

Izraženost markera PD-L1 (SP142) kod trostruko negativnog karcinoma dojke

Delić, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:464428>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Anja Delić

Izraženost markera PD-L1(SP142) kod trostruko negativnog
karcinoma dojke

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za patologiju i citologiju KB "Sveti Duh" pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Fabijana Kneževića te suvoditeljstvom prof. dr. sc. Vesne Benković, Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Od srca zahvaljujem svom voditelju diplomskog rada izv. prof. dr. sc. Fabijanu Kneževiću, suvoditeljici prof. dr. sc. Vesni Benković i dr. sc. Snježani Ramić, na izdvojenom vremenu, strpljivosti, pomoći i savjetima tijekom provedbe i pisanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se mojim roditeljima na svestranoj podršci, razumijevanju i pomoći tijekom studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Izraženost markera PD-L1 (SP142) kod trostruko negativnog karcinoma dojke

Anja Delić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Razlikujemo četiri do pet glavnih podtipova dukalnog invazivnog karcinoma dojke koji pokazuju značajne razlike u incidenciji, preživljenju i odgovoru na terapiju. Trostruko negativni karcinomi dojke (TNBC) ne izražavaju niti jedan od hormonskih receptora (ER- / PR- / HER2-). PD-L1 (*engl.* Programmed Death-Ligand 1) je ligand programirane stanične smrti, negativni regulator imunosti koji može zaštititi tumore od citotoksičnih T stanica tako da ometa ciklus imunološkog sustava unutar limfnih čvorova i unutar mikrookruženja tumora. Cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost izraženosti PD-L1 proteina u tumor infiltrirajućim limfocitima s dobi bolesnica te patohistološkim parametrima; veličine tumora, proliferacijskim indeksom Ki-67, proširenosti tumora u regionalne limfne čvorove i prisutnost udaljenih metastaza te s podtipom TNBC; bazalnog karaktera ("basal like") ili luminalnog karaktera ("luminal like"). Imunohistokemijskim bojenjem 28 uzoraka TNBC detektirali smo prisutnosti proteina PD-L1. Svi podaci analizirani su neparametrijskim Spearman korelacijskim testom, χ^2 -testom i Kendall Tau analizom. Progresija bolesti TNBC češće se pojavljivala kod bolesnica kod kojih je uočena proširenost tumora u regionalne limfne čvorove kao i kod bolesnica čija je veličina tumora bila veća od 2 cm. Prisustvo proteina PD-L1 češće je bilo uočeno u bolesnica starijih od 50 godina dok samo prisustvo proteina PD-L1 nije ovisilo o proširenosti tumora u regionalne limfne čvorove kao i postotku Ki-67.

(42 stranice, 21 slika, 3 tablice, 41 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: trostruko negativni karcinom dojke, ciklus protutumorske imunosti, PD-L1

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Fabijan Knežević

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Vesna Benković

Ocjenitelj: Prof. dr. sc. Vesna Benković

Rad prihvaćen: 19.02.2020

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Expression of PD-L1 (SP142) in triple-negative breast cancer

Anja Delić

Rooseveltova Trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

There are four to five major ductal invasive cancer subtypes that show significant differences in incidence, survival, and response to therapy. Triple-negative breast cancers (TNBC) do not express any of the receptors (ER- / PR-/ HER2-). PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) is a programmed cell death ligand, a negative regulator that can protect a tumor from cytotoxic T cells by interfering with the immune system cycle within the lymph nodes and within the tumor microenvironment. The aim of this study was to determine the association of PD-L1 protein expression in TNBC with age of patients, with histopathological parameters; tumor size, Ki-67 proliferation index, tumor presence into regional lymph nodes and with the presence of distant metastasis and subtype of TNBC (basal like or luminal like). The immunohistochemical staining of 28 samples of TNBC was used to detect the presence of PD-L1 protein. All data were analyzed with the nonparametric Spearman correlation test, χ^2 test and Kendall Tau analysis. Progression of TNBC occurs in patients who have had tumor infiltration into the regional lymph nodes as well as in patients with a tumor size greater than 2 cm. The presence of PD-L1 protein was observed more frequently in patients over 50 years of age, whereas PD-L1 protein alone did not depend on tumor invasion into regional lymph nodes as well as the percentage of Ki-67.

(42 pages, 21 figures, 3 tables, 41 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: triple negative breast cancer, anticancer immune cycle, PD-L1

Supervisor: Dr. Knežević Fabijan, Assoc. Prof.

Cosupervisor: Dr. Vesna Benković, Full. Prof.

Reviewers: Dr. Vesna Benković, Full. Prof.

Thesis accepted: 19.02.2020

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Epidemiologija i čimbenici rizika karcinoma dojke.....	1
1.2	Histološka klasifikacija tumora dojke.....	1
1.2.1	Duktalni invazivni karcinom.....	2
1.3	Podjela tumora dojke prema imunohistokemijskim pokazateljima	2
1.3.1	Hormonski receptori.....	2
1.3.1.1	Estrogenski i progesteronski receptor (ER i PR)	2
1.3.1.2	Receptor humanog epidermalnog faktora rasta (HER2)	3
1.3.1.3	Prognoza bolesti.....	3
1.4	Molekularni podtipovi karcinoma dojke	4
1.4.1	Luminalni podtipovi	5
1.4.2	„Normal-like“ podtip.....	5
1.4.3	HER2 podtip	5
1.4.4	Podtip bazalnog karaktera	6
1.5	Podtipovi TNBC.....	7
1.6	Proliferacijski indeks Ki-67.....	8
1.7	Citokeratin 5 i citokeratin 14	8
1.8	Ciklus protutumorske imunosti	8
1.9	Signalizacija putem PD-L1.....	10
1.9.1	Ligand programirane stanične smrti 11 (PD-L1)	10
1.9.2	Kancerogeni inhibitorni put imunološkog sustava preko PD-L1 i PD-L2	11
1.10	PD-L1 kao potencijalni prediktivni biomarker za inhibitore imunskih kontrolnih točaka kod različitih zloćudnih tumora	13
1.10.1	Inteferencija PD-L1 na tumorskim i na imunskim stanicama	13
1.10.2	Utjecaj interferencije PD-L1 na PD-L2 interakcije	14
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3	MATERIJALI I METODE.....	16
3.1	Materijal.....	16
3.2	Metode	16
3.2.1	Priprema tkiva za bojanje	16
3.2.2	Imunohistokemijsko bojenje	17
3.3	Statistička obrada podataka	18
4	REZULTATI	19
4.1	Dob bolesnica	21
4.2	Veličina tumora	21
4.3	Ki-67 i histološki gradus tumora	23
4.4	Proširenost tumora u regionalne limfne čvorove.....	24
4.5	Prisustvo proteina PD-L1	25
4.6	Progresija bolesti	28
4.7	Detekcija citokeratina 5 i citokeratina 14	29

5	RASPRAVA	33
6	ZAKLJUČCI.....	37
7	LITERATURA.....	38
8	ŽIVOTOPIS	43

POPIS KRATICA:

BRCA-1	Gen povezan s karcinomom dojke 1 (prema engl. Breast Cancer 1)
BRCA-2	Gen povezan s karcinomom dojke 2 (prema engl. Breast Cancer 2)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (prema engl. World Health Organization)
IDC	Duktalni invazivni karcinom (prema engl. Invasive Ductal Carcinoma)
HER2	Receptor humanog epidermalnog faktora rasta (prema engl. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
ER	Estrogenski receptori
PR	Progesteronski receptori
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
TNBC	Trostruko negativni karcinom dojke (prema engl. Triple-Negative Breast Cancer)
MHCI	Glavni kompleks histokompatibilnosti (prema engl. Major Histocompatibility Complex I)
MHCII	Glavni kompleks histokompatibilnosti (prema engl. Major Histocompatibility Complex II)
PD-L1	Ligand programirane stanične smrti 1 (prema engl. Programmed Death-Ligand 1)
PD-1	Protein programirane stanične smrti 1 (prema engl. Programmed Cell Death Protein 1)
PD-L2	Ligand programirane stanične smrti 2 (prema engl. Programmed Death-Ligand 2)
SHP-2	Src homologna regija 2 koja sadrži domenu fosfataza-1 (prema engl. Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1)
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaza (prema engl. Phosphoinositide 3-kinase)
ADCC	Stanična citotoksičnost ovisna o antitijelu (prema engl. Antibody-dependent cellular cytotoxicity)

1 UVOD

1.1 Epidemiologija i čimbenici rizika karcinoma dojke

Rak dojke je najčešće dijagnosticiran rak i vodeći uzrok smrti od raka kod žena, što čini 23% ukupnih slučajeva raka i 14% smrtnih slučajeva raka (1). Prema podacima Registra za rak, Zavoda za javno zdravstvo Republike Hrvatske godišnje od raka dojke oboli preko 2500 žena. Prema posljednjim dostupnim epidemiološkim podacima rak dojke je prvi uzrok smrti u ženskoj populaciji u 2016. Stopa smrtnosti od raka dojke u Hrvatskoj je među najvišima u Europi. Prema podatcima iz 2016. stopa incidencije raka dojke je 2735 dok je stopa smrtnosti 990 (2).

Rak dojke je vrlo heterogen po svojim patološkim karakteristikama, neki slučajevi pokazuju spori rast s odličnom prognozom, dok su drugi tumori agresivni. Etiologija karcinoma dojke još uvijek nije razjašnjena. Mnogi od utvrđenih čimbenika rizika povezani su s estrogenima. Rizik se povećava u ranoj menarhi, kasnoj menopauzi i pretilosti u žena u postmenopauzi, a prospektivne studije su pokazale da su visoke koncentracije endogenog estradiola povezane s povećanjem rizika. Povećan rizik od razvoja karcinoma dojke imaju žene koje nisu rađale ili starije prvorotkinje. I oralni kontraceptivi i hormonska terapija za menopauzu uzrokuju mali porast rizika od raka dojke, koji izgleda da se smanjuje nakon prestanka korištenja (3). Faktori rizika također uključuju konzumaciju alkohola, pušenje i pretilost. Mutacije u određenim genima uvelike povećavaju rizik od raka dojke, ali one čine manji broj slučajeva budući da se samo 5-6 % karcinoma dojke smatra nasljednim. Žene nositeljice mutacije gena BRCA-1 (engl. Breast Cancer 1) i BRCA-2 (engl. Breast Cancer 2) imaju rizik do 85 % za razvoj karcinoma dojke te povećan rizik za razvoj karcinoma jajnika (4).

1.2 Histološka klasifikacija tumora dojke

Tumore dojke dijelimo na dobroćudne i zloćudne tumore. Najčešći poremećaj dojki dobroćudne naravi obuhvaća široku skupinu promjena u dojkama koje se stavljaju pod zajednički naziv mastopatija ili fibrocistične promjene dojki. Zloćudni tumori se dijele na one nastale iz duktalnog epitela i one nastale iz lobularnog epitela. Najčešći tip zloćudnog tumora dojke je duktalni zloćudni tumor (90%). Zloćudni tumor koji nastaje u acinusima ili lobulima naziva se lobularni zloćudni tumor (10%). Oba ova tipa se dijele na *in situ* karcinome i

invazivne karcinome. Obzirom na veliku heterogenost duktalnog karcinoma dojke postoji veliki broj histoloških podtipova koji se klasificiraju prema WHO (5).

1.2.1 Duktalni invazivni karcinom

Invazivni karcinomi dojke su adenokarcinomi. Oko 80% je infiltrirajućeg dukalnog tipa (IDC, prema engl. Invasive Ductal Carcinoma) a 20% su infiltrirajući lobularni. Karcinom dojke invadira lokalno i širi se u početku u regionalne limfne čvorove a kasnije metastazira hematogeno. Metastatski karcinom dojke može zahvatiti skoro sve organe u tijelu–najčešće pluća, jetra, kosti, mozak i kožu (6).

1.3 Podjela tumora dojke prema imunohistokemijskim pokazateljima

Jedan od načina definiranja vrste raka dojke je pozitivnost ili negativnost na određeni stanični receptor, pa tako postoje karcinomi dojke koji su pozitivni na hormonske receptore (estrogenski ili progesteronski receptor) ili na HER2, protein humanog epidermalnog faktora rasta 2 (prema engl. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), zatim karcinomi koji nisu pozitivni na estrogenski, progesteronski i HER2 receptor, te karcinomi koji su pozitivni na sva tri stanična receptora. Navedena klasifikacija pruža liječnicima vrijedne informacije o tome kako će se tumor ponašati te koja bi terapija bila najprikladnija za njegovo liječenje.

1.3.1 Hormonski receptori

1.3.1.1 Estrogenski i progesteronski receptor (ER i PR)

Estrogenski i progesteronski receptori, izraženi su u zdravom tkivu dojke kao i u nekim karcinomima, su jezgri hormonski receptori koji potiču replikaciju DNK i diobu stanice kad se vežu za odgovarajuće hormone. Stoga, lijekovi koji blokiraju ove receptore mogu biti korisni u liječenju tumora s tim receptorima. Oko $\frac{2}{3}$ postmenopauzalnih bolesnica ima tumore pozitivne na estrogenske receptore (ER+). Među premenopauzalnim bolesnicama je incidencija ER+ tumora manja. Hormonski receptori u karcinomima dojke imaju veće značenje kao prediktivni (vjerojatnost odgovora na terapiju) nego prognostički čimbenik. Tumori s pozitivnim estrogenskim i progesteronskim receptorima (ER+PR+) reagirat će na hormonsku terapiju u 78% slučajeva, ER+PR- tumori u 34% slučajeva, a ER-PR+ tumori reagirat će u 45%

slučajeva. Međutim, zanimljivo je da će i tumori koji su ER-PR- u oko 10% slučajeva reagirati na hormonsku terapiju. Tumori s većom razinom hormonskih receptora reagirat će jače na hormonsku terapiju od onih s nižim razinama (8).

1.3.1.2 Receptor humanog epidermalnog faktora rasta (HER2)

Izraženost membranskog receptora humanog epidermalnog faktora rasta (HER2) u korelaciji je s lošijom prognozom u bilo kojem stadiju raka. HER2/neu onkogen nalazi se na lokusu 17q21, a njegova amplifikacija dovodi do prekomjerne izraženosti HER2/neu glikoproteina koji je član obitelji transmembranskih receptora epidermalnih čimbenika rasta s funkcijom tirozin kinaze. Amplifikacija HER2/neu proto-onkogene i/ili prekomjerna izraženost HER2/neu proteina nađena je u 20% invazivnih duktalnih karcinoma dojke (9). Povoljna strana prekomjerne izraženosti HER2/neu je mogućnost terapije Herceptinom (trastuzumab) tj. monoklonskim protutijelom na HER2/neu protein i to na njegovu izvanstaničnu domenu, za koju je dokazano da inhibira rast tumorskih stanica *in vitro* i *in vivo* (10).

1.3.1.3 Prognoza bolesti

Dugoročna prognoza bolesti ovisi o broju zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova, veličini primarnog tumora, stupnju diferenciranosti tumora, kliničkom stadiju tumorske bolesti, prisutnosti estrogenskih i progesteronskih receptora, prisutnosti HER2 proteina i dobi bolesnice.

Bolesnice s ER+ tumorima imaju nešto bolju prognozu i veću vjerojatnost povoljnog utjecaja hormonskog liječenja. Bolesnice s progesteronskim receptorima u tumoru mogu također imati bolju prognozu.

Kada je HER2 gen amplificiran, HER2 je pretjerano eksprimiran, pojačavajući rast stanice i umnožavanje te često dovodi do agresivnijih tumorskih stanica. Pretjerana izraženost HER2 može biti povezana s visokim histološkim gradusom, ER- tumorima, jačom proliferacijom, većim tumorima te stoga i s lošijom prognozom (11, 12).

Treba spomenuti da je trostruko negativni karcinom dojke (ER-, PR-, HER2-) koji se često može naći u žena koje su nositeljice mutiranog BRCA-1 gena, također povezan s lošijom prognozom, iako polovina tih pacijentica dobro reagira na kemoterapiju.

1.4 Molekularni podtipovi karcinoma dojke

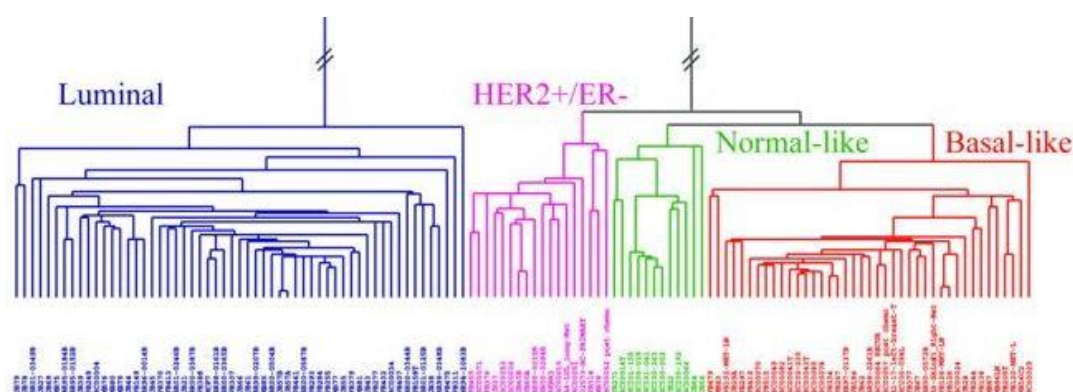
Predviđanje kliničkog tijeka karcinoma dojke često je teško jer je to raznolika bolest koja se sastoji od mnogih bioloških podtipova. Profiliranje genske ekspresije pomoću analize mikročipovima identificiralo je signale svojstvene određenom tipu karcinoma dojke koji su važni za prognozu i liječenje .

Iako su klinički stadij i histološki gradus važni prognostički čimbenici, često ne uspijevaju predvidjeti klinički tijek bolesti. Kako bi se poboljšao standard skrbi za bolesnice s karcinomom dojke, postoji potreba za novim molekularnim markerima i dijagnostičkim algoritmima.

Microarray studije su pokazale da razlike u ekspresiji gena mogu objasniti mnogo različitosti u raku dojke i da ovi profili imaju prognostičko značenje (13).

Tumori dojke su različiti u svojoj prirodnoj povijesti i u odgovoru na tretmane. Varijacije u transkripcijskim profilima predstavljaju velik dio biološke raznolikosti ljudskih stanica i tumora. U svakoj stanici, prijenos signala i regulatorni sustavi pretvaraju informacije iz identiteta stanice u stanje okoliša, čime se kontrolira razina ekspresije svakog gena u genomu (14).

Različite genomske studije su profiliranjem ekspresije gena microarray analizom utvrdile četiri do pet glavna podtipa karcinoma dojke (Luminalni podtip A, Luminalni podtip B, “Normal-like“, HER2 obogaćeni, podtip bazalnog karaktera (prema eng. “Basal-like“)). koja pokazuju značajne razlike u incidenciji, preživljavanju i odgovoru na terapiju (15) (Slika 1). U ovakvoj vrsti klasifikacije razina Ki-67 se navodi kao visoka ili niska.



Slika 1. Gensko profiliranje karcinoma dojke analizom mikročipova (Preuzeto i prilagođeno na temelju Perreard i sur, 2006)

1.4.1 Luminalni podtipovi

Tumori dojke luminalnog podtipa su pozitivni na estrogenski receptor (ER) i imaju sličan profil ekspresije keratina s epitelnim stanicama koje oblažu duktuse dojke. Luminalni A podtip (ER+ / PR+ / HER2-) najčešći je oblik karcinoma dojke (70%). Ima nisku razinu proteina Ki-67, koji pomaže u kontroli brzine rasta tumorskih stanica stoga ima tendenciju sporog rasta i ima najbolju prognozu. Iako su ER-negativni podtipovi tumora agresivni i tipično smrtonosniji od luminalnih tumora, postoje podtipovi luminalnih tumora koji dovode do loših ishoda unatoč ER-pozitivnosti. Na primjer, identificiran je podtip Luminal B (ER+ / PR+ / HER2+) s visokom razinom Ki-67. Karcinom luminalnog B podtipa obično raste nešto brže od karcinoma luminalnog A podtipa i njegova je prognoza nešto lošija (13).

1.4.2 „Normal-like“ podtip

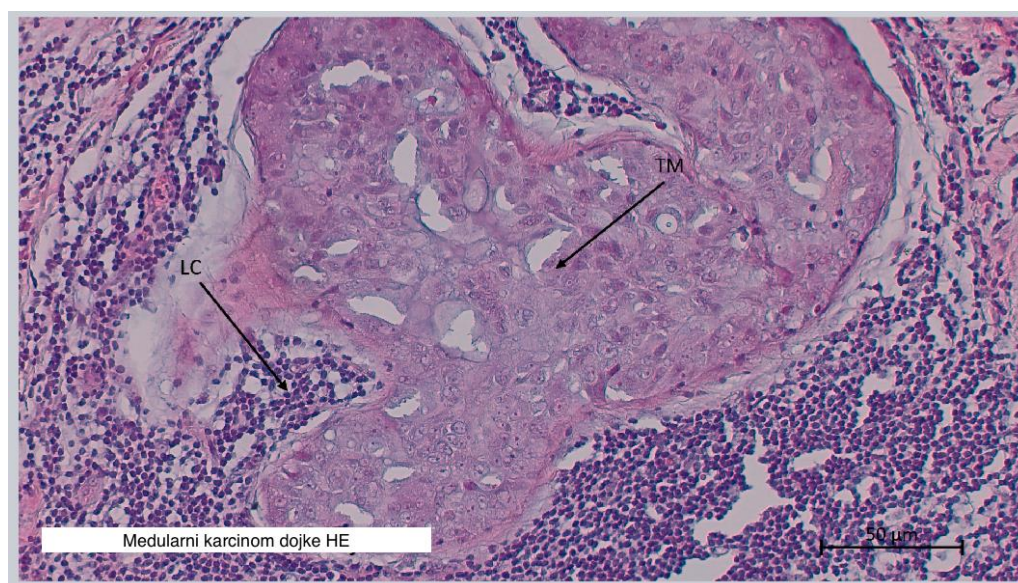
Normal-like podtip karcinoma (ER+ / PR+ / HER2-) dojke sličan je luminalnom A podtipu: pozitivan na hormonske receptore, negativan na HER2 i ima nisku razinu proteina Ki-67, koji pomaže u kontroli brzine stanica raka rasti. Ipak, prognoza normal-like podtipa karcinoma dojke je nešto lošija od prognoze karcinoma luminalnog A podtipa.

1.4.3 HER2 podtip

Nasuprot tome, ER-negativni tumori mogu se podijeliti u dva glavna podtipa - naime one koji prekomjerno izražavaju HER2 (ER- / HER2 +) i "bazalni" tumori koji imaju profil ekspresije gena sličan bazalnom epitelu s izraženim citokeratinima 5, 6B, 14 i 17. Tumor HER2 podtipa ima tendenciju rasta brže od luminalnih karcinoma i može imati lošiju prognozu, ali često se uspješno liječi ciljanim terapijama usmjerenim na protein HER2. Gen humanog receptora epidermalnog faktora rasta 2 (HER2) je i prognostički i prediktivni faktor. HER2 je pojačan u otprilike 10% do 20% karcinoma dojke. Pretkliničke studije su pokazale da amplifikacija HER2 ili prekomjerna izraženost njegovog kodirajućeg proteina igra važnu ulogu u biologiji karcinoma dojke. Sustavnim pregledom literature iz 2001. godine zaključeno je da je HER2 slab do umjeren prognostički faktor i ne bi se trebao koristiti u procesu odlučivanja o adjuvantnoj sistemske terapiji (16).

1.4.4 Podtip bazalnog karaktera

Podtip bazalnog karaktera otkriven je prije više od desetljeća nazvan zbog sličnosti u ekspresiji gena s bazalnim mioepitelnim stanicama normalnog tkiva dojke. Ti se tumori često nazivaju trostruko negativnim karcinomima dojke (TNBC, prema engl. Triple-Negative Breast Cancer) jer je većina tumora bazalnog karaktera tipično negativna za ER, PR i HER2 (Slika 2) (17).



Slika 2. Medularni karcinom dojke, HE. Strelice označavaju tumorske stanice kao i tumor infiltrirajuće stanice

Budući da je genetsko testiranje nedostupno većini bolesnica s karcinomom dojke zbog visoke cijene, St. Gallenski konsenzus iz 2013. godine predložio je upotrebu nadomjesne klasifikacije u molekularne podtipove na temelju receptorskog statusa, izraženosti HER2 onkogeni i proliferacijskog indeksa Ki-67: Luminal A (ER+, PR+, HER2-, Ki67<20%), Luminal B1 (ER+, HER2-, jedno od: PR<20%, Ki67>=20%), Luminal B2 (ER+, HER2+), HER2 tip (HER2+, ER-, PR-) i „Basal-like“ (ER-, PR-, HER2-) (Tablica 1). Bolesnice s Luminal A tumorima imaju najbolju, a bolesnice s HER2 tipom i „Basal-like“ tipom najlošiju prognozu (18).

Tablica 1. Imunohistokemijska klasifikacija karcinoma dojke

Podtip karcinoma dojke	Imunohistokemijske karakteristike	Incidencija
Luminalni A	ER+ / PR+, PR>20%, / HER2-, Ki-67<20%	40%
Luminalni B1	ER+ / PR+, PR<20% / HER2+, Ki-67>=20%	10-15%
Luminalni B2	ER+ / HER2-, PR +/-, Ki-67 bilo kakav	10-15%
Her2	ER- / PR- / HER2+	10-15%
Basal-like	ER- / PR- / HER2-	15-20%

1.5 Podtipovi TNBC

Trostruko negativni karcinom dojke obuhvaća spektar različitih cjelina s izrazitim molekularnim karakteristikama što se može iskoristiti za ciljanu terapiju pri liječenju. Prisutna je velika heterogenost studija koje govore o različitoj klasifikaciji podtipova TNBC. U jednoj od studija, upotrebom imunohistokemijskih markera uspješno su se izdvojile podvrste koje pokazuju različite patohistološke i prognostičke karakteristike. Daljnja analiza suzila ih je na tri glavne podskupine: bazalnog karaktera (prema eng. „basal like“ (BL)), mezenhimalnog karaktera „mesenchymal stem-like“ (MSL), luminalnog karaktera „luminal androgen receptor“ (LAR). BL izražavaju višu razinu bazalnih citokeratina (tj. CK5 / 6 i CK14), dok tumori u kategoriji MSL pokazuju značajno nižu ekspresiju bazalnog citokeratina, a LAR tumori nemaju bazalnu citokeratinsku ekspresiju (Tablica 2) (19).

Tablica 2. Podtipovi trostruko negativnog karcinoma dojke s obzirom na razinu ekspresije CK5/CK14

Podtip TNBC	Razina ekspresije bazalnog citokina (CK5/CK14)
„basal like“(BL)	Visoka
„mesenchymal stem-like“(MSL)	niska
„luminal androgen receptor“ (LAR)	nema ekspresije

1.6 Proliferacijski indeks Ki-67

Izraženost humanog Ki-67 proteina je strogo povezana sa staničnom proliferacijom. Tijekom interfaze, antigen se može otkriti isključivo unutar jezgre, dok je u mitozu većina proteina premještena na površini kromosoma. Činjenica da je protein Ki-67 prisutan u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa (G1, S, G2, i mitozu), ali je odsutan u stanicama koje miruju (G0), čini ga izvrsnim biljekom za određivanje tzv. frakcija rasta zadane stanične populacije. Ekspresija Ki-67 se obično procjenjuje imunohistokemijskim metodama, a izražava se kao postotak pozitivnih, odnosno obojenih, jezgara tumorskih stanica. Udio Ki-67 pozitivnih tumorskih stanica često je povezan s kliničkim tijekom bolesti. Najpoznatiji primjeri u ovom kontekstu su karcinomi prostate i dojke. Viša razina izraženosti Ki-67 povezana je s lošijom prognozom karcinoma dojke neovisno o zahvaćenosti limfnih čvorova. Iako je protein Ki-67 dobro opisan na molekularnoj razini i opsežno se koristi kao marker proliferacije, funkcionalno značenje i dalje ostaje nejasno (20). Ki-67 je testiran u mnogim istraživanjima kao prognostički i / ili prediktivni pokazatelj u ranom karcinomu dojke. Studije su pokazale značajnu povezanost između ekspresije Ki-67 i rizika od recidiva i smrti (21). Proliferacijski indeks mjeren pomoću Ki-67 manji od 20% se smatra „niskim“, a veći od 20% se smatra „visokim“ (22). Po novom 20% za BC.

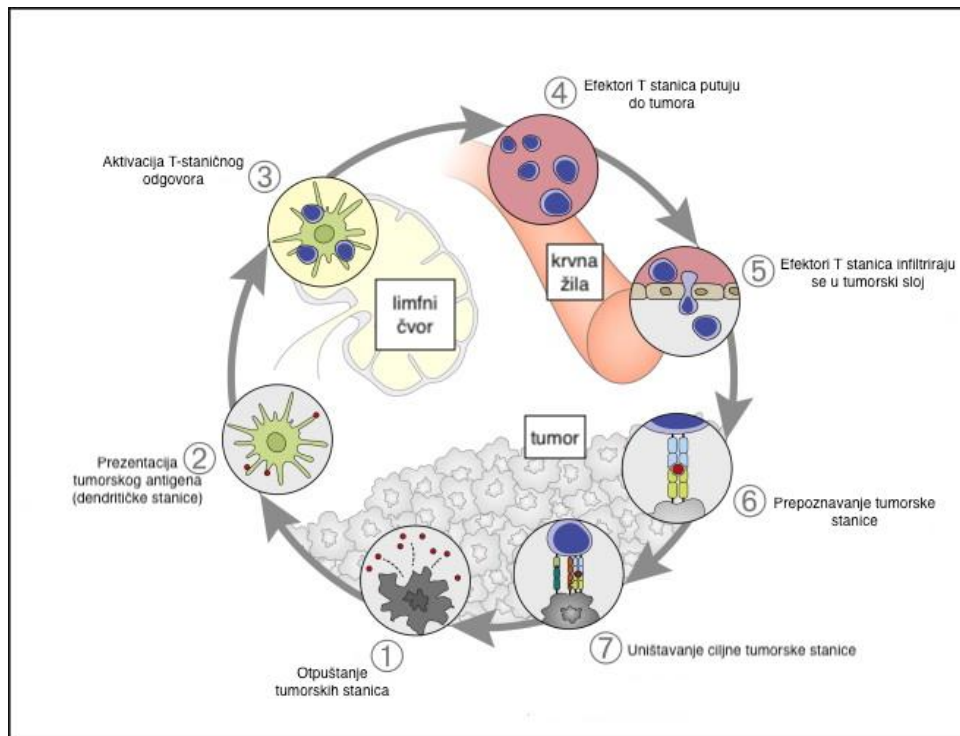
1.7 Citokeratin 5 i citokeratin 14

Citokeratin 5 je citokeratin tipa II (osnovni). Antitijela na taj protein identificiraju bazalne stanice skvamoznog i žljezdanog epitela, mioepitel i mezotelne stanice. Citokeratin 14 je polipeptid koji se nalazi u bazalnim stanicama skvamoznog epitela, nekim žljezdanim epitelima, mioepitelu i mezotelnim stanicama. Dokazano je da je anti-citokeratin 14 koristan u razlikovanju karcinoma pločastih stanica od ostalih epitelnih tumora. Anti-citokeratin 5, zajedno sa anti -citokeratin 14 ima primjenu u identificiranju bazalnog fenotipa karcinoma dojke (23).

1.8 Ciklus protutumorske imunosti

Da bi antikancerogeni imunološki odgovor doveo do učinkovitog ubijanja tumorskih stanica, mora se započeti niz postupnih događaja i omogućiti im da se nastave. Proces kojim imunološki

sustav ubija stanice tumora opisan je ciklusom imunosti protiv tumora (Slika 3). Istraživanja o imunoterapiji tumora nastoje razumjeti kako iskoristiti adaptivnu imunološku obranu organizma protiv sposobnosti tumora da se razvije i izbjegne uništenje. U prvom koraku, antigeni stvoreni onkogenezom oslobađaju se i hvataju dendritičkim stanicama za obradu (korak 1). Da bi se u ovom koraku postigao antikancerogeni T-stanični odgovor, mora biti popraćen signalima koji određuju imunost tako da se ne izazove periferna tolerancija na tumorske antigene. Takvi imunogeni signali mogu uključivati proupalne citokine i faktore oslobođene od strane tumorskih stanica. Dalje, dendritičke stanice prezentiraju uhvaćene antigene MHC I (prema engl. Major Histocompatibility Complex I) i MHC II (prema engl. Major Histocompatibility Complex II) molekulama na T-stanicama (korak 2), što rezultira aktivaciji efekorskog T-staničnog odgovora protiv tumor-specifičnih antigena (korak 3) koji se smatraju stranim ili protiv kojih je tolerancija nepotpuna. Priroda imunološkog odgovora određena je u ovoj fazi, pri čemu kritična ravnoteža predstavlja odnos T-efektorskih stanica prema T-regulatornim stanicama, što je bitno za konačni ishod. Konačno, aktivirani efektori T stanica putuju do tumora (korak 4) i infiltriraju se u tumorski sloj (korak 5), specifično prepoznaju i vežu se na tumorske stanice interakcijom između njihovog T-staničnog receptora (TCR) i njegovog srodnog antigena vezanog na MHC I (korak 6), i uništavaju ciljnu stanicu tumora (korak 7). Odumiruće stanice tumora otpuštaju dodatne tumorske antigene i tako omogućuju nastavak ciklusa protutumorske imunosti (ponovno korak 1). Kod pacijenata oboljelih od tumora, ciklus tumora i imunosti ne djeluje optimalno. Antigeni tumora možda neće biti detektirani, dendritičke i T stanice mogu tretirati antigene kao vlastite, a ne strane, čime se stvaraju T regulatorni stanični odgovori, a ne efektorski odgovori. Nadalje, T stanice ne moraju pravilno naciljati tumorski okoliš, a može biti inhibirana i njihova infiltracija u tumor (24).



Slika 3. Ciklus imunosti protiv tumora

(Preuzeto i prilagođeno na temelju Chen i Mellman, 2013)

Kod zdravih osoba, ciklus protutumorske imunosti je samoodrživ. Međutim, u bolesnika oboljelih od raka ciklus imunosti može biti narušen, što omogućuje nekontrolirani rast tumora. Jedan od čimbenika koji mogu narušiti ciklus protutumorske imunosti jest ligand programirane stanične smrti 1 ili PD-L1 (prema engl. Programmed Death-Ligand 1). Ovaj negativni regulator imunosti može biti izražen u tumorskom mikrokruženju.

1.9 Signalizacija putem PD-L1

1.9.1 Ligand programirane stanične smrti 1 (PD-L1)

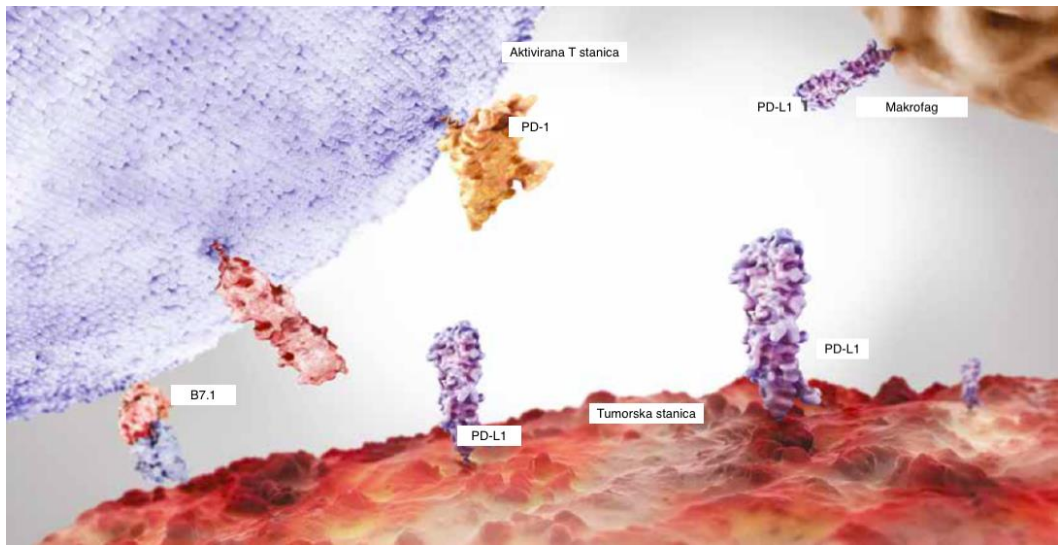
Aktivacija i ekspanzija T stanica su neophodne komponente učinkovitog stečenog imunološkog odgovora. Učinkovitost kojom CD4 T-stanice usmjeravaju imunološki odgovor zahtijeva odgovarajuće regulatorne mjere kako bi se spriječila imunološka hiperaktivacija koja dovodi do autoimune bolesti. Regulacija ekspanzije i aktivacije T stanica je složen proces koji uključuje koordiniranu interakciju više signalnih putova. CD28 obitelj receptora na površini stanice igra važnu ulogu u kontroli aktivacije T stanica (26).

Konačno, nedavno se pokazalo da se PD-L1 izrazito izražava na iscrpljenim T stanicama tijekom kronične virusne infekcije. Blokada PD-1 (prema engl. Programmed Cell Death Protein 1) ili PD-L1 sprječava njihovu međusobnu interakciju što može oporaviti iscrpljene T stanice omogućujući im proliferaciju i proizvodnju efektorskih citokina (27).

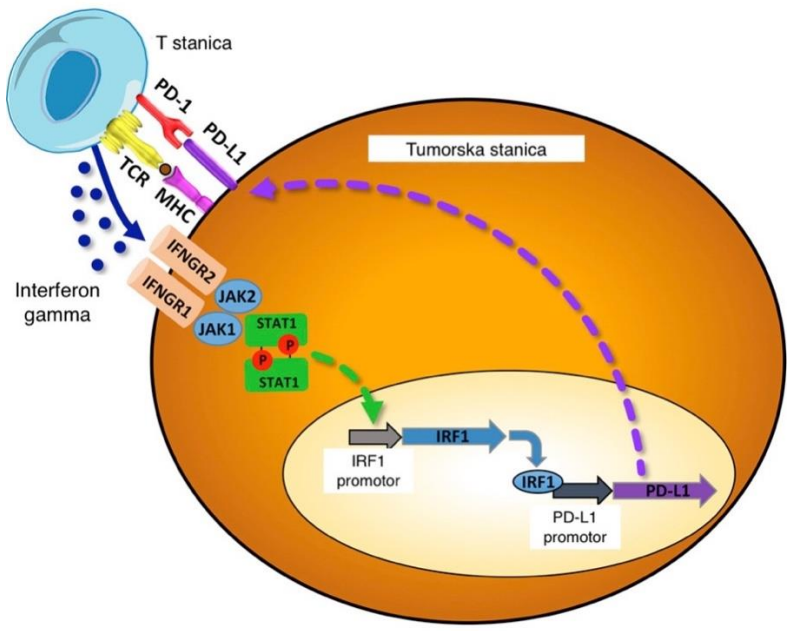
1.9.2 Kancerogeni inhibitorni put imunološkog sustava preko PD-L1 i PD-L2

Tumor može izbjeći imunosni odgovor tijela. Mnogi tumori to čine izražavanjem inhibitornog liganda PD-L1 na tumorskim stanicama i imunosnim stanicama koje infiltriraju tumor. PD-L1 se u velikoj mjeri stvara u više različitih vrsta tkiva, uključujući hematopoetske, endotelne i epitelne stanice. U normalnim uvjetima, signalni put PD-L1 može pomoći u održavanju imunološke homeostaze. PD-L1 i PD-L2 su inhibicijski ligandi koji se stvaraju na imunosnim stanicama i u drugim tkivima. PD-L1 i PD-L2 vezuju se za specifične receptore na T-stanicama. Kada se vežu za njih, smanjuju aktivnost citotoksičnih T-stanica te tako štite normalne stanice od oštećenja. Kod karcinoma, put PD-L1 može zaštititi tumore od citotoksičnih T-stanica tako da ometa ciklus imunološkog sustava na dva načina; unutar limfnih čvorova i unutar mikrookruženja tumora.

PD-L1 može inhibirati širenje ciklusa imunosti raka u limfnim čvorovima. Izraženost PD-L1 na imunosnim stanicama koje infiltriraju tumor mogu spriječiti punjenje i aktivaciju novih citotoksičnih T-stanica u limfnim čvorovima i kasnije regrutiranje u tumor (28). Izraženost PD-L1 je regulirana na dendritičkim stanicama unutar mikrookruženja tumora. Dendritičke stanice koje izražavaju PD-L1 putuju od tumora do limfnog čvora gdje se PD-L1 veže na B7.1 i PD-1 receptore na T-stanicama, suzbijajući njihovu aktivaciju. Aktivirane T-stanice u tumorskom mikrookruženju oslobađaju interferon gama što rezultira izražavanjem PD-L1 na tumorskim i imunosnim stanicama. Prekomjerna izraženost PD-L1 u tumoru može inhibirati posljednje korake ciklusa imunosti tumora deaktiviranjem citotoksičnih T stanica u mikrookruženju tumora. PD-L1 se veže na T-stanične receptore B7.1 i PD-1, deaktivirajući citotoksične T-stanice. Kada se jednom deaktiviraju, T-stanice ostaju inhibirane u tumorskom mikrookruženju. To je u skladu s predloženim mehanizmom djelovanja ovog negativnog regulatora, gdje se PD-L1 (izražen ili na tumorskim stanicama ili na tumorskim infiltrirajućim imunskim stanicama) veže na PD-1 na aktiviranim efektorskim T-stanicama uzrokujući regrutaciju fosfataze SHP-2 i kasniju inaktivaciju PI3-kinaza signalnog puta (26). Ovi događaji blokiraju izlučivanje ili proizvodnju citotoksičnih medijatora potrebnih za ubijanje. Međutim, čini se da je ovaj blok brzo reverzibilan nakon uklanjanja inhibicije (Slika 4 i 5).



Slika 4. Aktivnost PD-L1 kao rezultat interakcije s PD-1 i B7.1 (Preuzeto i prilagođeno sa Roche Pro portal (2016) Dostupno na: <https://www.rochepr.com/therapeutic-areas/onkologija/Research-Cancer-Immunotherapy/Pathways/PD-L1-Pathway/Role-of-PD-L1-Pathway.protected.html>)



Slika 5. Signalni put PD-L1 (Preuzeto i prilagođeno na temelju Garcia-Diaz i sur., 2017)

1.10 PD-L1 kao potencijalni prediktivni biomarker za inhibitore imunskih kontrolnih točaka kod različitih zloćudnih tumora

Čimbenici u mikrookruženju tumora mogu djelovati na moduliranje postojećeg aktiviranog antitumornog imunološkog odgovora T stanica, djelujući kao imunološki reostat ili "imunostat". Imunološki odgovor tumora odražava niz pažljivo reguliranih događaja koji se mogu optimalno adresirati ne pojedinačno nego kao skupina (29). Izazov je sada iskoristiti ovo novo razumijevanje za razvoj novih lijekova i provedbu kliničkih strategija.

Imunohistokemijski marker PD-L1 (SP142) je mogući prediktivni biološki biljeg za one tumore koji koriste taj signalni put da bi inhibirali imuni odgovor. Identifikacija PD-L1 kao imunološkog modulatora izraženog u 20% -50% zloćudnih tumora (25) dovela je do razvoja brojnih imunoterapija tumora koje ciljaju na interakcije između PD-L1: PD -1, PD-L1: B7.1, i PD-L2: PD-1. Stope odgovora na monoterapiju anti-PD-L1 i anti-PD-1 prikazane su za više od 750 bolesnika (u rasponu od 13% do 38%) liječenih u širokom rasponu tipova raka kod ljudi. Antitumorsko djelovanje PD-L1- i PD-1-ciljanih terapija koje koriste sintetizirani imunoglobulin G1 (IgG1) (MPDL3280A; modificiran da eliminira ADCC promjenom vezanja FcyR) (29) ili IgG4 antitijela (nivolumab i lambrolizumab), je rezultiralo u posebno brzom antitumorskom djelovanju, s nekim odgovorima opaženim unutar dana nakon početka liječenja. Ovi podaci upućuju na zaključak da je za mnoge vrste tumora ciklus tumor-imunost netaknut sve do točke ubijanja tumorskih stanica pomoću T-stanica, koje se može snažno obuzdati pomoću PD-L1. Jednom kada je PD-L1:PD-1 interakcija blokirana, prethodno postojeće antikancerogene T stanice mogu brzo obnoviti svoju efektorsku funkciju.

Prekliničke studije upućuju na to da prevencija obje interakcije može propagirati aktivnost citotoksičnih limfocita. Ispitivanja također pokazuju da je ekspresija PD-L1 povezana s odgovorom na inhibiciju interakcije između PD-L1 i PD-1, što ukazuje na to da kod tumora s visokim stupnjem ekspresije PD-L1 postoji veća vjerojatnost odgovora na imunoterapije koje ciljano djeluju na signalizaciju putem PD-L1(29).

1.10.1 Inteferencija PD-L1 na tumorskim i na imunskim stanicama

Interferencija PD-L1 aktivnosti na tumorskim stanicama kao i na imunskim stanicama koje infiltriraju u tumor može spriječiti supresivno signaliziranje kroz B7.1 i PD-1 na aktiviranim T limfocitima.

1.10.2 Utjecaj inteferencije PD-L1 na PD-L2 interakcije

Drugi ligand je PD-L2 koji se primarno eksprimira na normalnim stanicama, štiteći ih tijekom imunološkog odgovora za održavanje imunološke homeostaze, što sugeriraju prekliničke studije. Izravno ciljanje PD-L1 (za razliku od ciljanja PD-1) ostavlja PDL2 / PD-1 interakciju netaknutu, potencijalno je očuvana periferna imunološka homeostaza. Prekliničke studije upućuju na to da ometanje aktivnosti PD-L1 ne inhibiraju interakcije PD-L2 / PD-1(31).

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ustanoviti postoji li povezanost izraženosti proteina PD-L1 u trostruko negativnim karcinomima dojke s dobi bolesnica te patohistološkim parametrima veličine tumora, proliferacijskim indeksom Ki-67, perineuralnoj i limfovaskularnoj invaziji te proširenost tumora u regionalne limfne čvorove i prisutnost udaljenih metastaza te s podtipom TNBC (bazalni ili luminalni tip).

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijal

Istraživanje je provedeno na uzorku od 28 bolesnica s dijagnozom trostruko negativnog karcinoma dojke. Imunohistokemijom metodom su analizirani arhivirani uzorci biopsija tumora na prisustvo proteina PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima kao i u samom tumorskom tkivu. Iz patohistoloških nalaza arhive zavoda za patologiju KBC "Sestre milosrdnice" preuzeti su podaci o dobi bolesnica, veličini tumora, HER-2 statusu, proliferacijskom indeksu Ki-67, histološkom gradusu, perineuralnoj i limfovaskularnoj invaziji te proširenost tumora u regionalne limfne čvorove i prisutnost ili odsutnost udaljenih metastaza.

Kontrole tkiva koristile su se za praćenje učinkovitosti reakcije obrade tumorskih uzoraka, ispitivanih reagensa i instrumenata. Kao kontrolu koristilo se benigno tkivo ljudskih krajnika kod kojih je pozitivna reakcija bio rezultat obojenih limfocita i makrofaga u germinalnim centrima raspršenim među nebojanim PD-L1 negativnim stanicama u interfolikularnim regijama.

3.2 Metode

Za detekciju prisutnosti proteina PD-L1 u uzorcima tumora koristili smo imunohistokemijsku metodu. Prije imunohistokemijske analize bojenja uzorci tkiva se moraju pripremiti za bojenje.

3.2.1 Priprema tkiva za bojanje

Tumorsko tkivo fiksirano u 10% formalinu i u uklopljeno u parafin se izreže na mikrotomu na 2-3 μm debele rezove. Nakon toga izrezani rezovi se stave u vodenu kupelj (56 °C) da se razvuku te se navlače na predmetna stakla, zatim se suše u termostatu 40 minuta na 60 °C. Prije postupka bojenja potrebno je preparate deparafinirati u ksilolu (3x po 15 minuta), rehidrirati do vode u silaznom gradijentu etanola (100%, 95%, 70%) i isprati u destiliranoj vodi. Prije bojenja materijal se također mora obraditi postupkom demaskiranja antigena zbog toga što se prije prožimanja parafinom fiksira u formalinu. Formalin inhibira raspadanje i deformaciju

stanica te štiti tkivo od štetnih utjecaja tijekom daljnje obrade tkiva, s druge strane formalin stvara intra- i intermolekularne veze između proteina i na taj način skriva antigene za reakciju s antitijelom. Stoga se na kraju materijal prije bojenja mora obraditi postupkom demaskiranja antigena kombinacijom termičke obrade u puferima visokog pH (kuhanje u puferu pH 9,0), čime se antigeni oslobađaju za imunološku reakciju.

3.2.2 Imunohistokemijsko bojenje

Imunohistokemijska metoda koristi specifična primarna antitijela koja se vežu za antigene u fiksiranom tkivu, imunohistokemijska bojenja provedena su u automatiziranom uređaju Benchmark GX proizvođača Ventana (Roche) koji vrši proces demaskiranja antigena (standardni predtretman 1), inhibira proteaze, inkubira antitijela te na kraju uzorke boji "hematoksilinom II" i "bluing reagensom" proizvođača Ventana (Roche).

Za detekciju vezanja primarnog protutijela koristili smo OptiView Universal DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit proizvođača Ventana (Roche) koji sadrži sekundarna antitijela obilježena s peroksidazom iz hrena (prema eng. horseradish peroxidase, HRP), a cijeli kompleks vizualizira se pomoću vodikova peroksida i diaminobenzidina (DAB), kromogena što daje smeđe obojenje na mjestu antigena koji je lokaliziran pomoću primarnog antitijela.

Za određivanje prisutnosti proteina PD-L1 koristili smo primarno protutijelo proizvođača Ventana (Roche) anti-PD-L1 (klon SP142, rabbit monoclonal primary antibody) uz pozitivnu kontrolu koja je potvrđena reakcijom PCR (prema eng. polymerase chain reaction).

U uređaj Benchmark GX umetnu se stakalca s uzorcima trostruko negativnog karcinoma dojke, dozator s antitijelom anti- PD-L1(SP142) i dozator kompleta za detekciju ultraView. Zatim se odabire opcija deparafinizacije tkiva te predtretman 1 (kondicioniranje stanice 1, prema eng. cell conditioning 1 u trajanju od 64 minute. Nakon toga odabire se opcija za inhibiciju endogenih peroksidaza. Inkubacija antitijela postavlja se na 28 minuta pri temperaturi od 37 °C. Uzorci se na kraju boje 'hematoksilinom II' u trajanju od 8 minuta te 'bluing reagensom' u trajanju od 4 minute.

Izraženost PD-L1 je zabilježena kao pozitivna kod svih onih koji imaju više od 1% pozitivnih tumor-infiltrirajućih imunih stanica kao i kod svih onih koji imaju više od 1% pozitivnih tumorskih stanica.

Kako bismo razlučili koji karcinomi pripadaju skupini bazalnih tumora dukalnog invazivnog karcinoma (CK5/14 pozitivni), gore opisanom metodom imunohistokemijskog bojenja smo upotrebom primarnog protutijela na citokeratin 5 i citokeratin 14 (CK5/14) obojili uzorke.

3.3 Statistička obrada podataka

Za osnovnu obradu korištena je deskriptivna statistika. Odnos svih histopatoloških parametara (dob, veličina tumora, Ki-67 proliferacijski indeks, histološki gradus tumora, prisutnost proteina PD-L1, perineuralna i limfovaskularna invazija, proširenost tumora u regionalne limfne čvorove i prisutnost udaljenih metastaza) analiziran je neparametrijskim Spearman korelacijskim testom, χ^2 -testom i Kendall Tau analizom. Statistička analiza provedena je pomoću statističkog programa Statistika 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) s razinom statističke značajnosti 5% ($P < 0,05$) te korelacijskim koeficijentom [r] većim od 0,20.

4 REZULTATI

Kliničke i patohistološke karakteristike bolesnica s trostruko negativnim karcinomom dojke koje smo koristili u ovom istraživanju kao što su dob, veličina tumora, Ki-67 proliferacijski indeks, prisutnost proteina PD-L1, proširenost tumora u regionalne limfne čvorove, progresija bolesti i pozitivnost na citokeratin 5 i citokeratin 14 prikazane su u Tablici 3.

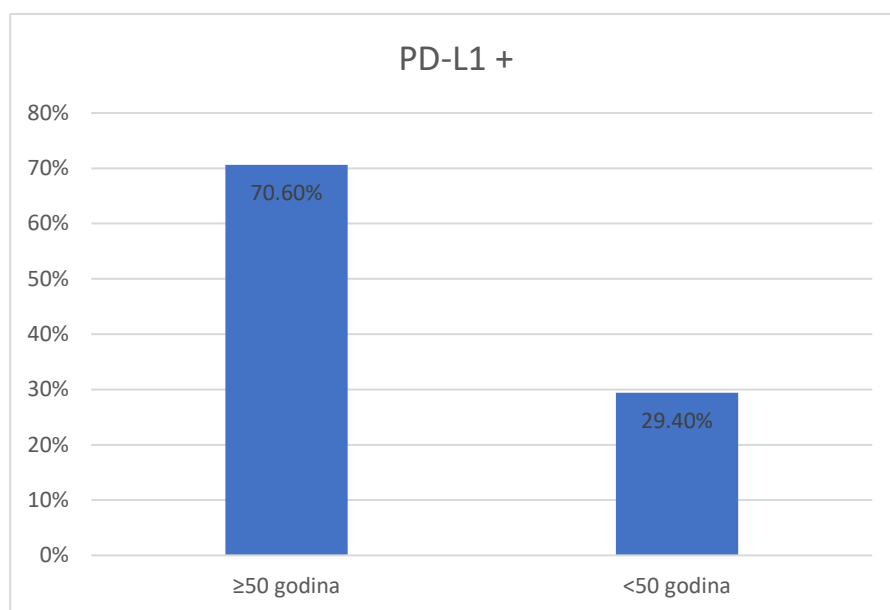
Tablica 3. Kliničke i patohistološke karakteristike bolesnica s trostruko negativnim karcinomom dojke

Karakteristika	Broj slučajeva N (%)
DOB	
<50 godina	7 (25%)
≥50 godina	21 (75%)
VELIČINA TUMORA	
≤3 cm	16 (57,1%)
>3 cm	12 (42,9%)
ER	
pozitivno	28 (100%)
negativno	0
PR	
pozitivno	28 (100%)
negativno	0
HER-2	
pozitivno	17 (60,7%)
negativno	11 (39,3%)
Ki-67 POZITIVNOST	
<50%	15 (53,6%)
≥50%	13 (46,4%)
ZAHVAĆENOST LIMFNIH ČVOROVA	
pozitivno	8 (29,6%)
negativno	19 (70,4%)
PROGRESIJA BOLESTI	
prisutna	10 (35,7%)
nije prisutna	18 (64,3%)
PD-L1	
pozitivno	17 (60,7%)
negativno	11 (39,3%)
CK 5/14	
pozitivno	11 (39,3 %)
negativno	17 (60,7 %)

χ^2 -test nije pokazao statističku značajnost između testiranih parametara. U našem istraživanju dobiveni su sljedeći rezultati:

4.1 Dob bolesnica

Srednja životna dob osoba oboljelih od trostruko negativnog karcinoma dojke je 57,6 godina, s rasponom od 30 do 76 godina. Od 17 slučajeva (60,7%) kod kojih se imunohistokemijom dokazalo prisustvo proteina PD-L1, njih 12 (70,6%) pripada skupini bolesnica starijih od 50 godina (Slika 6).

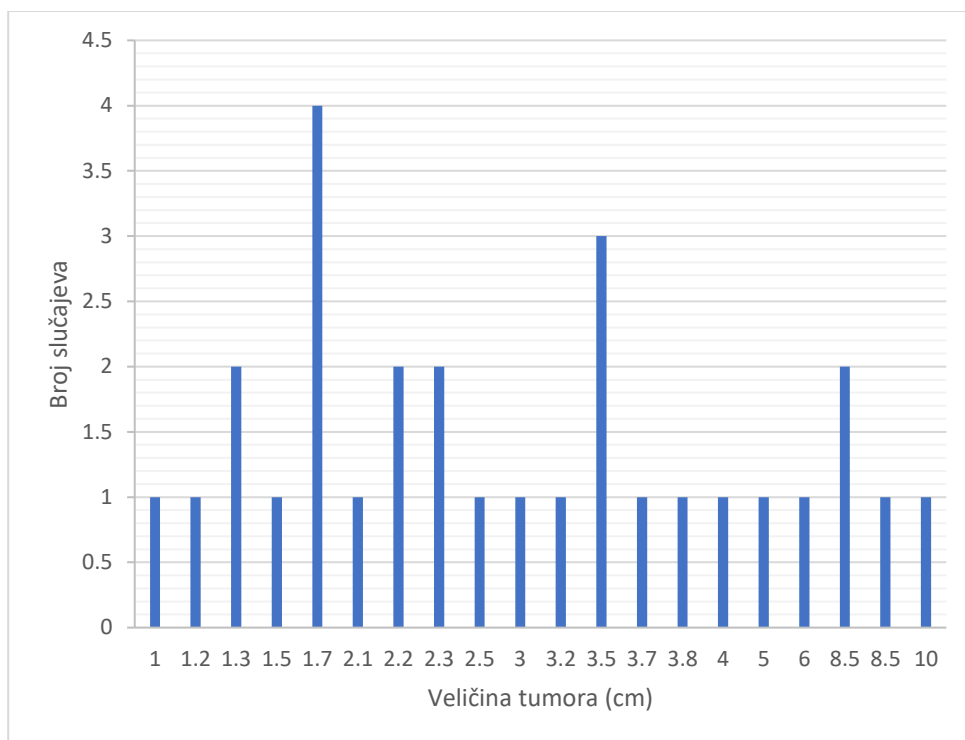


Slika 6. Korelacija ekspresije PD-L1 sa dobi bolesnica s trostruko negativnim karcinomom dojke

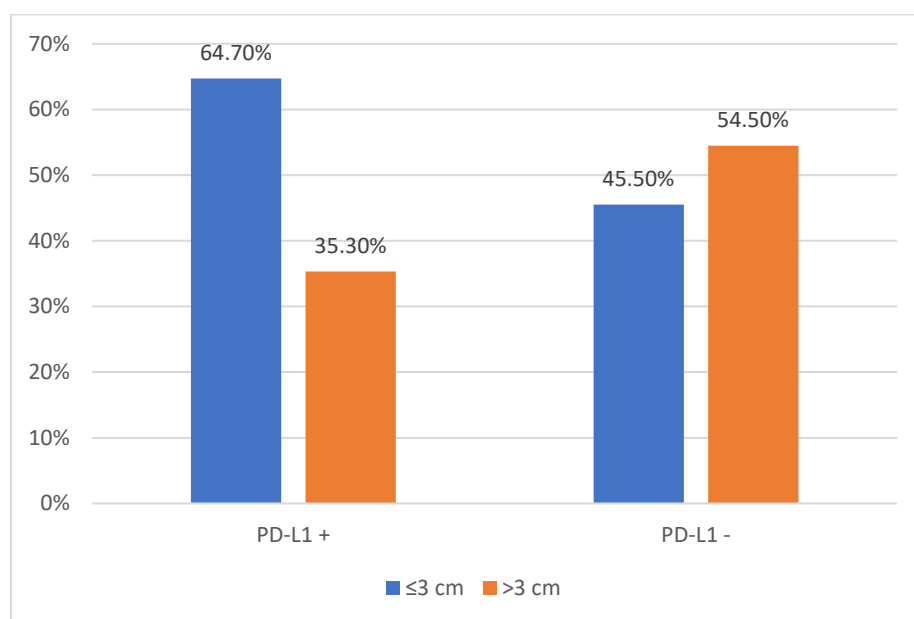
Spearmanovom analizom korelacije patohistoloških parametara trostruko negativnog karcinoma dojke nisu pronađene značajne korelacije dobi bolesnica s ostalim istraženim parametrima.

4.2 Veličina tumora

U ovom uzorku bolesnica s trostruko negativnim karcinomom dojke veličina tumora varira od 1 do 10 cm. Srednja veličina tumora bolesnica je 3,32 cm, a medijan veličine je 1,7 cm (Slika 7). Od 17 slučajeva (60,7%) kod kojih se imunohistokemijom dokazalo prisustvo proteina PD-L1, njih 11 (64,7%) pripada skupini bolesnica kod kojih je tumor manji od 3 cm (Slika 8).



Slika 7. Distribucija veličine tumora u bolesnica s trostruko negativnim karcinomom dojke

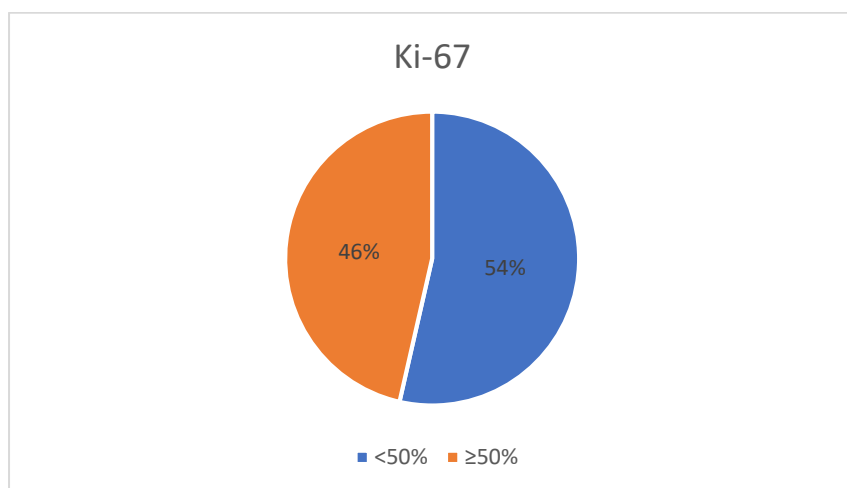


Slika 8. Korelacija PD-L1 ekspresije sa veličinom trostruko negativnog karcinoma dojke

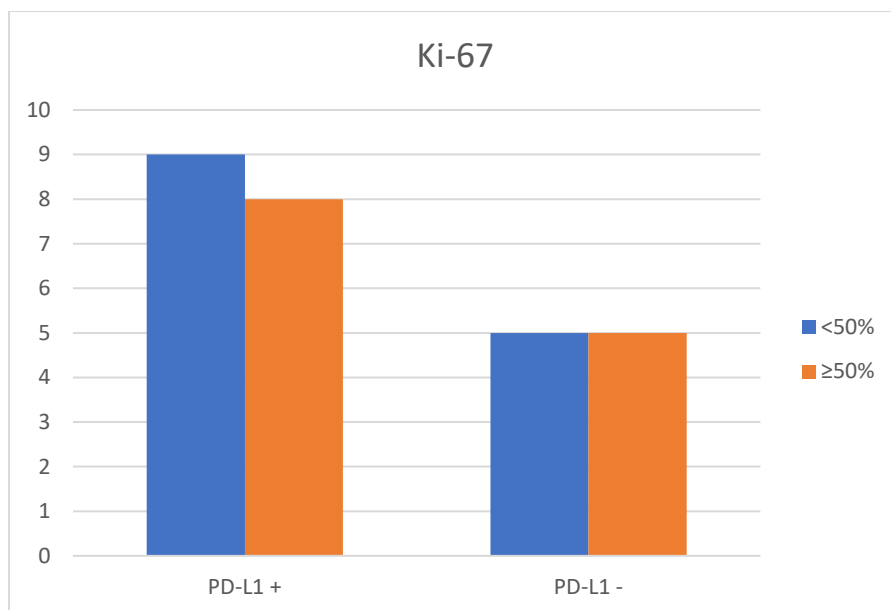
Spearmanovom analizom korelacije patohistoloških parametara trostruko negativnog karcinoma dojke nisu pronađene značajne korelacije veličine tumora s ostalim istraženim parametrima.

4.3 Ki-67 i histološki gradus tumora

Sve bolesnice u uzorku imaju trostruko negativni karcinom dojke gradusa 3. Većina bolesnica u uzorku ima postotak Ki-67 pozitivnih jezgara manji od 50% (54%) (Slika 9). Od 17 slučajeva (60,7%) kod kojih se imunohistokemijom dokazalo prisustvo proteina PD-L1, njih 9 (52,9%) pripada skupini uzoraka čiji je postotak Ki-67 manji od 50%. Kod uzoraka sa negativnim PD-L1 jednaka je distribucija među skupinama uzoraka sa Ki-67 manjim od 50% i uzoraka sa Ki-67 većim od 50% (Slika 10).



Slika 9. Distribucija Ki-67 u bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke

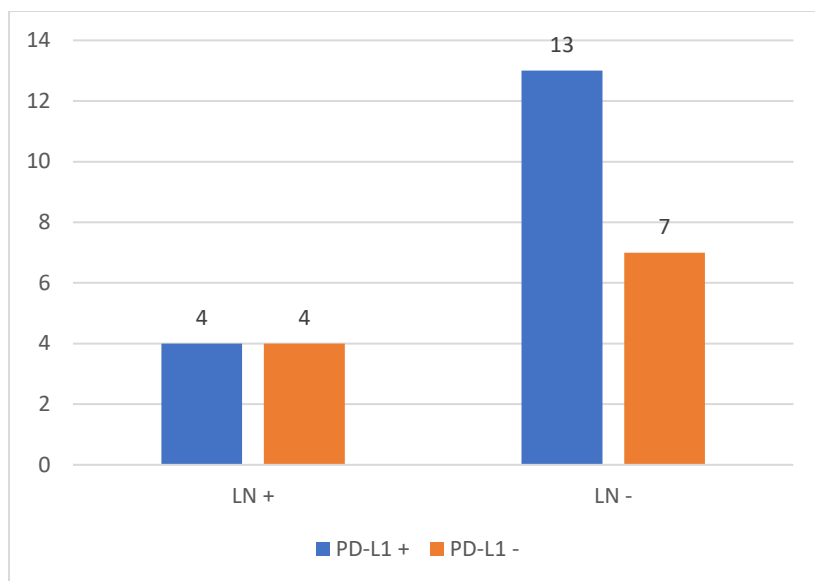


Slika 10. Korelacija ekspresije PD-L1 sa Ki-67 u bolesnika sa trostruko negativnim karcinomom dojke

Spearmanovom analizom korelacije patohistoloških parametara trostruko negativnog karcinoma dojke nisu pronađene značajne korelacije Ki-67 s ostalim istraženim parametrima.

4.4 Proširenost tumora u regionalne limfne čvorove

U uzorku je 29,6% slučajeva kod kojih se tumor proširio u limfne čvorove (Tablica 3). Kada se uspoređuju skupine bolesnika kod kojih je PD-L1 pozitivan i skupina bolesnika kod kojih je PD-L1 negativan i proširenost tumora u regionalne limfne čvorove, može se vidjeti da su metastaze jednako zastupljene u obje skupine (Slika 11).

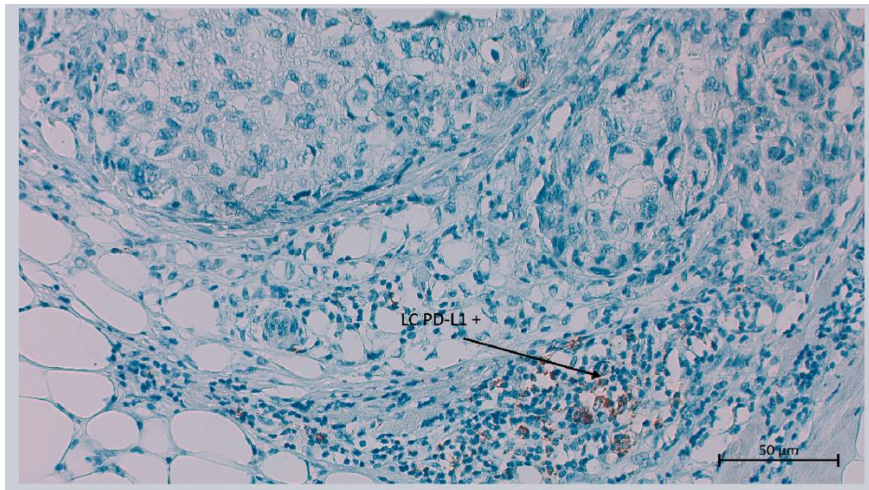


Slika 11. Proširenost tumora u regionalne limfne čvorove u uzorcima trostruko negativnog karcinoma dojke

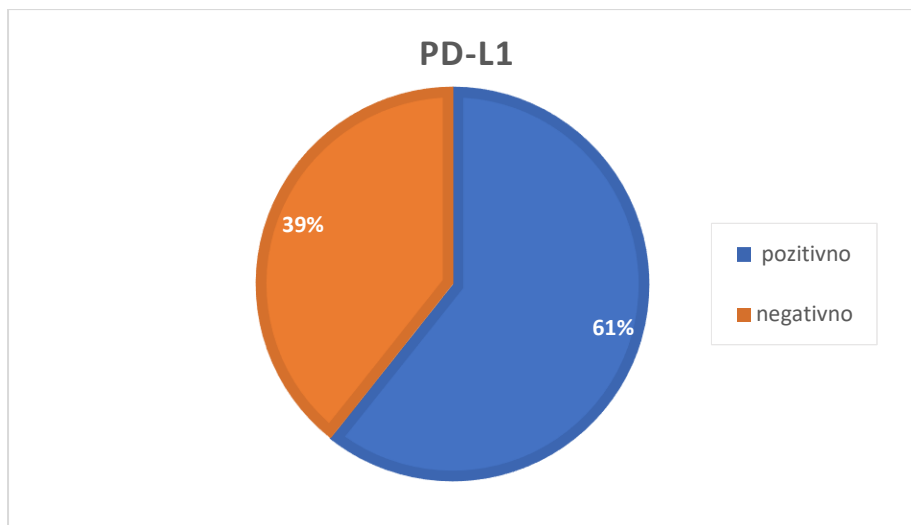
Spearmanovom analizom korelacije patohistoloških parametara trostruko negativnog karcinoma dojke nisu pronađene značajne korelacije proširenosti tumora u regionalne limfne čvorove s ostalim istraženim parametrima.

4.5 Prisustvo proteina PD-L1

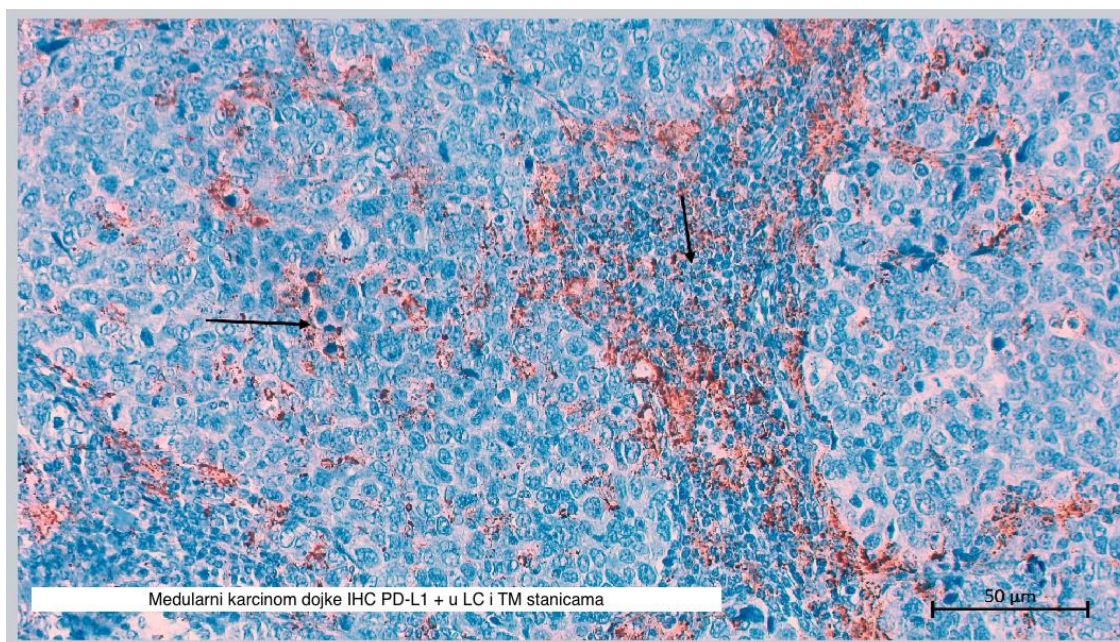
U ovom istraživanju bilo je 17 slučajeva (60,7%) kod kojih se imunohistokemijom dokazalo prisustvo proteina PD-L1 u trostruko negativnim karcinomima dojke (Slika 12 i 13). Od 17 uzoraka kod kojih je PD-L1 bio pozitivan, 3 uzorka su pokazala prisustvo PD-L1 u tumor-infiltrirajućim limfocitima kao i u samim tumorskim stanicama (Slika 14 i 15). Kendall Tau analiza korelacije pokazala je povezanost između prisustva proteina PD-L1 u tumor-infiltrirajućim limfocitima i prisustva proteina PD-L1 u tumorskim stanicama ($p = 0,037$).



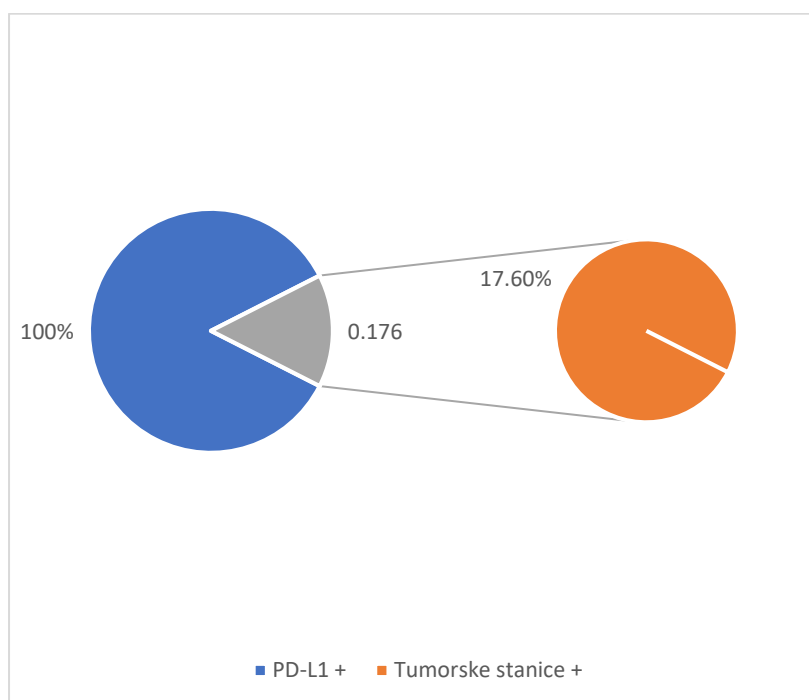
Slika 12. Prisustvo PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima kod trostruko negativnog karcinoma dojke. Vizualizacija reakcije antigena i antitijela kromogenom DAB



Slika 13. Prisustvo PD-L1 u uzorcima trostruko negativnog karcinoma dojke



Slika 14. Prisustvo PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima i u tumorskim stanicama kod trostruko negativnog karcinoma dojke. Vizualizacija reakcije antigena i antitijela kromogenom DAB

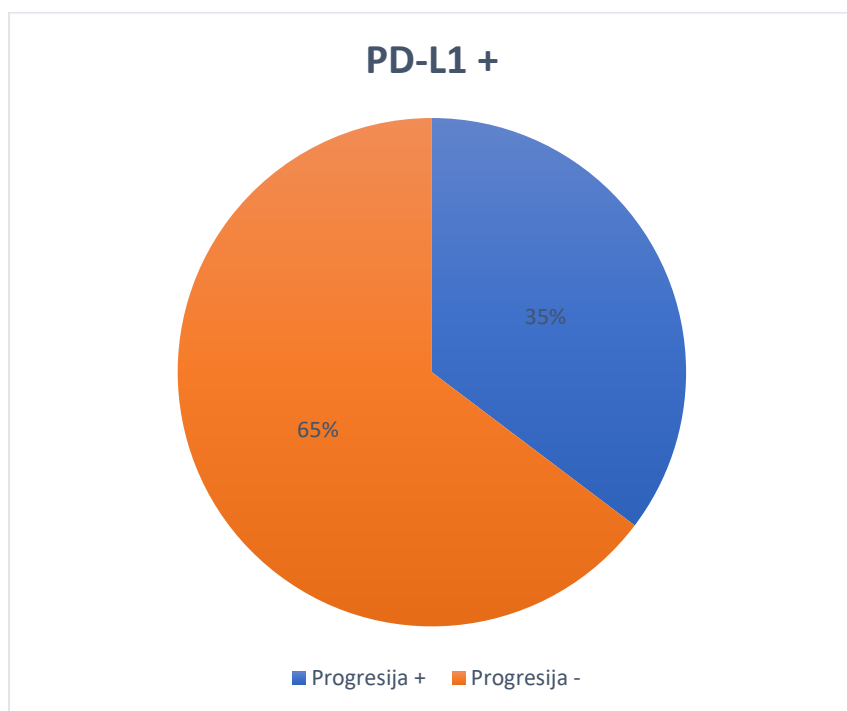


Slika 15. Prisustvo PD-L1 u tumor-infiltrirajućim limfocitima i u tumorskim stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke

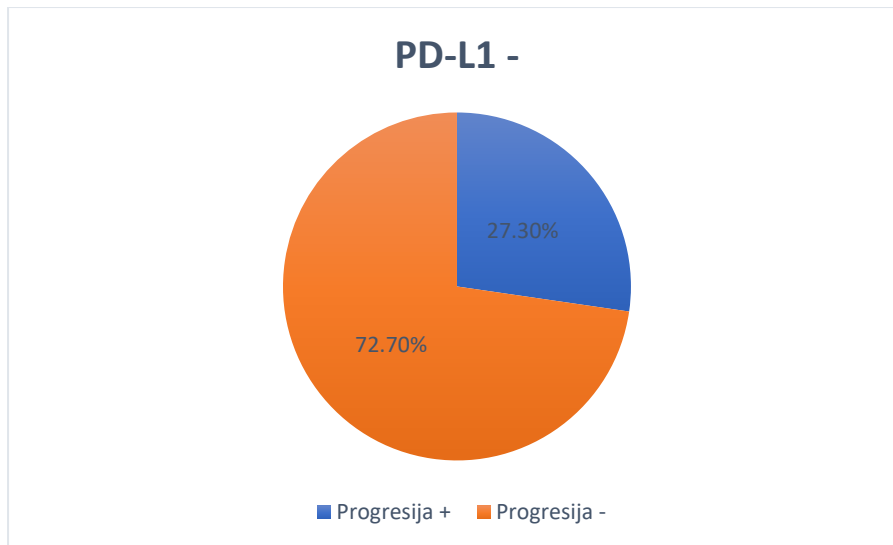
Spearmanovom analizom korelacije patohistoloških parametara trostruko negativnog karcinoma dojke nisu pronađene značajne korelacije prisustva PD-L1 proteina s ostalim istraženim parametrima.

4.6 Progresija bolesti

Od 17 slučajeva (60,7%) kod kojih se imunohistokemijom dokazalo prisustvo proteina PD-L1, kod njih 6 (35,3%) se očitovala progresija same bolesti u bolesnica s trostruko negativnim karcinomom dojke (Slika 16). Od preostalih 11 slučajeva (39,3%) kod kojih se imunohistokemijom nije dokazalo prisustvo PD-L1 proteina kod 3 uzorka (27,3%) se očitovala progresija same bolesti s trostruko negativnim karcinomom dojke (Slika 17).



Slika 16. Distribucija progresije bolesti u bolesnica sa pozitivnim PD-L1 u trostruko negativnom karcinomu dojke



Slika 17. Distribucija progresije bolesti u bolesnica sa negativnim PD-L1 u trostruko negativnom karcinomu dojke

Kendall Tau analiza korelacije pokazala je povezanost između progresije bolesti i proširenosti tumora u regionalne limfne čvorove ($p = 0,0002$).

Kendall Tau analiza korelacije također je pokazala povezanost između progresije bolesti i broja pozitivnih limfnih čvorova ($p = 0,0002$).

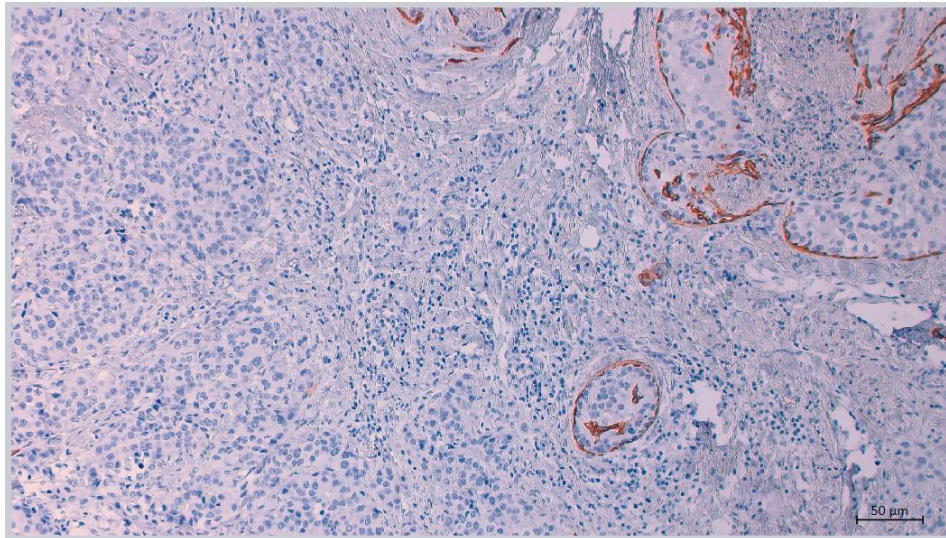
Kendall Tau analiza korelacije pokazala je povezanost između progresije bolesti i veličine tumora ($p = 0,001$).

Spearmanovom analizom korelacije patohistoloških parametara trostruko negativnog karcinoma dojke nisu pronađene značajne korelacije progresije bolesti s ostalim istraženim parametrima.

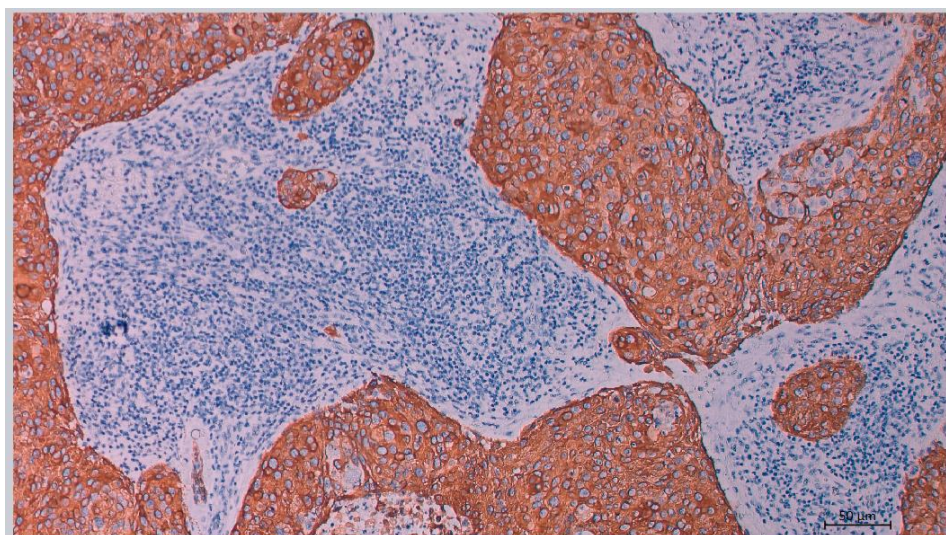
4.7 Detekcija citokeratina 5 i citokeratina 14

Upotrebom primarnog protutijela na citokeratin 5 i citokeratin 14 (CK5/14) od 28 uzoraka trostruko negativnog karcinoma dojke za njih 17 (60,7%) je reakcija bila negativna ukazujući na tumour luminalnog karaktera (Slika 18). Od preostalih 11 uzoraka 6 ih je pokazalo potpunu pozitivnu reakciju (Slika 19) dok je preostalih 5 uzoraka bilo mješovitog karaktera odnosno pokazivalo karakteristike bazalnog kao i luminalnog karcinoma dojke (Slika 20). Zbog malog broja istraživane skupine od svega 28 uzoraka one koji su pokazivali karakteristike mješovitog

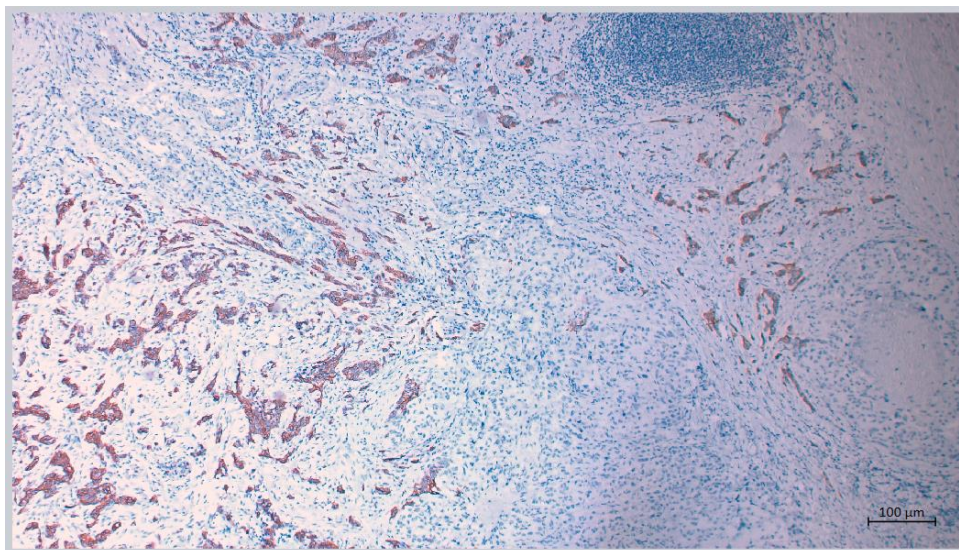
podtipa izrazili su se kao pozitivni. Od 17 slučajeva (60,7%) kod kojih se imunohistokemijom dokazalo prisustvo proteina PD-L1, 8 uzoraka trostruko negativnog karcinoma dojke (47%) pokazalo je pozitivnu reakciju na citokeratin 5 i citokeratin 14 (Slika 21).



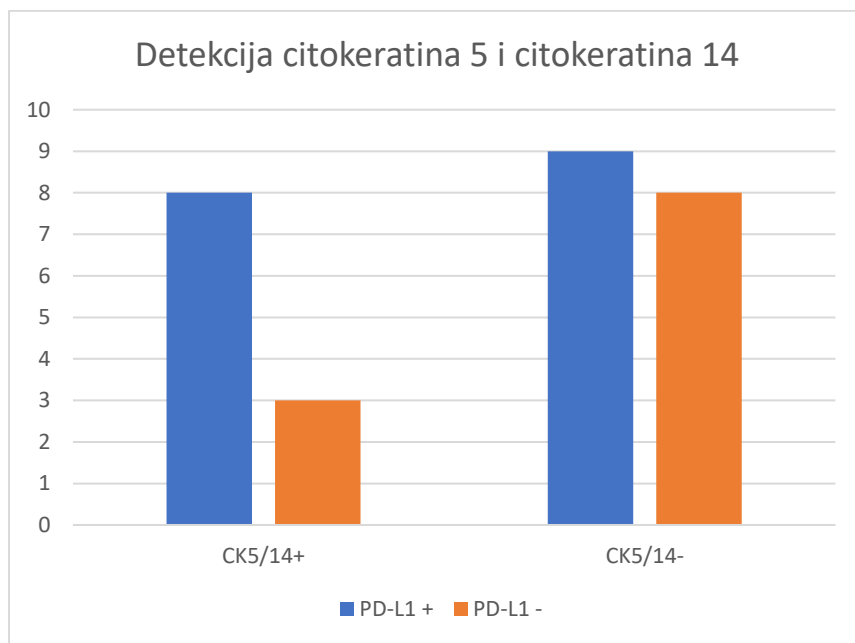
Slika 18. Prikaz luminalnog podtipa trostruko negativnog karcinoma dojke i negativne reakcije na citokeratin 5 i citokeratin 14. Smeđe obojenje prikazuje pozitivne mioepitelne stanice. Vizualizacija reakcije antigena i antitijela kromogenom DAB



Slika 19. Prikaz bazalnog podtipa trostruko negativnog karcinoma dojke i pozitivne reakcije na citokeratin 5 i citokeratin 14. Vizualizacija reakcije antigena i antitijela kromogenom DAB



Slika 20. Prikaz uzorka trostruko negativnog karcinoma dojke s karakterom bazalnog kao i luminalnog karcinoma dojke. Vizualizacija reakcije antigena i antitijela kromogenom DAB



Slika 21. Korelacija PD-L1 izraženosti s CK5/14 pozitivnim uzorcima

Kendall Tau analiza korelacije pokazala je povezanost između pozitivne reakcije na citokeratin 5 i citokeratin 14 i dobi bolesnica ($p = 0,048$).

Kendall Tau analiza korelacije pokazala je povezanost između pozitivne reakcije na citokeratin 5 i citokeratin 14 i limfovaskularne invazije ($p = 0,005$).

Kendall Tau analiza korelacije pokazala je povezanost između pozitivne reakcije na citokeratin 5 i citokeratin 14 i veličine tumora ($p = 0,037$).

Spearmanovom analizom korelacije patohistoloških parametara trostruko negativnog karcinoma dojke nisu pronađene značajne korelacije CK5/14 pozitivne reakcije s ostalim istraženim parametrima.

5 RASPRAVA

Trostruko negativni podtip karcinoma dojke koji je otkriven prije više od desetljeća, a nazvan je podtip bazalnog karaktera zbog sličnosti u ekspresiji gena s bazalnim epitelnim stanicama normalnog tkiva dojke (17). To je vrsta karcinoma dojke kojem u jezgrama tumorskih stanica nisu prisutni estrogenski i progesteronski receptori niti je prekomjerno izražen HER2 protein na površini stanice. Zato su mehanizmi koji tu vrstu raka potiču na rast i dijeljenje uglavnom nepoznati i zbog toga je ta vrsta raka iznimno teška za liječenje, mogućnosti liječenja su ograničene i prognoze su često loše. Dugoročna prognoza ovisi dobi bolesnice, veličini primarnog tumora, stupnju diferenciranosti tumora, broju zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova i kliničkom stadiju tumorske bolesti (12). Općenito, prognoza TNBC je najlošija od svih duktalnih invazivnih karcinoma dojke.

Bolesnice s tumorom dojke mlađe od 35 godina imaju lošiju prognozu od starijih bolesnica. Ova se razlika samo djelomično objašnjava većom učestalošću lošijih patoloških čimbenika koji se primjećuju kod mlađih bolesnica. Bolesnice mlađe od 35 godina imali su značajno višu ukupnu stopu recidiva ($P = 0.002$), kao i veći rizik za razvoj udaljenih metastaza ($p = 0.03$), u usporedbi sa starijim bolesnicama. Karcinom kod mlađih bolesnica češće je pokazivao čimbenike povezane s lošijom prognozom, koji su povezani sa histološkim gradusom 3 i limfovaskularnom invazijom, u usporedbi sa starijim bolesnicama (32). U ovom istraživanju srednja životna dob osoba oboljelih od trostruko negativnog karcinoma dojke je 57,6 godina. Od 28 uzoraka ispitivanih u ovom istraživanju, samo jedan uzorak pripada skupini bolesnica mlađih od 35 godina. 21 uzorak (75%) trostruko negativnog karcinoma dojke pripada bolesnicama iz skupine koja je imala 50 godina ili više.

U jednoj retrospektivnoj studiji bilo je uključeno 849 bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke. Od 849 slučajeva u 308 slučajeva (44,8%) veličina tumora je bila manja od 2 cm. 438 uzoraka tumora (51,6%) je imalo veličinu između 2 cm i 5 cm a svega 17 uzoraka tumora (2%) pripadalo je skupini veličine više od 5 cm. Postotak koji otpada na veličinu tumora između 2 cm i 5 cm se relativno podudara sa vrijednostima istog u našem istraživanju (33). Od 28 slučajeva trostruko negativnog karcinoma dojke u 9 slučajeva (32%) veličina tumora je bila manja od 2 cm. 15 uzoraka tumora (53,6%) je imalo veličinu između 2 cm i 5 cm a 4 (14,4%) uzorka su bila veća od 5 cm.

Prema studiji u kojoj je ispitano 44 uzorka karcinoma dojke, prisustvo PD-L1 bilo je visoko povezano s velikim veličinama tumora ($p = 0,042$) (34). U našem uzorku Spearmanovom analizom nije pronađena značajna korelacija veličine trostruko negativnog karcinoma dojke i prisustva PD-L1 proteina ($p = 0,343$).

U prethodnoj studiji ispitano je 280 bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke. 99 uzoraka (35,3%) je imalo Ki-67 vrijednost manju od 20%. 85 uzoraka (30,3%) je imalo vrijednost Ki-67 između 20 % i 50 % dok je 96 (34,4%) uzoraka imalo Ki-67 vrijednost veću od 50% (35). U našem istraživanju nije bilo uzoraka čija je vrijednost Ki-67 bila manja od 20%. Vrijednost Ki-67 bila je jednaka između skupine uzoraka trostruko negativnog karcinoma dojke čija je vrijednost Ki-67 bila između 20% i 50% (50%) i skupine uzoraka trostruko negativnog karcinoma dojke čija je vrijednost Ki-67 bila veća od 50 % (50%).

U jednom istraživanju ispitano je 849 uzoraka trostruko negativnog karcinoma dojke. U 298 uzoraka (35,1%) je potvrđena proširenost tumora u regionalne limfne čvorove od kojih je u 112 (37,6%) uočena limfovaskularna invazija. U preostalim 551 uzorak (64,9%) nije bilo proširenosti tumora u regionalne limfne čvorove (33). U našem ispitivanju od 28 uzoraka kod njih 8 (29,6%) je uočena proširenost tumora u regionalne limfne čvorove dok u 19 uzoraka (70,4%) nije uočena proširenost tumora u regionalne limfne čvorove. Za jedan uzorak nisu pronađeni spomeni podatci. U 5 uzoraka je potvrđena limfovaskularna invazija (17,9%).

U prethodnom istraživanju imunohistokemijskim metodama ispitivali su prisutnost PD-L1 proteina u 44 uzorka karcinoma dojke. Prisustvo PD-L1 uočeno je u 22 uzorka (50%) u tumor infiltrirajućim limfocitima a u 15 uzoraka je PD-L1 bio prisutan i u tumorskim stanicama (68,2%) (36). U našem ispitivanju od 28 uzoraka trostruko negativnog karcinoma dojke bilo je 17 slučajeva (60,7%) kod kojih se imunohistokemijom dokazalo prisustvo proteina PD-L1. Od 17 uzoraka kod kojih je PD-L1 bio pozitivan, 3 uzorka su pokazala prisustvo PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima kao i u samim tumorskim stanicama (17,7%).

U jednoj studiji ispitivali su prisutnost PD-L1 proteina u 5454 uzorka karcinoma dojke. Ekspresija PD-L1 općenito je bila povezana s značajkama loše prognoze: velika veličina tumora, visoki histološki gradus, negativni ER status, negativni PR status i veliki postotak Ki-67. Prisustvo PD-L1 uočeno je u 1076 uzoraka (19,7%) od kojih njih 598 (69%) pripada skupini bolesnica starijih od 50 godina a preostalim 267 (31%) uzoraka pripada skupini bolesnica od 50 godina ili mlađih od 50 godina (35). Protein PD-L1 u našem istraživanju bio je pozitivan u 17 slučajeva od kojih 5 uzoraka (29,4%) pripada skupini bolesnica od 50 godina

ili mlađih od 50 godina dok njih 12 (70,6%) pripada skupini bolesnica starijih od 50 godina. Od 1076 uzoraka koji su PD-L1 pozitivni za njih 769 nađen je podatak za proširenost tumora u regionalne limfne čvorove. Od 769 uzoraka u 398 (52%) je bila prisutna proširenost tumora u regionalne limfne čvorove dok u ostalih 371 (48%) nije bila prisutna. U našem istraživanju od 8 uzoraka kod kojih je bila prisutna proširenost tumora u regionalne limfne čvorove jednaka je distribucija između skupine koja je PD-L1 pozitivna i skupine koja je PD-L1 negativna.

Također, Od 1076 uzoraka karcinoma dojke koji su PD-L1 pozitivni kod njih 665 (62%) je Ki-67 bio pozitivan dok je kod preostalih 411 (38%) bio negativan. U našem istraživanju od 17 slučajeva (60,7%) kod kojih se imunohistokemijom dokazalo prisustvo proteina PD-L1, njih 9 (52,9%) pripada skupini uzoraka čiji je postotak Ki-67 manji od 50 %.

U jednoj retrospektivnoj studiji pokazali se da su bolesnice mlađe od 35 godina s ranim stadijem karcinoma dojke nakon mastektomije imale lošiju prognozu s većim rizikom progresije bolesti i metastatskim potencijalom u usporedbi sa starijim pacijentima (37). U našem ispitivanju od 28 uzoraka trostruko negativnog karcinoma u 10 slučajeva je uočena progresija bolesti. Ni jedan od tih uzoraka ne pripada dobnoj skupini manjoj od 35 godina.

Nadalje, prema drugoj studiji, ako je prisutna proširenost tumora u regionalne limfne čvorove postoji visoki rizik od metastaza, dok ako nema zahvaćanja limfnih čvorova, bolesnice imaju nizak rizik od udaljenih metastaza. Uz to, prisutnost više od četiri metastaze na limfnim čvorovima povezana je s vrlo visokim rizikom od udaljenih metastaza (38). U našem ispitivanju od 10 potvrđenih progresija bolesti u bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke u 6 uzoraka je pronađena proširenost tumora u regionalne limfne čvorove ($p = 0,0002$)

Veći tumori općenito imaju lošiju prognozu i veći metastatski potencijal od manjih tumora. Do sada je pokazano da veličina karcinoma dojke ≤ 2 cm u bolesnica mlađih od 40 godina u pravilu ukazuje na relativno nizak rizik od metastaza. Međutim, tumori veličine od 2-5 cm imaju visoki rizik od metastaza, dok tumori veličine više od 5 cm imaju vrlo visok rizik od metastaza (39). U našem istraživanju od 10 potvrđenih progresija bolesti u bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke 7 uzoraka spada u skupinu veličine tumora unutar 2-5 cm dok su preostala 3 uzorka bila veća od 5 cm.

U jednoj studiji istraživana su 154 uzorka trostruko negativnog karcinoma dojke. Od 154 uzorka, 83 (53,9%) uzorka su pokazala pozitivnu reakciju na citokeratin 5 i citokeratin 14 (40).

U našem istraživanju od 28 uzoraka za njih 11 je reakcija na citokeratin 5 i citokeratin 14 (CK5/14) bila pozitivna (39,3%).

Od 83 CK5/14 pozitivnih uzoraka u spomenutoj studiji, 52 uzorka (62,6%) su pripadala dobnoj skupini od 50 godina ili manje. U našem ispitivanju od 11 uzoraka trostruko negativnog karcinoma koji su pokazali pozitivnu reakciju na CK5/14 4 uzorka (36,4%) su pripadala dobnoj skupini od 50 godina ili manje.

Od 83 CK5/14 pozitivnih uzoraka, kod 36 uzoraka (43,4%) se uočila proširenost tumora u regionalne limfne čvorove. U našem ispitivanju od 11 uzoraka trostruko negativnog karcinoma koji su pokazali pozitivnu reakciju na CK5/14 u 2 slučaja (18%) se uočila proširenost tumora u regionalne limfne čvorove.

Od 83 CK5/14 pozitivnih uzoraka, u 32 slučaja (38,5%) uočila se progresija bolesti u obliku lokalnog recidiva i/ili metastaza. U našem ispitivanju od 11 uzoraka trostruko negativnog karcinoma koji su pokazali pozitivnu reakciju na CK5/14 u 3 slučaja (27,3%) uočila se progresija bolesti.

6 ZAKLJUČCI

- Bolesnice s izraženim proteinom PD-L1 pripadaju dobnoj skupini starijoj od 50 godina
- Prisustvo proteina PD-L1 potvrđeno je kod skupine bolesnica čiji je Ki-67 manji od 50%
- Polovina bolesnica s tumorom proširenim u regionalne limfne čvorove ima izražen protein PD-L1 u tumor infiltrirajućim limfocitima
- Progresija bolesti trostruko negativnog karcinoma dojke bila je češća u bolesnica čija je veličina tumora bila veća od 2 cm
- Prisustvo proteina PD-L1 jednako je distribuirano između skupine karcinoma dojke bazalnog karaktera i skupine karcinoma dojke luminalnog karaktera

7 LITERATURA

1. Bray, Freddie, et al. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA: a cancer journal for clinicians* 68.6 (2018): 394-424.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016. godine, Bilteni 41. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2019.
3. Key, T. J., Verkasalo, P. K., & Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology*, 2(3), 133-140.
4. McPherson, K., Steel, C., & Dixon, J. M. (2000). Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *British Medical Journal*, 321(7261), 624-628.
5. Kurman, R. J., Carcangiu, M. L., Herrington, S., & Young, R. H. (2014). *WHO classification of tumours of female reproductive organs*. IARC.
6. Vajpeyi, R. (2005). WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.
7. Hilsenbeck, S. G., Ravdin, P. M., de Moor, C. A., Chamness, G. C., Osborne, C. K., & Clark, G. M. (1998). Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 52(1-3), 227-237.
8. Bae, S. Y., Kim, S., Lee, J. H., Lee, H. C., Lee, S. K., Kil, W. H., Kim S. W., Lee J. E. & Nam, S. J. (2015). Poor prognosis of single hormone receptor-positive breast cancer: similar outcome as triple-negative breast cancer. *BioMed Central Cancer*, 15(1), 138.
9. Suo, Z., Risberg, B., Kalsson, M. G., Willman, K., Tierens, A., Skovlund, E., & Nesland, J. M. (2002). EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 196(1), 17-25.
10. Schnitt, S. J. (2001). Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges. *Modern Pathology*, 14(3), 213.
11. Winstanley, J., Cooke, T., Murray, G. D., Platt-Higgins, A., George, W. D., Holt, S., Myskov M., Spedding A., Barraclough B. R. & Rudland, P. S. (1991). The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. *British Journal of Cancer*, 63(3), 447.

12. Clark, G. M., & McGuire, W. L. (1991). Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Research*, *51*(3), 944-948.
13. Perreard, L., Fan, C., Quackenbush, J. F., Mullins, M., Gauthier, N. P., Nelson, E., Mone M., Hansen H., Buys S. S., Rasmussen R. & Orrico, A. R. (2006). Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Research*, *8*(2), R23.
14. Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A. & Fluge, Ø. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747.
15. Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A., Savage M. I., Osborne C. K., Hilsenbeck S. G., Chang J. C. & Mills, G. B. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *21*(7), 1688-1698.
16. Chia, S., Norris, B., Speers, C., Cheang, M., Gilks, B., Gown, A. M., Huntsman D., Olivetto I. A., Nielsen T. O. & Gelmon, K. (2008). Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(35), 5697-5704.
17. Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *490*(7418), 61.
18. Alduk, A. M. (2015). *Povezanost morfoloških i kinetičkih osobitosti duktalnoga invazivnoga karcinoma dojke dobivenih magnetnom rezonancijom s patohistološkim prognostičkim pokazateljima [Correlation of morphological and kinetic features at magnetic resonance imaging and pathohistological prognostic factors in invasive ductal breast cancer]* (Doctoral dissertation, Sveučilište u Zagrebu).
19. Liu, Y. X., Wang, K. R., Xing, H., Zhai, X. J., Wang, L. P., & Wang, W. (2016). Attempt towards a novel classification of triple-negative breast cancer using immunohistochemical markers. *Oncology Letters*, *12*(2), 1240-1256.
20. Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, *182*(3), 311-322.
21. De Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro Jr, G., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V., Sotiriou C., Larsimont D., Piccart-Gebhart M J. & Paesmans, M. (2007). Ki-67

- as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British Journal of Cancer*, 96(10), 1504.
22. Aleskandarany, M. A., Rakha, E. A., Macmillan, R. D., Powe, D. G., Ellis, I. O., & Green, A. R. (2011). MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(3), 591-599.
 23. Dabbs, D. J., Chivukula, M., Carter, G., & Bhargava, R. (2006). Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. *Modern Pathology*, 19(11), 1506-1511.
 24. Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1-10.
 25. Wang, J., Yuan, R., Song, W., Sun, J., Liu, D., & Li, Z. (2017). PD-1, PD-L1 (B7-H1) and tumor-site immune modulation therapy: the historical perspective. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 34
 26. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., & Riley, J. L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *The Journal of Immunology*, 173(2), 945-954.
 27. Salmaninejad, A., Valilou, S. F., Shabgah, A. G., Aslani, S., Alimardani, M., Pashar, A., & Sahebkar, A. (2019). PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *Journal of Cellular Physiology*.
 28. Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert S., Eynden G., Baehner F. L., Penault-Llorca F. & Perez, E. A. (2014). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of Oncology*, 26(2), 259-271.
 29. Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, 24(2), 207-212.
 30. Spigel, D. R., Gettinger, S. N., Horn, L., Herbst, R. S., Gandhi, L., Gordon, M. S., Cruz C., Conkling P., Cassier P. A., Antonia S. J. & Burris, H. A. (2013). Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*

31. Chen, D. S., Irving, B. A., & Hodi, F. S. (2012). Molecular pathways: next-generation immunotherapy—inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clinical Cancer Research*, *18*(24), 6580-6587.
32. Nixon, A. J., Neubergh, D., Hayes, D. F., Gelman, R., Connolly, J. L., Schnitt, S., Abner A., Recht A., Vicini F. & Harris, J. R. (1994). Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *12*(5), 888-894.
33. Yin, L., Shuang, H., Sheng, C., Liang, H., Sun, X. J., Yang, W. T., & Shao, Z. M. (2018). The Prognostic Value of Nodal Staging in Triple-Negative Breast Cancer—A Cohort from China. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-7.
34. Ghebeh, H., Mohammed, S., Al-Omair, A., Qattan, A., Lehe, C., Al-Qudaihi, G., Elkum N., Alshabanah M., Amer S. B., Tulbah A. & Ajarim, D. (2006). The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia (New York, NY)*, *8*(3), 190.
35. Wang, R. X., Chen, S., Jin, X., & Shao, Z. M. (2016). Value of Ki-67 expression in triple-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy with weekly paclitaxel plus carboplatin. *Scientific Reports*, *6*(1), 1-8.
36. Sabatier, R., Finetti, P., Mamessier, E., Adelaide, J., Chaffanet, M., Ali, H. R., Viens P., Caldas C., Birnbaum D. & Bertucci, F. (2015). Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, *6*(7), 5449.
37. Ribnikar, D., Ribeiro, J. M., Pinto, D., Sousa, B., Pinto, A. C., Gomes, E., Moser E. C., Cardoso M. J. & Cardoso, F. (2015). Breast cancer under age 40: a different approach. *Current Treatment Options in Oncology*, *16*(4), 16.
38. Milner, T. D., de Lusignan, S., Jones, S., Jackson, P. A., Layer, G. T., Kissin, M. W., & Irvine, T. E. (2015). Breast cancer metastasis burden in sentinel nodes analysed using one-step nucleic acid amplification predicts axillary nodal status. *The Breast*, *24*(5), 568-575.
39. Xue, C., Fu, F., & Wang, C. (2015). Analysis of prognostic parameters in patients with breast cancer of size smaller than or equal to 2 cm. *Zhonghua bing li xue za zhi= Chinese Journal of Pathology*, *44*(4), 245-249.
40. Liu, Y. X., Wang, K. R., Xing, H., Zhai, X. J., Wang, L. P., & Wang, W. (2016). Attempt towards a novel classification of triple-negative breast cancer using immunohistochemical markers. *Oncology Letters*, *12*(2), 1240-1256.

41. Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky J. M., Sun L., Hugo W., Wang X. & Parisi, G. (2017). Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression. *Cell Reports*, *19*(6), 1189-1201.

8 ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Anja Delić

Datum i mjesto rođenja: 03.10.1995., Split

Završeno obrazovanje:

- Listopad 2017. - veljača 2020. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, diplomski studij Molekularne biologije
- listopad 2014. – rujan 2017. Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Preddiplomski studij biologije i kemije (sveučilišna prvostupnica biologije i kemije)
- rujan 2010. – svibanj 2014. Peta gimnazija Vladimir Nazor
- rujan 2002. – lipanj 2010. Osnovna škola Lučac

Prakse i sudjelovanja:

- 2019. Erasmus + stručna praksa na medicinskom fakultetu u Grazu pod vodstvom mentora dr. scient. med. Alexander Deutscha i temom istraživanja utjecaja NR4A1 kao tumor supresora na imunosupresivne proteine u agresivnim limfomima
- 2018. Laboratorijska stručna praksa pod vodstvom dr. sc. Sanje Kapitanović na Institutu Ruđer Bošković s područjem istraživanja molekularno-genetičke osnove nastanka i napredovanja sporadičnih tumora debelog crijeva

Radna iskustva:

- Brojni studentski poslovi tijekom studiranja

Znanja i vještine:

- rad na računalu: dobro poznavanje rada na računalu, poznavanje rada u paketu MS Office: Word, Excel, PowerPoint, Outlook, pretraživanje interneta i stručne literature
- strani jezici: engleski (C1), talijanski (A1)
- komunikativnost, timski rad, upornost, organizacijske sposobnosti, želja i volja za učenjem