

# Tumorski mikrookoliš trostruko negativnog karcinoma dojke

---

**Novak, Kosjenka**

**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:184:116265>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-22**



*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

Kosjenka Novak

TUMORSKI MIKROOKOLIŠ TROSTRUKO NEGATIVNOG KARCINOMA DOJKE

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Kosjenka Novak

TUMORSKI MIKROOKOLIŠ TROSTRUKO NEGATIVNOG KARCINOMA DOJKE

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Manuela Avirović

Komentor rada: dr. sc. Koraljka Rajković-Molek, naslovni poslijedoktorand

Diplomski rad ocijenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Emina Babarović
2. izv. prof. dr. sc. Ita Hadžisejdić
3. doc. dr. sc. Tamara Gulić

Rad sadrži 33 stranica, 1 sliku, 2 tablice, 25 literaturnih navoda.

## **Zahvala**

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Manuli Avirović i komentorici dr. sc. Koraljki Rajković-Molek na pomoći i usmjeravanju u pisanju diplomskog rada.

Zahvaljujem obitelji i prijateljima na potpori kroz sve ove godine. Posebno zahvaljujem Vjeranu na pomoći i podršci kroz cijeli fakultet.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Svrha rada.....	5
3. Pregled literature na zadanu temu .....	6
3.1. Trostruko negativan karcinom dojke (TNKD) .....	6
3.2. Imunouređenje tumora .....	10
3.3. Tumorski mikrookoliš .....	10
3.4. Dvojake uloge TMO-a u imunomodulaciji TNKD-a .....	14
3.4.1. Imunosupresivni TMO u TNKD-u.....	15
3.4.2. Imunoreaktivni TMO u TNKD-u .....	17
3.5. Utjecaj komponenata TMO-a u prognozi TNKD-a.....	18
3.5.1. Prognostička vrijednost TIL-ova u TNKD-u.....	18
3.5.2. Prognostička vrijednost TPM-ova u TNKD-u.....	20
3.5.3. Prognostička vrijednost TPF-ova u TNKD-u.....	21
4. Rasprava .....	23
4.1. Kemoterapija .....	23
4.2. <i>Epidermal growth factor receptor</i> (EGFR).....	23
4.3. PARP inhibitori i PI3K inhibitori.....	24
4.4. Androgeni receptor (AR).....	24
4.5. Estrogen receptor ER- $\alpha$ 36 .....	25
4.6. Imunoterapija.....	25
4.6.1. Djelovanje na kontrolne točke.....	25
4.6.2. Djelovanje na TPM.....	26
5. Zaključci.....	27
6. Sažetak.....	28
7. Summary .....	29
8. Literatura .....	30
9. Životopis.....	33

## **Popis skraćenica i akronima**

AR – androgeni receptor

BL – engl. *basal like*

BRCA – gen karcinoma dojke (engl. *breast cancer gene*)

ECM – ekstracelularnog matriksa

EGFR – engl. *epidermal growth factor receptor*

ER – receptor za estrogen

HER2 – engl. *human epidermal growth factor receptor 2*

IHC – imunohistokemija

LAR – luminal androgen receptor

M, MES – mezenhimalni (engl. *mesenchymal*)

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

PD-L1 – ligand proteina programirane smrti (engl. *programmed cell death protein ligand*)

PPB – preživljenje do progresije bolesti

PR – receptor za progesteron

SPKD – specifično preživljenje od karcinoma dojke

TIL – tumor infiltrirajući limfociti

TMO – tumorski mikrookoliš

TNKD – trostruko negativni karcinom dojke

TPA – tumoru pridruženi adipociti

TPF – tumoru pridruženi fibroblasti

TPM – tumoru pridruženi makrofagi

T<sub>reg</sub> – regulacijski T limfociti

UP – ukupno preživljenje



## 1. Uvod

Karcinomi dojke su velika heterogena skupina malignih epitelnih neoplazmi koje imaju podrijetlo iz žljezdanog tkiva dojke (1). Ako se izuzmu karcinomi kože, karcinom dojke je u žena najčešći dijagnosticirani maligni tumor, incidencije 24,2 % te je vodeći uzrok smrti od malignih bolesti (2). Ukupna incidencija karcinoma dojke je 11.7 %, stoga je to trenutno najčešći karcinom na svijetu. U zemljama u razvoju incidencija karcinoma dojke je u porastu. U razvijenim zemljama poput SAD-a, Kanade, Velike Britanije, incidencija ovog karcinoma pada od početka 21. stoljeća. Pad incidencije djelomično se može pripisati smanjenju upotrebe hormonskog nadomjesnog liječenja (HNL) u menopauzi, nakon što su objavljena istraživanja da HNL povećava rizik od karcinoma dojke (2). Gledajući globalno, kako je sve više starijeg stanovništva, invazivni karcinom dojke je u porastu. 2020. godine bilo je oko 2.3 milijuna novih slučajeva karcinoma dojke i skoro 685 000 smrti uzrokovanih njime. Incidencija je različita u različitim dijelovima svijeta. Najveći rizik nosi bogato stanovništvo u Australiji, Europi i Sjevernoj Americi gdje oko 9 % žena ima dijagnozu invazivnog karcinoma dojke prije 75. godine života (1). Razlog tome je veća prevalencija poznatih čimbenika rizika (nuliparitet, rana pojava menarhe, kasno stupanje u menopauzu, debljina, nutritivni čimbenici i drugi) (2).

Etiologija karcinoma dojke je multifaktorijalna. Karcinom dojke je češći u bogatijim zemljama, gdje je prehrana temeljena na visokom udjelu životinjske masti i na proteinima, a češća je i tjelesna neaktivnost i gojaznost (1). Karcinom dojke povezan je i s reproduktivnim značajkama. Žene koje nisu rađale ili koje su prvo dijete imale u kasnijoj dobi, imaju povećani rizik od karcinoma dojke. Isto tako, veći rizik karakterističan je za nulipare, žene koje su kraće dojile, žene s ranom menarhom (3). U karcinomu dojke identificirane su mutacije dvaju tumor supresorskih gena, BRCA1 i BRCA2. Kada žena naslijedi jedan

mutirani BRCA gen, dok drugi mutira somatskom mutacijom, takav se karcinom naziva hereditarnim (3). Mutacija BRCA1 gena povezana je s većim rizikom za trostruko negativni karcinom, dok je BRCA2 mutacija povezana s većim rizikom za ER i PR pozitivni karcinom (1).

Karcinom dojke se klinički prezentira kao palpabilna masa, najčešće unifokalna i lokalizirana u gornjem vanjskom kvadrantu dojke. Moguće su retrakcije kože, inverzije bradavice, pojava iscjetka kroz bradavicu, a rijetko je moguća i promjena veličine i oblika zahvaćene dojke. Posebni klinički oblik karcinoma dojke jest inflamatorni karcinom. Ovdje susrećemo difuzni eritem i edem kože koji zahvaća barem jednu trećinu dojke. Pri sumnji na malignitet, potrebno je napraviti mamografiju ili ultrazvuk dojke. Za definitivnu dijagnozu potrebno je napraviti biopsiju tkiva i materijal poslati na patohistološku obradu (1).

Na temelju histologije, razlikujemo invazivne karcinome dojke ne-specijalnog tipa ili NST karcinome (*non special type*) od posebnih tipova karcinoma dojke. NST invazivni karcinomi dojke su najčešći (čine 80 % svih karcinoma dojke) i histološki su građeni od atipičnih epitelnih stanica koje su nakupljene u različite formacije (u obliku tračaka, tubula ili solidnih područja). Zbog toga što se ne mogu svrstati u neku specifičnu histološku kategoriju, dobili su naziv *non special type*. Slijedećih 10% čini lobularni invazivni karcinom koji je građen od tračaka, nakupina ili jednoreda atipičnih tumorskih stanica koje su izgubile ekspresiju E.kadherina. Preostalih 10 % čine posebne vrste karcinoma dojke, a ovdje podrazumijevamo papilarni invazivni karcinom, mucinozni karcinom, karcinom s medularnim karakteristikama, kribriiformni i tubularni karcinom, adenoidno cistični karcinom i metaplastični karcinom dojke (1, 3).

Invazivni karcinom dojke je kategoriziran u nekoliko molekularnih subtipova na osnovu molekularnih karakteristika velikih setova gena (PAM 50 analiza). PAM 50 analiza obuhvaća analizu 50 gena pomoću RT-PCR-a te karcinom dojke dijeli u 5 molekularnih subtipova:

luminal A, luminal B, HER2-obogaćen, basal-like i normal-like. Svaki subtip se razlikuje prema prognozi i biološkim karakteristikama. Luminal A karcinom ima najbolju prognozu, dok su HER2-obogaćen i basal-like karcinomi agresivnije prirode (4).

Karcinom dojke kategoriziran je i na temelju imunohistokemijskih karakteristika (IHC) (prema ekspresiji prediktivnih čimbenika). Spomenuti prediktivni čimbenici jesu receptori za steroidne hormone ER i PR te receptori za čimbenike rasta HER2. Na temelju toga razlikujemo ER i PR pozitivne i HER2 negativne tumore; ER, PR i HER2 pozitivne tumore; ER, PR negativne i HER2 pozitivne; te ER, PR i HER2 negativne karcinome (trostruko negativni karcinomi) (3). Najčešći je ER i PR pozitivan karcinom, zatim slijedi HER2 pozitivan karcinom. Treći po učestalosti je trostruko negativni karcinom dojke (TNKD) (1). Pojedini imunofenotipovi se ne razlikuju samo prema odgovoru na terapiju, već imaju i različite prognoze.

Svaki od pet subtipova dobivenih PAM50 analizom može se spojiti s odgovarajućim IHC definiranim imunofenotipom (Tablica 1.). Luminal A i normal-like subtipovi su ER i PR pozitivni, HER2 negativni i KI67 niski, dok je luminal B subtip ER i KI67 visok, PR nizak, a HER2 negativan ili pozitivan. HER2-obogaćen subtip je ER i PR negativan, a HER2 pozitivan. Basal-like subtip je ER, PR i HER2 negativan (TN karcinom) (5).

Tablica 1. Usporedba subtipova dobivenih PAM50 analizom i IHC karakteristika (5).

Subtip dobiven PAM50 analizom	Imunohistokemijske karakteristike
luminal A	ER+, PR+, HER2-, KI67-
luminal B	ER+, PR-, HER2-, KI67+
	ER+, PR-, HER2+, KI67+
HER2-enriched	ER-, PR-, HER2+
basal-like	ER-, PR-, HER2-, basal marker+
normal-like	ER+, PR+, HER2-, KI67-

Dakle, luminalni subtipovi sadrže hormonske receptore i najčešći su (64,3 %) karcinomi dojke. Luminal A subtip je najčešći (54,3%). Dok luminal A subtip ima veću ekspresiju ER povezanih gena, manju ekspresiju proliferacijskih gena i niži histološki gradus, luminal B subtipovi su češće višeg gradusa nego luminal A karcinomi, imaju veću ekspresiju proliferacijskih gena i lošiju prognozu. Međutim, općenito vrijedi da luminalni karcinomi imaju dobru prognozu, dobro odgovaraju na hormonsku terapiju, ali loše na konvencionalnu kemoterapiju. Normal-like i luminal A subtipovi, iako imaju isti IHC status markera, razlikuju se po prirodi ponašanja (normal-like subtipovi imaju nešto lošiju prognozu). HER2-enriched karcinomi dojke imaju lošu prognozu, no osjetljivi su na kemoterapiju i na terapiju anti-HER2 monoklonalnim protutijelima (trastuzumab). Basal-like karcinomi dojke odgovaraju trostruko negativnom karcinomu u 60 do 90 % slučajeva. Karakterizirani su visokom ekspresijom bazalnih markera i gena povezanih s proliferacijom. Češći su u premenopausalnih žena i neki od čimbenika rizika, osim već spomenutih, su i pluriparitet te prva trudnoća u mlađoj dobi. Basal-like karcinom dojke ima nisku stopu preživljenja i visoki rizik od lokalnog i regionalnog relapsa bolesti. Basal-like karcinomi su od posebnog interesa zbog svoje agresivne prirode i zbog manjka ciljane terapije (5).

## **2. Svrha rada**

Svrha rada je prikazati saznanja i trenutni pregled o trostruko negativnom karcinomu dojke te dati prikaz mogućnosti terapijskog djelovanja na isti. TNKD je jedan od najvećih izazova današnje medicine jer do danas nisu razvijeni specifični i ciljani lijekovi za ovu bolest. Imunološki odgovor u TNKD-u je predmet brojnih znanstvenih i kliničkih istraživanja i osnova za razvoj imunoterapije. Pregledni rad o tumorskom mikrookolišu TNKD-a može biti početna točka svima koji će se u budućnosti baviti istraživanjem prognostičkih čimbenika i terapijskih mogućnosti u TNKD-u. Cilj rada je definirati TNKD i molekularne mehanizme koji ga obilježavaju, objasniti što je imunouređenje tumora, definirati mikrookoliš tumora i opisati komponente tumorskog mikrookoliša TNKD-a te njihovo dvojako djelovanje. Nadalje, cilj je opisati prognostičku i terapijsku vrijednost komponenti mikrookoliša TNKD-a te navesti druge potencijalne mogućnosti liječenja.

### **3. Pregled literature na zadanu temu**

#### **3.1. Trostruko negativan karcinom dojke (TNKD)**

Trostruko negativan karcinom dojke (TNKD) je imunohistokemijski definiran odsutnošću estrogenskih i progesteronskih receptora (ER i PR negativan) te HER2 proteina (HER2 negativan). TNKD čini približno 15 do 20 % svih karcinoma dojke. U usporedbi s ostalim karcinomima dojke, TNKD je agresivnije prirode, ima veliki potencijal metastaziranja i loš klinički ishod (veći broj recidiva i niže stope preživljenja) (6). Zbog svog specifičnog molekularnog fenotipa, TNKD nije osjetljiv na endokrinu terapiju ni na molekularnu ciljanu terapiju (7). Stoga, kemoterapija i danas ostaje glavna terapija u ovih pacijentica.

Epidemiološki, TNKD je češći u premenopauzalnih žena (ispod 40. godine života). U usporedbi s ostalim karcinomima dojke, vrijeme preživljenja pacijentica koje boluju od TNKD-a je kraće, a stopa smrtnosti iznosi 40 % unutar prvih pet godina od dijagnoze. TNKD je agresivniji od ostalih tipova karcinoma dojke i gotovo 46 % pacijentica će u prvih nekoliko godina od dijagnoze razviti metastaze. U pacijentica koje razviju metastaze, medijan preživljenja s trenutnim mogućim terapijama iznosi od 13 do 18 mjeseci, dok je stopa recidiva nakon operacije 25 % (6, 7). TNKD najčešće metastazira u mozak i visceralne organe unutar prve tri godine od dijagnoze. Dok je u ne-TNKD bolesnica prosječno vrijeme do relapsa 35 – 67 mjeseci, u bolesnica koje boluju od TNKD-a vrijeme do relapsa iznosi 19 – 40 mjeseci. Tijekom relapsa je stopa smrtnosti čak 75 % (7).

Velika većina (95 %) TNKD-a je histološki klasificirana kao invazivni karcinom NST. Međutim, postoje i drugi histološki oblici TNKD-a. TNKD se rijetko prezentira kao karcinom s medularnim karakteristikama (0,4 - 1 %). Karcinom dojke s medularnim karakteristikama je karakteriziran obilnom limfocitnom infiltracijom i ima bolju prognozu nego drugi histološki oblici TNKD-a. Ostali histološki subtipovi TNKD-a su još rjeđi (<1 %): adenoidni cistični

karcinom, adenoskvamozni karcinom i metaplastični karcinomi dojke vretenastih stanica nalik fibromatozi. Oni su manje agresivni, ali mogući su lokalni recidivi (8).

Brojne su somatske genetske promjene u TNKD-u (6). TNKD prosječno sadrži oko 1,68 somatskih mutacija po megabazi (Mb) (tj. oko 60 mutacija u svakom tumoru) (8). Prosječan broj mutacija u basal-like subtipu iznosi oko 1,69 mutacija po Mb. Karcinome koji sadrže više od 4,68 mutacija po Mb zovemo hipermutiranima. Next generation sequencing (NGS) metodom otkrivene su promjene u tumor supresijskim genima - geni ključni za unutarstanične signalizacijske puteve (PI3K/AKT i RAS/MAPK signalizacija), za popravak oštećene DNA i za regulaciju staničnog ciklusa ili transkripcije. Najčešće somatske mutacije u TNKD-u jesu mutacije TP53, RB1 i PTEN (6). Mutacija TP53 gena čini 60 do 70 % mutacija u TN karcinomima. Takva mutacija češća je u basal-like subtipu (62 – 80 %) u odnosu na ostale subtipove TNKD-a (8). U basal-like karcinomu rjeđe su alteracije u PI3K/AKT putu. PI3K mutacija javlja se u 7 %, AKT3 amplifikacija u 28% karcinoma, a PTEN mutacija ili delecija u 35 % basal-like karcinoma dojke (6). Mutacija PI3K gena češća je u LAR subtipu TNKD-a (8). Istraživanja su dokazala da više od 90 % TNKD pacijentica ima alteriran barem jedan unutarstanični signalizacijski put. Međutim, samo tri alteracije dokazane su prognostičnima za ukupno preživljenje (UP) oboljelih od TNKD-a. To su JAK2 amplifikacija i BRCA1 mutacija (koje predviđaju niže UP) te PTEN alteracija (više UP) (6). BRCA1 i BRCA2 su tumor supresorski proteini važni za diobu stanice, kontrolu grešaka u replikaciji DNA, nužni su za popravak DNA i apoptozu (8). Ukoliko nedostaje jedan funkcionalan BRCA gen dolazi do nedostatnog popravka dvostrukih lomova DNA molekule, čime se stvara genomska nestabilnost (6). Oko 10 % TNKD pacijenata naslijedi jedan mutirani BRCA gen. Osoba koja naslijedi jedan mutirani BRCA gen ima do 70 % veći rizik za razvoj karcinoma dojke. Karcinom koji sadrži naslijeđen BRCA gen najčešće je basal-like fenotipa, češće je ER-negativan, sadrži pojačanu ekspresiju EGFR-a, MYC amplifikaciju, TP53 mutaciju i veliku

genomsku nestabilnost. Osim BRCA gena, produkti ATM i TP53 gena također su važni za signalizaciju oštećenja DNA, stoga njihova mutacija ima ulogu u karcinogenezi karcinoma dojke (8).

BRCA1 mutacije su rijetke u sporadičnim slučajevima TNKD-a (<5 %). U sporadičnom obliku TNKD-a identificirane su somatske mutacije i epigenetičke alteracije koje mogu inaktivirati BRCA1/2 gene i druge gene važne za popravak DNA molekule (6). Altrernativni mehanizmi gubitka BRCA1/2 funkcije su metilacija promotora, somatske mutacije ili delecije BRCA1/2 gena. Takvi genotipovi se nazivaju „BRCAness“ genotipovi. Oni su karakterizirani biološkim i kliničkim fenotipom sličnom karcinomu s naslijeđenom BRCA mutacijom (8).

U TNKD-u nalazimo i epigenetičke promjene. Od 60 do 80 % basal-like subtipova sadrže DNA hipermetilaciju. Najčešće dolazi do hipermetilacije i inaktivacije gena CDH1, CEACAM6, CST6, GNA11, ESR1, MUC1, MYB, SCNN1A i TFF3. Takvi karcinomi imaju niže preživljenje do progresije bolesti (PPB) u odnosu na nemetilirane karcinome (6).

TNKD je heterogena bolest koja se dijeli na različite subtipove. Svaki subtip ima specifične markere i karakteristike. Postoje podjele prema autorima Lehmanu i Bursteinu. Lehmann je dokazao postojanje četiri TNKD subtipa: dva basal-like (BL1, BL2), *mesenchymal* (M) i luminal androgen receptor (LAR) (9). Burstein je svojim istraživanjem dokazao i identificirao sljedeće TNKD subtipove: luminal androgen receptor (LAR), *mesenchymal* (MES), *basal-like immunosuppressed* (BLIS) i *basal like immune-activated* (BLIA). Prognoza je najgora za BLIS subtip, dok je za BLIA subtip najbolja (10). Prema Lehmanu, BL1 ima najniži, a BL2 subtip najviši rizik od progresije (9). Basal-like subtip je definitivno najčešći: od 10 do 25 % invazivnih karcinoma dojke, tj. od 47 do 88 % svih TNKD-a su basal-like subtipa (10).

Postoje specifične molekule koje definiraju svaki pojedini subtip (biomarkeri). LAR subtip sadrži AR (androgeni receptor), MUC1 i nekoliko gena reguliranih estrogenom (ESR1, PGR,



FOXA, XBP1, GATA3) (10). U odnosu na druge subtipove, LAR subtip je stabilniji i sadrži manje mutacija. Međutim, češća je aktivacija PIK3CA i ERBB2 mutacija te povećana AKT signalizacija (9).

M ili MES subtip sadrži visoku ekspresiju gena za receptor prostaglandina F i IGF1 (10). Karakteriziran je visokim brojem mutacija, genomskom nestabilnošću i odsutnošću stanica imunološkog sustava. M subtip pokazuje slabu ekspresiju PD-L1, smanjenu lokalnu metilaciju DNA i supresiju antigen prezentirajućih gena. Ovdje je MHC-1 molekula transkripcijski suprimirana H3K27me3-om, koji je modificiran PRC2-om (polycomb repressor complex 2). To sugerira da nedostatak MHC-1 antigena služi bijegu imunološkom sustavu (9).

BLIS subtip ima najgoru prognozu. Karakteriziran je *down*-regulacijom B, T i NK staničnih regulacijskih puteva te citokinskih puteva. Sadrži visoku ekspresiju imunosuprimirajuće molekule VTCN1, a nisku ekspresiju molekula koje kontroliraju prezentaciju antigena, diferenciranje imunoloških stanica i komunikaciju imunoloških stanica (10). BLIA subtip karakteriziran je *up*-regulacijom gena koji kontroliraju funkcije B, T i NK stanica. Sadrži visoku ekspresiju STAT gena i puteva kontroliranih STAT transkripcijskim faktorima. BLIA subtip ima najbolju prognozu (10).

Prema Lehmanu, BL2 subtip sadrži manje mutacija, a povećanu razinu CDK6 proteina. BL2 subtip ima aktivirajuće mutacije MAPK puta, KRAS amplifikacije i aktiviranu signalizaciju MAPK proteina. BL1 subtip karakteriziran je većim brojem mutacija te gubitkom broja kopija i niskom razinom Rb proteina. U BL1 podtipu identificirana je CCNE1 amplifikacija, u M podtipu NOTCH3, dok je u oba tipa nađena amplifikacija MYC gena i mutacija NOTCH (9).

Mnoge izražene molekule u specifičnim podtipovima TNKD-a mogu biti ciljane odgovarajućim lijekovima. U LAR subtipu mogu se koristiti AR antagonisti i MUC1 cjepiva.

Beta blokatori, IGF i PDGFR inhibitori potencijalno bi mogli biti korisni u MES subtipu. PD1 i VTCN1 protutijela mogu se koristiti u BLIS subtipu, dok bi u BLIA subtipu mogli biti korisni CTLA4 inhibitori, STAT inhibitori, protutijela na citokine ili na njihove receptore (10).

### **3.2. Imunouređenje tumora**

Postoji složena interakcija između tumorskih stanica i imunološkog sustava. Ono što se nekada nazivalo imuni nadzor (engl. *immune surveillance*), danas se naziva mnogo prikladnijim nazivom imunouređenje tumora (engl. *immunoediting*). Imunouređenje označava dvostruku ulogu imunološkog sustava – ulogu zaštite domaćina te ulogu u rastu i razvoju tumora (tumor-sculpting). Imunouređenje tumora ima tri faze: eliminacija, ravnoteža i bijeg. Faza eliminacije odgovara imunom nadzoru, odnosno ovdje imunološki sustav pokušava pronaći i uništiti tumorske stanice. U fazi ravnoteže imunološki sustav učinkovito održava tumor pod kontrolom, iako nije uspio eliminirati sve tumorske stanice. Međutim, time opstaju tumorske stanice koje su postale tolerantne i otporne na imunološki sustav. To nazivamo fazom bijega. Sadašnje razumijevanje imunouređenja tumora važno je zbog razvoja novih terapijskih strategija. Nove strategije sastoje se od blokiranja inhibicijskih molekula imunoloških kontrolnih točaka T limfocita kako bi se izazivale i ojačale postojeće imunološke reakcije na stanice tumora. Navedeno se naziva blokadom kontrolnih točaka (8).

### **3.3. Tumorski mikrookoliš**

Tumorski mikrookoliš (TMO) po definiciji je stanični okoliš tumorskih stanica ili matičnih stanica tumora. Tumorske stanice i komponente TMO stalno se prilagođavaju novim uvjetima s ciljem poticanja rasta tumora. TMO se sastoji od različitih komponenata: imunoloških stanica (granulocita, limfocita, makrofaga), fibroblasta, pericita, adipocita, krvnih žila, ekstracelularnog matriksa (ECM) i signalnih molekula. Ne-maligne stanice u TMO-u često

imaju protumorsku ulogu u karcinogenezi (stimuliraju nekontroliranu proliferaciju stanica). Budući da utječu na razvoj tumora, komponente TMO kao što su imunološke stanice značajne su u procjeni prognoze tumora kao i u odabiru odgovarajućeg liječenja (11, 12).

U TMO-u postoji interakcija između ne-tumorskih i tumorskih stanica. Interakcija među njima dovodi do promjene komponenata TMO-a, remodeliranja ECM-a i neovaskularizacije. Na taj način stvaraju se optimalni uvjeti za metastaziranje. Tumorske stanice mogu utjecati na TMO, a cilj im je supresija imunološkog sustava i uspostava imunološke tolerancije na antigene tumora. U početnim stadijima razvoja tumora, maligne stanice u TMO-u slabo stimuliraju imunološki odgovor. Kako tumor napreduje, tumorske stanice postaju rezistentne na urođeni imunološki odgovor te počnu narušavati stečeni imunološki odgovor. Stečeni imunološki odgovor narušavaju blokiranjem sazrijevanja i funkcije T limfocita, koji se s vremenom nakupljaju u TMO-u (11).

U TMO-u nalazimo tumor infiltrirajuće limfocite (TIL) i makrofage (tumor pridruženi makrofagi, TPM). U TIL-ove ubrajamo CD8<sup>+</sup> T limfocite, CD4<sup>+</sup> T helper stanice, CD4<sup>+</sup> T regulacijske stanice (T<sub>reg</sub>), natural killer stanice (NK), natural killer T (NKT) stanice i B stanice. U TPM-ove ubrajamo M1 i M2 makrofage (12).

Citotoksični CD8<sup>+</sup> memorijski T limfociti ubijaju tumorske stanice prepoznavanjem specifičnog antigena na tumorskim stanicama i stimuliranjem imunološkog odgovora. Uobičajeno ih podržavaju CD4<sup>+</sup> T helper 1 stanice (TH1) otpuštanjem interferona-gama (IFN- $\gamma$ ) i interleukina-2 (IL-2). TH17 stanice značajne su jer potiču rast tumora proizvodnjom IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22 (11). U TMO-u nalazimo i TH2 stanice koje produkcijom IL-4, IL-5 i IL-13 potiču B limfocite. B limfociti imaju ključnu ulogu u regulaciji preživljavanja i proliferaciji tumorskih stanica te u razvoju rezistencije na liječenje. Uobičajeno se nalaze u drenirajućim limfnim čvorovima i limfnim tkivima. Regulacijske T stanice (T<sub>reg</sub>) mogu

suprimirati antitumorski odgovor imunološkog sustava i time poticati imunosupresivnu ulogu TMO-a i progresiju tumora (11).

TPM-ovi, dendritičke stanice i fibroblasti (tumoru pridruženi fibroblasti, TPF) su također važni u razvijanju i prognozi tumora. Najistaknutije imunološke stanice u TMO-u su makrofagi. TPM-ovi imaju protumorsku ulogu i karakterizira ih izražavanje CD68 i CD163 površinskih antigena (13). Imaju mnogo uloga u karcinogenezi – potiču rast tumora, invaziju i metastaziranje. TPM-ovi utječu na invaziju i ekspanziju tumorskih stanica proizvodnjom molekula koje potiču remodeliranje tumorskog tkiva (EGF, MMP9, MT1-MMP, MMP2) i proizvodnjom proupalnih molekula (TNF- $\alpha$ , CXCL10, i IL-1 $\beta$ ) (11). Osim toga, potiču progresiju i metastaziraju tumorskih stanica proizvodnjom kemokina CCL-18. Kemokin se veže na receptor (Nir-1) na stanici tumora karcinoma dojke i time se potiče PI3k/AKT/GSK3 $\beta$ /Snail signalni put (13). TPM-ovi mogu povećati, posredovati ili antagonizirati antitumorsko djelovanje zračenja, citotoksičnih lijekova i blokade kontrolnih točaka (*checkpoint inhibitors*) (11).

Mezenhimalne stanice su najvažnije stanice u interakciji tumora i TMO-a. One mogu diferencirati u pericite i fibroblaste (TPF-ove). TPF-ovi su u velikoj mjeri prisutni u mikrookolišu tumora. Doprinosu proliferaciji tumorskih stanica, potiču širenje i rast metastaza te proizvode citokine i čimbenike rasta (EGF, HGF, FGF) (11, 13). Sudjeluju i u angiogenezi, remodeliranju ECM-a, upali povezanoj s karcinomom te regulaciji diferencijacije epitelnih stanica (14). Istraživanja su pokazala da TPF-ovi mogu poticati napredovanje TNKD-a aktiviranjem TGF- $\beta$ . Osim toga, u TMO-u dolazi do interakcije između tumorskih stanica i TPF-ova te se time proizvode kemokini i interleukini (IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL3, TGF- $\beta$ ) (14). Uz to, tumorske stanice mogu aktivirati TPF-ove preko prostaglandina (PG) E2, VEGF-a i Wnt signalizacijskog puta, čime se potiče rast tumora. Dendritičke stanice u TMO-u potiču prezentaciju antigena te migriraju u limfna tkiva gdje stimuliraju B i T stanice (11).

U TMO-u nalazimo i tumorske matične stanice. One stupaju u interakciju s komponentama TMO-a pomoću signalnih puteva Notch-1 i PI3K. Tumorske matične stanice potiču toleranciju imunološkog sustava na neoantigene proizvodnjom protuupalnih citokina te u hipoksičnim uvjetima proizvode proangiogene čimbenike (VEGF) (11).

Adipociti (tumoru pridruženi adipociti, TPA) mogu poticati rast tumora (13). Produciraju hormone, čimbenike rasta, citokine, adipokine i time osiguravaju gorivo za rast. Osim toga, mogu potisnuti odgovore na lijekove i promovirati rezistenciju na radioterapiju (13, 14). Stanice karcinoma dojke mogu potaknuti oslobađanje masnih kiselina iz adipocita, čime se potiče stvaranje čimbenika povezanih s upalom i pogoršava prognoza bolesti (Tablica 2.) (14).

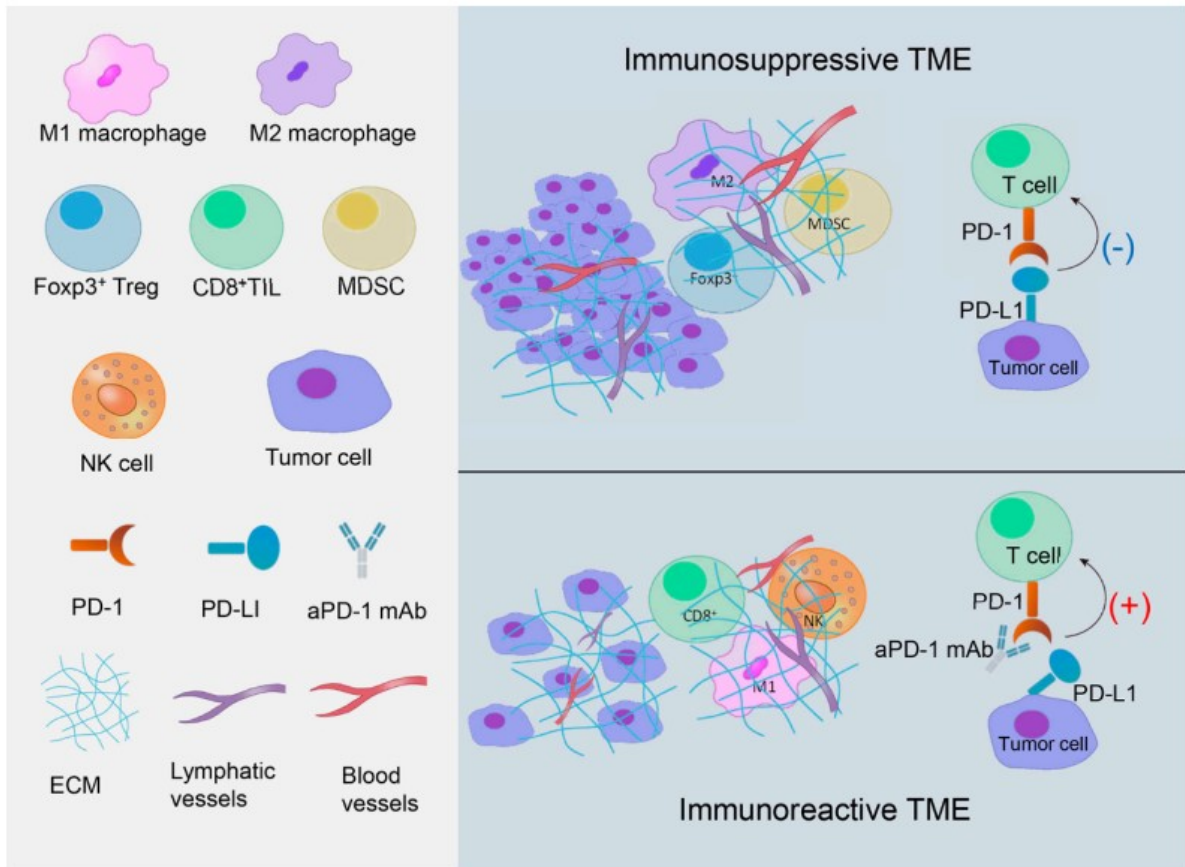
Sastavni dio TMO-a, uz različite stanice, je i ekstracelularni matriks (ECM) (11). ECM je složena mreža koja se sastoji od proteina sa strukturnom i regulacijskom funkcijom. Proteinski sastav i fizičke karakteristike ECM-a upravljaju stanicama putem biokemijskih i biomehaničkih mehanizama (14). ECM se sastoji od tri tipa proteina: strukturni proteini (kolagen, elastin), specijalizirani glikoproteini (fibronektin) i proteoglikani. Svaki ima svoju ulogu. Kolagen je glavna komponenta i daje snagu i otpornost ECM-u. Specijalizirani glikoproteini važni su za staničnu adheziju, dok proteoglikani kontroliraju prolaz citokina i faktora rasta između stanica. Interakcija između proteina TMO-a također je važna u poticanju rasta tumora. Naime, biomehanička se svojstva ECM-a mijenjaju u patološkim stanjima. Na primjer, tip I i tip IV kolagen mogu povećati agresivne karakteristike stanice tumora. Dokazano je da TNKD tumori sadrže akumulaciju kolagena te da kolagen tipa I u luminal-like karcinomu dojke inducira apoptozu stanica. Osim toga, u TNKD-u dolazi do povećanja broja fibroblasta, koji zatim potiču ECM na remodeliranje, čime se poveća krutost ECM-a. To je povezano s TGF- $\beta$  signalizacijom (stimulira proizvodnju kolagena) i TPM infiltracijom. Povećana krutost ECM-a može promijeniti mehanosignalizaciju, vaskularnu distribuciju i

poticati pro-tumorigenu infiltraciju imunoloških stanica, što sve može poticati stanice karcinoma na invazivnost. Dakle, u karcinomu dojke mnogi ECM proteini nisu regulirani i specifične komponente ECM-a promiču progresiju tumora i metastaziranje. Budući da su metastaze glavni uzrok smrti u TNKD pacijenata, ECM bi mogao biti terapijski cilj za sprječavanje metastaziranja (14).

### **3.4. Dvojake uloge TMO-a u imunomodulaciji TNKD-a**

TMO ima ključnu ulogu u imunomodulaciji i progresiji TNKD-a. Prema doprinosu imunološkog odgovora, TMO u TNKD-u se može podijeliti na imunosupresivni i imunoreaktivni (Slika 1). Tumor infiltrirajući limfociti (TIL) čini veliki dio TMO-a, i sastoji se od heterogenog infiltrata. Poglavitito su to CD3<sup>+</sup> T stanice, a u manjoj mjeri i CD20<sup>+</sup> B stanice. CD3<sup>+</sup> T stanice dijelimo na citotoksične CD8<sup>+</sup> limfocite (CD8<sup>+</sup> TIL), CD4<sup>+</sup> helper limfociti (pomagači) (CD4<sup>+</sup> TIL) i FoxP3<sup>+</sup> regulacijski T limfociti (FoxP3<sup>+</sup> Treg). Svaka od ovih stanica ima različitu ulogu u imunomodulaciji (14, 15, 16).

TMO kontrolira razvoj metastaza u TNKD-u preko signalnih puteva Wnt, NFkB Notch i hedgehog. Notch signalni put ima onkogenu i tumor supresorsku ulogu. Abnormalno je izražen u stanicama TNKD-a. Notch signalni put potiče angiogenezu u TNKD-u i povezan je s imunosupresivnim mehanizmima. Preko T<sub>reg</sub>-ova aktivira CD8<sup>+</sup> limfocite T i smanjuje antigen prezentirajuću ulogu TPM-ova. Wnt signalni put potiče progresiju TNKD-a. Naime, Wnt ligand regulira MCL1 (mitohondrijalni regulator) preko c-Myc-a i time potiče progresiju karcinoma. Ovaj signalni put također je uključen u sazrijevanju NK stanica i povećava ekspresiju PD-L1 u karcinomu dojke. Hedgehog signalni put potiče neovaskularizaciju, metastaziranje i komunikaciju među tumorskim stanicama (povećanjem proizvodnje upalnih citokina). NFkB je nuklearni transkripcijski faktor koji sudjeluje u regulaciji proupalnih signala, proliferaciji i preživljenju stanica tumora. (13).



Slika 1. Imunosupresivni i imunoreaktivni TMO. Imunosupresivni TMO sadrži M2 makrofage, FoxP3<sup>+</sup> regulacijske limfocite T, supresorske stanice mijeloidne loze (MDSC) i PD-1/PD-L1 os. Imunoreaktivni TMO sadrži CD8<sup>+</sup> T limfocite, NK stanice i M1 makrofage. Os PD-1/PD-L1 postaje imunoreaktivna u odgovoru na anti-PD1 ili anti-PD-L1 monoklonalno protutijeli (aPD-1/PD-L1 mAb) zbog aktivacije CD8<sup>+</sup> T limfocita (15).

### 3.4.1. Imunosupresivni TMO u TNKD-u

Visoki broj mutacija i genomska nestabilnost TNKD-a rezultira prisustvom neoantigena na stanicama tumora, koje prepoznaju stanice imunološkog sustava. Prema tome, TNKD u usporedbi s drugim tipovima karcinoma dojke ima više TIL-ova i više „programmed cell death ligand 1“ proteina (PD-L1). PD-L1 i njegov receptor „programmed cell death protein 1“ (PD-1) uključeni su u imunomodulaciju (8, 14). PD-L1 je izražen na tumorskim stanicama, a PD-1 je izražen na TIL-ovima. Ekspresija PD-L1 i PD-1 ima negativnu ulogu u imunomodulaciji – inhibira aktivaciju TIL-ova. Time tumorske stanice mogu pobjeći imunološkoj reakciji (15). Također, trajna visoka ekspresija PD-1 na CD8<sup>+</sup> T stanicama

dovodi do "iscrpljenosti T stanica". Iscrpljene CD8<sup>+</sup> T stanice tada imaju poremećenu efektorsku funkciju i trajnu ekspresiju inhibitornih receptora (14). Ekspresija PD-L1 je modificirana mnogim signalnim putevima (PTEN, Wnt, PI3K, c-Myc, NF- $\kappa$ B) (15). Gubitak PTEN ekspresije u TNKD-u povezana je s povećanom ekspresijom PD-L1 (8). BL karcinom dojke ima najveću učestalost PD-L1 amplifikacija/promjena (17 %) (8).

U TMO-u postoje različite vrste TIL-ova, među kojima su i regulacijski T limfociti (T<sub>reg</sub>). Karakterizira ih ekspresija faktora transkripcije forkhead box P3 (FoxP3) (13). U odnosu na druge tipove karcinoma dojke, TNKD ima najviše T<sub>reg</sub> stanica (14). Prognostička uloga T<sub>reg</sub>-ova ostaje kontroverzna budući da postoje istraživanja s oprečnim rezultatima. T<sub>reg</sub>-ovi dakle djeluju i imunosupresivno i imunoreaktivno. Imunosupresivno djeluju zahvaljujući *down*-regulaciji Notch signalizacijskog puta, sekrecijom upalnih interleukina (IL-4, IL-4, IL-10) te smanjenom sekrecijom IFN- $\gamma$  i IL-17 (15).

Glavni makrofagi imunosupresivnog djelovanja TMO-a su alternativnim putem aktivirani M2 makrofagi. M2 makrofagi promoviraju inicijaciju, angiogenezu, remodeliranje ECM-a, invaziju i metastaziranje. Sudjeluju u proizvodnji citokina, kemokina i čimbenika rasta. TNKD izlučuje više vrsta G-CSF čime potiče diferencijaciju makrofaga u M2 fenotip, koji potiče rast tumora (14). „Reactive oxygen species-induced“ makrofagi povećavaju ekspresiju PD-L1 aktiviranjem NF- $\kappa$ B signalizacijskog puta, proizvode imunosupresivne kemokine i interleukine (IL-10, IL-17, IL-4, IL-1 $\beta$ ) (15).

Supresijske stanice mijeloidnog podrijetla (SSMP) također imaju supresivno djelovanje na urođenu i T staničnu antitumorsku imunost. To su nezrele mijeloidne prethodničke stanice iz koštane srži koje se nakupljaju u limfnim tkivima, krvi ili tumorima. Češće su u TNKD-u nego u drugim tipovima karcinoma dojke (15, 16).



### 3.4.2. Imunoreaktivni TMO u TNKD-u

NK stanice su vrsta citotoksičnih limfocita i dio urođenog imunološkog sustava te imaju antitumorsku funkciju u TNKD-u. NK stanice koje infiltriraju tkivo tumora imaju manje agresivnu aktivnost u usporedbi s cirkulirajućim NK stanicama. Nalaze se u izobilju u ranim fazama tumora, no u metastazama je njihov broj manji. Dakle, NK stanice su važne u fazi eliminacije, no jednom kada se razvije tumor, TMO djeluje supresivno na NK stanice. Tumorske stanice proizvode IL-18 koji povećava ekspresiju PD-1 na NK stanicama i time pridonose lošoj prognozi TNKD-a. NK stanice su glavni efektori stanične citotoksičnosti posredovane antitijelima i stoga imaju važnu ulogu u terapiji temeljenoj na antitijelima. Funkciju NK stanica reguliraju različite molekule i ligandi. Lectin-like Transcript-1 je ligand koji dolazi u interakciji s receptorom NKRP1A na NK stanicama i sprječava njihovu aktivaciju (15).

M1 makrofagi imaju proupalnu ulogu, aktiviraju imunološki odgovor i suprotstavljaju se tumorigenezi. Visoka razina CCL5 povezana je s aktiviranjem M1 makrofaga, CD8+, CD4+ TIL-ova i NK stanica u TNKD-u. U ranoj fazi tumora dolazi do oslobađanja M1 povezanih citokina uz manje infiltraciju M2 makrofaga u TMO. Međutim, u višim stadijima i metastatskoj bolesti dolazi do povećanja ekspresije CD4+ TH2 citokina čime se potiče značajnije infiltriranje imunosupresivnih M2 aktiviranih stanica u TMO (15, 16).

TNKD je bogat TIL-ovima - sadrži više od 50 % limfocitnog infiltrata, stoga se naziva limfocitno-predominantnim karcinomom dojke (LPKD). TNKD sadrži najviše CD8+ citotoksičnih T stanica. Ukupan broj CD8+ stanica u obrnutoj je korelaciji s ER i PR ekspresijom. CD8+ TIL-ovi su glavni citolitički limfociti u tumoru i imaju prognostičku ulogu u TNKD-u (14). Podržavaju ih TH1 stanice otpuštanjem IFN- $\gamma$  i IL-2. Ubijaju tumorske stanice prepoznavanjem specifičnog antigena na tumorskim stanicama i stimuliranjem imunološkog odgovora (11). Granzyme B je serinska proteaza koju luče aktivirani

citotoksični limfociti i NK stanice kako bi potaknule apoptozu ciljnih stanica. Kemokini (CXCL10 i CCL5) ključni su za selektivno privlačenje aktiviranih citotoksičnih stanica u tumor. Osim neoantigena, CD8<sup>+</sup> T limfociti mogu prepoznati povišene razine vlastitih antigena, što označava da njihova infiltracija može biti važna u kontroli slabo imunogenih karcinoma s ograničenim brojem mutacija (17).

### **3.5. Utjecaj komponenata TMO-a u prognozi TNKD-a**

#### **3.5.1. Prognostička vrijednost TIL-ova u TNKD-u**

Tumor infiltrirajući limfociti ključni su igrači u TMO-u. TNKD ima više TIL-ova u usporedbi s drugim subtipovima karcinoma dojke (14). TIL-ovi nisu prognostički markeri za ukupno preživljenje (UP) i preživljenje do progresije bolesti (PPB), ali su povezani s povoljnim UP i PPB. CD8<sup>+</sup> limfociti su povezani s boljim PPB i specifičnim preživljenjem od karcinoma dojke (SPKD), dok za FoxP3<sup>+</sup> limfocite postoje oprečni rezultati (15, 16, 18). Suprotno od toga, povećana razina imunosupresivnih markera kao PD-L1 i CD 163 ukazuju na lošiju prognozu (19). Detaljnije je razrađeno u nastavku.

Budući da CD4<sup>+</sup> T limfociti promjene svoj dominantni subtip iz TH1 (koji je u početnom stadiju tumora) u T<sub>reg</sub> i TH17 (u kasnijim stadijima), njihova uloga u prognozi tumora je kompleksna i teško ju je potpuno razjasniti (14, 20). Istraživanja daju oprečne rezultate. U istraživanju autora Yu et al. dokazano je da je dobar prognostički indikator u TNKD-u visoka razina CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stanica te kombinacija visokog omjera CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> TIL-ova (14). Međutim, istraživanje Matkowski et al. dokazalo je da bolesnici s visokom ekspresijom CD4 ili CD8 imaju lošije UP. U ranom karcinomu dojke, prisutnost CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T stanica korelira sa zahvaćenošću limfnih čvorova i nepovoljnom prognozom (21). U istraživanju Huang et al. dokazan je dominantni udio CD8<sup>+</sup> T stanica u odnosu na CD4<sup>+</sup> T stanica u ranoj fazi razvoja tumora. S progresijom bolesti CD4<sup>+</sup> T stanice sve više infiltriraju tumor, stoga postaju dominantne u kasnim fazama razvoja tumora. Dakle, dinamika omjera CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

limfocita mijenja se s progresijom tumora. Omjer CD4+/CD8+ limfocita pozitivno korelira s uznapređovalim stadijem tumora, veličinom tumora i pozitivnim statusom limfnih čvorova, a negativno korelira s UP i PPB (20).

TNKD pacijenti s visokom razinom CD8+ TIL-ova imaju povoljno PPB i SPKD (15, 20). Isto vrijedi za rezidualne tumore s visokim omjerom CD8+/FoxP3+ limfocita (15). Uz to, TNKD pacijenti s niskim TIL-ovima (<10 %) imaju tendenciju ranijeg recidiva (14). Dokazano je da su CD8+ T limfociti neovisni prognostički faktor povezan s boljim preživljenjem samo u basal-like TNKD-u. U odnosu na primarni tumor, metastaze TNKD-a sadrže manje TIL-ova. Nakon razvoja metastaza, niži omjer CD8+/FoxP3+ T stanica povezan je s boljim preživljenjem (14).

Uloga T<sub>reg</sub>-ova je dvojaka - imunoreaktivna i imunosuprimirajuća. Zbog toga postoje kontradiktorni rezultati u njihovoj prognostičkoj ulozi, koja može biti negativna i pozitivna. U istraživanju Yu et al. dokazano je da je FoxP3 ekspresija povoljan prognostički indikator za TNKD pacijente te da njihov broj direktno korelira s dužim PPB u TNKD pacijenata (Tablica 2.) (14). Međutim, u istraživanju Mao et al. dokazano je da FoxP3+ limfociti ukazuju na loše ishode preživljavanja. Stoga su potrebna daljnja istraživanja za otkrivanje uloge ovih stanica u prognozi TNKD-a (18).

Prisutnost imunoloških stanica (poglavito TIL-ova) i njihova prostorna raspodjela unutar TNKD-a pokazala je da imaju prognostičku ulogu. Prema tome, TNKD je klasificiran u četiri podtipa: *fully inflamed* (FI), *stromal restricted* (SR), *margin restricted* (MR) i *immune desert* (ID) (9). FI sadrži velik broj TIL-ova ( $\geq 10\%$ ) u stromi i parenhimu tumora. SR sadrže TIL-ove u intratumorskoj stromi. MR sadrži mali broj ili su TIL-ovi popuno odsutni u parenhimu, ali su prisutni na rubovima (marginama) tumora. ID podtip definiran je malim brojem ili odsutnošću TIL-ova u parenhimu tumora, rubovima i okolnom tkivu (9). Tumori s nižim brojem CD8+ T stanica (MR i ID subtipovi) imaju lošu prognozu. Sadrže imunosupresivni

TMO i negativni su na ekspresiju PD-L1 (22). SR subtip je povezan s lošim UP, iako sadrži velik broj CD8+ T stanica. Pozitivan je na PD-L1 i sadrži FoxP3+ infiltraciju, što ukazuje na imunosupresivnu ulogu TMO-a u ovom podtipu. FI podtip TNKD-a ima proupalni TMO te bolju prognozu. Dakle, iako i SR i FI podtip imaju velik broj TIL-ova u TMO-u, SR ima lošiju prognozu u odnosu na FI podtip. To ukazuje na nužnost uključivanja lokalizacija i prostornih uzoraka CD8+ T stanica u prognozu bolesti (22).

Prognostička vrijednost TIL-ova u TNKD-u u kontekstu neoadjuvantne kemoterapije (NAC) je jasna - povezani su s boljom stopom preživljenja (14). TNKD-ov mikrokoliš na temelju kvantitativnih TIL analiza možemo podijeliti na imunološki "vruće" (sadrži velik broj TIL-ova) i "hladne" tumore (mali broj TIL-ova) (6). U pacijentica s rezidualnom bolešću TNKD-a, kvantitativna procjena TIL-ova nakon NAC-a pokazala je da se TMO može promijeniti iz „hladnog“ oblika u „vrući“ (6, 8). Tumori koji ostaju „hladni“ nakon NAC-a imaju veći rizik od relapsa bolesti. Time se može zaključiti da NAC ima imunomodulatornu ulogu. Dakle, u TNKD-u je „vrući“ TMO povezan s boljom prognozom, većom vjerojatnošću od koristi kemoterapije te nižim rizikom od recidiva (8, 14).

PD-1 suprimira antitumorski imunološki odgovor i važna je kontrolna točka u imunoterapiji (18). U istraživanju Mao et al. dokazano je da PD-1+ limfociti ukazuju na niži UP. Osim toga, PD-L1 je povezan s nižim PPB i UP (18). Bolji je UP u pacijenata koji su koristili PD-L1 inhibitore (atezolizumab) u kombinaciji s nab-paklitakselom, dok doksorubicin i cisplatina mogu imunoreaktivirati TMO i poboljšati odgovor na PD-1 inhibitore u TNKD-u (15).

### **3.5.2. Prognostička vrijednost TPM-ova u TNKD-u**

TNKD stanice su pod utjecajem TPM-ova koji utječu na progresiju tumora (14). U više radova prikazana je povezanost markera CD163+ i CD68+ M2 makrofaga s agresivnim ponašanjem TNKD-a te većim rizikom od metastaziranja i nižim PPB-om i UP (15). Stoga je

visoka razina infiltracije CD68+ TPM-ova u TMO nepovoljan prognostički čimbenik u TNKD pacijenata (Tablica 2.). Pacijenti s visokom razinom infiltrirajućih CD68+ TPM-ova izražavaju veće razine IL-6 i CCL5, koji su povezani s lošijom prognozom (14). Osim toga, TNKD pacijenti s visokim CD68+, CD163+ TPM-ovima i niskim CD4+, CD8+, CD20+ TIL-ovima imaju niži PPB i UP u odnosu na pacijente s niskim CD68+, CD163+ TPM-ovima i visokim CD4+, CD8+, CD20+ TIL-ovima. Isto tako, TNKD-ovi s visokim omjerom CD68+/CD8+ stanica imaju kraći PPB i UP u odnosu na pacijente s niskim omjerom CD68+/CD8+ stanica. Može se zaključiti da TPM-ovi proizvode optimalne uvjete TMO-a za daljnju progresiju TNKD-a (23).

### **3.5.3. Prognostička vrijednost TPF-ova u TNKD-u**

Interakcije fibroblasta posebno utječu na TNKD. Pod utjecajem fibroblasta, luminalni tip karcinoma dojke ima promijenjenu proliferaciju, dok basal-like stanice pokazuju povećanu migraciju. Dolazi i do *up*-regulacije određenih gena (TGFB1, TWIST, EMT). Spomenute promjene pogoršavaju prognozu u TNKD-pacijenata. TNKD pacijenti koji imaju tumore s bogatom dezmpolastičnom stromom ( $\geq 50$  % strome) imaju lošiji ishod od pacijenata koji imaju tumore s malom količinom strome. Osim toga, dokazano je da su geni koji kodiraju membranske proteine i čimbenici koje luče TPF-ovi također povezani s rezistencijom na kemoterapiju. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dokazala prognostička vrijednost TPF-ova u karcinomu dojke (Tablica 2.) (14).

Tablica 2. Prikaz prognostičke uloge pojedinih stanica TMO-a u TNKD-u (14).

Vrsta stanice	Karakteristike stanica u TNKD-u	Prognostička vrijednost u TNKD-u
TIL	Visoki broj (CD8+ TIL-ova, T <sub>reg</sub> -ova)	Pozitivna korelacija
TPM	Više TPM-ova, <i>up</i> -regulacija M2 markera, <i>up</i> -regulacija Ki-67	Negativna korelacija (još u istraživanju)
TPF	Migracija	Negativna korelacija (još u istraživanju)
TPA	Učinak na rast i invazivnost tumora	Negativna korelacija (još u istraživanju)

## **4. Rasprava**

### **Terapijske mogućnosti u TNKD-u**

Zbog visoke heterogenosti TNKD-a teško je otkriti nove terapijske ciljeve i provesti ciljanu terapiju. Trenutno je u tijeku veliki broj kliničkih ispitivanja koja su usmjerena na specifične receptore i molekule, odnosno na potencijalne terapijske ciljeve (7). Takva ciljana terapija bila bi idealna u TNKD pacijenata koji nemaju dobru reakciju na kemoterapiju. 90 % TNKD-a koji perzistiraju nakon kemoterapije sadrže promijenjene molekularne puteve na koje bi se mogla razviti ciljana terapija (8). Neke od trenutnih terapijskih mogućnosti i terapijskih ciljeva obradit ćemo u nastavku.

#### **4.1. Kemoterapija**

Citotoksična kemoterapija je temelj liječenja TNKD-a. Pacijenti s TNKD-om imaju veći odgovor na kemoterapiju nego pacijenti s drugim tipovima karcinoma dojke. Iako nisu definirani režimi neoadjuvantne i adjuvantne kemoterapije, preferirani su taksani i antraciklini . Usprkos kemoterapiji, manje od 30 % pacijenata s razvijenim metastazama preživi više od 5 godina nakon dijagnoze (8). Do danas ne postoji kemoterapija koja bi poboljšala stopu preživljenja pacijenata s proširenim TNKD-om.

#### **4.2. *Epidermal growth factor receptor (EGFR)***

Okolo 60 % basal-like karcinoma dojke sadrži EGFR, stoga se smatra da EGFR može biti novi terapijski cilj u TNKD-u. Analiza EGFR signalnog puta u TNKD pacijenata nakon primjene liječenja usmjerenog na EGFR pokazala je da je ovaj signalni put aktiviran u većine ovih pacijenata. Međutim, liječenje usmjereno izolirano na EGFR ne postiže značajnu učinkovitost. Korištenje terapije usmjerene na EGFR s drugim inhibitorima prijenosa signala (PI3K, MAPK, Src inhibitori) moglo bi voditi do boljih rezultata (7).

### **4.3. PARP inhibitori i PI3K inhibitori**

PARP je enzim koji sudjeluje u popravku DNA molekule te u progresiji staničnog ciklusa i apoptozi. Najznačajniji je PARP-1. Inhibicija PARP-a vodi do nemogućnosti popravka DNA molekule i time do apoptoze. PARP inhibitori mogu povećati terapijsko djelovanje radioterapije i kemoterapije. Imaju značajne antitumorske učinke u BRCA1/2 mutiranim tumorima. Njihovo djelovanje u takvim tumorima je 100-1000 puta jače naspram tumora bez BRCA mutacije. Budući da do 19,5 % TNKD pacijenata sadrži BRCA mutaciju, PARP-inhibitori mogli bi imati veliku ulogu u liječenju takvih bolesnika. Međutim, klinička ispitivanja nisu dala obećavajuće rezultate. Olaparib (PARP-inhibitor) nije očekivano djelovao u TNKD pacijenata s mutiranom BRCA genom. Stoga, zaključuje se da postoje i drugi mehanizmi popravka DNA molekule (7).

PI3K stabilizira dvolančane lomove DNA, regulira rast stanice, metabolizam i preživljenje stanice (7, 8). Zbog spomenutih karakteristika, obećavajuće je koristiti PI3K inhibitore zajedno s DNA oštećujućim agensima u ne-LAR subtipovima TNKD-a (8). PI3K blokadom dolazi do *down*-regulacije BRCA1/2 i time se stvaraju tumori nalik BRCA mutiranima („BRCAness“ stanje). Time se omogućuje djelotvornost PARP inhibitora (7, 8). Trenutno je u istraživanju učinkovitost kombinacije PARP inhibitora (olaparib) i PI3K inhibitora BKM120 (7). PARP inhibitori mogli bi biti učinkoviti u liječenju BL-1 subtipa karcinoma dojke (7).

### **4.4. Androgeni receptor (AR)**

Ekspresija AR je pozitivna u 10 do 15 % TNKD pacijenata. LAR subtip TNKD karakteriziran je ekspresijom AR, pa bi antiandrogena terapija potencijalno mogla biti uspješna u ovom subtipu. Uz to, LAR subtip ima i mnogo aktivirajućih mutacija PI3K gena, stoga je senzitivan na PI3K inhibitore. Kombinacija PI3K i AR inhibitora mogla bi biti uspješna u liječenju LAR subtipa (7, 8).



## **4.5. Estrogen receptor ER- $\alpha$ 36**

TNKD stanice su neosjetljive na endokrinu terapiju. Međutim, izoliran je novi estrogini receptor ER- $\alpha$ 36. Nalazi se u citoplazmi i na membrani stanice, a izoliran je i na ER-pozitivnim i ER-negativnim stanicama. Zbog toga, mogla bi se razviti ciljana terapija na receptor ER- $\alpha$ 36 (7).

## **4.6. Imunoterapija**

### **4.6.1. Djelovanje na kontrolne točke**

Stanice tumora mogu izbjeći imunološko prepoznavanje kroz sustav imunoloških kontrolnih točaka (*checkpoints*) (7). Imunološke kontrolne točke su raznolik skup regulacijskih točaka za stečeni imunitet, s antitumorskom ulogom i ulogom u imunotoleranciji. Regulacijske kontrolne točke mogu djelovati pozitivno i negativno na imunološki odgovor – koordiniraju opsežnost i tip imunološkog odgovora (24). Zbog toga je blokiranje imunoloških kontrolnih točaka obećavajuća strategija liječenja tumora (7). Danas se istražuju antitijela na „cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4“ (CTLA-4) i „programmed cell death protein 1 pathway“ (PD-1/PD-L1). CTLA-4 i PD-1 su negativni regulatori imunološkog odgovora. Stoga bi monoklonska antitijela na PD-1/PD-L1 ili CTLA-4 uklonila inhibiciju na imunološki odgovor (24).

PD-1 je član CD28/CTLA-4 obitelji kostimulatornih receptora i može potisnuti antitumorski imunološki odgovor (18). Nalazi se na limfocitima i antigen prezentirajućim stanicama (24). PD-L1 je transmembranski protein izražen na tumorskim stanicama. PD-L1 se veže za PD-1 i odašilje signale za inhibiciju proliferacije T stanica (7). Prema istraživanju, 59 % TNKD pacijenata ima visoku ekspresiju PD-L1, 70 % ima visoku ekspresiju PD-1, a 45 % ima visoku ekspresiju PD-L1 i PD-1. Istraživanje s pembrolizumabom (anti-PD-1 monoklono protutijelo) pokazalo je da je ukupna stopa odgovora u TNKD pacijenata na ovo protutijelo

18,5 %. Istraživanje s atezolizumabom (anti-PD-L1 monoklonalno protutijelo) pokazalo je da je približno 10 % TNKD pacijenata doživjelo trajni učinak liječenja. Trenutni glavni izazov je poboljšati odgovor TNKD pacijenata na liječenje anti-PD-1/PD-L1 terapijom. Osim toga, otkrivena je povezanost Ras/MAPK puta i imunološkog odgovora u TNKD pacijenata. Ras/MAPK put negativno regulira antitumorski imunitet - utječe na prezentaciju antigena (uključujući MHC-I, MHC-II i PD-1). Stoga bi kombinacija MEK inhibicije i anti-PD-1/PD-L1 protutijela mogla biti korisna u liječenju TNKD-a (7).

CTLA-4 djeluje ranije u procesu aktivacije T stanica. Ima važnu ulogu u supresiji regulacijskih T stanica (24). Nedavna istraživanja upućuju da je jedan od glavnih načina djelovanja anti-CTLA-4 terapije iscrpljivanje  $T_{reg}$  -ova (24). Trenutno su u istraživanju anti-CTLA-4 protutijela, kao ipilimumab (7).

Radioterapija ima potencijal povećati broj tumorskih mutacija i povećati njegovu imunogenost. Trenutno se provode istraživanja koja ispituju učinkovitost kombinacije radioterapije i blokade kontrolnih točaka (24).

#### **4.6.2. Djelovanje na TPM**

U tijeku kliničkih istraživanja faze I i II nalazi se lijek Trabectedin koji djeluje na regulaciju transkripcije i reparacije DNA, ali i na moduliranje TMO smanjenjem broja TPM-a u tumoru. Budući da je TNKD bogat M2 polariziranim makrofagima (koji lučenjem brojnih citokina pospješuju rast i širenje tumora), ovaj lijek ima potencijal djelovati u TNKD - kao što je već opisano njegovo antitumorsko djelovanje u drugim sjjelima tumora (25).

## 5. Zaključci

Očekivana uloga imunoloških stanica bila bi uništavanje tumorskih stanica i usporavanje rasta tumora. Međutim, prikupljeni podaci ukazuju na to da stanice TNKD-a mogu modulirati antitumorska svojstva imunoloških stanica. Uloga imunoloških stanica ovisna je o stadiju bolesti, ali i o stadiju njihove diferencijacije i aktivacije. Pri tome one igraju ključnu ulogu u imunosupresivnom TMO-u i koreliraju s progresijom tumora.

Imunološka terapija na bilo koju komponentu TMO-a ima mogućnost „normalizirati“ tumorski mikrokoliš i uspostaviti imunološki odgovor nužan za borbu protiv tumora - bilo da se radi o blokiranju inhibicijskih molekula imunoloških kontrolnih točaka T limfocita ili ciljanjem protumorskih makrofaga smanjivanjem njihovog nakupljanja u tumoru.

Osim toga, dodatno obećavajuće se pokazala imunoterapija u kombinaciji s ciljanom terapijom, tj. specifičnom onkološkom terapijom ili zračenjem. Navedeni zaključci objašnjavaju zbog čega su mehanizmi kojima tumorske stanice izbjegavaju imunološki odgovor u TNKD-u danas predmet brojnih znanstvenih istraživanja.

## 6. Sažetak

Karcinomi dojke su velika heterogena skupina malignih epitelnih neoplazmi podrijetla iz žljezdanog tkiva dojke. Ako se izuzmu karcinomi kože, karcinom dojke je u žena najčešći dijagnosticirani maligni tumor, incidencije 24,2 % te je vodeći uzrok smrti od malignih bolesti. TNKD je imunohistokemijski ER, PR i HER2 negativan. Čini približno 15 – 20 % karcinoma dojke. U usporedbi s ostalim karcinomima dojke, TNKD je agresivnije prirode, ima veliki potencijal metastaziranja i loš klinički ishod. TMO je stanični okoliš tumorskih stanica ili matičnih stanica tumora. Sastoji se od različitih komponenata: imunoloških stanica (granulocita, limfocita, makrofaga), fibroblasta, pericita, adipocita, krvnih žila, ECM i signalnih molekula. Složene interakcije između tumorskih stanica i imunološkog sustava nazivamo imunouređenje. Imunouređenje označava dvostruku ulogu imunološkog sustava – ulogu zaštite domaćina te ulogu u rastu i razvoju tumora. Ne-maligne stanice u TMO-u često imaju protumorsku ulogu u karcinogenezi. Budući da komponente TMO-a (kao što su imunološke stanice) utječu na razvoj tumora, značajne su u procjeni prognoze tumora kao i u odabiru odgovarajućeg liječenja.

Ključne riječi: trostruko negativni karcinom dojke, tumorski mikrookoliš, tumor infiltrirajući limfociti, tumoru pridruženi makrofagi, imunouređenje tumora

## 7. Summary

Breast cancers are a large heterogeneous group of malignant epithelial neoplasms originating from breast glandular tissue. With the exception of skin cancer, breast cancer is the most commonly diagnosed malignant tumor in women, with an incidence of 24.2 % and the leading cause of death from malignant diseases. Triple negative breast cancer (TNBC) is immunohistochemically ER, PR and HER2 negative. It accounts for about 15 - 20 % of breast cancers. Compared to other breast cancers, TNBC is more aggressive in nature, has a high potential for metastasis and a poor clinical outcome. Tumor microenvironment (TME) is the cellular environment of tumor cells or tumor stem cells. It consists of various components: immune cells (granulocytes, lymphocytes, macrophages), fibroblasts, pericytes, adipocytes, blood vessels, ECM and signaling molecules. Complex interactions between tumor cells and the immune system are called immune regulation. Immune regulation means the dual role of the immune system - the role of protecting the host and the role in tumor growth and development. Non-malignant cells in TME often play an antitumor role in carcinogenesis. Since they affect tumor development, TME components (such as immune cells) are important in assessing tumor prognosis as well as in selecting appropriate treatment.

Keywords: triple negative breast cancer, tumor microenvironment, tumor infiltrating lymphocytes, tumor-associated macrophages, tumor immunoediting

## 8. Literatura

1. Allison K, Brogi E, Ellis I, Fox S, Morris E, Sahin A et al. WHO Classification of Tumours, Breast Tumours. 5. izd. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019.
2. Arneth B. Tumor microenvironment. *Medicina*. 2019 Dec 30;56(1):15.
3. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016 Nov;13(11):674-90.
4. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, Savage MI, Osborne CK, Hilsenbeck SG, Chang JC, Mills GB. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015 Apr 1;21(7):1688-98.
5. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*. 2015;5(10):2929.
6. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. *Patologija*. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
7. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer discovery*. 2019 Feb 1;9(2):176-98.
8. Kensler KH, Sankar VN, Wang J, Zhang X, Rubadue CA, Baker GM, Parker JS, Hoadley KA, Stancu AL, Pyle ME, Collins LC. PAM50 molecular intrinsic subtypes in the Nurses' health study cohorts. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2019 Apr 1;28(4):798-806.

9. Lehmann BD, Colaprico A, Silva TC, Chen J, An H, Ban Y, Huang H, Wang L, James JL, Balko JM, Gonzalez-Ericsson PI. Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nature communications*. 2021 Nov 1;12(1):1-8.
10. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021 May;71(3):209-49.
11. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*. 2020 Dec;22(1):1-3.
12. Deng L, Lu D, Bai Y, Wang Y, Bu H, Zheng H. Immune profiles of tumor microenvironment and clinical prognosis among women with triple-negative breast cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2019 Dec 1;28(12):1977-85.
13. Malla RR, Deepak KG, Merchant N, Dasari VR. Breast Tumor Microenvironment: Emerging target of therapeutic phytochemicals. *Phytomedicine*. 2020 Apr 15;70:153227.
14. Yu T, Di G. Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2017 Jun;29(3):237.
15. Zheng H, Siddharth S, Parida S, Wu X, Sharma D. Tumor microenvironment: key players in triple negative breast cancer immunomodulation. *Cancers*. 2021 Jan;13(13):3357.
16. Abbas A. K, Lichtman A. H, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. 8.izd. Zagreb: Medicinska Naklada; 2018.
17. Katsuta E, Yan L, Opyrchal M, Kalinski P, Takabe K. Cytotoxic T-lymphocyte infiltration and chemokine predict long-term patient survival independently of tumor mutational burden in triple-negative breast cancer. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2021 Apr;13:17588359211006680.

18. Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen K. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2016 Apr 13;11(4):e0152500.
19. Ensenyat-Mendez M, Llinàs-Arias P, Orozco JI, Íñiguez-Muñoz S, Salomon MP, Sesé B, DiNome ML, Marzese DM. Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2021;11.
20. Huang Y, Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, Hunborg P, Varvares MA, Hoft DF, Hsueh EC, Peng G. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015 Jul 10;6(19):17462.
21. Matkowski R, Gisterek I, Halon A, Lacko A, Szewczyk K, Staszek U, Pudelko M, Szynglarewicz B, Szelachowska J, Zolnierek A, Kornafel J. The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer research*. 2009 Jul 1;29(7):2445-51.
22. Gruosso T, Gigoux M, Manem VS, Bertos N, Zuo D, Perlitch I, Saleh SM, Zhao H, Souleimanova M, Johnson RM, Monette A. Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. *The Journal of clinical investigation*. 2019 Apr 5;129(4):1785-800.
23. Kuroda H, Jamiyan T, Yamaguchi R, Kakumoto A, Abe A, Harada O, Masunaga A. Tumor microenvironment in triple-negative breast cancer: the correlation of tumor-associated macrophages and tumor-infiltrating lymphocytes. *Clinical and Translational Oncology*. 2021 Dec;23(12):2513-25.
24. Vikas P, Borcharding N, Zhang W. The clinical promise of immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Cancer management and research*. 2018;10:6823.
25. D'Incalci M, Zambelli A. Trabectedin for the treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2016 Jan 2;25(1):105-15.



## 9. Životopis

Kosjenka Novak rođena je 9.2.1998. godine u Čakovcu. Osnovnoškolsko obrazovanje završila je 2012. godine u II. osnovnoj školi Čakovec. Od godine 2006. do 2012. je pohađala Umjetničku školu Miroslav Magdalenić Čakovec gdje je završila klavir i solfeggio. Gimnaziju Josipa Slavenskog Čakovec, opći smjer, upisala je godine 2012., a završila godine 2016. Godine 2015. kao koautor napisala je rad „Zastupljenost krvnih grupa AB0 sustava na uzorku studenata Učiteljskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu“ koji je objavljen u zborniku radova međunarodnog znanstvenog skupa „The Day of Hungarian Science“, József Eötvös College, Baja.

Integrirani preddiplomski i diplomski studij Medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci upisuje 2016. godine. Tijekom studija, bila je demonstrator na Zavodu za anatomiju od 2017. do 2021. i na Zavodu za opću patologiju i patološku anatomiju od 2019. do 2022. godine. Tijekom 2021. i 2022. godine povremeno je radila na COVID-19 uzorkovanju u Specijalnoj bolnici Medico.

Kao aktivni sudionik sudjelovala je na 15. hrvatskom onkološkom kongresu s radom „Associations of TILs components CS8, CS4, PD-L1, CTLA4 and FOXP3 in triple negative breast carcinoma with the clinicopathological prognostic factors“.