

Usporedba dva načina procjene tumorskog infiltrata limfocita (TIL) u HR+/HER2- karcinomu dojke i njihova povezanost s kliničkopatološkim karakteristikama

Kralj, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:091717>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Lucija Kralj

USPOREDBA DVA NAČINA PROCJENE TUMORSKOG INFILTRATA LIMFOCITA

(TIL) U HR+/HER2- KARCINOMU DOJKE I NJIHOVA POVEZANOST S

KLINIČKOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Lucija Kralj

USPOREDBA DVA NAČINA PROCJENE TUMORSKOG INFILTRATA LIMFOCITA

(TIL) U HR+/HER2- KARCINOMU DOJKE I NJIHOVA POVEZANOST S

KLINIČKOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Emina Babarović, dr.med.

Diplomski rad ocijenjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv.prof.dr.sc. Ita hadžisejdić, dr.med.

2. Doc.dr.sc. Manuela Avirović, dr.med.

3. Doc.dr.sc. Damir Grebić, dr.med.

Rad sadrži 47 stranica, 1 sliku, 6 tablica i 86 literaturnih navoda.

Zahvala

Hvala svima koji su me na bilo koji način podržali tijekom studija.

Posebno hvala mentorici doc.dr.sc. Emini Babarović na izdvojenom vremenu, podršci prilikom provođenja istraživanja i izrade ovog rada, kao i inspiraciji za budući rad.

Popis skraćenica i akronima

ACOG- engl. American College of Obstetricians and Gynecologists; Američko društvo ginekologa i opstetričara

ACS- engl. American cancer society; Američko onkološko društvo

ADH- atipična duktalna hiperplazija

aGnRH- engl. gonadotropin-releasing hormone agonist; agonist gonadotropin-oslobađajućeg hormona

AI- inhibitor aromataze

AJCC- engl. American Joint Committee on Cancer; Američko društvo za rak

AKT- proteinska kinaza B

ASCO- engl. American Society of Clinical Oncology; Američko društvo za kliničku onkologiju

BBD- engl. benign breast disease; benigna bolest dojke

BC- engl. breast cancer; karcinom dojke

BCS- engl. breast-conserving surgery; poštedni kirurški zahvat na dojci

BRCA- engl. breast cancer gene; gen za karcinom dojke

CAP- engl. College of American Pathologists; Američko društvo patologa

CDH1- engl. cadherin-1; kadherin-1

CDK- engl. cyclin-dependent kinase; ciklin-ovisna kinaza

CEP17- engl. chromosome enumeration probe 17; enumeracijski biljeg 17. kromosoma

CT- centar tumora

CTC- engl. circulating tumor cells; cirkulirajuće tumorske stanice

ctDNA- engl. circulating tumor DNA; cirkulirajuća tumorska DNA

DCIS- engl. ductal carcinoma in situ; duktalni karcinom in situ

DFS- engl. disease-free survival; preživljenje bez povrata bolesti

ER- estrogenski receptor

ER α - estrogenski receptor alfa

ESR 1- gen za estrogenski receptor 1

ET- endokrina terapija

FOXA1- engl. forkhead box A1; aktivator transkripcije

FOXP3- engl. forkhead box P3; regulator transkripcije

G- (histološki) gradus

GATA3- transkripcijski faktor

HE- hemalaun- eozin

HER2- engl. human epidermal growth factor receptor 2; receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2

HNL- hormonsko nadomjesno liječenje

HR- hormonski receptor

IBC-NST- engl. invasive breast carcinoma of no special type; invazivni karcinom ne-specijalnog tipa

ICC- engl. intraclass correlation coefficient; interklasni koeficijent korelacije

IF- invazivna fronta

IHC- engl. immunohistochemistry; imunohistokemija

ILC- engl. invasive lobular carcinoma; invazivni lobularni karcinom

ISH- metoda in situ hibridizacije

KT- kemoterapija

LA- luminalni A podtip karcinom dojke

LB- luminalni B podtip karcinoma dojke

LCIS- engl. lobular carcinoma in situ; lobularni karcinom in situ

LPBC- engl. lymphocyte-predominant breast cancer; limfocitno-predominantni karcinom dojke

LVI- limfovaskularna invazija

mi-RNA- mikro-RNA

mTOR- engl. mammalian target of rapamycin; meta rapamicina u sisavaca, proteinska kinaza u signalnim putovima

NACT- engl. neoadjuvant chemotherapy; neoadjuvantna kemoterapija

NCI- engl. National Cancer Institute; Nacionalni institut za rak

NEC- neuroendokrini karcinom

NET- neuroendokrini tumor

OS- engl. overall survival; sveukupno preživljenje

pCR- engl. pathologic complete response; kompletni patološki odgovor

PI3K- engl. fosfatidilinozitol-3-kinaza

PIK3CA- engl. phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha; katalitička podjedinica
alfa izoforme fosfatidilinozitol-3-kinaze

PR- progesteronski receptor

RD- engl. residual disease; rezidualna (ostatna) bolest

RH- Republika Hrvatska

RS- engl. relative survival; relativno preživljenje

RT- radioterapija

SAD- Sjedinjene Američke Države

SHBG- engl. sex hormone binding globulin; globulin koji veže spolne hormone

SNLB- engl. sentinel lymph node biopsy; biopsija sentinel limfnog čvora

Tfh- engl. T follicular helper cells; folikularnepomagačke T stanice

TGFβ- engl. transforming growth factor beta; transformirajući faktor rasta beta

Th- engl. helper T-cells; pomagačke T stanice

TIL- tumor-infiltrirajući limfociti

TLS- engl. tertiary lymphoid structure; tercijarna limfoidna struktura

TME- engl. tumor microenvironment; tumorski mikrookoliš

TNBC- engl. triple negative breast cancer; trostruko negativni karcinom dojke

Treg- regulatorne T stanice

VEGF- engl. vascular endothelial growth factor; vaskularni endotelni faktor rasta

WHO- engl. World Health Organization, Svjetska zdravstvena organizacija

Sadržaj

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1. Klasifikacija karcinoma dojke..... | 1 |
| 1.1.1. LA i LB HER2- BC..... | 1 |
| 1.1.2. Histološki tipovi HR+/HER2- BC..... | 2 |
| 1.2. Epidemiologija HR+/HER2- BC..... | 4 |
| 1.3. Etiologija i patogeneza HR+/HER2- BC..... | 5 |
| 1.4. Klinička slika..... | 7 |
| 1.5. Dijagnostika HR+/HER2- BC..... | 8 |
| 1.6. Terapijski postupci u HR+/HER2- BC..... | 10 |
| 1.6.1. Rani i lokalno prošireni HR+/HER2- BC..... | 10 |
| 1.6.1.1. Lokoregionalno liječenje..... | 10 |
| 1.6.1.2. Sistemsko liječenje..... | 10 |
| 1.6.2. Lokalno recidivirajući i metastatski HR+/HER2- BC..... | 12 |
| 1.6.3. Praćenje..... | 12 |
| 1.7. Prognostički i prediktivni čimbenici..... | 12 |
| 1.8. Tumor-infiltrirajući limfociti..... | 14 |
| 2. Ciljevi istraživanja..... | 16 |
| 2.1. Glavni ciljevi istraživanja..... | 16 |
| 2.2. Specifični ciljevi istraživanja..... | 16 |
| 3. Ispitanici, materijali i postupci..... | 17 |
| 3.1. Ispitanici i materijali..... | 17 |
| 3.2. Postupci..... | 18 |
| 3.2.1. Određivanje prognostičkih parametara..... | 18 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2. Procjena gustoće tumorskog limfocitnog infiltrata (TIL)..... | 18 |
| 3.2.2.1. Procjena TIL prema preporukama Međunarodne radne skupine za imuno-onkološke biomarkere..... | 18 |
| 3.2.2.2. Procjena TIL prema studiji Klinturpa i suradnika..... | 19 |
| 3.2.3. Statistička obrada podataka..... | 20 |
| 4. Rezultati..... | 21 |
| 4.1. Kliničkopatološke karakteristike..... | 21 |
| 4.2. Usporedba metode procjene TIL prema preporukama Međunarodne radne skupine za imuno-onkološke biomarkere i metode procjene prema studiji Klinturpa i suradnika.. | 23 |
| 4.3. Usporedba sTIL u primarnom tumoru, RD nakon NACT i metastatskom tumoru/recidivu..... | 24 |
| 4.4. Prisustvo sTIL u odnosu na kliničkopatološke karakteristike..... | 25 |
| 4.5. Analiza sveukupnog preživljenja i preživljenja bez povrata bolesti..... | 28 |
| 5. Rasprava..... | 30 |
| 6. Zaključak..... | 36 |
| Sažetak..... | 37 |
| Summary..... | 38 |
| Literatura..... | 39 |
| Životopis..... | 47 |

1. Uvod

1.1. Klasifikacija karcinoma dojke

Karcinomi dojke (BC, *breast cancer*) predstavljaju morfološki i biološki heterogenu skupinu bolesti s različitim kliničkim tijekom i terapijskim odgovorom. Stoga se klasificiraju na osnovu različitih karakteristika (1, 2). Morfologija tkiva je osnova klasifikacije Svjetske Zdravstvene organizacije (WHO, *World Health Organization*) (1, 3). Među histološkim tipovima koje obuhvaća, najzastupljeniji je invazivni karcinom ne-specijalnog tipa (IBC-NST, *invasive breast carcinoma of no special type*). Ostali se označuju kao „posebni oblici“, karakterizirani jedinstvenom, karakterističnom histološkom slikom, molekularnim profilom i kliničkim tijekom (2, 4). Molekularna se klasifikacija temelji na rezultatima analiza genske ekspresije *microarray* tehnikom početkom 21. stoljeća. Prema istoj se razlikuju tzv. „molekularni podtipovi“ BC, karakterizirani sličnostima u genskoj ekspresiji, fenotipu, prognozi i liječenju. Radi se o luminalnim A (LA), luminalnim B (LB), karcinomima s prekomjernom ekspresijom receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2+, *human epidermal growth factor receptor 2-positive*) i trostruko negativnim BC (TNBC, *triple negative breast cancer*) (2).

1.1.1. LA i LB HER2- BC

Genetski profil luminalnih BC odgovara onom u normalnih luminalnih epitelnih stanica dojke (1). Povećana ekspresija gena za estrogenske i progesteronske receptore (ER, PR), uz izostanak ekspresije HER2 gena, karakteristika je LA BC. LB BC također pokazuju ekspresiju gena za ER. U ovisnosti o ekspresiji HER2 gena, razlikuju se LB HER2 negativni (LB HER2-) te LB HER2 pozitivni (LB HER2+) BC. U LB HER2- BC prisutna je ekspresija gena povezanih s proliferativnom aktivnošću. Ekspresija gena za PR je slaba ili odsutna (1, 2, 4).

Tehnike genetskog profiliranja pokazale su se skupim i složenim u svakodnevnoj praksi. Molekularni se podtipovi stoga rutinski definiraju imunohistokemijski (IHC, *immunohistochemistry*) dokazanom ekspresijom hormonskih receptora (HR), HER2 i markera

prolifracije Ki67 (1, 2, 4). U tom se slučaju radi o „surogatnim“ („receptorskim“) podtipovima, koji djelomično odgovaraju molekularnim (1, 2, 4, 5). Surogatni LA i LB HER2- podtipovi određeni su pozitivnom ekspresijom HR i odsustvom HER2. Stoga se radi o HR pozitivnim i HER2 negativnim (HR+/HER2-) BC. Razlikuje ih veći udio stanica u proliferaciji (visok Ki67) te slabija PR ekspresija u LB HER2- u odnosu na LA (1, 4, 5). Najveći udio BC, njih 60-70%, je LA podtipa. LB HER2- čine 10-20% svih slučajeva. Udio HER2+ iznosi 10-15%, neovisno o HR ekspresiji. TNBC fenotip se nalazi u 10-15% slučajeva BC (5).

1.1.2. Histološki tipovi HR+/HER2- BC

Histološke varijante koje su najčešće HR+/HER2- fenotipa uključuju IBC-NST, invazivni lobularni karcinom (ILC, *invasive lobular carcinoma*), tubularni, mikropapilarni, mucinozni i kribriformni karcinom te neuroendokrine novotvorine (1, 5, 6).

IBC-NST obuhvaćaju sve karcinome čija histološka slika ne odgovara onoj u posebnih oblika (3, 6). Približno 40-80% svih invazivnih karcinoma odgovara ovom tipu (6). Radi se o morfološki najheterogenijem tipu, unutar kojega WHO klasifikacija opisuje različite histološke uzorke: medularni, pleomorfni, koriokarcinomatozni, melanocitni, onkocitni, sebacealni, bogat lipidima ili glikogenom i svijetlostanični, kao i karcinom sa neuroendokrinom diferencijacijom ili stromalnim orijaškim stanicama nalik osteoklastima (3). Opisuju se i miješani oblici IBC-NST. Uz potonji, u istom se tumoru nalazi histološki uzorak koji odgovara nekom od posebnih tipova, pri čemu udio posljednjeg iznosi 10-90% (3, 6, 7). Stroma pokazuje varijabilan stupanj dezmodoplastične reakcije. Približno 96% HR+ BC histološki odgovara IBC-NST, a ER pozitivitet je izražen u 61-80% IBC-NST. Pozitivna ekspresija HER2 prisutna je u 15% slučajeva (6). **ILC** se nalazi u 5-15% slučajeva BC i najzastupljeniji je među posebnim histološkim oblicima (4). U klasičnom obliku, tumor je građen od malih, uniformnih diskohezivnih stanica, koje pojedinačno ili u nizovima infiltriraju ostatne strukture dojke. Karakterističan je i tzv. targetoidni uzorak, odnosno koncentričan periduktalni i/ili perilobularni raspored staničnih nizova (3, 4, 6). Uz navedenu, opisuju se i solidne, trabekularne, alveolarne,

histiocitoidne i pleomorfne varijante (3, 6). Pojava diskohezije posljedica je gubitka gena za kadherin-1 (CDH1, *cadherin-1*) na kromosomu 16q te odusustva e-kadherina, što se potvrđuje IHC. Ekspresija ER je prisutna u 95-99%, a PR u 60-70% klasičnih varijanti. U 30-85% slučajeva se radi o LA, a u 20-64% o LB BC (4). Ekspresija HER2 je odsutna u gotovo svim slučajevima klasičnih varijanti, a nešto je učestalija u pleomorfnim varijantama. **Tubularni** se karcinom očituje prisustvom angularnih ili ovalnih tubularnih struktura otvorenih lumena, obloženih jednim slojem kubičnih ili cilindričnih stanica sa znakovima blage atipije. Gotovo u svim slučajevima radi se o luminalnim podtipovima, s izraženom ekspresijom ER i odsustvom HER2. Ekspresija PR je pozitivna u 69-75% slučajeva (4, 6). **Mucinozni** je karcinom karakteriziran prisustvom obilnog ekstracelularnog mucina koji okružuje nakupine tumorskih stanica. Najčešće se radi o LA podtipovima, s pozitivnom ER i negativnom HER2 ekspresijom u gotovo svim slučajevima (2, 4, 6). U **invazivnom mikropapilarnom** karcinomu, stanice čine nakupine nalik morulama bez fibrovaskularnih držaka, a u **kribriformnom** karcinomu se nalaze u vidu nakupina koje tvore istoimeni uzorak, uz katkada prisutnu mukoznu sekreciju ili mikrokalifikate. U oba slučaja nalazi se pozitivna ekspresija HR. Amplifikacija HER2 je odsutna u 90-98% slučajeva kribriformnog, a varijabilna u mikropapilarnog BC. **Neuroendokrine novotvorine** se histološki očituju solidnim nakupinama ili trabekularnim rasporedom tumorskih stanica. Karakterističan je izgled kromatina koji podsjeća na zrno soli i papra („*salt and papper chromatin*”). Ukoliko su niskog ili umjerenog gradusa, radi se o neuroendokrinim tumorima (NET), dok se u slučaju visokog gradusa radi o neuroendokrinim karcinomima (NEC). Ovisno o veličini stanica, razlikuju se krupunostanični i sitnostanični NEC. Imunohistokemijski se dokaže ekspresija sinaptofizina A i kromogranina. Ekspresija HR se dokaže u 30-100% slučajeva, a ekspresija HER2 je u većini slučajeva negativna (2, 6).

1.2. Epidemiologija HR+/HER2- BC

Karcinom dojke je najčešća maligna bolest u žena. U svijetu je 2020. godine dijagnosticirano 2,3 milijuna novih slučajeva (8). Također se radi o najzastupljenijem malignom tumoru žena u Republici Hrvatskoj (RH), s udjelom od 25% (9). Najvišu incidenciju bilježe razvijene zemlje zapadnog svijeta, dok je najniža u nerazvijenim azijskim zemljama i Supsaharskoj Africi (5, 10). Incidencija dostiže vrhunac oko 60. godine, pri čemu žene afričkog i azijskog porijekla obolijevaju u prosječno nižoj dobi u odnosu na bjelačku populaciju (11). Unaprjeđenje liječenja i rana dijagnostika doveli su do pada smrtnosti u razvijenim zemljama od 80-ih godina 20. stoljeća (10, 12). S druge strane, problem visokog mortaliteta i dalje perzistira među zemljama u razvoju (5, 10, 13).

Prema izvješću Nacionalnog instituta za rak (NCI, *National Cancer Institute*), HR+/HER2-BC imaju najvišu incidenciju i stopu 5-godišnjeg relativnog preživljenja (RS, *relative survival*) među svim podtipovima. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), iste su iznosile 87,4/100 000, odnosno 94,4% (14). Osim toga, HR+/HER2- BC čine najveći udio među podtipovima BC u svim dobnim, rasnim i etničkim skupinama (12-15). Ipak, najviše su stope novootkrivenih slučajeva u bjelačkoj populaciji, zatim u crnačkoj, a najniže u Azijata i ostalih etničkih skupina (12, 14). Među dobnim skupinama, populacijskim studijama su utvrđene veće proporcije HR+/HER2- BC u starijih u odnosu na mlađe pacijentice (8, 15). Rezultati statističke analize Američkog onkološkog društva (ACS, *American cancer society*) i pojedinih populacijskih studija ukazuju na trend porasta incidencije HR+/HER2- BC posljednjih desetljeća (12, 13). Navedena se pojava povezuje s promjenama u načinu života povezanim s povećanim rizikom nastanka ovog podtipa. Među istima se ističu promjene u reproduktivnom životu, pretilost, konzumacija alkohola i pušenje (12, 13, 15). Razlike u zastupljenosti navedenih faktora također bi mogle objasniti opisane rasne i etničke varijacije. Osim toga, iste se tumače razlikama u genskoj ekspresiji (12).

1.3. Etiologija i patogeneza HR+/HER2- BC

Lumeni izvodnih kanala i alveola mliječnih žlijezda obloženi su jednim slojem epitelnih luminalnih stanica, koje okružuje sloj bazalnih mioepitelnih stanica, uz prisustvo istoimenih progenitora i bipotentnih matičnih stanica (16-18). Iako je patogeneza BC još uvijek nerazjašnjena, smatra se da do razvoja karcinoma može doći malignom alteracijom bilo koje od navedenih stanica. Podtip koji će se razviti pri tome je određen unutarstaničnim onkogenim zbivanjima, a ne tipom izvorne stanice (17-19). U navedena su zbivanja uključeni genetski, hormonalni i okolišni faktori (16). Od genetskih faktora, s nastankom HR+/HER2- BC povezuju se dobitak p kraka 1. i gubitak q kraka 16. kromosoma (5, 16). Među onkogenim mutacijama, najznačajnije su mutacije koje dovode do konstitutivne aktivnosti katalitičke podjedinice alfa izoforme fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*; PIK3CA, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*). Posljedično, dolazi do pojačane aktivacije signalnoga puta posredovanog proteinskim kinazama PI3K, AKT i *mammalian target of rapamycin* (PI3K/AKT/mTOR), te nekontrolirane stanične proliferacije i mitotičke aktivnosti (16, 17). Od ostalih mutacija, utvrđene su mutacije aktivatora transkripcije *Forkhead box A1* (FOXA1) i transkripcijskog faktora GATA3 (5, 19).

Povećan rizik utvrđen u stanjima produljene ekspozicije endogenim estrogenima, kao i korištenjem egzogenih estrogena, ukazuje na ulogu hormonskog djelovanja u etiologiji ER+ BC (11, 18, 20). Učinak estrogena ostvaruje se stvaranjem kompleksa s alfa estrogenskim receptorima (ER α), koji izravno ili posredno sudjeluju u transkripciji gena uključenih u regulaciju staničnog rasta, diferencijacije, apoptoze i angiogeneze. Fiziološki, navedeno se u tkivu dojke očituje razvojnim procesima i promjenama povezanim s reproduktivnim životom (17, 21, 22). Međutim, takvi pro-proliferacijski učinci povećavaju vjerojatnost replikacijskih grešaka i potencijalne maligne alteracije u slučajevima prolongirane ekspozicije (21). U slučaju HR+/HER2- BC, istraživanjima je utvrđen veći utjecaj nulipariteta, prvog porođaja u kasnijoj dobi i hormonskog nadomjesnog liječenja (HNL) (23-25). S druge strane, dokazi o rizičnom

utjecaju rane menarhe i kasne menopauze su oprečni (11, 23-25). Dokazi o riziku korištenja hormonske kontracepcije također se razlikuju od statistički značajnih u jednom, do blago povišenog rizika u drugim istraživanjima (20, 23, 25). Protektivan je učinak utvrđen prvim porođajem u ranijoj dobi i naknadnim porođajima, što se objašnjava smanjenom razinom plazmatskih estrogena u trudnoći (25). Smanjenje rizika dojenjem utvrđeno je neovisno o podtipu, ukazujući na moguće složenije protektivne mehanizame od isključivo hormonskih (25, 26). Povećana tjelesna masa i pretilost također su se pokazale rizičnim čimbenicima za nastanak HR+/HER2- BC, isključivo u postmenopauzalnih žena (23, 26). Masno tkivo dojke, posredstvom enzima aromataze, sintetizira estradiol iz cirkulirajućih prekursora, a prestankom ovarijske funkcije u postmenopauzi postaje glavni izvor endogenog estrogena (18, 21). Od životnih navika, rizik je utvrđen pri konzumaciji alkohola, pušenju i određenim prehrambenim navikama. Ostali faktori rizika uključuju BC i druge bolesti u osobnoj i obiteljskoj anamnezi, dob i spol. Konzumacija alkohola povezana je s povećanim rizikom za LA, a pušenje s LA i LB HER2- BC. U podlozi je vjerojatno mutageni učinak metabolita etanola i sastojaka cigaretnog dima, kao i povećanih razina estrogena i tkivne osjetljivosti na estrogene povezanih sa konzumacijom etanola (8, 11, 20, 27). Utjecaj zasićenih masti životinjskog porijekla na razine estrogena i duktalnu proliferaciju mliječnih žlijezda objašnjava rizični značaj konzumacije namirnica koje ih sadrže (20, 28). Protektivan učinak tjelesne aktivnosti, dokazan u LA BC, povezan je sa redukcijom sveukupne upalne reakcije u organizmu, povećanom osjetljivošću na inzulin, te povišenom razinom globulina koji veže spolne hormone (SHBG, *sex hormone binding globulin*), a time i smanjenom bioraspoloživosti estrogena (8, 27). Benigne bolesti dojke (BBD, *benign breast disease*), uključujući proliferativne bolesti sa i bez atipije, udružene su s povećanim rizikom za BC neovisno o receptorskom statusu. Ipak, pojedinim studijama utvrđena je predominacija LA BC u slučajevima prethodno dijagnosticirane atipične duktalne hiperplazije (ADH) (18, 20, 29). Rizik također predstavljaju BC u osobnoj anamnezi

te duktalni i lobularni karcinomi *in situ* (DCIS, LCIS, *ductal carcinoma in situ*, *lobular carcinoma in situ*) (8, 11). Neke od BBD, kao što je ravna epitelna atipija ili ADH, kao i karcinomi *in situ*, pojavljuju se kao prekursorske lezije tijekom razvoja invazivnih HR+/HER2- BC (16). Uz osobnu, rizik predstavljaju i slučajevi BC u obiteljskoj anamnezi, naročito među rođacima u prvom koljenu (8). Nasljedni oblici BC najčešće su povezani s mutacijama gena za karcinom dojke 1 i 2 (BRCA 1/2, *breast cancer gene*). Radi se o tumor supresorskim genima uključenim u popravak oštećenja DNA (16-18). U slučaju ER+ podtipova, od većeg su značaja mutacije BRCA 2 gena (16). Iste se mutacije javljaju u ovarijskim karcinomima, koji u nasljednim oblicima bolesti mogu biti udruženi s BC. Stoga pozitivna obiteljska anamneza na karcinome jajnika može predstavljati rizični čimbenik za razvoj BC. Rizik nastanka BC iznosi 1,4% u dobi od 40 godina, 3% u dobi od 50, te preko 4% u 70-oj godini života. Stoga se starija dob također smatra rizičnim čimbenikom, naročito u slučaju HR+/HER2- podtipova, koji su zastupljeniji starijih pacijentica u odnosu na mlađe (8). Konačno, rizik obolijevanja neovisno o podtipu je ~ 100 puta veći u žena u odnosu na muškarce, što se tumači većom osjetljivošću ženskih dojki na hormonske učinke (8, 18).

1.4. Klinička slika

Zahvaljujući programima ranog otkrivanja, simptomi su prisutni u manje od polovice novo dijagnosticiranih slučajeva BC (10, 16, 30). Radi se o osobama bez pristupa probiru, mlađim od 40 godina, intervalnim karcinomima i simptomatskim slučajevima uz uredan nalaz probirne mamografije (10). Najznačajniji simptomi uključuju bol, palpabilne mase te promjene u veličini i obliku. Od kožnih promjena, dolazi do pojave nabora, ulceracija, eritema, uvlačenja, ili teksture poput narančine kore. Bradavice mogu biti edematozne, egzematozno promijenjene ili uvučene, uz pojavu sukrvavog ili seroznog iscjetka. U regionalno proširenih bolesti dolazi do uvećanja aksilarnih limfnih čvorova. U uznapredovaloj bolesti simptomi odgovaraju sijelu metastaza (10, 16, 30). Receptorski podtipovi su različito zastupljeni u simptomatskih i probirom otkrivenih slučajeva. U istraživanju na 100 983 pacijentica utvrđena je značajna

predominacija HR+/HER2- BC u mamografski utvrđenih lezija u odnosu na udio istih u klinički manifestnoj bolesti (31).

1.5. Dijagnostika HR+/HER2- BC

U RH, organizirani se probir provodi u sklopu Nacionalnog programa ranog otkrivanja raka dojke od 2006. godine. Ciljna skupina su žene u dobi od 50 do 69 godina, a uključuje mamografske preglede svake dvije godine (32). Osim toga, Američko društvo ginekologa i opstetričara (ACOG, *American College of Obstetricians and Gynecologists*) preporučuje preventivni klinički pregled jednom do svake tri godine u dobi od 20 do 39 godina, te jednom godišnje od 40. godine (11). Mjesečni samopregled se preporučuje od 20. godine, s ciljem upoznavanja vlastite strukture dojki i ranijeg uočavanja eventualnih promjena (18, 32).

Daljnja se evaluacija učini u slučajevima simptomatske bolesti ili suspektnog probiranoga mamografskog nalaza. Uključuje klinički pregled, te ovisno o dobi pacijentice, dijagnostičku mamografiju i/ili ultrazvuk. Magnetna rezonanca je dopunska metoda (5, 30). Biopsija je indicirana u slučaju nalaza suspektnih lezija slikovnim metodama ili neusklađenosti nalaza slikovnih metoda i kliničke slike (30). Konačna se dijagnoza postavlja patohistološkom analizom kirurški uklonjene lezije ili uzorka dobivenog biopsijom širokom iglom (30, 33). Patohistološki nalaz uključuje broj i veličinu lezija, histološki tip i gradus, status resekcijskih rubova, limfnih čvorova, ER, PR, HER2 i Ki67, te prisustvo limfovaskularne invazije (LVI), *in situ* komponente i ostalih promjena (33).

Histološki se gradus određuje prema Nottinghamskoj shemi po Elstonu i Ellisu. Parametri koji se procjenjuju uključuju nuklearni pleomorfizam, prisustvo tubularnih formacija i mitotički indeks. Svaki se od navedenih vrednuje od 1 do 3, razmjerno odstupanju od normalne morfologije tkiva dojke. Ukupan zbroj određuje histološki gradus (G):

- G1 (nizak): 3-5;
- G2 (umjereni): 6-7;
- G3 (visok): 8-9 (33-35).

Stadij se određuje prema smjernicama Američkog društva za rak (AJCC, *American Joint Committee on Cancer*). Temelji se na kliničkoj i patološkoj procjeni veličine tumora (T), nodalnog statusa (N) te prisustva udaljenih metastaza (M) (TNM) (Tablica 1) (1, 33, 34).

Tablica 1. TNM klasifikacija i *staging* sustav za BC prema AJCC (36)

| Stadij | | TNM | Kriteriji |
|------------|-------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0 | 0 | Tis, N0, M0 | DCIS |
| I | Ia | T1, N0, M0 | Primarni invazivni karcinom promjera do 20 mm bez nodalnih metastaza. |
| | Ib | T0-1, N1mi, M0 | Nodalne mikrometastaze promjera 0.2-2 mm, sa ili bez primarnog tumora promjera do 20 mm. |
| II | IIa | T0-1, N1, M0 | Metastaze u 1. i 2. etažu aksilarnih limfnih čvorova ipsilateralno. Primarni tumor odsutan ili promjera do 20 mm. |
| | | T2,N0, M0 | Tumor promjera 20-50 mm bez nodalnih metastaza. |
| | IIb | T2, N1, M0 | Metastaze u 1. i 2. etažu aksilarnih limfnih čvorova ipsilateralno. Primarni tumor promjera 20-50 mm. |
| | | T3, N0, M0 | Tumor promjera >50 mm bez nodalnih metastaza. |
| III | IIIa | T0-3, N2, M0 | Metastaze u 1. i 2. etažu aksilarnih limfnih čvorova uz fiksaciju ili metastaze u unutarnje mamarne limfne čvorove, neovisno o veličini primarne lezije. |
| | | T3,N1,M0 | Metastaze u 1. i 2. etažu aksilarnih limfnih čvorova ipsilateralno. Primarni tumor promjera > 50 mm. |
| | IIIb | T4, N0-3, M0 | Primarni tumor sa zahvaćanjem stjenke prsnog koša i/ili kože, neovisno o nodalnom statusu. |
| | IIIc | N3, M0 | Zahvaćani supraklavikularni limfni čvorovi ili 3. etaža aksilarnih ipsilateralno; zahvaćena 1. i 2. etaža aksilarnih, te unutarnji marni limfni čvorovi, neovisno o veličini primarne lezije. |
| IV | | M1 | Udaljene metastaze. |

Status HR, HER2 i Ki67 se određuje IHC (1, 2, 4, 5). Osim toga, HER2 status se može odrediti metodama *in situ* hibridizacije (ISH) (1, 5). Prema smjernicama Američkog društva kliničke onkologije (ASCO, *American Society of Clinical Oncology*) i Američkog društva patologa (CAP, *College of American Pathologists*), ekspresija HR je pozitivna u >1% utvrđenih imunoreaktivnih jezgara tumorskih stanica (37). HER2 status se IHC određuje na temelju intenziteta obojenosti staničnih membrana, prema kojem se označava kao IHC 0,+1,+2, ili +3. Ekspresija se smatra negativnom pri očitanim vrijednostima IHC 0 i IHC+1. U slučaju IHC+2, potvrđuje se temeljem ISH prikazanih prosječnih signala HER2 gena po stanici i omjera HER2 i enumeracijskog biljega 17. kromosoma (*chromosome enumeration probe 17, CEP17*).

Negativna je u slučajevima omjera $HER2/CEP17 \geq 2$, uz $HER2 < 4$ po stanici ili $HER2/CEP17 < 2$, uz $HER2 < 6$ i ≥ 4 po stanici. Navedene vrijednosti moraju biti očitane nezavisno od strane dva stručnjaka. Prosječni HER2 signali po stanici < 4 uz $HER2/CEP17 < 2$ predstavljaju negativan nalaz neovisno o nalazu IHC (38). Granična vrijednost Ki67 nije standardizirana, ali se u većini slučajeva prihvaća vrijednost od 20% (4, 5). Definicije surogatnih molekularnih podtipova usvojene su St. Gallen konsenzusom 2013. godine. Prema istima, LA se definira kao ER+, PR>20%, HER2-, uz Ki67 <20%, a LB HER2- kao ER+, HER2-, uz PR- /<20% ili Ki67>20% (1, 2, 4, 6, 33).

1.6. Terapijski postupci u HR+/HER2- BC

1.6.1. Rani i lokalno prošireni HR+/HER2- BC

1.6.1.1. Lokoregionalno liječenje

Tumorske se lezije uklanjaju kirurškim metodama različitog opsega: od pošteđenih zahvata (lumpektomija, segmentektomija, kvadrantektomija) do mastektomije, uz mogućnost neposrednih ili odgođenih rekonstruktivnih zahvata. U slučaju urednog kliničkog i ultrazvučnog nalaza aksile, uputno je učiniti biopsiju *sentinel* limfnog čvora (SNLB, *Sentinel Lymph Node Biopsy*). Pozitivan nalaz u više od dva limfna čvora, neuspjela SNLB, kao i klinički i radiološki utvrđena zahvaćenost, indikacija su za disekciju aksilarnih limfnih čvorova. Adjuvantna radioterapija (RT) slijedi nakon kirurškog zahvata ili kemoterapije (KT) provedene po završetku istog. Indicirana je nakon pošteđenih kirurških zahvata (BCS, *breast-conserving surgery*), u slučaju pozitivnih resekcijskih rubova (ili manjih od 1mm) po učinjenoj mastektomiji, u T3 ili 4 tumora po TNM klasifikaciji, te u prisustvu LVI (33). RT aksile se primjenjuje ukoliko je bolest proširena na istu regiju (33, 39).

1.6.1.2. Sistemska liječenje

Adjuvantna endokrina terapija (ET) predstavlja osnovu sistemskog liječenja (39). U terapiji **premenopausalnih** žena, primjenjuje se tamoksifen u trajanju 5-10 godina. U slučaju liječenja KT i dobi ispod 35 godina, učinkovitijom se pokazala primjena agonista gonadotropin-

oslobađajućeg hormona (aGnRH, *gonadotropin-releasing hormone agonist*) u kombinaciji s tamoksifenom ili inhibitorima aromataze (AI). Monoterapijska primjena aGnRH ili kombinacija s AI također se koriste ukoliko je tamoksifen kontraindiciran. Osim reverzibilne ovarijske supresije primjenom aGnRH, u premenopausalnih pacijentica liječenih s AI može se razmotriti ooforektomija. Monoterapija AI u premenopauzi je kontraindicirana. Prelazak na terapiju AI moguć je ukoliko u razdoblju tamoksifenskog liječenja nastupi menopauza. U **postmenopausalnih** se pacijentica preporučuje primjena AI inicijalno ili nakon 2-3 godine tamoksifenske terapije. Terapija AI provodi se uz suplementaciju vitaminom D, te moguću adjuvantnu primjenu bisfosfonata. Ostale opcije uključuju terapiju tamoksifenom, kombinaciju aGnRH i tamoksifena ili AI, te sekvencijsku terapiju tamoksifenom i AI. Odluka o liječenju ovisi o procijenjenom riziku pojave recidiva, podnošenju terapije i neželjenim učincima (33, 39, 40). **Adjuvantna KT** opravdana je u slučajevima visokog rizika određenog kliničkopatološkim karakteristikama, te procijenjenog visokog rizika pojave recidiva. Odluku o primjeni također određuju dob, menopausalni status te omjer potencijalne dobrobiti i rizika. U premenopausalnih se žena, zbog supresivnog učinka na ovarijsku funkciju, KT pokazala korisnom i u slučajevima bolesti niskog do umjerenog rizika. Primjenjuju se protokoli koji sadrže antracikline i taksane (39, 40). **Neoadjuvantno liječenje** može biti endokrino ili kemoterapijsko (NACT, *neoadjuvant chemotherapy*). Neoadjuvantna KT se primjenjuje u stadijima IIA, IIB, IIIA-IIIC te ukoliko BCS nije moguće izvesti zbog veličine tumora. Protokoli odgovaraju onima u adjuvantnoj KT (33). Neoadjuvantna ET se primjenjuje u starijih pacijentica u kojih je kontraindicirano učiniti kirurški zahvat. Istom je također moguće postići mogućnost izvođenja BCS u slučajeva inicijalno predviđenih za mastektomiju. Preferiraju se AI (33, 39, 40). Kirurški se zahvat učini ukoliko je postignut odgovor nakon 3 mjeseca liječenja. U protivnom se terapija nastavlja naredna 3 mjeseca. Po obavljenom kirurškom zahvatu nastavlja se adjuvantno liječenje (33, 40).

1.6.2. Lokalno recidivirajući i metastatski HR+/HER2- BC

Lokalnom se recidivu pristupa jednako kao primarnoj bolesti. Lezija se uklanja kirurški sa ili bez RT, uz odgovarajuće adjuvantno sistemsko liječenje. U **premenopausalih** se pacijentica u metastatskoj bolesti primjenjuje tamoksifen ukoliko nije primjenjivan ranije ili je od liječenja prošlo više od godinu dana. U protivnom se primjenjuje terapija korištena u postmenopausalnih pacijentica, uz ovarijsku supresiju. U **postmenopausalnih** se žena u prvoj liniji primjenjuju fulvestrant, AI i tamoksifen. U slučaju progresije, sekvencijski se primjenjuju lijekovi neprimjenjivani u prvoj liniji, koji uz navedene mogu uključivati estrogene, progesterone i androgene. KT se primjenjuje u slučaju progresije na ET, visceralnih metastaza ili izraženih simptoma. Primjenjuju se antraciklini i/ili taksani, osim u slučaju prethodne primjene u adjuvantnom liječenju i ranog relapsa bolesti. Ostale opcije uključuju antimetabolite, alkilirajuće agense, te inhibitore mikrotubula (33). Ciljana terapija u kombinaciji s ET pokazala se učinkovitom u uznapredovaloj, metastatskoj bolesti, s progresijom unatoč primjeni ET. Primjenjuju se inhibitori regulatora staničnog ciklusa ciklin ovisne kinaze 4/6 (CDK 4/6, *cyclin-dependent kinase 4/6*), te inhibitori molekula uključenih u PI3K/AKT/mTOR signalni put (40).

1.6.3. Praćenje

Nakon adjuvantnog liječenja obavljaju se klinički pregledi svakih 4-6 mjeseci tijekom 5 godina, a zatim jednom godišnje, uz godišnji mamografski pregled. U metastatskoj se bolesti radiološkim mjerenjima lezija procjenjuje učinkovitost terapije. Izvode se svaka 3 mjeseca pri liječenju ET, odnosno svaka 3 ciklusa liječenja KT. Ostale pretrage ovise o indikaciji (33).

1.7. Prognostički i prediktivni čimbenici

Veličina tumora, nodalni status i histološki gradus su snažni nezavisni prognostički čimbenici povezani s kraćim sveukupnim preživljenjem (OS, *overall survival*) i preživljenjem bez pojave bolesti (DFS, *disease-free survival*) (34, 35, 41, 42). Nepovoljan utjecaj veličine lezije utvrđen je u svih receptorskih podtipova, pri čemu su stope preživljenja najviše u

luminalnih, a najniže u TNBC iste veličine (34, 35, 39, 40, 41, 43, 44). Utjecaj zahvaćenosti limfnih čvorova na smanjenje OS i DFS također ne ovisi o podtipu. Međutim, rezultati istraživanja ukazuju na veću tendenciju nodalnog širenja u HER2+ i TNBC, u odnosu na luminalne podtipove. Prema dugima je, naprotiv, ona najmanja u TNBC (34, 35, 44, 45). Luminalni A BC su u ~90% slučajeva G1 ili 2, dok su LB HER2- G2 ili 3. Ponašanje i tijekom ER+/HER2- BC G1 odgovara LA neovisno o statusu PR i Ki67, dok G3 odgovara LB HER2- podtipu (34, 35, 41, 46). Istraživanjem na 671 pacijentici, utvrđena je pojava udaljenih metastaza u 35% slučajeva LA BC G3. U LB HER2- G1, naprotiv, nije došlo do diseminacije bolesti (46). Stope OS i DFS su niže u dobi ispod 40 godina pri dijagnozi ER+ BC u odnosu na ER- BC, uz slabiji terapijski odgovor i agresivnije značajke tumora. Pojedina istraživanja osporavaju navedeno, dok je u drugih loša prognoza utvrđena i u dobi iznad 60 godina (40, 47, 48). Među HR+/HER2- histološkim tipovima, najpovoljniji je ishod u tubularnih, mucinoznih, papilarnih i kribriformnih BC. Ovisno o istraživanju, ishod ILC je lošiji, povoljniji ili jednak u usporedbi s IBC-NST, uz učestaliju pojavu recidiva u ILC. IBC-NST je zbog svoje heterogenosti manje relevantan kao prognostički pokazatelj (4, 39, 48-50).

Ekspresija ER je značajna u terapijskom odlučivanju. Primjena ET učinkovita je u ER+ BC, s učinkom proporcionalnim ekspresiji ER. Uz navedeno, pozitivan ER status povezan je s većim OS, neovisno o ranije navedenim prognostičkim čimbenicima. Stoga se radi o ujedno prognostičkom i prediktivnom čimbeniku. Ekspresija PR je posljedica estrogenske aktivnosti, te pozitivan status PR upućuje na prisustvo funkcionalnih ER. Ovo je ujedno mogući razlog boljeg terapijskog odgovora u ER+/PR+ u odnosu na ER+/PR- BC. Osim toga, vezanjem liganda PR mogu uzrokovati alteraciju veznog mjesta za ER, dovodeći do transkripcije gena povezanih s procesima suprotnim od onih inače aktiviranih estrogenskim djelovanjem (8, 35, 42, 51). Od ostalih prediktivnih čimbenika, istražuje se značaj mutacijskog statusa gena za estrogenski receptor 1 (ESR1), povezane s rezistencijom na ET. Javlja se u recidivu ili

metastatskoj bolesti ranije liječenih AI (35, 42). Visoki Ki67 povezan je s kraćim OS i DFS te agresivnijim karakteristikama tumora. Prognoza LB HER2- (visok Ki67, agresivnije značajke) je nepovoljnija u odnosu na LA BC (nizak Ki67) (35, 42).

Posljednjih su desetljeća razvijeni multigeniski prognostički testovi (*Oncotype, Mammaprint, Prosigna, BC index, Endopredict*), kojima se temeljem profila genske ekspresije procjenjuje rizik pojave recidiva u ranom HR+/HER2- BC liječenim ET. Primjenjuju se u procjeni potrebe za uvođenjem adjuvantne KT (35, 39).

Stadij određen AJCC smjernicama obrnuto je proporcionalan preživljenju. U stadiju I, 10 godišnje preživljenje iznosi 86%, u stadiju II 71%, u stadiju III 54%, dok u stadiju IV iznosi svega 11%. Stope preživljenja u istom stadiju su veće u ER+ u odnosu na ER- BC unutar 5 godina od dijagnoze. Kasnije se ta razlika smanjuje, što se objašnjava agresivnijim kliničkim tijekom ER- BC, s najvećim udjelom smrtnih ishoda unutar navedenog razdoblja (12, 14, 16, 34, 51, 52). Uz potonji, tzv. anatomske stadij, u 8. izdanju priručnika AJCC predstavljen je i prognostički stadij. Osim TNM, određuje se temeljem statusa ER, PR, HER2, histološkog gradusa i genetskog profila određenog ranije spomenutim multigeniskim testovima. Dosadašnjim istraživanjima utvrđena je diskrepancija između anatomske i prognostičke stadija u istih tumora u ~40% slučajeva. Osim toga, prognostički se stadij prema nekim od istraživanja pokazao kao pouzdaniji prognostički pokazatelj prilikom odvojene analize receptorskih podtipova u odnosu na anatomske stadij (1, 8, 34, 51, 52).

Od prognostičkih i prediktivnih biomarkera s potencijalnom primjenom u budućnosti, istražuju se tkivne genetičke signature i mikro-RNA (mi-RNA) te mi-RNA, cirkulirajuće tumorske stanice (CTC, *circulating tumor cells*) i tumorska DNA (ctDNA, *circulating tumor DNA*) u perifernoj krvi (35, 42).

1.8. Tumor-infiltrirajući limfociti

Uspješno izbjegavanje imunološkog odgovora preduvjet je razvoja i progresije maligne bolesti. Sam proces, opisan fazama eliminacije, ekvilibrija i bijega, rezultat je složenih

interakcija tumorskih stanica i tumorskog mikrookoliša (TME, *tumor microenvironment*)(53). Čine ga više elemenata s pro- ili antitumorskom aktivnosti. Tumor-infiltrirajući limfociti (TIL) su stanični elementi TME koji sudjeluju u imunološkoj reakciji na tumor (54). Među njima se razlikuju podskupine koje uključuju citotoksične CD8+ limfocite T, CD4+ limfocite T te limfocite B. Nadalje, CD4+ limfociti uključuju pomagačke (Th 1,2, *helper T-cells 1,2*) i regulatorne (Treg) T stanice te folikularne Th stanice (Tfh). Glavnu ulogu u eliminaciji tumorskih stanica imaju CD8+ limfociti. U njihovoj aktivaciji sudjeluju Th1 stanice. Limfociti B, Th2 i Tfh sudjeluju u humoralnom odgovoru. Osim toga, B limfociti su jedni od aktivatora CD4+ stanica. Regulacija imunološkog odgovora s ciljem redukcije kolateralnih oštećenja uloga je Treg (53).

Istraživanjima je dokazana povezanost gustoće TIL s kompletnim patološkim odgovorom (pCR, *pathologic complete response*) u TNBC liječenim NACT. Visoki udio TIL u rezidualnoj bolesti (RD, *residual disease*) nakon NACT povezan je s višim stopama OS i DFS te manjim rizikom od udaljenih metastaza. Pozitivan prognostički značaj dokazan je i u pacijenata liječenih adjuvantnom KT. Drugim su studijama utvrđene više stope OS i DFS u slučajevima obilnijeg TIL neovisno o KT liječenju (53, 55). Slična se povezanost pokazala u HER2+ BC. Međutim, ovisno o studiji, prognostički i prediktivni značaj utvrđeni su isključivo u monoterapiji anti HER2 ili KT, ili pak njihovoj kombinaciji (42, 55). S druge strane, temeljem dosadašnjih studija ne postoje čvrsti dokazi o vrijednosti TIL kao prognostičkog i prediktivnog čimbenika u HR+/HER2- BC. Stoga je u ovom slučaju potrebna daljnja validacija (53, 55). Rastući interes za korištenjem TIL kao prognostičkog i prediktivnog biomarkera potaknuo je organizaciju Međunarodne radne skupine za imuno-onkološke biomarkere, koja je 2014. godine objavila standardiziranu metodu procjene TIL u BC (53-55). Do tada se u procjeni primjenjivala četvero stupanjaska skala poput one korištene u istraživanju Klinturpa i suradnika (56).

2. Ciljevi istraživanja

2.1. Glavni ciljevi istraživanja

Glavni cilj istraživanja bio je procijeniti gustoću mononuklearnog infiltrata u tumorskoj stromi HR+/HER2- BC metodom korištenom u istraživanju Klinturpa i suradnika (56) te metodom Međunarodne radne skupine za imuno-onkološke biomarkere (54), usporediti podudarnost rezultata navedenih metoda te u svrhu utvrđivanja prognostičkog značaja analizirati povezanost TIL sa nekim od kliničkopatoloških karakteristika BC.

2.2. Specifični ciljevi istraživanja

1. Među izdvojenim bioptičkim materijalima BC odrediti uzorke koji pripadaju primarnoj leziji, RD nakon NACT, recidivu ili metastatskom tumoru
2. Patohistološkom analizom izdvojenih uzoraka odrediti tradicionalne patohistološke parametre i receptorski podtip
3. Procijeniti gustoću stromalnog mononuklearnog infiltrata prema preporukama Međunarodne radne skupine za imuno-onkološke biomarkere
4. Procijeniti gustoću stromalnog mononuklearnog infiltrata četvero stupanjskom skalom korištenom u Klinturpovoj studiji
5. Usporediti procijenjeni stromalni mononuklearni infiltrat između korištenih metoda i odrediti razinu podudarnosti očitanih gustoća mononuklearnih infiltrata
6. Usporediti gustoću mononuklearnog infiltrata u primarnom tumoru, RD nakon NACT i recidivnom/ metastatskom tumoru
7. Utvrditi prognostički značaj gustoće mononuklearnog infiltrata analizom povezanosti s kliničkopatološkim parametrima koji uključuju veličinu lezije, nodalni status, gradus, receptorski podtip, LVI, dob, stadij bolesti, OS i DFS
8. Usporediti rezultate navedenih analiza u ovisnosti o metodi korištenoj u procjeni gustoće stromalnog mononuklearnog infiltrata

3. Ispitanici, materijali i postupci

3. 1. Ispitanici i materijali

Materijal korišten u ovom retrospektivnom istraživanju uključuje tkiva invazivnog BC, među kojima se razlikuju uzorci tkiva primarnog BC, RD nakon provedene NACT, recidiva i udaljenih metastaza. Posljednji su uključivali tkiva jetre, jajnika, limfnih čvorova, kože i torakalne stjenke. Uzorci su dobiveni kirurški ili *core* biopsijom na Klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Rijeka u razdoblju od 2007. do 2019. godine. Kirurški zahvati uključivali su BCS (kvadrantektomija, lumpektomija), mastektomiju, disekciju/ekstirpaciju limfnih čvorova, SNLB, te eksciziju metastatskih tumora. Uzorci su izdvojeni iz arhive Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Nakon fiksacije u 10% pufiriranom formalinu i uklapanja u parafin, rezani su i bojani hemalaun-eozinom (HE) te pregledani u svrhu postavljanja dijagnoze i izdvajanja uzoraka sa zadovoljenim kriterijima uključivanja u studiju. Od histoloških tipova, utvrđeni su IBC-NST, ILC te miješani oblici IBC-NST i/ili ILC i/ili drugih posebnih tipova. Klinički je stadij određen prema AJCC smjernicama (36). Receptorski status i podtip su određeni prema smjernicama ASCO/CAP i kriterijima St. Gallen konsenzusa (37,38,57). Patohistološki podaci za potrebu istraživanja su prikupljeni u računalnoj bazi podataka Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Klinički su podaci prikupljeni iz medicinske dokumentacije pacijentica preko računalne baze WinBis KBC-a Rijeka. Uključene su sve pacijentice sa dostatnom količinom bioptičkog materijala, dostupnim kliničkim i patohistološkim podacima, HR+/HER2- imunofenotipom te invazivnim tumorom. Konačno, u istraživanju je analiziran bioptički materijal 37 pacijentica, uključujući 23 uzoraka primarnog tumora, 6 uzoraka RD nakon NACT te 8 uzoraka recidiva ili udaljenih metastaza.

3.2. Postupci

3.2.1. Određivanje prognostičkih parametara

Nakon fiksacije bioptičkih uzoraka u 10% puferiranom formalinu i uklapanja u parafin, mikrotomom su dobiveni presjeci tkiva debljine 3-4 μ m, koji su prebačeni na predmetno stakalce s pozitivno nabijenom površinom za bolju adheziju tkiva. Stakla s rezovima sušila su se na toploj ploči za sušenje stakala od 60-70°C tijekom 15–20 minuta. Nakon sušenja preparati su se deparafinizirali u ksilenu, rehidrirali u 96% i 70% etanolu (5 minuta ispiranja u svakom gradijentu etanola) te potom rutinski bojali HE metodom u automatskom bojaču. Uslijedile su reklasifikacija i patohistološka obrada cijelokupnog materijala, kojom su uključeni sljedeći patohistološki parametri: veličina tumora, nodalni status, gradus, prisustvo LVI, te stadij prema AJCC smjernicama. Histološki gradus je određen u kirurški dobivenih uzoraka, a nuklearni gradus u uzorcima dobivenim core biopsijom. Ekspresija HR, HER2 i proliferacijski indeks određeni su IHC, uz dopunsku analizu HER2 statusa ISH u slučajevima nalaza IHC+2. Status HR i HER2 definiran je prema ASCO/CAP smjernicama, a surogatni imunofenotip prema kriterijima St. Gallen konsenzusa (37,38,57).

3.2.2. Procjena gustoće tumorskog limfocitnog infiltrata (TIL)

3.2.2.1. Procjena TIL prema preporukama Međunarodne radne skupine za imuno-onkološke biomarkere

Upalni infiltrat je procijenjen na rutinskim HE bojenim rezovima korištenim u standardnoj patohistološkoj analizi BC. U procjenu je uključen mononuklearni (limfocitni i plazmastični) infiltrat unutar tumorske strome (sTIL). Svjetlosnim se mikroskopom na najmanjem povećanju (x4) najprije razgraničilo tkivo invazivnog BC u odnosu na okolne strukture, a potom se analiziralo cjelokupno stromalno područje kako bi se utvrdilo prisustvo mononuklearne infiltracije. Mononuklearni je infiltrat bio analiziran na srednjem i velikom povećanju (200-400x). U primarnih BC, recidiva i metastaza, gustoća infiltrata se procijenila kao prosječna vrijednost udjela cjelokupne površine tumorske strome infiltrirane upalnim

stanicama, izražene u postocima. Analizirano područje uključivalo je tumorsku stromu unutar centralnog tumora (CT) i invazivne fronte (IF). U vrijeme provođenja ovog istraživanja preporuke Radne skupine nisu uključivale odvojenu procjenu sTIL u CT i IF. Obilnije infiltrirana područja, tzv. „vruće točke“ (*hot spots*), također su bile uključene u navedenu prosječnu vrijednost; umjesto izolirane procjene. Procijenjena je gustoća bila izražena kao kontinuirana vrijednost, s preciznošću ovisnom o promatraču. U literaturi su očitane vrijednosti u najvećem broju slučajeva zaokružene na najbližih 5% ili 10%. Na isti su način bile iskazane i u ovom istraživanju. Infiltracija u područjima *crush* artefakta, nekroze, fibroze, regresivne hijalinizacije, kao i na mjestima prethodno učinjenih *core* biopsija, je bila isključena iz procjene. Od upalnih stanica, bili su isključeni polimorfonukleari, makrofagi, dendritičke stanice i tercijarne limfoidne stukture (TLS, *tertiary lymphoid structure*). Procjena intraepitelnih TIL (iTIL) također nije obuhvaćena preporukama. U slučaju RD nakon NACT, sTIL je bio procijenjen unutar ležišta ostatne bolesti. Procjena infiltrata u regresijskom području se ne preporučuje (58). Uz navedeno, sve prethodno opisane preporuke odnosile su se i na ovu skupinu uzoraka.

3.2.2.2. Procjena TIL prema studiji Klinturpa i suradnika

Druga je metoda procijene bila preuzeta i modificirana prema onoj kojom su Klinturp i suradnici u svojoj studiji procijenili upalni tumorski infiltrat u kolorektalnom karcinomu. I u ovom slučaju procjena je izvršena na standardnim HE bojenim rezovima. Za razliku od metode Međunarodne radne skupine za imuno-onkološke biomarkere, u slučaju ove metode ne postoje jasne preporuke o vrsti upalnih stanica i područjima koja se uključuju i isključuju u procjeni. U ovom je istraživanju bio procijenjen sveukupni sTIL, s uključenim i isključenim vrstama upalnih stanica i područjima procjene prema jednakim kriterijima kao u procjeni prethodno opisanom metodom. U procjeni se koristila četvero stupanjaska ljestvica, prema kojoj se sTIL razmjerno gustoći infiltracije vrednovao na slijedeći način:

- 0: odsutan mononuklearni infiltrat
- 1: oskudan mononuklearni infiltrat
- 2: srednje obilan mononuklearni infiltrat
- 3: obilan mononuklearni infiltrat

3.2.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada izvršena je pomoću računalnog programa MedCalc, verzija 20 (MedCalc Statistical Software, Ostend, Belgija). Razina podudarnosti procijenjenog sTIL među korištenim metodama određena je interklasnim koeficijentom korelacije (ICC, *intraclass correlation coefficient*). Fisherovim egzaktnim testom i χ^2 testom određene su razlike proporcija skupina tumora s prisutnom i odsutnom infiltracijom u odnosu na kliničkopatološke parametre i skupine uzoraka. U ispitivanju povezanosti navedenih varijabli korišten je Kendallov tau koeficijent korelacije. Analiza sveukupnog preživljenja i preživljenja bez povrata bolesti učinjena je Kaplan-Meierovom metodom. Log-rank testom je potom određena statistička značajnost razlika među krivuljama preživljenja. Osim ICC, svi navedeni statistički testovi izvršeni su dva puta: analizirajući sTIL procijenjen jednom, a zatim drugom metodom. Statistički se značajnom označila p vrijednost <0.05 u svim provedenim analizama.

Provođenje istraživanja odobreno je od strane Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (Klasa: 007-08/22-01/30, Ur.br: 2170-24-04-3/1-22-10) te Etičkog povjerenstva KBC-a Rijeka (Klasa: 003-05/22-1/70, Ur.br: 2170-29-02/1-22-2).

4. Rezultati

4.1. Kliničkopatološke karakteristike

Istraživanje je provedeno na uzorku od 37 pacijentica s BC. Uključen je bioptički materijal 23 primarnih lezija (62%), 6 RD nakon provedene NACT (16%), te 8 uzoraka metastatskog tumora ili recidiva (22%). Među potonjima, uključeni su uzorci tkiva jetre (3), jajnika (1), limfnog čvora (1), kože/dojke (2) i torakalne stjenke (1). Medijan dobi iznosio je 57 godina, s rasponom od 39 do 75 godina. Dvadeset i troje (62%) pacijentica je bilo starije, a 14 (38%) mlađe od 50 godina. Sveukupno, 24 (65%) bioptičkih uzoraka je histološki odgovaralo IBC-NST, 10 (27%) ILC, a 1 (3%) papilarnom tipu dukalnog BC. U preostalih 2 (5%) utvrđena je mješovita morfologija koja uključuje IBC-NST uz ILC ili mucinoznu komponentu. Veći udio uzoraka (26, 70%) je LB HER2- podtipa. Luminalni A imunofenotip je utvrđen u preostalih 11 (30%). Šest (16%) tumora iz uzorka bilo je dobro diferencirano (G1), 29 (78%) tumora je bilo umjereno diferencirano (G2), dok je preostalih 2 (5%) bilo loše diferencirano (G3). Među kliničkim stadijima prema AJCC smjernicama, analizirani materijal nije uključivao niti jedan tumor stadija IB. Ostali su stadiji bili prisutni u sljedećim udjelima: IA u 8 (22%), IIA u 4 (11%), IIB u 1 (3%), IIIA u 7 (19%), IIIB u 1 (3%), IIIC u 4 (11%) te stadij IV u 12 (32%) slučaja.

Devetnaest uključenih lezija uklonjeno je poštednim kirurškim zahvatima. Među njima je kvadrantektomijom uklonjeno 6 primarnih lezija, a lumpektomijom 7 primarnih lezija i svih 6 RD nakon provedene NACT. Mastektomija je učinjena u 3 slučaja primarne bolesti. U preostalih 7 slučajeva iste dijagnoza je potvrđena patohistološkom analizom uzoraka dobivenih *core* biopsijom. Među uzorcima recidiva i metastaza, njih 5 je dobiveno otvorenom, a 3 *core* biopsijom. Nodalne su metastaze utvrđene u 25 (68%) slučajeva. Disekcija aksile je učinjena u 20, a SNLB u 5 pacijentica. Oba su postupka učinjena u dvije pacijentice, dok je u jedne učinjena aspiracija aksilarnog limfnog čvora tankom iglom. U preostalih 9 slučajeva nodalni status je određen klinički. Osim kirurškog uklanjanja lezije, sistemsko je liječenje primijenjeno

u 34 slučajeve. Dvije su pacijentice liječene isključivo ET, dok je ista u kombinaciji s NACT ili KT primijenjena u 3, odnosno 15 slučajeva. Kemoterapijski se uz RT i kastraciju liječila jedna pacijentica. Ciljano je liječenje monoterapijski također ordinirano u jedne pacijentice. Kombinacijom istog uz KT i ET je liječeno 3, a kombinacijom uz ET 4 pacijentica. Uz endokrino liječenje, u 2 pacijentice je primijenjena palijativna RT. Pacijentice su praćene od vremena postavljanja dijagnoze do posljednje kontrole ili smrtnog ishoda. U navedenom razdoblju, pojava recidiva ili metastaza utvrđena je u 31 (84%) slučaju, s medijanom od 48 i rasponom od 10 do 153 mjeseci. Lokalni su se recidivi pojavili u 8, a metastaze u 27 slučajeva. Pojava recidiva i metastaza utvrđena je u 4 pacijentice. Najzastupljenije su bile koštane metastaze, sa 17 utvrđenih slučajeva. Ostala metastatska sjela su uključivala jetru (10), jajnike (3), aksilarne (3) i supraklavikularne (2) limfne čvorove i pluća (2). Lokalnim su recidivima bile zahvaćene torakalna stjenka u 4 te ostatno tkivo i/ili koža dojke u 5 pacijentica. Medijan i raspon sveukupnog preživljenja u razdoblju praćenja iznosili su 60, odnosno 15 do 192 mjeseca. Letalni je ishod nastupio u 15 (41%) slučajeva. Osnovna je bolest bila uzrok smrti u svih slučajeva.

Navedene kliničke i patološke karakteristike prikazane su u Tablici 2.

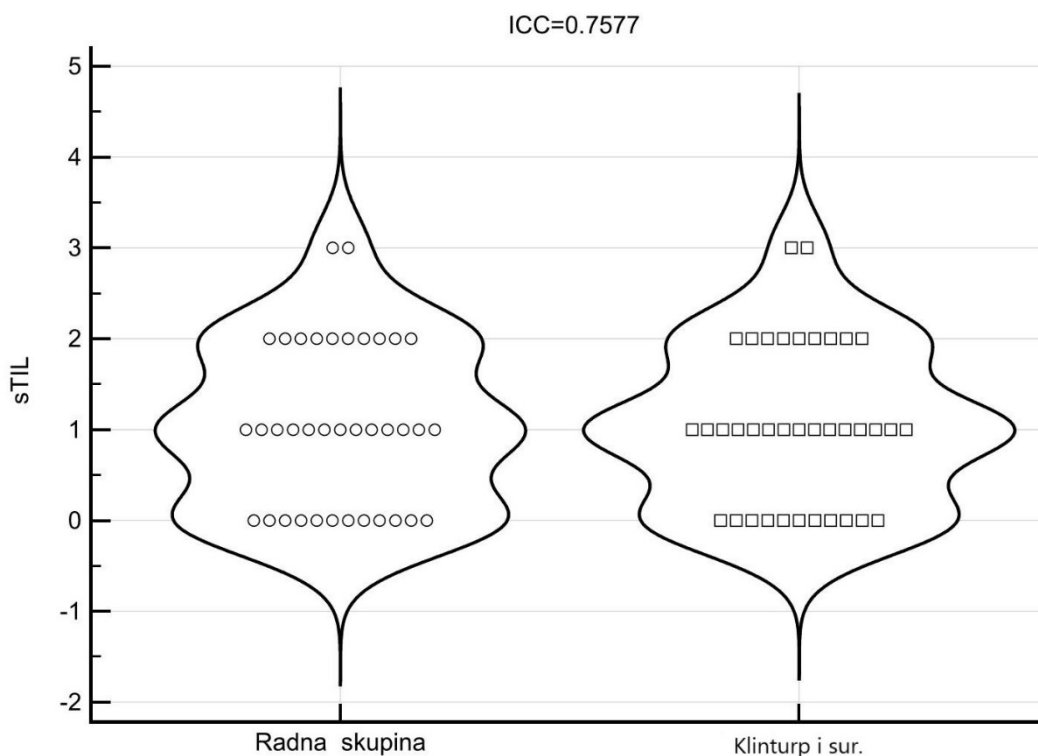
Tablica 2. Kliničkopatološke karakteristike pacijentica s HR+ HER2- BC

| OBILJEŽJE (N=37) | |
|---------------------------|--------------|
| DOB (godine) | |
| <i>Medijan (raspon)</i> | 57 (39-75) |
| HISTOLOŠKI TIP | N (%) |
| • IBC-NST | 24 (65) |
| • ILC | 10 (27) |
| • Mješoviti | 2 (5) |
| • Duktalni, papilarni tip | 1 (3) |
| RECEPTORSKI PODTIP | N (%) |
| • Luminalni A | 11 (30) |
| • Luminalni B HER2 - | 26 (70) |
| HISTOLOŠKI GRADUS | N (%) |
| • 1 | 6 (16) |
| • 2 | 29 (78) |
| • 3 | 2 (5) |
| KLINIČKI STADIJ | N (%) |

| | |
|------------------------------|--------------|
| • IA | 8 (22) |
| • IIA | 4 (11) |
| • IIB | 1 (3) |
| • IIIA | 7 (19) |
| • IIIB | 1 (3) |
| • IIIC | 4 (11) |
| • IV | 12 (32) |
| NODALNI STATUS | N (%) |
| • Negativan | 12 (32) |
| • Pozitivan | 25 (68) |
| RECIDIV/METASTAZE | N (%) |
| • Ne | 6 (16) |
| • Da | 31 (84) |
| POJAVA RECIDIVA (mj.) | |
| <i>Medijan (raspon)</i> | 48 (10-153) |
| PREŽIVLJENJE (mj.) | |
| <i>Medijan (raspon)</i> | 60 (15-192) |
| UMRLE OD BOLESTI | N (%) |
| | 15 (41) |

4.2. Usporedba metode procjene TIL prema preporukama Međunarodne radne skupine za imuno-onkološke biomarkere i metode procjene prema studiji Klinturpa i suradnika

Za potrebe usporedbe, vrijednosti sTIL očitane metodom Radne skupine podijeljene su u četiri kategorije kako bi odgovarale skali korištenoj u Klinturpovoj studiji: 0: 0-10%, 1: 11-30%, 2: 31-60% i 3: $\geq 61\%$. Raspodjela bioptičkih uzoraka po kategorijama u ovisnosti o korištenoj metodi prikazana je na Slici 1. Vrijednosti sTIL očitane metodom Radne skupine u 12 (32%) su uzoraka odgovarale kategoriji označenoj kao 0, dok je 13 (35%) uzoraka odgovaralo kategoriji 1, a 10 (27%), odnosno 2 (5%) uzorka kategorijama 2 i 3. Procjenom četvero stupanjskom skalom, raspodjela po kategorijama prema gustoći sTIL bila je sljedeća: 11 (30%) uzoraka je bilo označeno kao 0, 15 (41%) uzoraka je bilo označeno kao 1, 9 (24%) uzoraka je bilo označeno kao 2, a 2 (5%) su uzorka bila označena kao 3. Dobivena vrijednost ICC koeficijenta od 0.7577 (uz 95% CI=0.5777-0.8675), izračunatog u svrhu usporedbe metoda, odgovara dobrom stupnju njihove pouzdanosti. Odnosno dokazana je dobra povezanost i podudarnost rezultata očitanih korištenim metodama.



Slika1. Raspodjela bioptičkih uzoraka po kategorijama gustoće sTIL u ovisnosti o metodi procjene. Uzorci su prikazani simbolima "o" i "□", ovisno o metodi procjene navedenoj na X-osi, a raspoređeni prema kategorijama sTIL navedenima na Y-osi. Vidljive su varijacije u procijenjenim sTIL u obliku razlika u raspodjeli među kategorijama. Četvero stupanjskom skalom očitani sTIL u nešto većem broju slučajeva pripada kategoriji 1 u odnosu na onaj očitani metodom Radne skupine. Potonjom metodom procijenjen sTIL u nešto većem broju slučajeva pripada kategorijama 0 i 2. Objema metodama procijenjen je jednak broj uzoraka čiji sTIL odgovara kategoriji 3. Bez obzira na navedene varijacije, ICC-om je dokazana dobra podudarnost među rezultatima očitanim korištenim metodama (ICC=0.7577).

4.3. Usporedba sTIL u primarnom tumoru, RD nakon NACT i metastatskom tumoru/recidivu

Rezultati ispitivanja značajnosti razlike u prisustvu sTIL među navedenim skupinama prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Usporedba prisustva sTIL procijenjenog dvjema metodama među primarnim tumorima, RD nakon NACT i recidivima/ metastatskim tumorima

| | Radna skupina | | p* | Klinturp i sur. | | p* |
|------------------------|-----------------|------------------|----|-----------------|------------------|----|
| | sTIL odsutan | sTIL prisutan | | sTIL odsutan | sTIL prisutan | |
| Ukupno N=37 | | | | | | |

| | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|------------|-------------|--------|------------|-------------|--------|
| Primarni tumor | 23 (62%) | 5 (22%) | 18 (78%) | 0.0507 | 7 (30%) | 16 (70%) | 0.5803 |
| RD nakon NACT | 6 (16%) | 4 (67%) | 2 (33%) | | 3 (50%) | 3 (50%) | |
| Recidiv/metastaza | 8 (22%) | 1 (13%) | 7 (87%) | | 2 (25%) | 6 (75%) | |

* χ^2 test

Vrijednosti sTIL dihotomizirane su u skupine s prisutnim i odsutnim stromalnim infiltratom. Kao prijelomna vrijednost za odsustvo infiltrata određena je gustoća sTIL <10%, jednako kao u pojedinim istraživanjima u literaturi (59-62). U slučaju procjene četvero stupanjskom skalom, skupinom uzoraka s odsutnim sTIL obuhvaćene su sve vrijednosti označene vrijednošću 0. Vrijednosti sTIL \geq 10%, odnosno kategorizirane kao 1,2 i 3, čine skupinu uzoraka s prisutnim stromalnim infiltratom. Metodom Radne skupine utvrđeno je prisustvo sTIL u većem broju slučajeva primarne bolesti i recidiva/metastaza (78%, 87%) u odnosu na odsustvo istog u navedenim skupinama. Obrnuti odnos utvrđen je u RD nakon provedene NACT, gdje je u većem broju slučajeva stromalni infiltrat bio odsutan (67%). Procjenom četvero stupanjskom skalom utvrđene su slične vrijednosti za prve dvije skupine (70%, 75%), dok je u RD sTIL bio prisutan i odsutan u jednakom broju slučajeva. Nije dokazana razlika u prisustvu sTIL između ispitivanih skupina niti jednom od korištenih metoda ($p=0.0507$, $p=0.5803$), no rezultati dobiveni metodom Radne skupine su na razini statističkog trenda, te vjerujemo da bi povećanjem skupine dobili značajan rezultat.

4.4. Prisustvo sTIL u odnosu na kliničkopatološke karakteristike

Stromalni je infiltrat i u ovoj analizi grupiran na jednaki način kao u prethodnoj. Analiziran je cjelokupni uzorak od 37 bioptičkih materijala, bez odvojene analize uzoraka primarnih lezija, RD, recidiva ili metastaza. Prisustvo sTIL uspoređivano je u odnosu na dob pacijentica, veličinu tumora, gradus, receptorski podtip, nodalni status, prisustvo LVI i klinički stadij. Zbog svega 2 tumora G3 u ispitivanom uzorku, gradus je u analizi grupiran u dvije

skupine: tumori G1 vs tumori G2 i 3. Klinički stadij je za potrebe analize također podijeljen u dvije skupine: stadij I-III vs stadij IV.

Sveukupno, metodom Radne skupine prisustvo stomalnog mononuklearnog infiltrata utvrđeno je u 27 (73%), a četvero stupanjskom skalom u 25 (68%) uzoraka. Koristeći obje metode, sTIL je procijenjen kao prisutan u većoj proporciji u odnosu na njegovo odsustvo neovisno o dobi, veličini tumora, gradusu, receptorskom podtipu i nodalnom statusu. Prisustvo stromalnog infiltrata metodom Radne skupine, odnosno četvero stupanjskom skalom utvrđeno je u 79%, odnosno 71% pacijentica u dobi do 50 godina i u 70%, odnosno 65% starijih pacijentica te u 77% ili 62% tumora promjera do 2 cm. U većih tumora, prisutan sTIL utvrđen je u jednakom udjelu (71%) objema metodama. Među ostalim parametrima, prisutan sTIL procijenjen je u slijedećim udjelima: u 67%/ 83% slučajeva tumora G1 i u 74%/ 65% slučajeva tumora G2 i 3, zatim s obje metode u 73% LA BC i 73%/ 65% LB HER2- BC te u 68%/ 64% slučajeva tumora s zahvaćenim, odnosno 83%/ 75% slučajeva tumora s nezahvaćenim limfnim čvorovima. Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisustvu i odsustvu sTIL s obzirom na navedene parametre (dob: $p=0.7099$, $p=1$, veličina: $p=1$, $p=0.7161$, gradus: $p=0.6527$, $p=0.6409$, podtip: $p=1$, $p=1$, nodalni status: $p=0.4447$, $p=0.7109$). Metodom radne skupine sTIL se procijenio kao prisutan u većem udjelu skupine uzoraka s pozitivnom (62%) i negativnom LVI (79%). S druge strane, četvero stupanjskom skalom je utvrđena veća proporcija odsutnog mononuklearnog infiltrata u tumora s negativnom LVI (62%), a njegovo prisustvo u većoj mjeri bilo izraženo u uzoraka s pozitivnom LVI (83%). Navedena razlika dosegla je razinu statističke značajnosti ($p=0.0097$). U sTIL procijenjenog metodom Radne skupine za isti parametar nije dokazana statistički značajna razlika ($p=0.2749$). Dvanaest (32%) pacijentica je imalo proširenu malignu bolest pri dijagnozi (stadij IV). U istoj je skupini četvero stupanjskom skalom utvrđeno prisustvo sTIL u manjem broju slučajeva (42%) u odnosu na tumore stadija I, II i III (80%). Metodom Radne skupine upalni je infiltrat procijenjen kao

prisutan i odsutan u jednakom udjelu tumora stadija IV, dok je proporcija pozitivnog sTIL bila veća u odnosu na negativan sTIL u stadijima I-III (84%). Razlike u prisustvu stromalnog mononuklearnog infiltrata u odnosu na stadij IV te stadije I-III pokazala se statistički značajnom za sTIL očitana objema metodama ($p=0.0486$, $p=0.0291$). Rezultati opisane analize prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Usporedba prisustva sTIL u odnosu na kliničkopatološke karakteristike

| | Ukupno N=37 | Radna skupina | | | Klinterp i sur. | | |
|-----------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------------|---------------|
| | | sTIL | | p^{\pm} | sTIL | | p^{\pm} |
| | | <i>odsutan</i> | <i>prisutan</i> | | <i>odsutan</i> | <i>prisutan</i> | |
| Dob (godine) | | | | | | | |
| ≤50 | 14 (38%) | 3 (21%) | 11 (79%) | 0.7099 | 4 (29%) | 10 (71%) | 1 |
| >50 | 23 (62%) | 7 (30%) | 16 (70%) | | 8 (35%) | 15 (65%) | |
| Veličina tumora (cm) | | | | | | | |
| <2 | 13 (35%) | 3 (23%) | 10 (77%) | 1 | 5 (38%) | 8 (62%) | 0.7161 |
| ≥2 | 24 (65%) | 7 (29%) | 17 (71%) | | 7 (29%) | 17 (71%) | |
| Histološki gradus | | | | | | | |
| 1 | 6 (16%) | 2 (33%) | 4 (67%) | 0.6527 | 1 (17%) | 5 (83%) | 0.6409 |
| 2,3 | 31 (84%) | 8 (26%) | 23 (74%) | | 11 (35%) | 20 (65%) | |
| Podtip | | | | | | | |
| Luminalni A | 11 (30%) | 3 (27%) | 8 (73%) | 1 | 3 (27%) | 8 (73%) | 1 |
| Luminalni B HER2- | 26 (70%) | 7 (27%) | 19 (73%) | | 9 (35%) | 17 (65%) | |
| Nodalni status | | | | | | | |
| negativan | 12 (32%) | 2 (17%) | 10 (83%) | 0.4447 | 3 (25%) | 9 (75%) | 0.7109 |
| pozitivan | 25 (68%) | 8 (32%) | 17 (68%) | | 9 (36%) | 16 (64%) | |
| LVI | | | | | | | |
| negativna | 13 | 5 | 8 | 0.2749 | 8 | 5 | 0.0097 |

| | | | | | | | |
|---------------|-------|-------|-------|---------------|-------|-------|---------------|
| | (35%) | (38%) | (62%) | | (62%) | (38%) | |
| pozitivna | 24 | 5 | 19 | | 4 | 20 | |
| | (65%) | (21%) | (79%) | | (17%) | (83%) | |
| Stadij | | | | | | | |
| I, II, III | 25 | 4 | 21 | 0.0486 | 5 | 20 | 0.0291 |
| | (68%) | (16%) | (84%) | | (20%) | (80%) | |
| IV | 12 | 6 | 6 | | 7 | 5 | |
| | (32%) | (50%) | (50%) | | (58%) | (42%) | |

±Fisherov egzaktni test

Korelacijskom analizom istih parametara utvrđena je statistički značajna slaba povezanost sTIL i LVI neovisno o metodi procjene ($\tau=0.271$, $p=0.0190$ za metodu Radne skupine, $\tau=0.337$; $p=0.0036$ za četvero stupanjsku skalu). Također je utvrđena slaba, statistički značajna negativna korelacija sTIL i kliničkog stadija procijenjenog četvero stupanjskom skalom ($\tau=-0.272$, $p=0.0171$). Jednako kao u prethodnoj analizi, ni u ovom slučaju nije dokazana statistički značajna povezanost sTIL s ostalim kliničkopatološkim karakteristikama.

4.5. Analiza sveukupnog preživljenja i preživljenja bez povrata bolesti

Prisustvo stromalnog infiltrata za svaku metodu definirano je kao u prethodnim analizama. Analiza je također provedena na cjelokupnom uzorku od 37 bioptičkih materijala. Sumirane rezultate navedenih analiza prikazuju Tablice 5 i 6.

Uočeno je kraće sveukupno preživljenje pacijentica s odsutnim stromalnim mononuklearnim infiltratom u tumorskom mikrooklišu u odnosu na pacijentice s prisutnim sTIL, bez obzira na korištenu metodu procjene. Međutim, navedena se razlika za obje metode nije pokazala statistički značajnom ($p=0.1511$, $p=0.4992$).

Tablica 5. Sveukupno preživljenje pacijentica s HR+/HER2- karcinomom dojke. Univarijatna analiza

| Radna skupina | | N | Umrle od bolesti | % | p^{b} |
|---------------|-----------------|----|------------------|-------------------------|----------------|
| Čimbenik | | | | sveukupnog preživljenja | |
| sTIL | <i>odsutan</i> | 10 | 6 | 40 | 0.1511 |
| | <i>prisutan</i> | 27 | 9 | 67 | |

| Klinturp i sur. | | | | | |
|------------------------|-----------------|----------|-------------------------|----------------------------------|----------------------|
| Čimbenik | | N | Umrle od bolesti | % sveukupnog preživljenja | p[†] |
| sTIL | <i>odsutan</i> | 12 | 5 | 58 | 0.4992 |
| | <i>prisutan</i> | 25 | 10 | 60 | |

[†]Log-rank test

U slučaju procjene metodom Radne skupine, razdoblje do pojave prvog recidiva bilo je kraće u skupini pacijentica s odsutnim sTIL u odnosu na one u kojih je utvrđeno njegovo prisustvo, no uočena razlika nije se pokazala statistički značajna (p=0.1484). Obrnut se odnos pokazao prilikom procjene sTIL četvero stupanjskom skalom, gdje je preživljenje bez povrata bolesti bilo nešto duže u pacijentica čiji tumor je imao prisutni sTIL, a rezultat je na razini statističkog trenda (p=0.054).

Tablica 6. Preživljenje bez povrata bolesti u pacijentica s HR+/HER2- karcinomom dojke. Univarijatna analiza

| Radna skupina | | | | | |
|----------------------|-----------------|----------|-------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------|
| Čimbenik | | N | Broj dokumentiranih recidiva | % preživljenja bez povrata bolesti | p[†] |
| sTIL | <i>odsutan</i> | 10 | 10 | 0 | 0.1484 |
| | <i>prisutan</i> | 27 | 21 | 22 | |

| Klinturp i sur. | | | | | |
|------------------------|-----------------|----------|-------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------|
| Čimbenik | | N | Broj dokumentiranih recidiva | % preživljenja bez povrata bolesti | p[†] |
| sTIL | <i>odsutan</i> | 12 | 10 | 17 | 0.0541 |
| | <i>prisutan</i> | 25 | 21 | 16 | |

[†]Log-rank test

5. Rasprava

Pojedinim studijama, provedenim zajedno na svim receptorskim podtipovima, utvrđena je značajno niža razina mononuklearne infiltracije u metastatskim sijelima BC u odnosu na odgovarajuće primarne lezije (63-65). Zhu i suradnici u svojem su istraživanju dokazali značajno nižu infiltraciju imunološkim stanicama (uključujući TIL) u metastazama u odnosu na odgovarajući primarni tumor u HR+/HER2- BC (66). Zeppellini i suradnici uspoređivali su gustoću sTIL između primarnih HR+/HER2- BC i metastaza u istih pacijentica te primarnih BC kontrolne skupine, u kojih tijekom devetogodišnjeg praćenja nije došlo do diseminacije bolesti. Utvrđena je statistički značajna razlika u sTIL među primarnim i odgovarajućim metastatskim lezijama u odnosu na primarni BC kontrolne skupine (medijan sTIL: 5% u primarnih lezija obje skupine i 3.8% u metastaza; raspon: 0-20 u primarnih i 0-15 u metastatskih tumora te 0-60 u kontrolne skupine). Ta je značajnost, međutim, izostala međusobnom usporedbom sTIL u primarnih i odgovarajućih metastatskih lezija istih pacijentica (67). Našim istraživanjem nije dokazana statistički značajna razlika između primarnih HR+/HER2- BC i metastaza. Uzevši u obzir pojavu recidiva i/ili metastaza tijekom praćenja u većem udjelu ispitivanog uzorka (31/37, od čega su utvrđene metastaze u 27 slučajeva), rezultat ovog usporediv je s rezultatom istraživanja Zeppellini i suradnika. No, razlikuje ga analiza provedena na uzorcima primarnih tumora i metastaza različitih pacijentica.

Analizom promjene TIL prilikom neoadjuvantnog liječenja, Hamy i suradnici su zajedno i odvojeno u svih podtipova utvrdili značajno nižu infiltraciju post NACT TIL u odnosu na onu prije provedenog liječenja (68). Obrnuto, u istraživanju Uruene i suradnika, provedenom zajedno na svim podtipovima, utvrđen je obilniji mononuklearni infiltrat nakon NACT (69). Jednako se pokazalo u istraživanju Honga i suradnika na svim podtipovima. Ispitivanjem HR+/HER2- BC, ista se razlika nije pokazala statistički značajnom (62). Jednak je bio rezultat

našeg istraživanja. Ispitivani uzorci primarnih lezija i RD nakon NACT i u ovom slučaju nisu pripadali istim pacijenticama.

Istraživanjem na 987 slučajeva HR+/HER2- BC, Criscitiello i suradnici utvrdili su značajno veće proporcije gušće mononuklearne infiltracije u slučajevima zahvaćenih limfnih čvorova ($p=0.003$), višeg gradusa ($p<0.0001$), prisutne peritumoralne vaskularne invazije ($p=0.003$), LB podtipa ($p<0.0001$) i mlađe dobi ($p=0.02$). Razlika u razini infiltracije nije se pokazala značajnom u ovisnosti o veličini lezije ($p=0.07$) (70). Ista se, zajedno s dobi, također nije pokazala značajno povezana s razinom sTIL u istraživanju Miyoshi i suradnika, u kojem su analizirani rani i kasni recidivi i kontrolna skupina primarnih HR+/HER2- BC. U kasnih recidiva i kontrolnoj skupini, značajno veće proporcije gušćeg sTIL bile su prisutne u slučajevima pozitivnog nodalnog statusa ($p=0.008$, $p=0.002$) i visokog gradusa ($p=0.008$, $p=0.028$) (71). Suprotno, Takada i suradnici u svojoj su studiji pokazali kako je sTIL u HR+/HER2- BC prisutan u značajno većoj proporciji u većih lezija ($p=0.02$) te u dobi iznad 60 godina ($p=0.035$). Među ostalim parametrima, uključujući gradus ($p=0.19$), LVI ($p=0.276$) i nodalni status ($p=0.186$), nisu utvrđene razlike u prisustvu sTIL (60). U drugom istraživanju istog autora nije utvrđena značajna razlika procijenjenog sTIL u odnosu na dobne skupine prema sljedećoj raspodjeli: 1: <40, 2: 40-60 i 3: >60 godina ($p_{1,3}=0.111$, $p_{1,2}=0.218$, $p_{2,3}=0.561$) (61). Razine sTIL se nisu pokazale značajno povezane s obzirom na analizirane parametre u studiji Honde i suradnika, na uzorku od 65 HR+/HER2- BC (veličina: $p=0.87$, nodalni status: $p=0.46$, LVI: $p=0.68$, podtip: $p=0.41$, gradus: $p=0.65$) (72). Među navedenim parametrima, u našem smo istraživanju dokazali značajno višu proporciju pozitivne mononuklearne infiltracije u slučajevima pozitivne LVI, u slučajevima procjene sTIL četvero stupanjskom skalom, kao i značajnu slabu pozitivnu korelaciju navedenih značajki neovisno o metodi procjene. Osim toga, u našem istraživanju se pokazalo da su proporcije prisutnih sTIL značajno više nižim stadijima bolesti dok se u stadiju IV izjednačavaju s proporcijama odsutnih

sTIL neovisno o metodi procjene. Utvrđena je i značajna slaba negativna korelacija između stadija i sTIL procijenjenog četvero stupanjskom skalom. Pujani i suradnici utvrdili su značajnu i slabu, ali pozitivnu korelaciju sTIL i kliničkog stadija ($r=0.301$, $p=0.013$) (73). S druge strane, meta analizom, koja je obuhvaćala 33 studije i 18 170 pacijentica, nije utvrđena značajna razlika u prisustvu limfocitno predominantnog BC (LPBC, *lymphocyte-predominant breast cancer*) među stadijima I i II te III i IV (OR=0.825, 95% CI (0.220, 3.095), I²=81.4%, $z=0.29$, $p=0.775$) (74). Uzorci na kojima su provedene potonje studije uključivali su sve receptorske podtipove BC.

Analizom preživljenja, gustoća sTIL nije se pokazala značajno povezana s duljinom OS i/ili DFS u pojedinim istraživanjima (61, 62, 72, 74). S druge strane, Jang i suradnici dokazali su značajno duže OS ($p=0.012$) i DFS (0.002) u slučajevima većih gustoća sTIL u LB HER2-BC, no ta je značajnost izostala u LA BC ($p=0.394$) (59). Obrnuto, u Denkertovoj studiji i meta analizi Gao i suradnika visoki stupanj mononuklearne infiltracije pokazao se povezan sa značajno kraćim OS ($p=0.011$; HR =1.077, 95% CI (1.016 ~ 1.141), $p=0.012$) (74, 75). Našim istraživanjem razlike u duljini OS i DFS se nisu pokazale značajnima u ovisnosti o sTIL bez obzira na korištenu metodu procjene.

Većina je dosadašnjih studija, uz varijabilne rezultate, utvrdila povezanost agresivnijih značajka tumora i lošije prognoze s višim razinama mononuklearne infiltracije u HR+/HER2-BC. Iste su varijacije djelomično uvjetovane razlikama u metodologijama istraživanja, uključujući zajedničku analizu svih receptorskih podtipova u pojedinim studijama (63-65, 69, 73, 74). Osim toga, vrijednosti procijenjene metodom Radne skupine su ovisno o studiji analizirane kao kontinuirane (60, 61, 63, 64, 66-69, 73, 75) i/ili kao kategoričke varijable (59-62, 70-72, 74, 75). Radna skupina preporučuje procjenu sTIL kao kontinuirane vrijednosti, stoga prijelomne vrijednosti za njihovu kategorizaciju nisu standardizirane (54, 62, 75, 76). Kako predložena vrijednost kojom se definira LBPC od 50-60% zbog udjela jače infiltriranih

tumora manjeg od 10% nije primjenjiva u svim slučajevima, prijelomne vrijednosti korištene u istraživanjima variraju u rasponu od 5 do 60%, s podjelama u 2, 3 ili više kategorija (54, 59-62, 70-72, 74-76). Varijacije u rezultatima također su uvjetovane subjektivnošću metoda procjene. Cabuk i suradnici utvrdili su najniži stupanj podudarnosti očitane gustoće sTIL između 4 promatrača u HR+/HER2- BC (ICC=0.55, 95%CI=-0.384-0.693) u odnosu na ostale podtipove (77). Stromalni TIL procijenjen metodom Radne skupine u našoj je studiji kategoriziran zbog jednakog načina analize vrijednosti očitanih s obje metode i njihove usporedbe. Primarne lezije, RD nakon NACT i metastatski tumori pripadali su različitim pacijenticama te su zajedno analizirane u odnosu na kliničkopatološke karakteristike, s potencijalnim utjecajem na dobivene rezultate. Osim toga, mononuklearni tumorski infiltrat čini više podskupina stanica s različitim biološkim djelovanjem. Gustoća sTIL procijenjena na HE bojenim rezovima stoga samo djelomično odražava imunološki odgovor na tumor (71, 78). Razina sTIL u HR+/HER2- BC je prosječno niža u odnosu na agresivnije HER2+ BC i TNBC. Među čimbenicima povezanim sa slabijim stupanjem imunogenosti, studije opisuju imunosupresivne učinke estrogena i ER α te nižu razinu nastanka neoantigena zbog većeg stupnja genske stabilnosti u HR+/HER2- BC (53, 67, 70, 79). Rezultati istraživanja prognostičkog značaja podskupina TIL u HR+/HER2- BC nisu jednoznačni te je pojedinim studijama utvrđen nepovoljan ishod razmjernom infiltraciji Treg s ekspresijom regulatora transkripcije *forkhead box P3* (FOXP3+), CD8+, CD4+ i CD3+ stanica, dok se isti nisu pokazali značajni u drugim studijama (53, 70, 75, 80, 81). S druge strane, povoljan je ishod u pojedinim istraživanjima utvrđen u slučajevima infiltracije B stanicama (75). U našem smo istraživanju dokazali pozitivnu povezanost razine sTIL s prisutnom LVI. Chen i suradnici su dokazali značajnu povezanost prisustva LVI s infiltracijom TIL CD3+, CD4+, CD8+, CD45+, i FOXP3+ u svih podtipova (80). Regulacijske stanice FOXP3+ sudjeluju u navedenom procesu lučenjem vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) i ostalih proangiogenih čimbenika, kao i lučenjem

transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF β , *transforming growth factor beta*), ključnog u procesu endotelno mezenhimalne tranzicije tumorskih stanica, te posljedičnog slabljenja međustaničnih veza, pojačane pokretljivosti i intravazacije (81). S time u vezi, oprečna je negativna povezanost sTIL s kliničkim stadijem bolesti, koju smo također dokazali u istraživanju. Uz spomenuti nalaz niže razine sTIL u primarnim tumorima i odgovarajućim metastazama u odnosu na kontrolnu skupinu u kojoj nije došlo do diseminacije bolesti, Zepellini i suradnici su utvrdili značajno niži udio limfocita CD8⁺ u metastazama u odnosu na primarne HR+/HER2- BC istih pacijentica i kontrolne skupine, upućujući na smanjenu razinu imunološkog odgovora kao jednog od koraka u napredovanju bolesti (67). Szekey je sa suradnicima analizom genske ekspresije utvrdio smanjenu sveukupnu imunološku aktivnost u TME metastaza BC, uključujući smanjenu razinu antigene prezentacije, aktivacije i migracije T i B limfocita (64). Istom je studijom, kao i studijom Zhu i suradnika, dokazana pojačana ekspresija biljega M2 makrofaga, u čijem slučaju rezultati ranijih istraživanja upućuju na anti inflamatornu aktivnost (64-66, 78). S druge strane, jednakim udjelom i distribucijom podskupina TIL u primarnim BC i metastazama neovisno o sijelu, Sobottka i suradnici svojim su istraživanjem utvrdili moguću međusobnu podudarnost TME metastaza i odgovarajućih primarnih tumora (63).

Sveukupno, oprečni rezultati istraživanja sTIL u HR+/HER2- BC, njihove povezanosti s ostalim značajkama tumora i prognozom, odražavaju složenost njihovih interakcija s tumorskim stanicama i ostalim elementima TME te je iste potrebno razjasniti budućim istraživanjima.

Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje u kojem je sTIL u istom uzorku procijenjen na dva načina, s međusobnom usporedbom podudarnosti dobivenih rezultata te njihovom analizom u odnosu na kliničkopatološke parametre i preživljenje. Metoda Međunarodne Radne skupine za imuno-onkološke biomarkere je prva standardizirana metoda

procjene sTIL u BC, s jasnim preporukama o vrsti stanica, strukturama i područjima koja se uključuju i isključuju u procjeni (53-55, 82). Semikvantitativna metoda, kojom se TIL razmjerno gustoći infiltracije svrstava u 4 kategorije, u primjeni je dulje vrijeme i među različitim malignim tumorima, uključujući kolorektalni karcinom, karcinom želuca, karcinom pluća nemalih stanica i melanom. Ovisno o sijelu, navedenom se metodom TIL procjenjuje na cjelokupnom stromalnom području ili odvojeno u području CT i/ili IF te unutar gnijezda tumorskih stanica (iTIL) (56, 83-86). Budući da ista metoda nije standardizirana za BC, u procjeni smo izostavili područja i vrste stanica prema preporukama Radne skupine. Statističkom su analizom dobiveni slični rezultati neovisno o metodi procjene, s razlikom u vidu utvrđene značajne negativne korelacije sTIL i kliničkog stadija te veće proporcije prisutnog sTIL u tumora s pozitivnom LVI u slučaju procjene četvero stupanjskom skalom. Značajno veće proporcije odsutnog sTIL u stadiju IV i pozitivne korelacije s LVI utvrđene su neovisno o metodi procjene. Ostali se parametri nisu pokazali značajnima, no trend je postignut u usporedbi sTIL među primarnim tumorima, RD i metastazama te pozitivne povezanosti s kraćim DFS u slučaju procjene metodom Radne skupine. Navedene su razlike uvjetovane malim brojem ispitanika u uzorku (37), zbog čega manje razlike u raspodijeli varijabla među kategorijama značajno utječu na rezultat statističke analize. Sličnost u rezultatima ispitivanja odražava se vrijednošću ICC od 0.7577, koja označava dobar stupanj podudarnosti očitanih gustoća sTIL između ispitivanih metoda. Međutim, zbog nedostatka ranijih sličnih studija, ne možemo sa sigurnošću izjednačiti pouzdanost korištenja obaju metoda te je istu potrebno dodatno potvrditi budućim istraživanjima.

6. Zaključak

Rezultati našeg istraživanja upućuju na dobar stupanj podudarnosti razina stromalne mononuklearne infiltracije u HR+/HER2- BC procijenjenih metodom Međunarodne Radne skupine za imuno-onkološke biomarkere i četvero stupanjskom skalom korištenom u Klinturpovoj studiji. Time smo dokazali dobru pouzdanost ispitivanih metoda. Neovisno o korištenoj metodi, dokazana je pozitivna korelacija očitanih vrijednosti sTIL i prisustva LVI, kao i veće proporcije tumora s odsutnim sTIL i višim kliničkim stadijem. Procjenom četvero stupanjskom skalom, uz navedeno je dokazana negativna korelacija razina sTIL i kliničkog stadija te veće proporcije prisutnog sTIL u tumora s pozitivnom LVI. Povezanost sTIL s ostalim kliničopatološkim karakteristikama, razlike u infiltraciji između primarnih lezija, RD nakon provedene NACT i metastaza, kao i povezanost s duljinom OS i DFS, nisu dokazane neovisno o metodi korištenoj u procjeni.

Sažetak

Karcinom dojke je najčešća maligna bolest u žena, a najzastupljeniji receptorski podtip čine karcinomi s pozitivnom ekspresijom hormonskih receptora i negativnom ekspresijom receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HR+/HER2-). Cilj istraživanja bio je usporediti dvije metode procjene tumorskog infiltrata limfocita (TIL) u HR+/HER2- karcinomu dojke te ispitati njegovu povezanost s kliničkopatološkim karakteristikama i prognozom. U istraživanju su analizirani biopsijski materijali 37 pacijentica liječenih u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Rijeka u razdoblju 2007.-2019. godine. Medijan dobi bio je 57 godina, s rasponom od 39 do 75 godina. Klinički i patološki podaci su prikupljeni u računalnoj bazi podataka Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i u računalnoj bazi podataka WinBis KBC-a Rijeka. Procjena TIL je učinjena svjetlosno mikroskopskom analizom rezova rutinski bojenih hemalaun-eozinom; metodom Međunarodne radne skupine za imuno-onkološke biomarkere te četvero stupanjskom skalom ranije korištenom u istraživanju upalne reakcije u kolorektalnom karcinomu (Klinturp i suradnici). Podaci su statistički obrađeni računalnim programom MedCalc. Neovisno o metodi procjene, utvrđena je pozitivna korelacija razine TIL s prisustvom limfovaskularne invazije (LVI) te prisustvo TIL u značajno većim proporcijama u tumorima nižih stadija. Procjenom četvero stupanjskom skalom, prisustvo TIL se pokazalo povezano s pozitivnom LVI, uz negativnu korelaciju s kliničkim stadijem. Usporedbom podudarnosti između očitanih gustoća TIL, dobivena je vrijednost interklasnog koeficijenta korelacije od 0.7577, čime je utvrđena dobra razina pouzdanosti metoda korištenih u njegovoj procjeni.

Ključne riječi: karcinom dojke, receptorski podtip, tumorski mikrookoliš, tumor-infiltrirajući limfociti, metoda procjene

Summary

Breast cancer is the most common malignancy in women, with hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-negative (HR+/HER2-) breast cancers representing the vast majority of receptor subtypes. This study aimed to compare two assessment methods of the tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in HR+/HER2- breast cancer and to examine the associations of the TILs density with clinicopathological characteristics and prognostic significance. The analysis included Bioptic material from 37 female patients treated in the Clinical Hospital Center (CHC) Rijeka from 2007 to 2019. The median age was 57 years, with a range of 39 to 75 years. Clinical and pathological data were collected from the computer database of the Department of Pathology and Pathological Anatomy of the Faculty of Medicine, University of Rijeka, and from the WinBis database of CHC Rijeka. The TIL density was evaluated by light microscopic analysis of hematoxylin and eosin (HE) stained specimens; following the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group recommendations, and by a four-degree scale previously used in the inflammatory reaction in colorectal cancer research work (Klinturp et al). MedCalc statistical software was used for statistical analysis. Evaluated by both methods, TIL was significantly positively correlated with the presence of lymphovascular invasion (LVI) and was predominantly presented in low-stage disease. Assessed with a four-degree scale, TIL was presented in more significant proportions in positive LVI cases and was negatively correlated with the clinical stage. The intraclass correlation coefficient was calculated to determine the agreement of TIL densities evaluated in both ways. The value of 0.7577 demonstrated good reliability among the methods used.

Key words: breast cancer, receptor subtype, tumor-infiltrating lymphocytes, tumor microenvironment, assesment method

Literatura

- 1) Tsang J Y S, Tse G M. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020; 27: 27–35.
- 2) Nascimento R G , Otoni K M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*. 2020; 30: e20200024.
- 3) Cserni G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica*. 2020; 112: 25-41.
- 4) Provenzano E, Ulaner G A, Chin S. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clinics*. 2018; 13(3): 325-338.
- 5) Harbeck N, Penault- Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5: 66.
- 6) Erber R, Hartmann A. Histology of Luminal Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*. 2020; 15(4): 327-336.
- 7) Hoda S A, Brogi E, Koerner F C, Rosen P P. *Rosen's breast pathology*. 4. izd. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015.
- 8) Łukasiewicz S, Czeczulewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*. 2021; 13: 4287.
- 9) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019., Bilten 44, Zagreb, 2021.
- 10) Joe B N. Clinical features, diagnosis and staging of newly diagnosed breast cancer U: UpToDate, Burstein H J ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2022 [citirano 20.5.2022.] Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-diagnosis-and-staging-of-newly-diagnosed-breast-cancer>
- 11) Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar N K. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2017; 151: 1-32.
- 12) DeSantis C E, Ma J, Gaudet M M, Newman L A, Miller K D, Goding Sauer A et al. Breast Cancer Statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69: 438–451.
- 13) Cortet M, Bertaut A, Molinié F, Bara S, Beltjens F, Coutant C et al. Trends in molecular subtypes of breast cancer: description of incidence rates between 2007 and 2012 from three French registries. *BMC Cancer*. 2018; 18: 161.
- 14) seer.cancer.gov [internet] USA: Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer Subtypes; [citirano:19.6.2022.]. Dostupno na: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html>

- 15) van der Meer D J, Kramer I, van Maaren M C, van Diest P J, Linn S C, Maduro J H et al. Comprehensive trends in incidence, treatment, survival and mortality of first primary invasive breast cancer stratified by age, stage and receptor subtype in the Netherlands between 1989 and 2017. *Int. J. Cancer.* 2021; 148: 2289–2303.
- 16) Kumar V, Abbas A K, Aster J C. *Robbins basic pathology*. 10. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2018.
- 17) Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases.* 2018; 5: 77-106.
- 18) Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Ullah Khan A U. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017; 50(1): 33.
- 19) Zhou J, Chen Q, Zou Y, Chen H, Qi L, Chen Y. Stem Cells and Cellular Origins of Breast Cancer: Updates in the Rationale, Controversies, and Therapeutic Implications. *Front. Oncol.* 2019; 9: 820.
- 20) Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer - Targets and Therapy.* 2019; 11: 151–164.
- 21) Bhardwaj P, Au C C, Benito-Martin A, Ladumor H, Oshchepkova S, Moges R et al. Estrogens and breast cancer: mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019; 189: 161–170.
- 22) Hilton H N, Clarke C L, Graham J D. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2018; 466: 2-14.
- 23) Gaudet M M, Gierach G L, Carter B D, Luo J, Milne R L, Weiderpass E et al. Pooled Analysis of Nine Cohorts Reveals Breast Cancer Risk Factors by Tumor Molecular Subtype. *Cancer Res.* 2018; 78(20): 6011-6021.
- 24) Holm J, Eriksson L, Ploner A, Eriksson M, Rantalainen M, Li J et al. Assessment of Breast Cancer Risk Factors Reveals Subtype Heterogeneity. *Cancer Res.* 2017; 77(13): 3708-3717.
- 25) Ellingjord-Dale M, Vos L, Tretli S, Hofvind S, dos-Santos-Silva I, Ursin G. Parity, hormones and breast cancer subtypes - results from a large nested case-control study in a national screening program. *Breast Cancer Research.* 2017; 19: 10.
- 26) McCarthy A M, Friebel-Klingner T, Ehsan S, He W, Welch M, Chen J et al. Relationship of established risk factors with breast cancer subtypes. *Cancer Medicine.* 2021; 10: 6456–6467.
- 27) Ellingjord-Dale M, Vos L, Hjerkind K V, Hjartaker A, Russnes H G, Tretli S et al. Alcohol, Physical Activity, Smoking, and Breast Cancer Subtypes in a Large, Nested Case–Control

Study from the Norwegian Breast Cancer Screening Program. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017; 26(12): 1736-1744.

28) Yuan G, Zhang J, Ren Y, Ding W, Du Y, Zhang L et al. Dietary effects on breast cancer molecular subtypes, a 1:2 paired case-control study. *Food Sci Nutr.* 2020; 8: 5545–5549.

29) Figueroa J D, Gierach G L, Duggan M A, Fan S, Pfeiffer R M, Wang Y et al. Risk factors for breast cancer development by tumor characteristics among women with benign breast disease. *Breast Cancer Research.* 2021; 23: 34.

30) Bevers T B, Helvie M, Bonaccio E, Calhoun K E, Daly M B, Farrar W B et al. Breast Cancer Screening and Diagnosis, Version 3.2018. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* 2018; 16(11): 1362-1389.

31) Farshid G, Walters D. Molecular subtypes of screen-detected breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2018; 172: 191–199.

32) Šiško I, Šiško N. Preventivni programi za rano otkrivanje raka dojke u Republici Hrvatskoj
Prevention programs for early detection of breast cancer in Croatia. *Sestrinski glasnik.* 2017; 22(2): 107-110.

33) Šeparović R, Ban M, Silovska T, Beketić Orešković L, Soldić Ž, Podolski P et al. Kliničke upute Hrvatskoga onkološkog društva za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnica/ka oboljelih od raka dojke. *Liječ Vjesn.* 2015; 137: 143–149.

34) Plichta J K, Campbell B M, Mittendorf E A, Hwang E S. Anatomy and Breast Cancer Staging: Is It Still Relevant? *Surg Oncol Clin N Am.* 2018; 27: 51–67.

35) Nicolini A, Ferrari P, Duffy M J. Prognostic and Predictive Biomarkers in Breast Cancer: Past, Present and Future. *Semin Cancer Biol.* 2018; 52(1): 56-73.

36) Amin M B, Edge S, Greene F, Byrd D R, Brookland R K, Washington M K, et al. *AJCC Cancer Staging Manual.* 8. izdanje. New York: Springer International Publishing; 2017.

37) Allison K H, Hammond M E H, Dowsett M, McKernin S E, Carey L A, Fitzgibbons P L et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2020; 38(12): 1346-1366.

38) Wolff A C, Hammond M E H, Allison K H, Harvey B E, Mangu P B, Bartlett J M S et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol.* 2018; 36(20): 2105-2122.

39) Lopez-Tarruella S, Echavarria I, Jerez Y, Herrero B, Gamez S, Martin M. How we treat HR-positive, HER2-negative early breast cancer. *Future Oncol.* 2022; 18(8): 1003-1022.

- 40) Burstein H J. Systemic Therapy for Estrogen Receptor– Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020; 383: 2557-2570.
- 41) Johansson A L V, Trewin C B, Fredriksson I, Reinertsen K V, Russnes H, Ursin G. In modern times, how important are breast cancer stage, grade and receptor subtype for survival: a population-based cohort study. *Breast Cancer Research*. 2021; 23:17.
- 42) Tarighati E, Keivan H, Mahani H. A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer. *Clin Exp Med [Internet]*. 15.1.2022. [citirano 15.6.2022.]; 2022; Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00781-1>
- 43) Parise C A, Caggiano V. Risk of mortality of node-negative, ER/PR/HER2 breast cancer subtypes in T1, T2, and T3 tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 2017; 165: 743–750.
- 44) Min S K, Lee S K, Woo J, Jung S M, Ryu J M, Yu J et al. Relation Between Tumor Size and Lymph Node Metastasis According to Subtypes of Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2021; 24(1): 75-84.
- 45) Isheden G, Grassmann F, Czene K, Humphreys K. Lymph node metastases in breast cancer: Investigating associations with tumor characteristics, molecular subtypes and polygenic risk score using a continuous growth model. *Int. J. Cancer*. 2021; 149: 1348–1357.
- 46) Ehinger A, Malmström P, Bendahl P, Elston C W, Falck A, Forsare C et al. Histological grade provides significant prognostic information in addition to breast cancer subtypes defined according to St Gallen 2013. *Acta Oncologica*. 2017; 56(1): 68-74.
- 47) Sopik V, Sun P, Narod S A. The prognostic effect of estrogen receptor status differs for younger versus older breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2017; 165: 391–402.
- 48) Fallahpour S, Navaneelan T, De P, Borgo A. Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. *CMAJ Open*. 2017; 5(3): 734-739.
- 49) Zhanga H, Zhanga N, Moranb M S, Lia Y, Lianga Y, Suc P et al. Special subtypes with favorable prognosis in breast cancer: A registry-based cohort study and network meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2020; 91: 102108.
- 50) Zhao H. The prognosis of invasive ductal carcinoma, lobular carcinoma and mixed ductal and lobular carcinoma according to molecular subtypes of the breast. *Breast Cancer*. 2021; 28: 187–195.
- 51) Allison K H. Prognostic and predictive parameters in breast pathology: a pathologist's primer. *Modern Pathology*. 2021; 34: 94–106.

- 52) Lee S B, Sohn G, Kim J, Chung I Y, Lee J W, Kim H J et al. A retrospective prognostic evaluation analysis using the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2018; 169: 257–266.
- 53) Burug S, Karama Asleh-Aburaya K, Nielsen T O. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer*. 2017; 24: 3–15.
- 54) 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. *Annals of Oncology* 2015; 26: 259–271.
- 55) Dieci M V, Miglietta F, Guarneri V. Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells*. 2021; 10: 223.
- 56) Klintrup K, Maˆkinen J M, Kauppila S, Vaˆre P O, Melkko J, Tuominen H et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*. 2005; 41: 2645–2654.
- 57) Goldhirsch A, Winer E P, Coates A S, Gelber R D, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013; 24: 2206–2223.
- 58) Diecia M V, Radosevic-Robinc N, Fineberge S, van den Eyndeng G, Ternesı N, Penault-Llorca F et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno- Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2018; 52: 16–25.
- 59) Jang N, Kwon H J, Park M H, Kang S H, Bae Y K. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Density Assessed Using a Standardized Method Based on Molecular Subtypes and Adjuvant Chemotherapy in Invasive Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018; 25: 937–946.
- 60) Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Kouhashi R, Yabumoto A et al. Prediction of lymph node metastasis by tumor-infiltrating lymphocytes in T1 breast cancer. *BMC Cancer*. 2020; 20: 598.
- 61) Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Morisaki T, Shibutani M et al. Differences in tumor-infiltrating lymphocyte density and prognostic factors for breast cancer by patient age. *World Journal of Surgical Oncology*. 2022; 20: 38.
- 62) Hong J, Rui W, Fei X, Chen X, Shen K. Association of tumor-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant chemotherapy with pathological complete response and prognosis in patients with breast cancer. *Cancer Medicine*. 2021; 10: 7921–7933.

- 63) Sobottka B, Pestalozzi B, Fink D, Moch H, Varga Z. Similar lymphocytic infiltration pattern in primary breast cancer and their corresponding distant metastases. *OncoImmunology*. 2016; 5(6): e1153208.
- 64) Szekely B, Bossuyt V, Li X, Wali V B, Patwardhan G A, Frederick C et al. Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2018; 29: 2232–2239.
- 65) Solinas C, Carbognin L, De Silva P, Criscitiello C, Lambertini M. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: Current state of the art. *The Breast*. 2017; 35: 142-150.
- 66) Zhu L, Narloch J L, Onkar S, Joy M, Broadwater G, Luedke C et al. Metastatic breast cancers have reduced immune cell recruitment but harbor increased macrophages relative to their matched primary tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2019; 7: 265.
- 67) Zeppellini A, Galimberti S, Leone B E, Pacifico C, Riva F, Cicchiello F et al. Comparison of tumor microenvironment in primary and paired metastatic ER+/HER2- breast cancers: results of a pilot study. *BMC Cancer*. 2021; 21: 260.
- 68) Hamy A S, Bonsang-Kitzis H, De Croze D, Laas E, Darrigues L et al. Interaction between Molecular Subtypes and Stromal Immune Infiltration before and after Treatment in Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2019; 25(22): 6731-6741.
- 69) Urueña C, Lasso P, Bernal-Estevez D, Rubio D, Salazar A J, Olaya M et al. The breast cancer immune microenvironment is modified by neoadjuvant chemotherapy. *Scientific reports*, 2022; 12(1): 7981.
- 70) Criscitiello C, Vingiani A, Maisonneuve P, Viale G, Viale G, Curigliano G. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2- breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2020; 183: 347–354.
- 71) Miyoshi Y, Shien T, Ogiya A, Ishida N, Yamazaki K, Horii R et al. Associations in tumor infiltrating lymphocytes between clinicopathological factors and clinical outcomes in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2 negative breast cancer. *Oncology letters*. 2019; 17: 2177-2186.
- 72) Honda C, Kurozumi S, Katayama A, Hanna-Khalil B, Masuda K, Nakazawa Y et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer. *Molecular and clinical oncology*. 2021; 15: 252.
- 73) Pujani M, Jain H, Chauhan V, Agarwal C, Singh K, Singh M. Evaluation of Tumor infiltrating lymphocytes in breast carcinoma and their correlation with molecular subtypes, tumor grade and stage. *Breast Disease* 2020; 1: 1–9.

- 74) Gao Z, Li C, Liu M, Jiang J. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020; 20: 1150.
- 75) Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner B I, Weber K E et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018; 19: 40–50.
- 76) Iseki Y, Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Matsutani S et al. A new method for evaluating tumorinfiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer using hematoxylin and eosin (H-E)-stained tumor sections. *PLoS ONE*. 2018; 13(4): e0192744.
- 77) Cabuk F K, Aktepe F, Kapucuoglu F N, Coban I, Sarsenov D, Ozmen V. Interobserver reproducibility of tumor-infiltrating lymphocyte evaluations in breast cancer. *Indian J Pathol Microbiol*. 2018; 61(2): 181-186.
- 78) Zarrilli G, Businello G, Dieci M V, Paccagnella S, Carraro V, Rocco Cappellesso R et al. The Tumor Microenvironment of Primitive and Metastatic Breast Cancer: Implications for Novel Therapeutic Strategies. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21: 8102.
- 79) Segovia-Mendoza M, Morales-Montor J. Immune Tumor Microenvironment in Breast Cancer and the Participation of Estrogens and Its Receptors Into Cancer Physiopathology. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 348.
- 80) Chen Y, Klingen T A, Aas H, Wik E, Akslen L A. Tumor-associated lymphocytes and macrophages are related to stromal elastosis and vascular invasion in breast cancer. *Pathol Clin Res*. 2021; 7: 517–527.
- 81) Oner G, Altintas S, Canturk Z, Tjalma W, Van Berckelaer C, Broeckx G et al. The immunologic aspects in hormone receptor positive breast cancer. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2020; 25: 100207.
- 82) Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell P A, John T, Thapa B et al. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Adv Anat Pathol*. 2017; 24(5): 235–251.
- 83) Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell P A, John T, Thapa B et al. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors. *Adv Anat Pathol*. 2017; 24(6): 311–335.

84) Azimi F, Scolyer R A, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy S W et al. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Grade Is an Independent Predictor of Sentinel Lymph Node Status and Survival in Patients With Cutaneous Melanoma. *Journal of clinical oncology*. 2012; 30(21): 2678-2683.

85) Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S, Lantuejoul S, Dunant A, Graziano S et al. Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology*. 2016; 34(11): 1223-1230.

86) Zhang D, He W, Wu C, Tan Y, He Y, Xu B et al. Scoring System for Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Its Prognostic Value for Gastric Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 71.

Životopis

Lucija Kralj je rođena 5.6.1997. godine u Varaždinu. Osnovnoškolsko obrazovanje stječe u OŠ Grofa Janka Draškovića u Klenovniku, nakon čega upisuje prirodoslovno-matematički smjer u Prvoj gimnaziji Varaždin. Isti završava s odličnim uspjehom 2016. godine te upisuje integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Tijekom akademskih godina 2017./2018. i 2018./2019. obnaša dužnost demonstratora na zavodu za anatomiju, a akademskih godina 2019./2020., 2020./2021. i 2021./2022. na zavodu za opću patologiju i patološku anatomiju. Nagrađena je dekanovom nagradom za izvrsnost za akademsku godinu 2019./2020. Akademске godine 2020./2021., tijekom pandemije COVID-19 volontira na COVID odjelu u respiracijskom centru na neurologiji, KBC Rijeka. Iste akademske godine sudjeluje u radionici „Kako napisati dobar prikaz slučaja?“