2-negativan)	Kemoterapija temeljena na antraciklinima i taksanima; u odabраних postmenopauzalnih bolesnica mogućа endokrina terapija	Doksorubicin + Ciklofosamid (4 ciklusa) → Paklitaksel tjedno (12 ciklusa); ili Docetaksel svaka 3 tjedna (4 ciklusa); alternativno aromatazni inhibitor 4–6 mjeseci	Adjuvantna endokrina terapija (aromatazni inhibitori ili tamoksifen)
Luminal B / HER2-pozitivan	Kemoterapija uz dualnu anti-HER2 blokadu	Docetaksel + Karboplatin + Trastuzumab + Pertuzumab (6 ciklusa); ili Doksorubicin + Ciklofosamid → Taksan + Trastuzumab + Pertuzumab	Nastaviti anti-HER2 terapiju do 1 godine; kod rezidualne bolesti Trastuzumab emtanzin, (14 ciklusa); + endokrina terapija
Trostruko negativni karcinom dojke (TNBC)	Kemoterapija (taksan + platina) → antraciklin/ciklofosamid; često uz imunoterapiju	Paklitaksel + Karboplatin → Doksorubicin + Ciklofosamid ili Epirubicin + Ciklofosamid; ± Pembrolizumab	Nastavak imunoterapije; razmotriti Kapecitabin kod rezidualne bolesti

13. ZAKLJUČCI

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju izraženu biološku heterogenost karcinoma dojke i naglašavaju ključnu ulogu molekularnog podtipa u određivanju patohistoloških obilježja, terapijskog odgovora i dugoročnog ishoda bolesti.

Trostruko negativni podtip pokazao je agresivniji biološki profil, viši proliferacijski indeks, viši početni izražaj PD-L1 te najnepovoljnije ukupno preživljenje, dok je luminalni B/HER2-pozitivni podtip imao najpovoljniji ishod liječenja.

- U ranom stadiju bolesti angiogeneza (posredovana VEGF) i imunološka modulacija (posredovana PD-L1) ne moraju biti istovremeno aktivirani. Tumori dojke pokazali su diskontinuiranu aktivaciju imunoloških puteva, dok je angiogeneza dominantna i neovisna o imunološkom odgovoru.
- Podtipovi raka dojke, osobito luminalni, imaju slab imunološki infiltrat, što dovodi do ograničenog izražaja PD- L1, dok je angiogeneza aktivna bez doprinosa imunološkog pritiska.
- Kemoterapija često uzrokuje povećanu hipoksiju (nekroza, fibroza), rezidualnog tumora, što potiče pojačanu ekspresiju VEGF, dok istovremeno može reducirati populaciju imunoloških stanica koje induciraju PD- L1.
- NAT može iscrpiti T stanične infiltrate ili smanjiti interferon γ signalizaciju, čime se snižava PD-L1, tumorske stanice preživjele kemoterapiju aktiviraju angiogenezu kao mehanizam prilagodbe.
- Terapijom inducirana fibroza i vaskularna remodelacija mogu dovesti do relativnog povećanja VEGF bez istovremenog povećanja imunološke signalizacije.
- NAT često uzrokuje tumorske nekroze i poremećaje cirkulacije, što povećava aktivnost HIF 1 α i posljedično VEGF-a.
- Preživjele stanice nakon kemoterapije često pokazuju fenotip visokog angiogenog potencijala kako bi obnovile vaskularnu mrežu u „borbi za opstanak“.
- NAT je smanjila broj TIL-ova, što direktno smanjuje IFN γ stimulaciju potrebnu za održavanje PD - L1 ekspresije.
- Stanice s visokom imunološkom aktivnošću osjetljivije su na kemoterapiju, zbog čega u rezidualnom tumoru ostaju subkloni s nižom PD-L1 ekspresijom.

- Nakon terapije često prevladava supresivni i fibrozni mikrookoliš, unatoč tome tumorski ostatak se bori za svoj reparativni proces, adaptira se na terapijski stres s potencijalom dalje progresije.

Ključno znanstveno saznanje ovog rada jest da tumor ova tri podtipa karcinoma dojke nakon NAT prelazi iz imunološki aktivnijeg u angiogeno dominantan fenotip. Ostatak tumora je selektirani, adaptirani i biološki preoblikovan sustav.

Analize ovog rada pokazuju kako remodeliranje vaskularne mreže tijekom NAT upućuje na jedan od glavnih elemenata koji čini tumor rezistentnim na terapiju.

PD-L1 i VEGF u karcinomu dojke ne ponašaju kao linearno povezani biomarkeri unutar jedinstvenog biološkog modela, nego predstavljaju dvije djelomično neovisne, terapijski osjetljive komponente tumorske biologije. Izostanak njihove robusne povezanosti s patološkim odgovorom i preživljenjem ne umanjuje njihovu biološku važnost, naglašava potrebu za integrativnim modelima koji uključuju molekularne, imunološke i kliničke parametre vezane za imunosupresivnu modulaciju i remodeliranje tumorskog mikrookoliša nakon NAT.

14. SAŽETAK

Karcinom dojke predstavlja biološki heterogenu bolest u kojoj imunološki i angiogeni mehanizmi imaju važnu ulogu u progresiji tumora i odgovoru na terapiju. Ligand programirane stanične smrti (PD-L1) i vaskularni endotelijalni čimbenik rasta (VEGF) ključni su regulatori tumorskog mikrookoliša, no njihova međusobna povezanost, dinamika tijekom neoadjuvantnog liječenja i klinička relevantnost nisu u potpunosti razjašnjeni.

Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti i usporediti izražaj PD-L1 i VEGF u tumorskom tkivu karcinoma dojke prije započinjanja neoadjuvantne terapije i nakon njezina završetka, te utvrditi njihovu povezanost s molekularnim podtipom, kliničko-patološkim obilježjima, tumor infiltrirajućim limfocitima (TIL), patološkim odgovorom na terapiju prema RCB klasifikaciji i ukupnim preživljenjem.

U istraživanje je uključeno 102 bolesnice od toga, 34 s luminalnim B, 34 s luminalnim B/HER2-pozitivnim i 34 pacijentice s trostruko negativnim podtipom karcinoma dojke. Analiza je provedena na uparenim uzorcima core biopsije prije terapije i resekcijskog preparata nakon završetka neoadjuvantnog liječenja. Imunohistokemijski su analizirani PD-L1 i VEGF, a rezultati su korelirani s kliničko-patološkim parametrima, RCB klasifikacijom i ukupnim preživljenjem. U statističkoj obradi korišteni su neparametrijski testovi, Spearmanova korelacija, logistička regresija te ROC analiza.

Trostruko negativni podtip pokazao je najviši inicijalni izražaj PD-L1 i najviši proliferacijski indeks. Nakon neoadjuvantne terapije zabilježeno je značajno smanjenje veličine tumora, PD-L1 i TIL-a u ukupnoj skupini, dok je raspodjela intenziteta VEGF-a pokazala promjene u rezidualnoj bolesti. PD-L1 i VEGF nisu pokazali značajnu povezanost s RCB klasifikacijom niti su se pokazali neovisnim prediktorima odgovora na terapiju. Početna veličina tumora bila je jedini značajan prediktor lošijeg patološkog odgovora (OR = 2,60), uz umjerenu diskriminacijsku sposobnost u ROC analizi (AUC = 0,705). Analiza ukupnog preživljenja pokazala je statistički značajne razlike među molekularnim podtipovima, pri čemu je trostruko negativni podtip imao najnepovoljniji ishod, dok PD-L1 i VEGF nisu pokazali neovisnu prognostičku vrijednost.

Rezultati ukazuju da su PD-L1 i VEGF dinamični biomarkeri koji odražavaju kompleksne promjene u tumorskom mikrookolišu tijekom neoadjuvantnog liječenja, ali ne predstavljaju samostalne prediktivne niti prognostičke čimbenike u ovom terapijskom kontekstu.

Molekularni podtip i početno tumorsko opterećenje ostaju ključni klinički determinanti terapijskog ishoda. Ovi nalazi naglašavaju potrebu za integrativnim pristupom koji kombinira molekularne, imunološke i kliničko-patološke parametre u personaliziranom liječenju karcinoma dojke.

Ključne riječi: Ligand programirane stanične smrti 1 (PD-L1), Luminalni B HER2 pozitivan karcinom dojke, Luminalni B karcinom dojke, molekularni podtip, neoadjuvantna terapija (NAT), rezidualni tumor (RCB), tumor infiltrirajući limfociti (TIL), Trostruko negativan karcinom dojke (TNBC), ukupno preživljenje, Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF).

15. SUMMARY

Breast cancer represents a biologically heterogeneous disease in which immune and angiogenic mechanisms play a significant role in tumor progression and therapeutic response. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are key regulators of the tumor microenvironment; however, their interrelationship, dynamic changes during neoadjuvant treatment, and clinical relevance remain incompletely elucidated.

The aim of this study was to assess and compare PD-L1 and VEGF expression in breast cancer tissue before initiation of neoadjuvant therapy and after its completion, and to determine their association with molecular subtype, clinicopathological characteristics, tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), pathological response according to the Residual Cancer Burden (RCB) classification, and overall survival.

A total of 102 patients with luminal B, luminal B/HER2-positive, and triple-negative breast cancer were included. Analyses were performed on paired core biopsy specimens obtained prior to therapy and surgical resection specimens collected after completion of neoadjuvant treatment. Immunohistochemical assessment of PD-L1 and VEGF was conducted, and the results were correlated with clinicopathological parameters, RCB classification, and overall survival. Statistical analysis included non-parametric tests, Spearman's correlation, logistic regression, and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis.

The triple-negative subtype demonstrated the highest baseline PD-L1 expression and the highest proliferative index. Following neoadjuvant therapy, a significant reduction in tumor size, PD-L1 expression, and TIL levels was observed in the overall cohort, while changes in

VEGF intensity distribution were noted in residual disease. Neither PD-L1 nor VEGF expression showed a significant association with RCB classification, nor did they emerge as independent predictors of therapeutic response. Baseline tumor size was the only significant predictor of poor pathological response (OR = 2.60), demonstrating moderate discriminatory ability in ROC analysis (AUC = 0.705). Overall survival analysis revealed statistically significant differences among molecular subtypes, with the triple-negative subtype exhibiting the poorest outcome, whereas PD-L1 and VEGF did not demonstrate independent prognostic value.

These findings indicate that PD-L1 and VEGF are dynamic biomarkers reflecting complex therapy-induced changes within the tumor microenvironment; however, in this therapeutic context, they do not represent independent predictive or prognostic factors. Molecular subtype and baseline tumor burden remain the principal determinants of treatment outcome. The results underscore the need for integrative models combining molecular, immunological, and clinicopathological parameters in the personalization of breast cancer treatment.

Keywords: breast cancer, PD-L1, VEGF, neoadjuvant therapy, residual cancer burden, tumor-infiltrating lymphocytes, molecular subtype, overall survival.

16. LITERATURA

1. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol.* 2020;84:106535.
2. Katsura C, Ogunmwonyi I, Kankam HK, Saha S. Breast cancer: presentation, investigation and management. *Br J Hosp Med (Lond).* 2022;83(2):1–7.
3. Mamounas EP, Anderson SJ, Dignam JJ, Bear HD, Julian TB, Geyer CE, Jr., et al. Predictors of locoregional recurrence after neoadjuvant chemotherapy: results from combined analysis of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 and B-27. *J Clin Oncol.* 2012;30(32):3960–6.
4. Diéras V, Fumoleau P, Romieu G, Tubiana-Hulin M, Namer M, Mauriac L, et al. Randomized parallel study of doxorubicin plus paclitaxel and doxorubicin plus cyclophosphamide as neoadjuvant treatment of patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(24):4958–65.
5. Verbeke H, Van Hecke D, Bauraing C, Dierick AM, Colleye O, Dalle I, et al. Belgian Recommendations for Analytical Verification and Validation of Immunohistochemical Tests in Laboratories of Anatomic Pathology. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2024;32(1):1–16.
6. Schmid P, Cortes J, Dent R, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, et al. Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(6):556–67.
7. 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. *The Lancet Oncology.* 2018;19(1):40–50.
8. 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;26(2):259–71.
9. Egelston CA, Avalos C, Tu TY, Rosario A, Wang R, Solomon S, et al. Resident memory CD8+ T cells within cancer islands mediate survival in breast cancer patients. *JCI Insight.* 2019;4(19).
10. Yao L, Jia G, Lu L, Ma W. Breast Cancer Patients: Who Would Benefit from Neoadjuvant Chemotherapies? *Current Oncology.* 2022;29(7):4902–13.

11. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777–89.
12. Zhang P, Liu X, Cao X. Extracellular pattern recognition molecules in health and diseases. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(3):255–7.
13. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:443–73.
14. Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, Natkunam Y, Redd RA, Homer H, et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2690–7.
15. Nallasamy P, Chava S, Verma SS, Mishra S, Gorantla S, Coulter DW, et al. PD-L1, inflammation, non-coding RNAs, and neuroblastoma: Immuno-oncology perspective. *Semin Cancer Biol*. 2018;52(Pt 2):53–65.
16. Kim EY, Kim A, Kim SK, Chang YS. MYC expression correlates with PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2017;110:63–7.
17. 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;5(230):ra46.
18. Honda T, Egen JG, Lämmermann T, Kastenmüller W, Torabi-Parizi P, Germain RN. Tuning of antigen sensitivity by T cell receptor-dependent negative feedback controls T cell effector function in inflamed tissues. *Immunity*. 2014;40(2):235–47.
19. Wang Y, Liu C, Lyu R, Zhang Y. Application and prospects of ultrasound combined with immunotherapy in cancer treatment of intensive care. *Front Immunol*. 2025;16:1670527.
20. Wang Y, Zhu C, Song W, Li J, Zhao G, Cao H. PD-L1 Expression and CD8(+) T Cell Infiltration Predict a Favorable Prognosis in Advanced Gastric Cancer. *J Immunol Res*. 2018;2018:4180517.
21. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol*. 2016;7:550.
22. Li Z, Dong P, Ren M, Song Y, Qian X, Yang Y, et al. PD-L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3(+) Regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient. *J Cancer*. 2016;7(7):784–93.
23. Thompson ED, Taube JM, Asch-Kendrick RJ, Ogurtsova A, Xu H, Sharma R, et al. PD-L1 expression and the immune microenvironment in primary invasive lobular carcinomas of the breast. *Mod Pathol*. 2017;30(11):1551–60.

24. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438(7070):967–74.
25. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(26):2666–76.
26. Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1252–60.
27. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One*. 2014;9(4):e92921.
28. Arai T, Kokubo T, Tang R, Abo H, Terui A, Hirakawa J, et al. Tumor-associated neutrophils and macrophages exacerbate antidrug IgG-mediated anaphylactic reaction against an immune checkpoint inhibitor. *J Immunother Cancer*. 2022;10(12).
29. Hao M, Huang B, Wu R, Peng Z, Luo KQ. The Interaction between Macrophages and Triple-negative Breast Cancer Cells Induces ROS-Mediated Interleukin 1 α Expression to Enhance Tumorigenesis and Metastasis. *Adv Sci (Weinh)*. 2023;10(29):e2302857.
30. 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;13(4):228–41.
31. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017;127(8):2930–40.
32. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8⁺ T cells. *Cancer Res*. 2004;64(3):1140–5.
33. Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol*. 2005;17(2):133–44.
34. Cao Z, Scandura JM, Inghirami GG, Shido K, Ding BS, Rafii S. Molecular Checkpoint Decisions Made by Subverted Vascular Niche Transform Indolent Tumor Cells into Chemoresistant Cancer Stem Cells. *Cancer Cell*. 2017;31(1):110–26.

35. Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2005;7(6):513–20.
36. Dvir K, Giordano S, Leone JP. Immunotherapy in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2024;25(14).
37. Li X, Warren S, Pelekanou V, Wali V, Cesano A, Liu M, et al. Immune profiling of pre- and post-treatment breast cancer tissues from the SWOG S0800 neoadjuvant trial. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):88.
38. Naji O, Ghoulzani A, Rafii S, Sadiqi RU, Kone AS, Harmak Z, et al. Investigating tumor immunogenicity in breast cancer: deciphering the tumor immune response to enhance therapeutic approaches. *Front Immunol*. 2024;15:1399754.
39. Udovica S, Ferner M, Marhold M, Strasser-Weippl K, Bartsch R. ESMO 2024: highlights in breast cancer. *memo - Magazine of European Medical Oncology*. 2025;18(2):75–9.
40. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(9):810–21.
41. Choe EA, Cha YJ, Kim JH, Pyo KH, Hong MH, Park SY, et al. Dynamic changes in PD-L1 expression and CD8(+) T cell infiltration in non-small cell lung cancer following chemoradiation therapy. *Lung Cancer*. 2019;136:30–6.
42. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med*. 2015;21(1):24–33.
43. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020;77(2):181–5.
44. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*. 1992;13(1):18–32.
45. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267(16):10931–4.
46. Boockch CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(7):506–16.
47. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res*. 1999;59(14):3374–8.
48. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci*. 1999;19(14):5731–40.

49. Harmey JH, Dimitriadis E, Kay E, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. *Ann Surg Oncol*. 1998;5(3):271–8.
50. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol*. 2000;192(2):150–8.
51. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res*. 1996;56(9):2013–6.
52. Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer*. 2001;85(2):273–8.
53. Chung J, Bachelder RE, Lipscomb EA, Shaw LM, Mercurio AM. Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J Cell Biol*. 2002;158(1):165–74.
54. Chilov D, Kukk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem*. 1997;272(40):25176–83.
55. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991;266(18):11947–54.
56. Bachelder RE, Ribick MJ, Marchetti A, Falcioni R, Soddu S, Davis KR, et al. p53 inhibits alpha 6 beta 4 integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *J Cell Biol*. 1999;147(5):1063–72.
57. Weaver VM, Lelièvre S, Lakins JN, Chrenek MA, Jones JC, Giancotti F, et al. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*. 2002;2(3):205–16.
58. Zahir N, Lakins JN, Russell A, Ming W, Chatterjee C, Rozenberg GI, et al. Autocrine laminin-5 ligates alpha6beta4 integrin and activates RAC and NFkappaB to mediate anchorage-independent survival of mammary tumors. *J Cell Biol*. 2003;163(6):1397–407.

59. Farahani M, Treweeke AT, Toh CH, Till KJ, Harris RJ, Cawley JC, et al. Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. *Leukemia*. 2005;19(4):524–30.
60. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*. 2001;15(7):807–26.
61. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res*. 1999;59(3):728–33.
62. De Benedetti A, Harris AL. eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(1):59–72.
63. Bellamy WT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies. *Semin Oncol*. 2001;28(6):551–9.
64. Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 1998;79(2):144–6.
65. Kranz A, Mattfeldt T, Waltenberger J. Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer*. 1999;84(3):293–8.
66. Murr MM, Sarr MG, Oishi AJ, van Heerden JA. Pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*. 1994;44(5):304–18.
67. Chung JY, Song Y, Wang Y, Magness RR, Zheng J. Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2484–90.
68. Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 2001;61(15):5736–40.
69. Stopeck AT, Unger JM, Rimsza LM, Bellamy WT, Iannone M, Persky DO, et al. A phase II trial of single agent bevacizumab in patients with relapsed, aggressive non-Hodgkin lymphoma: Southwest oncology group study S0108. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(5):728–35.
70. He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell*. 1997;90(4):739–51.

71. Barr MP, Byrne AM, Duffy AM, Condrón CM, Devocelle M, Harriott P, et al. A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br J Cancer*. 2005;92(2):328–33.
72. Fujii T, Hirakata T, Kurozumi S, Tokuda S, Nakazawa Y, Obayashi S, et al. VEGF-A Is Associated With the Degree of TILs and PD-L1 Expression in Primary Breast Cancer. *In Vivo*. 2020;34(5):2641–6.
73. Kiso M, Tanaka S, Saji S, Toi M, Sato F. Long isoform of VEGF stimulates cell migration of breast cancer by filopodia formation via NRP1/ARHGAP17/Cdc42 regulatory network. *Int J Cancer*. 2018;143(11):2905–18.
74. Liang Y, Brekken RA, Hyder SM. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(3):905–19.
75. Miralem T, Steinberg R, Price D, Avraham H. VEGF(165) requires extracellular matrix components to induce mitogenic effects and migratory response in breast cancer cells. *Oncogene*. 2001;20(39):5511–24.
76. Al Kawas H, Saaid I, Jank P, Westhoff CC, Denkert C, Pross T, et al. How VEGF-A and its splice variants affect breast cancer development - clinical implications. *Cell Oncol (Dordr)*. 2022;45(2):227–39.
77. Deng X, Liu J. Narrative review on efficacy and safety of anti-angiogenesis in combination with immunotherapy in the treatment of breast cancer. *Transl Breast Cancer Res*. 2024;5:32.
78. Chen Z, Han F, Du Y, Shi H, Zhou W. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):70.
79. Giri S, Lamichhane G, Pandey J, Khadayat R, K CS, Devkota HP, et al. Immune Modulation and Immunotherapy in Solid Tumors: Mechanisms of Resistance and Potential Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 2025;26(7).
80. Zhou Y, Liu Z, Yu A, Zhao G, Chen B. Immune Checkpoint Inhibitor Combined with Antiangiogenic Agent Synergistically Improving the Treatment Efficacy for Solid Tumors. *Immunotargets Ther*. 2024;13:813–29.
81. Shi Z, Kuai M, Li B, Akowuah CF, Wang Z, Pan Y, et al. The role of VEGF in Cancer angiogenesis and tumorigenesis: Insights for anti-VEGF therapy. *Cytokine*. 2025;189:156908.

82. Lee C, Kim MJ, Kumar A, Lee HW, Yang Y, Kim Y. Vascular endothelial growth factor signaling in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):170.
83. Hammerl D, Martens JWM, Timmermans M, Smid M, Trapman-Jansen AM, Foekens R, et al. Spatial immunophenotypes predict response to anti-PD1 treatment and capture distinct paths of T cell evasion in triple negative breast cancer. *Nat Commun.* 2021;12(1):5668.
84. Hussein MR, Hassan HI. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *J Clin Pathol.* 2006;59(9):972–7.
85. Thompson E, Taube JM, Elwood H, Sharma R, Meeker A, Warzecha HN, et al. The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. *Mod Pathol.* 2016;29(3):249–58.
86. Chin Y, Janseens J, Vandepitte J, Vandenbrande J, Opdebeek L, Raus J. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. *Anticancer Res.* 1992;12(5):1463–6.
87. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006;24(34):5373–80.
88. Wan S, Pestka S, Jubin RG, Lyu YL, Tsai YC, Liu LF. Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS One.* 2012;7(3):e32542.
89. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med.* 2006;203(5):1259–71.
90. Golden EB, Chhabra A, Chachoua A, Adams S, Donach M, Fenton-Kerimian M, et al. Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours: a proof-of-principle trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(7):795–803.
91. Oda N, Shimazu K, Naoi Y, Morimoto K, Shimomura A, Shimoda M, et al. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;136(1):107–16.

92. Mulligan AM, Pinnaduwege D, Tchatchou S, Bull SB, Andrulis IL. Validation of Intratumoral T-bet⁺ Lymphoid Cells as Predictors of Disease-Free Survival in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(1):41–8.
93. Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V, Conte P, Delalogue 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;26(8):1698–704.
94. Fang Y, Wang L, Wan C, Sun Y, Van der Jeught K, Zhou Z, et al. MAL2 drives immune evasion in breast cancer by suppressing tumor antigen presentation. *J Clin Invest.* 2021;131(1).
95. 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;33(9):983–91.
96. Li M, Quintana A, Alberts E, Hung MS, Boulat V, Ripoll MM, et al. B Cells in Breast Cancer Pathology. *Cancers (Basel).* 2023;15(5).
97. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541–50.
98. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell.* 2015;162(6):1229–41.
99. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, et al. Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):1949–55.
100. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):2959–66.
101. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo 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;31(7):860–7.

102. 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;2(10):1354–60.
103. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(4):326–32.
104. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* 2011;71(14):4809–20.
105. 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;71(3):209–49.
106. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747–52.
107. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869–74.
108. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis. *Lancet Oncol.* 2018;19(1):40–50.
109. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259–71.
110. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2108–21.
111. Schmid P, Cortes J, Dent R, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, et al. Event-free survival with pembrolizumab in early triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(6):556–67.
112. Emens LA. Breast cancer immunotherapy: facts and hopes. *Clin Cancer Res.* 2018;24(3):511–20.
113. 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;2(4):361–70.

114. Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, et al. PD-L1 expression in breast carcinoma and association with clinical outcomes. *Hum Pathol.* 2016;47(1):52–63.
115. Denkert C, Seither F, Schneeweiss A, Link T, Blohmer JU, Just M, et al. Integrated analysis of biomarkers in neoadjuvant trials. *Ann Oncol.* 2021;32(7):866–75.
116. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249–57.
117. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, et al. VEGF-A modulates immune response by inhibiting dendritic cell maturation and promoting regulatory T cells. *Cancer Res.* 2015;75(7):121–31.
118. Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(5):325–40.
119. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2007;25(28):4414–22.
120. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer. *Lancet.* 2014;384(9938):164–72.
121. Denkert C, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):105–13.
122. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):2959–66.
123. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are prognostic in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):2959–66.
124. Denkert C, Darb-Esfahani S, Loibl S, Anagnostopoulos I, Jöhrens K, Kayser G, et al. Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2012;65(7):575–80.
125. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet.* 2017;389(10074):1134–50.
126. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *Lancet.* 2021;397(10286):1750–69.

127. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):450–61.
128. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10.
129. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252–64.
130. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in tumors. *Sci Transl Med*. 2012;4(127):127ra37.
131. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Puztai 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;20(10):2773–82.
132. Solinas C, Carbognin L, De Silva P, Criscitiello C, Lambertini M. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2017;54:1–9.
133. Loi S. Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncoimmunology*. 2013;2(7):e24720.
134. Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(21):2460–7.
135. Adams S, Loi S, Toppmeyer D, Cescon DW, De Laurentiis M, Nanda R, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2019;30(3):397–404.
136. Emens LA, Cruz C, Eder JP, Braiteh F, Chung C, Tolaney SM, et al. Long-term clinical outcomes in metastatic breast cancer treated with atezolizumab. *JAMA Oncol*. 2019;5(1):74–82.
137. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy. *Science*. 2005;307(5706):58–62.
138. Huang Y, Goel S, Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Vascular normalization as an emerging strategy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(10):623–36.
139. Motz GT, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):702–11.
140. Hegde PS, Wallin JJ, Mancao C. Predictive markers of anti-VEGF and emerging role of immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(19):4673–80.

141. Allen E, Jabouille A, Rivera LB, Lodewijckx I, Missiaen R, Steri V, et al. Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity. *Sci Transl Med*. 2017;9(385):eaak9670.
142. Dushyanthen S, Beavis PA, Savas P, Teo ZL, Zhou C, Mansour M, et al. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):1000–10.
143. Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Kockx M, et al. IMpassion130 final OS analysis. *Ann Oncol*. 2021;32(8):983–93.
144. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in advanced TNBC (KEYNOTE-355). *N Engl J Med*. 2020;382(9):810–21.
145. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(11):674–90.
146. Symmans WF. Residual cancer burden classification and prognosis. *Breast Cancer Res*. 2013;15(5):S7.
147. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2013;19(19):5533–40.
148. Pelekanou V, Carvajal-Hausdorf DE, Altan M, Wasserman B, Carvajal-Hausdorf C, Wimberly H, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):91.
149. Grandal B, Evren S, Simal-Gandara J, et al. PD-L1 expression after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancers is associated with aggressive residual disease. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1246.
150. Wang RX, Chen S, Huang L, et al. Monitoring serum VEGF levels in neoadjuvant chemotherapy for patients with triple-negative breast cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:1459-1466.
151. Gradishar WJ, Moran MS, Abraham J, Abramson V, Aft R, Agnese D, et al. Breast Cancer, Version 3.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2024;22(5):331–57.
152. Aebi S, Davidson T, Gruber G, Cardoso F. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 6:vi12–24.

153. Giordano SH, Franzoi MAB, Temin S, Anders CK, Chandarlapaty S, Crews JR, et al. Systemic Therapy for Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2022;40(23):2612–35.
154. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(9):810-21.
155. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2019;380(7):617-28.
156. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, et al. Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy and impact on breast cancer recurrence and survival. *Clin Cancer Res.* 2020;26(12):2838-48.
157. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *Lancet.* 2021;397(10286):1750-69.
158. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.*

17. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 4. travnja 1969. u Zadvarju. Završila sam srednju školu ŠC „Ruđer Bošković“ smjer zdravstvenog tehničara u Osijeku.

Diplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike završila sam na Medicinskom fakultetu u Osijeku 2025. godine.

Zaposlena sam na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek od 1991. godine.

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti upisala sam 2020./2021. godine.

18. POPIS PUBLIKACIJA

1. Laryngopharyngeal Reflux Scoring in a Pediatric Population / Journal of Clinical Medicine, 12 (2023), 23; 7425. Abičić, Ivan; Čović, Marina; Zjalić, Milorad; Bakula, Marina...
2. Expressio of Vascular Endothelial Growth Factor – A (VEGF-A) in Adenocarcinoma and Squamous Cell Cervical Cancer and Its Impact on Disease Progression: Single Institution Experience, Medicina 2023, 59, 1189. <https://doi.org/10.3390/medicina59071189> Ivana Piškur, Zlatko Topolovec, Marina Bakula,...
3. Analysis of Uterine Morphology in ovariectomized rats treated With Alendronate and Hop Extract Using open – Source Software. 2022;41:193-202 doi: 105566/ias.2791 Edi Rođak, Nada Oršolić, Robert Grgac, Jasmina Rajc, Marina Bakula
4. VIRCHOWS ARCHIV, European Journal of Pathology, September, 2017. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors, estrogen receptor beta, androgen receptors, MLH1, MSH6, PMS2 and MSH2 proteins in triple negative breast carcinoma. B. Dmitrovic, M. Bakula, Monika Galic Krnjaic, A. Mandic
5. Faculty of Medicine Osijek, Dept. Of Pathology, Croatia CROSBID 392831 Histokemijske i imunohistokemijske metode u prikazu neurosekretornih granula u citoplazmi stanice, 2013.

SUDJELOVANJA NA SKUPOVIMA

1. Udruženje laboratorijskih i sanitarnih zdravstvenih stručnjaka (ULISZS) – 1. Kongres s međunarodnim sudjelovanjem u Sarajevu, travanj 2024.

„Molekularna dijagnostika malignog melanoma“ – dobila priznanje za najbolji rad. Skup Hrvatskih društava za patologiju i citologiju, studeni 2023.

Oralna prezentacija „ Ekspresija androgenih receptora u trostruko negativnom karcinomu dojke“, Knjiga sažetaka, str. 117.

2. Kongres Strukovnog razreda MLD HKZR s međunarodnim sudjelovanjem, rujan, 2023. Zagreb

„Gensko profiliranje tumora u patologiji“, Knjiga sažetaka – 12. str.

3. Joint Meeting of Croatian Societies for Pathology and Clinical Cytology; October 2 – 5, 2025. „Gomory – histokemijska metoda impregnacije srebrom za dokazivanje retikulinskih vlakana“.