SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Toni Čeprnja

Prognostička vrijednost izražaja anitgena za rak testisa i tumorskog mikrookoliša u trostruko negativnim karcinomima dojke

Doktorska disertacija

Split, 2023.

Rad je izrađen na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

Mentor: doc.dr.sc. Ivana Mrklić

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE 2

1.2. HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE 4

1.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE 5

1.4. MOLEKULARNA KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE I „BASAL-LIKE“ KARCINOMI 6

1.5. TNM KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE 8

1.6. DIJAGNOSTIKA TUMORA DOJKE 10

1.7. LIJEČENJE KARCINOMA DOJKE 12

1.8. TUMOR INFILTRIRAJUĆI LIMFOCITI 14

1.9. ANTIGENI ZA RAK TESTISA 17

1.9.1. NY-ESO-1 19

1.9.2. MAGE A 20

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE 21

2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 22

2.2. HIPOTEZE 23

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA 24

3.1. ISPITANICE 25

3.2. METODE 25

3.2.1. HISTOLOŠKA ANALIZA 26

3.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKE ANALIZE 30

3.3. STATISTIČKE ANALIZE 33

4. REZULTATI.....34

4.1. OBILJEŽJA ISPITANICA.....35

4.2. TUMORSKI MIKROOKOLIŠ.....38

4.3. ANTIGENI ZA RAK TESTISA.....43

4.4. ANALIZA PREŽIVLJENJA ZA INTERVAL BEZ ZNAKOVA POVRATA BOLESTI (DFS).....51

5. RASPRAVA.....54

6. ZAKLJUČCI.....62

7. SAŽETAK.....65

8. SUMMARY.....69

9. LITERATURA.....73

10. ŽIVOTOPIS.....86

POPIS SKRAĆENICA

ECIS - engl. European Cancer Information System

BRCA - gen karcinoma dojke (engl. breast cancer gene)

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

NST - engl. no special type

HER 2 - receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (engl. human epidermal growth factor receptor 2)

ER - estrogenski receptor (engl. estrogen receptor)

PR - progesteronski receptor (engl. progesteron receptor)

TNBC – trostruko negativni karcinomi dojke (engl. triple negative breast cancer)

BLm – bazalna morfologija (engl. basal-like morphology)

BI-RADS - engl. Breast Imaging-Reporting and Data System

TIL - tumor infiltrirajući limfociti (engl. tumor infiltrating lymphocytes)

sTIL – stromalni TIL

itTIL – intratumoralni TIL

Th - T pomagački (engl. T-helper)

Tfh - T folikularni pomagački (engl. T-follicular-helper)

DFS - preživljenje bez znakova bolesti (engl. disease free survival)

LN – limfatične nakupine (engl. lymphoid aggregates, LA)

LP – engl. lymphocyte predominant breast cancer

CTA – antigeni za rak testisa (engl. cancer testis antigens)

NY-ESO-1- engl. New York esophageal squamous cell carcinoma-1

MAGE A- engl. melanoma antigen gene A

SŽS – središnji živčani sustav

PD-L1- ligand programirane stanične smrti 1 (engl. programmed death-ligand 1)

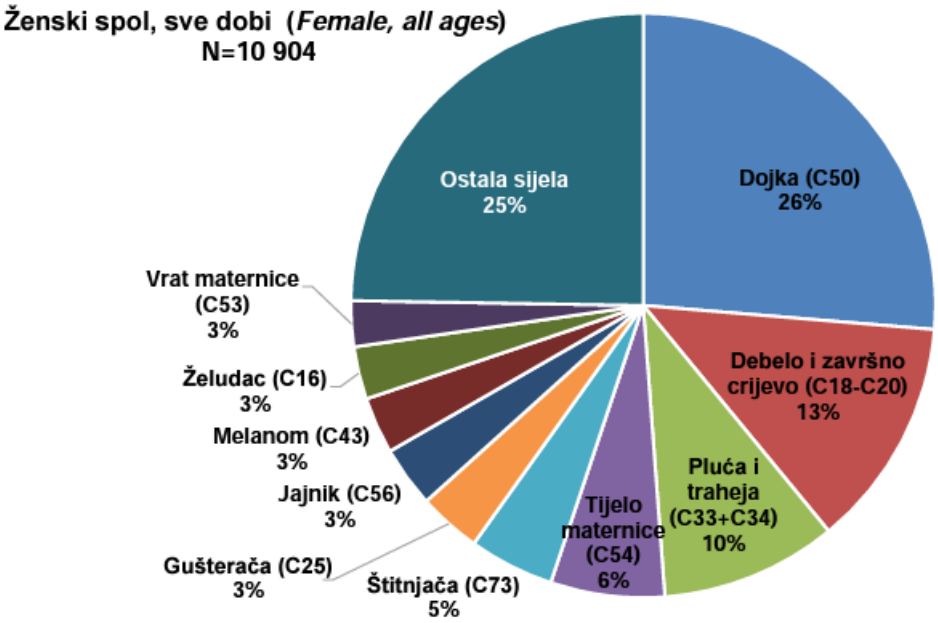
ICS – engl. immune cell score

1. UVOD

1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE

Karcinom dojke najčešća je zloćudna bolest u žena i veliki javnozdravstveni problem diljem svijeta. Posljednjih deset godina broj novootkrivenih karcinoma dojke je u porastu kao i broj smrti povezanih s karcinomom dojke (1). Analiza u sklopu istraživanja „Global burden of disease“ za 2019. godinu je utvrdila 2 000 000 novootkrivenih karcinoma dojke, te 701 000 smrti uzrokovanih karcinomom dojke (1). U 157 zemalja karcinom dojke bio je najčešća zloćudna bolest u žena, a u 119 zemalja bio je vodeći uzrok smrti među zloćudnim bolestima (1).

Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo karcinom dojke je u 2020. godini bio najčešća zloćudna bolest u žena. Od svih dijagnosticiranih zloćudnih bolesti u žena, karcinomi dojke su predstavljali 26%, s incidencijom 137.9/100 000 (2) (Slika 1). Prema podacima ECIS-a (European Cancer Information System) u Hrvatskoj je u 2020. godini očekivano da će 25.2% novodijagnosticiranih karcinoma u žena biti karcinomi dojke, s incidencijom 120.3/100 000 žena. Po broju smrti povezanih s karcinomom u žena, karcinom dojke se prema procjenama ECIS-a trebao nalaziti na trećem mjestu u Hrvatskoj, iza karcinoma kolorektuma i karcinoma pluća sa stopom smrtnosti od 32.8/100 000 žena, ali se prema podacima Registra za rak nalazio na drugom mjestu iza karcinoma pluća. Projekcije za idućih 20 godina predviđaju pad incidencije karcinoma dojke u Hrvatskoj (-4.8%), ali se na razini Europske unije predviđa daljnji porast od gotovo 10% (3).



Slika 1. Incidencija karcinoma u žena za 2020. godinu izražena u postotcima (preuzeto iz Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo)

Brzim napretkom dijagnostike i liječenja prognoza bolesnica s karcinomom dojke postaje sve bolja. U Hrvatskoj je 2006. godine uveden Nacionalni program probira i ranog otkrivanja raka dojke te se od tada bilježi porast incidencije uz postepeni pad stope smrtnosti u razdoblju između 2000. i 2017. godine, unatoč suboptimalnom odazivu žena (4).

Etiologija karcinoma dojke je multifaktorijalna. Većina studija ukazuje da su starija životna dob, izloženost egzogenim hormonima, prehrana, čimbenici vezani za reprodukciju (rana menarha, nuliparitet, starija dob pri prvom porodu) te genetika glavni čimbenici rizika. Većina karcinoma dojke nastaje sporadično, a dio se može direktno povezati s nasljednim promjenama u određenom genu. Dva gena čije mutacije izrazito povećavaju rizik za obolijevanje od karcinoma dojke su BRCA 1 i BRCA 2 s autosomno dominantnim nasljeđivanjem. Poznati su i brojni drugi geni koji nose visoki

(TP53, PTEN, STK11, CDH1) i umjereni rizik (PALB2, ATM, CHEK2) za nastanak karcinoma dojke, te se danas karcinom dojke smatra poligenetskom bolešću (5).

1.2. HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE

Invazivni karcinom dojke se prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) klasificira u različite histološke podtipove (5):

- Invazivni karcinom bez posebne oznake (NST)
- Invazivni lobularni karcinom
- Tubularni karcinom
- Kribriformni karcinom
- Mucinozni adenokarcinom
- Mucinozni cistadenokarcinom
- Invazivni mikropapilarni karcinom
- Apokrini adenokarcinom
- Metaplastični karcinom
- Ostali rijetki podtipovi

1.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE

Smjernice za imunohistokemijsku klasifikaciju karcinoma dojke temelje se na rezultatima dobivenim transkripcijskim profiliranjem, a prihvaćene su na 12. Internacionalnom sastanku održanom 2011. godine u St. Gallenu (6).

Karcinomi dojke se dijele u pet skupina na temelju izražaja sljedećih imunohistokemijskih biljega: estrogenski receptori, progesteronski receptori, HER2 receptori te Ki-67 proliferacijski biljeg (Tablica 1).

Tablica 1. Imunohistokemijska klasifikacija tumora dojke

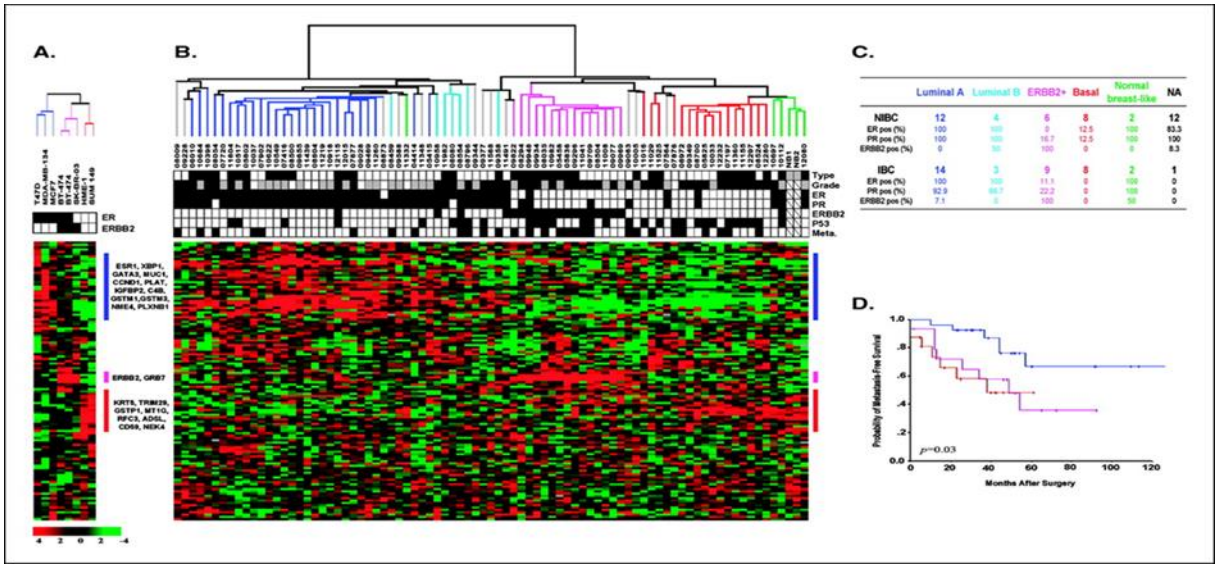
Podtip karcinoma dojke	Imunohistokemijski profil
Luminalni A	ER: + PR: ≥20% HER2: - Ki-67<20%
Luminalni B (HER2-negativni)	ER: + HER2: - Ki-67 ≥20% i/ili PR: <20%
Luminalni B (HER2-pozitivni)	ER: + HER2: +
HER2-pozitivni	ER: - PR: - HER2: +
Trostruko negativni	ER: - PR: - HER2: -

Zbog široke dostupnosti i visoke pouzdanosti imunohistokemijska klasifikacija osnova je za dijagnostiku i liječenje karcinoma dojke u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Na osnovu izražaja progesteronskih i HER2 receptora te proliferacijskog biljega Ki-67 luminalni tumori mogu se razdvojiti u dvije prognostički različite skupine, pri čemu je od ključne važnosti bilo određivanje granične vrijednosti (engl. „cut-off“) za Ki-67 koja se tijekom godina mijenjala, a trenutno se kao vrijednost

razgraničenja koristi 20% (7,8). Nedavno je opisana skupina „estrogen-low“ karcinoma dojke (s izražajem ER prisutnim u 1-10% tumorskih stanica), čije je biološko ponašanje vrlo slično trostruko negativnim karcinomima te će se u novoj klasifikaciji vjerojatno preporučiti izdvajanje ovih tumora u zasebnu skupinu (9).

1.4. MOLEKULARNA KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE I „BASAL-LIKE“ KARCINOMI

Histološki slični tumori mogu imati vrlo različito kliničko ponašanje i odgovor na primijenjenu terapiju. Perou i suradnici (10) su 2000. godine objavili istraživanje u kojem su na osnovu rezultata transkripcijskog profiliranja karcinome dojke podijelili u 5 skupina: luminalni A, luminalni B, HER2 obogaćeni, bazalni podtip i podtip „nalik normalnoj dojci“ (Slika 2).



Slika 2. Prema rezultatima transkripcijskog profiliranja u istraživanju Peroua i sur. karcinomi dojke se dijele u pet podskupina (Preuzeto iz: Carolina Center for Genome Sciences, Breast Cancer Genetics)

Lehman i suradnici su 2011. godine dodatno istraživali TNBC te su na temelju transkripcijskog profiliranja predložili podjelu na šest podtipova: luminalni s izražajem androgenih receptora (LAR), bazalnom nalik tip 1 (BL1), bazalnom nalik tip 2 (BL2), mezenhimalni (M), mezenhimalni nalik matičnim stanicama (MSL) te imunomodulatorni (IM) (11). Pet godina kasnije, isti autori predložili su izmjenu postojeće klasifikacije, ovaj put isključivši MSL i IM podtipove (12). Nadogradnjom Lehmannova rada, Jiang i suradnici 2019. godine klasificiraju TNBC u četiri podtipa, od kojih svaki ima jedinstveni genski profil, prognozu i odgovor na terapiju: bazalnom nalik i imunosuprimirani (BLIS), LAR, IM i mezenhimalnom nalik (MES) (13).

U osnovnoj molekularnoj podjeli karcinoma dojke, većina (oko 85%) TNBC-a pripada bazalnom intrinzičnom podtipu (14). Značenje složenice „basal-like“ (BL) u literaturi je višeznačno, jer osim molekularne implikacije, ima i imunohistokemijsko i morfološko značenje. Dok je određivanje intrinzičnog podtipa moguće jedino genetskim profiliranjem, određivanje BL imunofenotipa i BL morfoloških karakteristika je dostupnije i jeftinije. Dok BL imunofenotip ima zadovoljavajuću podudarnost s rezultatima transkripcijskog profiliranja (osjetljivost 78-86%, specifičnost do 100%) (15), BL morfologija (BLm) se pokazala vrlo nepouzdanom (15,16), vjerojatno zbog postojanja više različitih histoloških karakteristika koje upućuju na BL morfologiju: visoki gradus, visoki mitotski indeks, sincicijalni način rasta, naglašen stanični pleomorfizam, gurajući invazivni rub, bogati limfocitni infitrat unutar i oko tumora, nekroza, fibroza i nalaz metaplastične sastavnice (15,17-22).

1.5. TNM KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE

Za određivanje kliničkog stadija karcinoma dojke najčešće se koristi TNM klasifikacija, koja obuhvaća podatke o veličini i proširenosti tumora (T), statusu regionalnih limfnih čvorova (N) i udaljenim metastazama (M) (23).

- **T: primarni tumor**
  - Tx: primarni tumor se ne može odrediti
  - T0: primarni tumor se ne može dokazati
  - Tis: karcinom in situ
    - Tis (DCIS): dukatalni karcinom in situ
    - Tis (LCIS): lobularni karcinom in situ
    - Tis (Paget): Pagetova bolest bradavice nepovezana s invazivnim i/ili in situ karcinomom u podležećem parenhimu
  - T1: tumor promjera ≤2 cm
    - T1mi: mikroinvazija ≤0.1 cm
    - T1a: promjer >0.1 cm, ali ≤0.5 cm
    - T1b: promjer >0.5 cm, ali ≤1 cm
    - T1c: promjer >1 cm, ali ≤2 cm
  - T2: tumor promjera >2 cm, ali ≤5 cm
  - T3: tumor promjera >5 cm
  - T4: tumor bilo koje veličine s izravnim širenjem na torakalnu stjenku i/ili na kožu (ulceracija ili nodul)
    - T4a: zahvaćanje torakalne stjenke (ne uključujući samo invaziju pektoralnog mišića)

- T4b: edem kože (uključujući izgled kože poput narančine kore) ili ulceracija na koži dojke ili satelitski kožni čvorovi ograničeni na istu dojku
- T4c: oboje (T4a i T4b)
- T4d: inflamatorni karcinom

- **N: regionalni (ipsilateralni) limfni čvorovi**
  - Nx: postojanje metastaza u limfnim čvorovima nije moguće odrediti
  - N0: bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
  - N1: metastaza u nefiskiranim aksilarnim limfnim čvorovima
  - N2: metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima koji su međusobno ili u odnosu na okolinu fiksirani; ili metastaza u unutarnje mamarne limfne čvorove uz odsutne metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima
    - N2a: metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima koji su međusobno ili u odnosu na okolinu fiksirani
    - N2b: metastaza u unutarnje mamarne limfne čvorove uz odsutne metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima
  - N3: metastaza u infraklavikularnim i supraklavikularnim limfnim čvorovima s/bez metastaze u aksilarne limfne čvorove; metastaza u unutarnje mamarne limfne čvorove uz metastaze u aksilarne limfne čvorove
    - N3a: metastaza u infraklavikularne limfne čvorove
    - N3b: metastaza u unutarnje mamarne limfne čvorove uz metastaze u aksilarne limfne čvorove
    - N3c: metastaza u supraklavikularne limfne čvorove
- **M: udaljene metastaze**
  - M0: bez udaljenih metastaza
  - M1: prisutne udaljene metastaze

Klinički stadij bolesti

- Stadij 0: Tis, N0, M0
- Stadij IA: T1,N0,M0
- Stadij IB: T0-1, N1mi, M0
- Stadij IIA: T0-1,N1,M0 ili T2,N0,M0
- Stadij IIB: T2,N1,M0 ili T3,N0,M0
- Stadij IIIA: T0-2,N2,M0 ili T3,N1-2,M0
- Stadij IIIB: T4, bilo koji N,M0
- Stadij IIIC: bilo koji T,N3,M0
- Stadij IV: bilo koji T, bilo koji N,M1

1.6. DIJAGNOSTIKA TUMORA DOJKE

U populacijama bez mamografskog probira karcinom dojke se najčešće prezentira kao palpabilna masa, iako se u uznapredovalim slučajevima može naći i zadebljanje i uvlačenje kože i bradavice, promjene u veličini i obliku dojke te promjene teksture i boje, a rijeđe mogu nastati i ulceracije kože.

Standardne metode slikovne dijagnostike su mamografija, ultrazvuk te magnetska rezonancija, a postoje i druge metode koje trenutno nisu u širokoj upotrebi ili se tek ispituju kao što su mikrovalna tomografija te senzori radiofrekvencije.

Mamografija je široko dostupna dijagnostička metoda, te se preporuča kao metoda izbora za probir karcinoma dojke u žena starijih od 40 godina. U mlađih žena, zbog gustoće dojki mamografija nije pouzdana, uz veliki broj lažno pozitivnih i lažno negativnih nalaza. Osim toga, mamografija nije dovoljno osjetljiva u slučajevima malih

tumora (24). U svrhu standardizacije mamografskih nalaza u upotrebi je BI-RADS (Breast Imaging-Reporting and Data System) kategorizacija, prema kojoj se na temelju izgleda tumora, postojanja kalcifikata te poremećaja arhitektonike tumoru dodjeljuje jedna od 7 kategorija (0-6) koje predstavljaju vjerojatnost zloćudnosti (25).

Kod žena mlađih od 40 godina metoda izbora pri probiru je ultrazvuk dojki. Ultrazvuk u usporedbi s mamografijom ima izvrsnu osjetljivost uz manju specifičnost. Ultrazvuk u kombinaciji s mamografijom preporučuje se u svih žena koje imaju povišen rizik za razvoj karcinoma dojke. Osjetljivost kombinacije ovih metoda je usporediva s osjetljivošću magnetske rezonancije. Ultrazvuk je široko dostupna, bezbolna i jeftina metoda te omogućuje istovremenu analizu regionalnih limfnih čvorova (5,24).

Najosjetljivija dijagnostička metoda je magnetska rezonancija. Primjenjuje se za probir kod žena s visokim rizikom za razvoj karcinoma dojke (nositeljice BRCA mutacije), te za određivanje proširenosti bolesti nakon postavljanja dijagnoze invazivnog lobularnog karcinoma. Magnetska rezonancija se ne koristi u općoj populaciji zbog visoke stope lažno pozitivnih nalaza, visoke cijene, dugog trajanja pretrage te manjka educiranog liječničkog kadra i uređaja (5,24).

1.7. LIJEČENJE KARCINOMA DOJKE

Plan liječenja donosi se na multidisciplinarnom timu i temelji se na obilježjima bolesti, prediktivnim i prognostičkim čimbenicima te obilježjima i željama bolesnica.

U liječenju ranog nemetastatskog karcinoma dojke cilj je kirurškim zahvatom ukloniti tumor; a odabir zahvata (tumorektomija, kvadrantektomija ili mastektomija s ili bez rekonstrukcije) ovisi o veličini i proširenosti tumora te o željama bolesnice. Prije operativnog zahvata potrebno je napraviti procjenu statusa limfnih čvorova (26,27).

Kod klinički negativnih limfnih čvorova preporučuje se učiniti biopsiju limfnog čvora stražara (engl. sentinel lymph node). Potreba za dodatnom disekcijom pazuha nakon provedene biopsije limfnog čvora stražara donosi se na multidisciplinarnom timu i temelji se na broju pregledanih i udjelu pozitivnih limfnih čvorova i volumena njihove zahvaćenosti tumorom (26,27).

U slučaju klinički pozitivnih pazušnih limfnih čvorova često se inicijalno počinje neoadjuvantnom terapijom. Klinički negativne, a radiološki pozitivne limfne čvorove treba bioptirati i u slučaju pozitivnog nalaza obilježiti markerom prije početka neoadjuvantnog liječenja. U slučaju nalaza metastaza u klinički negativnim limfnim čvorovima nakon neoadjuvantnog liječenja, potrebno je učiniti disekciju pazuha (26,27).

Adjuvantna radioterapija značajno smanjuje rizik lokalnog povrata bolesti i smrtnost od raka dojke. Radioterapija je indicirana: nakon svih poštednih kirurških zahvata, nakon mastektomije u T3 i T4 tumorima, kada se tumor nalazi na resekcijskom rubu ili je od njega udaljen <1 mm, te kod ekstenzivne limfovaskularne invazije.

Adjuvantna radioterapija torakalne stijenke i regionalne limfne drenaže indicirana je i kada se nađu metastaze u regionalnim limfnim čvorovima (26,27).

Sustavno liječenje uključuje primjenu kemoterapije, endokrine terapije, imunoterapije te suportivno-simptomatske terapije. Odluka o vrsti sustavnog liječenja temelji se na stadiju i biologiji bolesti (imunofenotip tumora, gradus, Ki67 proliferacijski indeks, prisutnost/odsutnost limfovaskularne i perineuralne invazije) te na obilježjima bolesnice (dob, opće stanje, komorbiditeti, želje bolesnice) (26,27).

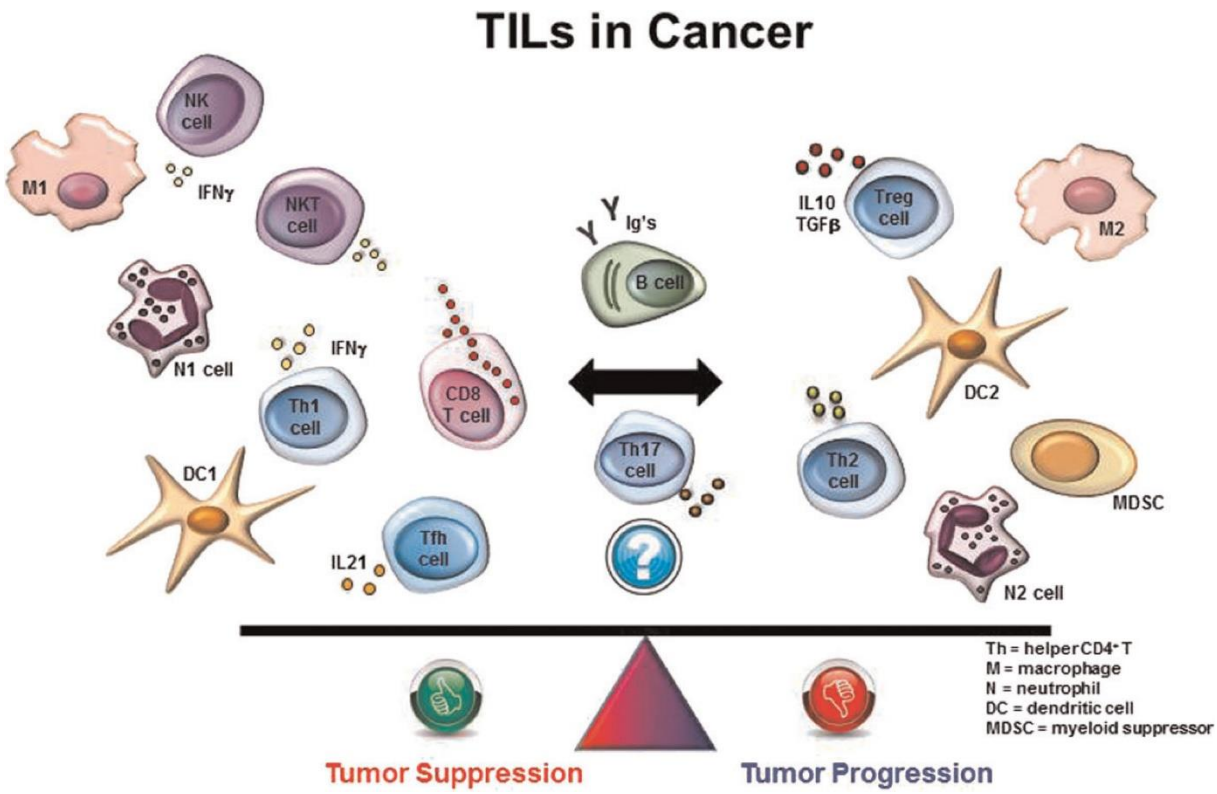
Adjuvantna endokrina terapija koristi se u liječenju svih tumora koji imaju izražene estrogenske receptore. Bolesnice s HER2 pozitivnim rakom dojke liječe se anti-HER2 lijekovima adjuvantno i/ili neoadjuvantno u kombinaciji s kemoterapijom. Adjuvantna kemoterapija indicirana je u bolesnica s HER2 pozitivnim karcinomima, trostruko negativnim karcinomima i luminalnim karcinomima visokog rizika (26,27).

Neoadjuvantna kemoterapija indicirana je u liječenju lokalno uznapredovalog i inflamatornog raka dojke, te u trostruko negativnim i HER2 pozitivnim tumorima koji su ≥ 2 cm, kod luminalnog visokorizičnog raka dojke, kao i u tumorima s inicijalno pozitivnim limfnim čvorovima pazuha, uz prethodnu raspravu na multidisciplinarnom timu. Neoadjuvantna endokrina terapija može se primijeniti u postmenopauzalnih bolesnica visoke dobi, s komorbiditetima te u situacijama kada ne očekujemo korist od kemoterapije, a ne postoji mogućnost operativnog zahvata (26,27).

1.8. TUMOR INFILTRIRAJUĆI LIMFOCITI

Tumor infiltrirajući limfociti (TIL) su važan dio staničnog antitumorskog imunološkog odgovora. Dokazana je njihova prognostička važnost u različitim zloćudnim bolestima poput melanoma i karcinoma probavnog sustava (28-30).

U dosadašnjim istraživanjima tumorskog mikrookoliša dokazano je da stečeni imunitet posredovan T i B limfocitima ima kritičnu ulogu u učinkovitom antitumorskom odgovoru (Slika 3). Dok se infiltracija citotoksičnim CD8+ T limfocitima povezuje isključivo s pozitivnom prognozom i dobrim odgovorom na terapiju (31,32), za prisutnost CD4+ T pomagačkih (engl. T helper, Th) stanica prognostičko značenje nije do kraja razjašnjeno (33-35). Novija istraživanja imunih stanica u tumorskom mikrookolišu u kojima su CD4+ T stanice podijeljene u podskupine pokazala su da prisutnost Th1 stanica ima pozitivan prognostički značaj (36), dok su Th2 stanice bile povezane s blokiranjem imunološkog odgovora i lošijom prognozom (37). Th17 stanice, koje luče proupalni interleukin 17 (IL-17), imaju različite učinke ovisno o drugim komponentama tumorskog mikrookoliša, te je značenje njihove prisutnosti različito ovisno o primarnom sijelu tumora (38). Prisutnost T folikularnih pomagačkih stanica (Tfh), opisanih relativno nedavno, povezana je s boljim odgovorom na terapiju, neovisno radi li se o adjuvantnoj ili neoadjuvantnoj primjeni (36). Uloga B limfocita u antitumorskom odgovoru ostaje nerazjašnjena, a dosadašnja istraživanja imaju proturječne rezultate (39).



Slika 3. Utjecaj različitih vrsta imunih stanica u tumorskom mikrookolišu (preuzeto iz *Salgado R i sur. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014*)

Tumor infiltrirajuće limfocite (TIL) ovisno o smještaju unutar karcinoma dojke dijelimo na stromalne (sTIL) i intratumoralne (itTIL). Prema preporuci Međunarodne radne skupine za očitavanje TILa u karcinomima dojke u svakodnevnoj kliničkoj praksi preporuča se očitavanje postotka intratumorske strome infiltrirane imunim stanicama (sTIL) u TNBC. S druge strane, itTIL nisu našli svoju primjenu u rutinskom radu, unatoč studijama koje ukazuju na njihovu moguću prognostičku vrijednost (40,41). Kao razlog tome navodi se zahtjevnije očitavanje u odnosu na sTIL, te činjenica da povećan broj itTIL u većini istraživanja prati povećani broj sTIL na osnovu čega se smatra da očitavanje itTIL kao zasebnog parametra nema dodatnu kliničku vrijednost (42). Međutim, dokazano je da su u ranim ER negativnim

karcinomima dojke itTIL povezani s duljim preživljenjem bez znakova bolesti (engl. disease free survival, DFS) (40), te da je infiltracija CD8+ T limfocitima unutar tumora povezana s manjom smrtnošću uzrokovanom karcinomom (41).

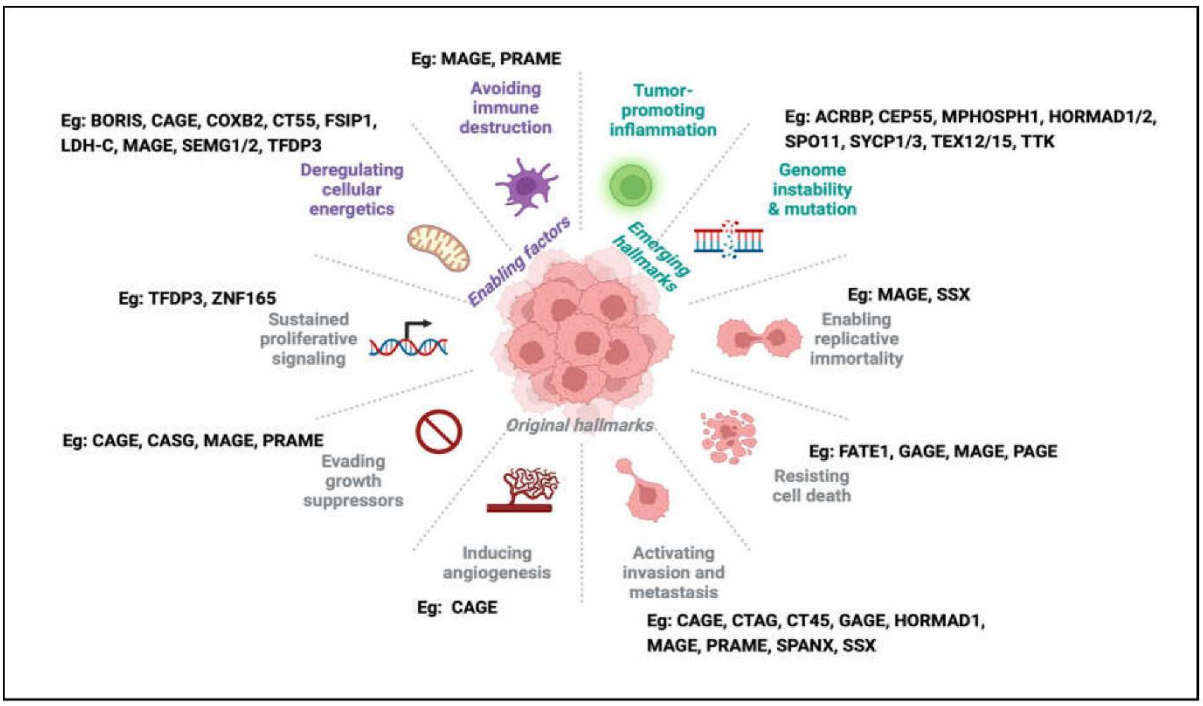
Veći broj tumor infiltrirajućih limfocita se u ranim TNBC pokazao kao važan prognostički pokazatelj pri primjeni adjuvantne kemoterapije (43). Prognostički učinak je linearan i logaritmičan: povećan broj tumor infiltrirajućih limfocita za svakih 10% smanjuje rizik povrata bolesti, rizik pojave metastaza te rizik smrtnog ishoda za 13%, 17% i 16%, nakon što se podaci prilagode drugim prognostički značajnim kliničko-patološkim pokazateljima (43).

Veliki dio istraživanja koja su proučavala TIL u karcinomima dojke rađena su metodom tkivnih mikropostroja (engl. tissue microarray) koja ne prikazuje potpunu heterogenost tumora (31,41,44). Iako je povećan broj TIL-a povezan s dužim DFS i boljim odgovorom na terapiju (45-49), za sada nema dovoljno podataka o kliničkom značaju lokalizacije TIL-a u tumorskom mikrookolišu te prisustvu primarnih i sekundarnih limfatičnih nakupina (LN) u okolini tumora.

U istraživanjima se kao posebna podskupina karcinoma dojke izdvaja „lymphocyte predominant breast cancer“ (LP), karakteriziran visokim brojem TIL-a u stromalnom odjeljku, koji se prema različitim publikacijama kreće između 50% i 60% (42,45,50). Ova skupina karcinoma dojke prema dosadašnjim istraživanjima povezana je s boljim ishodom (51-54).

1.9. ANTIGENI ZA RAK TESTISA

Antigeni za rak testisa (engl. cancer testis antigens, CTA) su proteini kodirani grupom gena koji su fiziološki izraženi u ljudskim spolnim stanicama, a aberantno ih nalazimo u stanicama raznih zloćudnih tumora. Tumorske stanice se od stanica zdravog tkiva razlikuju po tome što imaju brojne mehanizme koji im omogućuju besmrtnost, neregulirani rast i metastaziranje, a gotovo svaki od tih mehanizama se prema dosadašnjim istraživanjima može povezati s povećanim izražajem nekog od CTA (55) (Slika 4). Izražaj CTA je varijabilan te ga češće nalazimo u melanomima, karcinomima mokraćnog mjehura, pluća, jajnika i jetre; a rjeđe u karcinomima bubrega, kolona, želuca i hematološkim bolestima (56). U prethodnim istraživanjima zabilježena je i visoka razina ekspresije CTA u TNBC, uz različite rezultate vezane uz njihov prognostički utjecaj (57-62).



Slika 4. Izražaj CTA povezan je s različitim mehanizmima koji tumorskim stanicama omogućuje besmrtnost, neregulirani rast i metastaziranje (preuzeto iz *Nin DS, Deng LW. Biology of Cancer-Testis Antigens and Their Therapeutic Implications in Cancer. Cells. 2023;12(6):926.*)

Provode se brojna istraživanja o ulozi CTA kao potencijalnih meta za liječenje različitih vrsta karcinoma (63). Povećan izražaj CTA u TNBC predstavlja mogućnost za razvoj ciljane imunoterapije, te su potrebna dodatna istraživanja da bi se do kraja razjasnili mehanizmi djelovanja CTA u karcinomima dojke te njihova interakcija s imunološkim sustavom (64).

1.9.1. NY-ESO-1

„New York esophageal squamous cell carcinoma-1“ (NY-ESO-1), ili „cancer testis antigen 1B“ (CTAG1B) jedan je od najistraživanijih CTA. Izrazito je imunogeničan te dovodi do razvoja specifične B i T stanične imunosti. Njegova biološka funkcija nije do kraja razjašnjena, ali se zna da ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, apoptozi i staničnom rastu (65).

Izražaj NY-ESO-1 opisan je u velikom broju tumora, a najčešće u liposarkomima, neuroblastomima i sinovijalnim sarkomima (65). Njegov izražaj povezan je s brojnim negativnim prognostičkim značajkama, kao što su viši histološki gradus, prisutnost metastaza u limfnim čvorovima te uznapredovali klinički stadij (66). Unatoč tome, njegova prisutnost nije u svim sijelima povezana s lošijim kliničkim ishodom, pa tako i kod karcinoma dojke gdje njegov pozitivan izražaj nije jasno povezan s lošijom prognozom (65).

Zbog svoje izrazite imunogeničnosti i ograničenosti izražaja samo na tumorsko tkivo, NY-ESO-1 se smatra idealnim kandidatom za razvoj ciljane imunoterapije, a do sada provedena istraživanja faze I i II donijela su ohrabrujuće rezultate. U tijeku su studije koje ispituju protutumorska cjepiva, genetski modificirane T limfocite te terapiju u kombinaciji s inhibitorima kontrolnih točki (65).

1.9.2. MAGE A

"Melanoma antigen gene A" (MAGE A) antigeni su prva skupina antigena povezanih s tumorima koji su identificirani na molekularnoj razini. Biološka funkcija im još nije razjašnjena, ali kao moguće uloge spominju se disregulacija p53 proteina, pojačavanje proliferacijskog potencijala tumora te održavanje tumorskih stanica u stadiju „nalik matičnim" tumorskim stanicama. Iako nije još sa sigurnošću dokazano, postoje dokazi da je izražaj MAGE A antigena u tumorima povezan s epitelno-mezenhinalnom tranzicijom (67).

Kao i NY-ESO-1, i MAGE A antigeni se nalaze u velikom broju malignih tumora, pa tako i u karcinomu dojke. Dosadašnja istraživanja povezuju MAGE A izražaj s lošijom prognozom i slabijim odgovorom na kemoterapiju (68), za što se glavnim krivcem smatra ranije spomenuta disregulacija p53 proteina. Izražaj MAGE A antigena u tumorima povezan je i s povećanim rizikom za pojavu udaljenih metastaza (68).

MAGE A obitelj antigena također se smatra kandidatima za razvoj antitumorske terapije u budućnosti. Kao potencijalne terapijske mogućnosti istražuju se ciljana monoklonska protutijela, genetski modificirani T limfociti te protutumorska cjepiva (68). Unatoč pozitivnim rezultatima zabilježenima u ranim studijama, ono što nije bilo očekivano i što je donekle smanjilo entuzijazam oko ciljane terapije vezane uz MAGE A antigene je pojava toksičnosti za središnji živčani sustav (SŽS) i mišiće (68). Kao moguće objašnjenje navodi se izražaj MAGE A12 u SŽS-u te nedovoljna specifičnost genetski modificiranih T limfocita. Ipak, brojna klinička ispitivanja su i dalje u tijeku, te se njihovi definitivni zaključci tek očekuju.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi istraživanja

- Utvrditi povezanost povećanog broja stromalnih limfocita (sTIL), intratumoralnih limfocita (itTIL), limfatičnih nakupina i izražaja CTA u trostruko negativnim karcinomima dojke s dužinom preživljenja bez znakova povrata bolesti (DFS).

- Istražiti povezanost izražaja CTA s količinom TIL, formiranjem limfatičnih nakupina i „basal-like“ morfološkim karakteristikama u trostruko negativnim karcinomima dojke.

Sporedni ciljevi istraživanja

- Utvrditi povezanost povećanog broja stromalnih limfocita (sTIL), intratumoralnih limfocita (itTIL), limfatičnih nakupina, te izražaja CTA i PD-L1 ICS s kliničko-patološkim prognostičkim pokazateljima: dob, klinički stadij, veličina tumora, histološki gradus, histološki podtip, „basal like“ morfologija i proliferacijska aktivnost mjerena primjenom Ki-67 protutijela.

2.2. HIPOTEZE

- Bolesnice s trostruko negativnim karcinomima dojke kod kojih se nađe povećan broj stromalnih limfocita (sTIL), intratumoralnih limfocita (itTIL) i limfatične nakupine imat će duže vrijeme do povrata bolesti.

- Izražaj CTA-a u trostruko negativnim karcinomima dojke povezan je s povećanom infiltracijom TIL-a, „basal-like“ morfološkim karakteristikama te dužim vremenom do povrata bolesti.

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split, uz suradnju KBC-a Osijek, KBC-a Zagreb i Klinike za tumore KBC-a Sestre milosrdnice.

3.1. ISPITANICE

Uvidom u onkološku medicinsku dokumentaciju izdvojeno je 98 bolesnica koje su u razdoblju od 1. siječnja 2017. do 31. prosinca 2018. godine s dijagnozom ranog TNBC-a operirane u KBC-u Split, KBC-u Osijek, KBC-u Zagreb i KBC-u Sestre milosrdnice, a kod kojih nije provedeno neoadjuvantno liječenje. Kriteriji za uključenje u studiju bili su: dijagnoza TNBC-a, nepostojanje udaljenih metastaza u trenutku operacije (neovisno o statusu regionalnih limfnih čvorova), redovite onkološke kontrole, dostupnost potpunih kliničkih podataka i dostupnost parafinskih tkivnih blokova. Jedna bolesnica je naknadno isključena iz istraživanja zbog nepotpunih kliničkih podataka.

3.2. METODE

Uvidom u onkološku medicinsku dokumentaciju dobili smo kliničke podatke o dobi bolesnica, veličini tumora, kliničkom stadiju bolesti, primijenjenom kirurškom i onkološkom liječenju, te dužini perioda bez znakova povrata bolesti (DFS) (zaključno s 1. siječnja 2021. godine).

3.2.1. HISTOLOŠKA ANALIZA

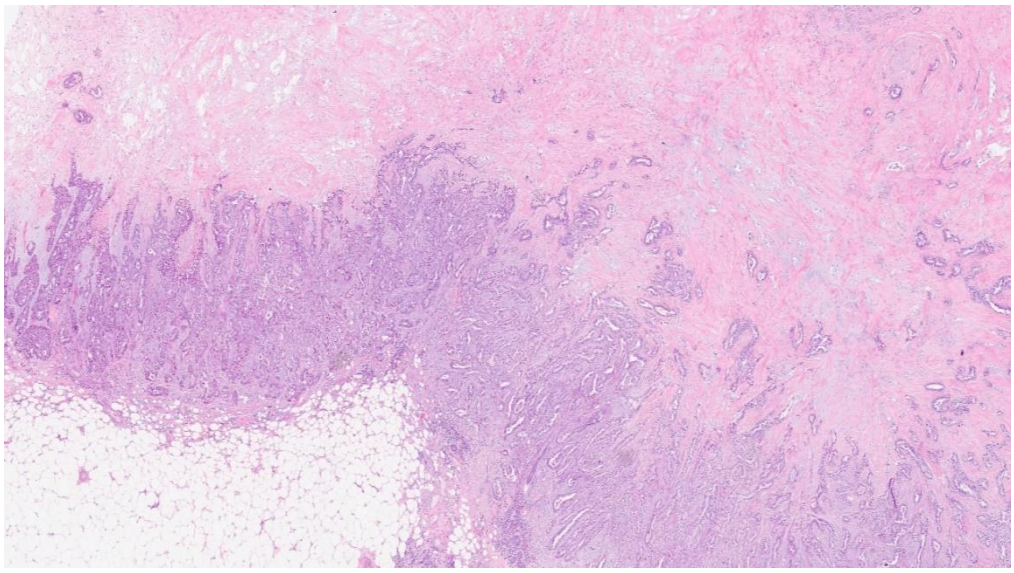
Ponovnom analizom arhiviranih hemalaun-eozinom obojenih patohistoloških stakala određene su morfološke karakteristike tumora i tumorskog mikrookoliša, uključujući histološki tip i gradus tumora, prisutnost bazalne morfologije, količinu TIL-a i prisutnost limfatičnih nakupina (LN).

Histološki tip karcinoma dojke određen je prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije, a histološki gradus prema Elston i Ellis-ovoj shemi za sve histološke tipove raka dojke (5).

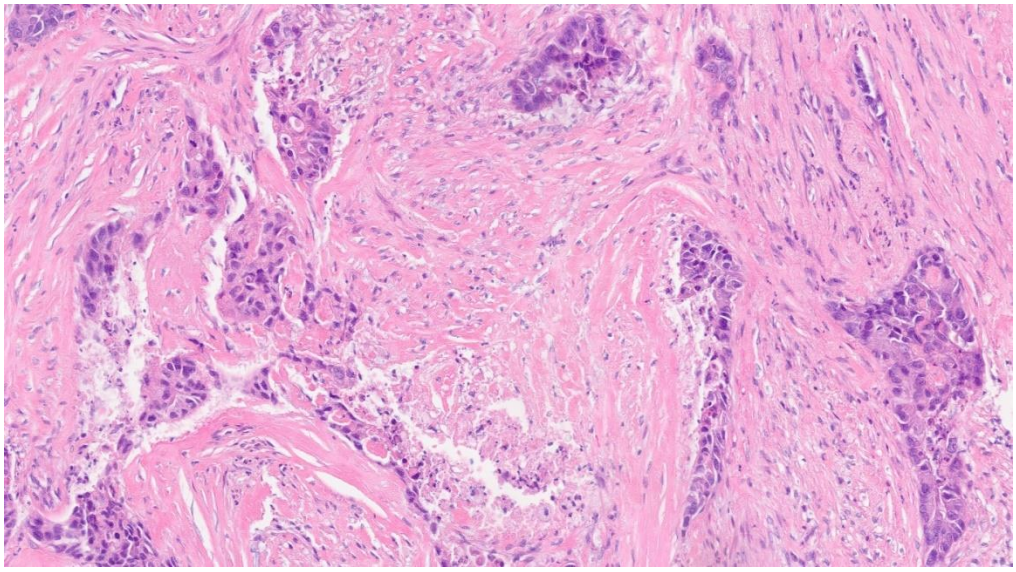
Bazalna morfologija procijenjena je na osnovu prisutnosti karakterističnih morfoloških obilježja kao što su: sincicijalan način rasta, nekroza i fibroza u centralnom dijelu, gurajući rubovi, prisutnost limfocitnog upalnog infiltrata na periferiji, te prisutnost metaplastičnih elemenata (15,17-22) (Slika 5).

Tumor infiltrirajući limfociti očitavani su prema preporukama Međunarodne radne skupine za TIL (engl. International TIL Working Group) (42). Nakupljanje stromalnih limfocita (sTIL ukupno) očitavano je kao postotak (%) strome infiltrirane imunim stanicama unutar tumora i na infiltrativnom rubu, te je naknadno zasebno evaluiran periferni dio strome na infiltrativnom rubu tumora (sTIL periferija) i centralni dio strome, unutar tumora (sTIL centar). Limfociti koji su se nalazili u izravnom dodiru s tumorskim stanicama očitavani su kao intratumoralni limfociti (itTIL) (Slike 6-8).

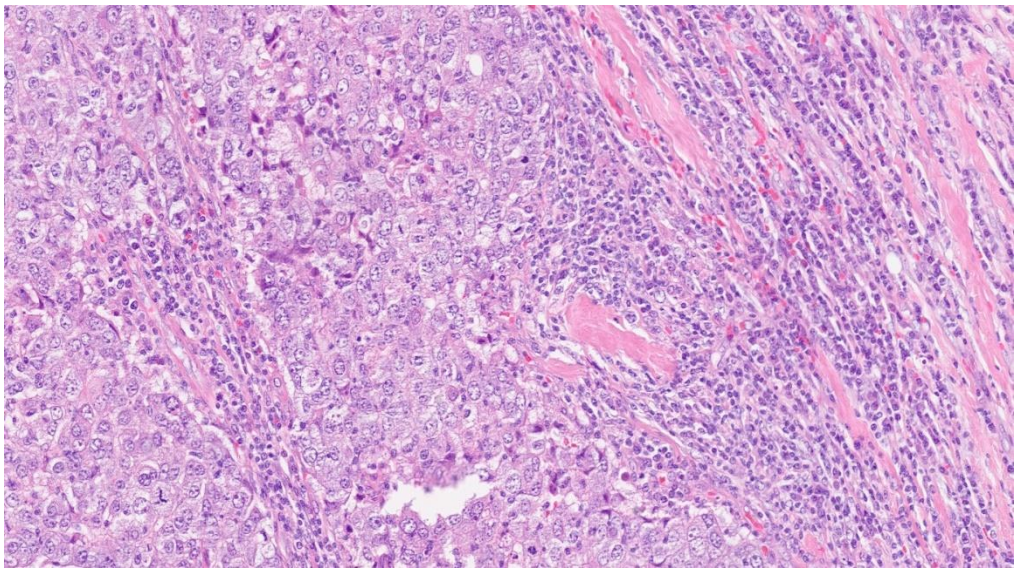
Također, bilježeno je i postojanje limfatičnih nakupina unutar tumora, te na udaljenosti manjoj od 5 mm od invazivnog ruba tumora, uz dodatnu podjelu na primarne i sekundarne ovisno o postojanju germinativnog centra (Slike 9 i 10).



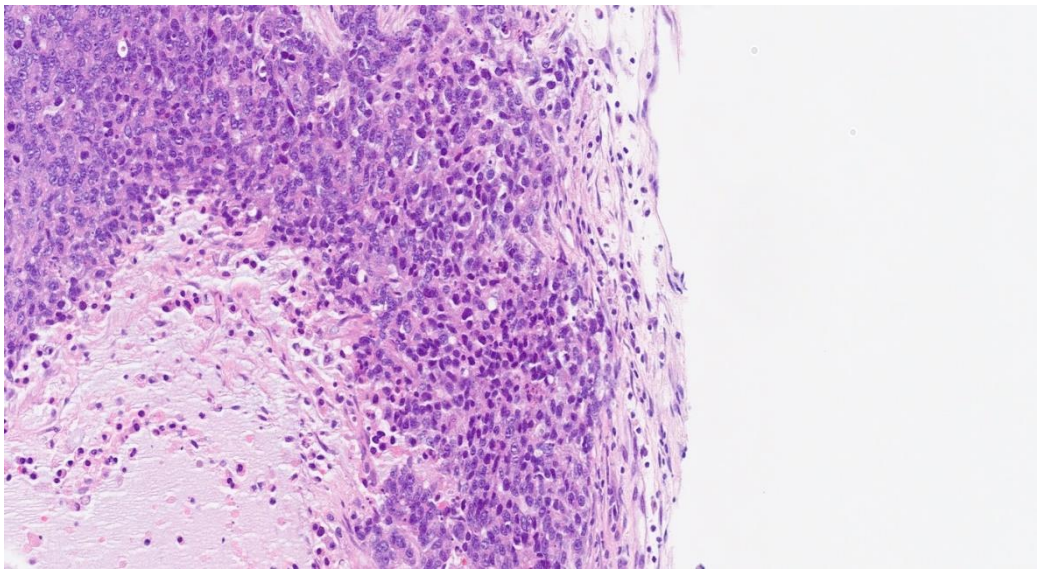
Slika 5. Bazalna morfologija: centralna nekroza i fibroza (HE, 20x)



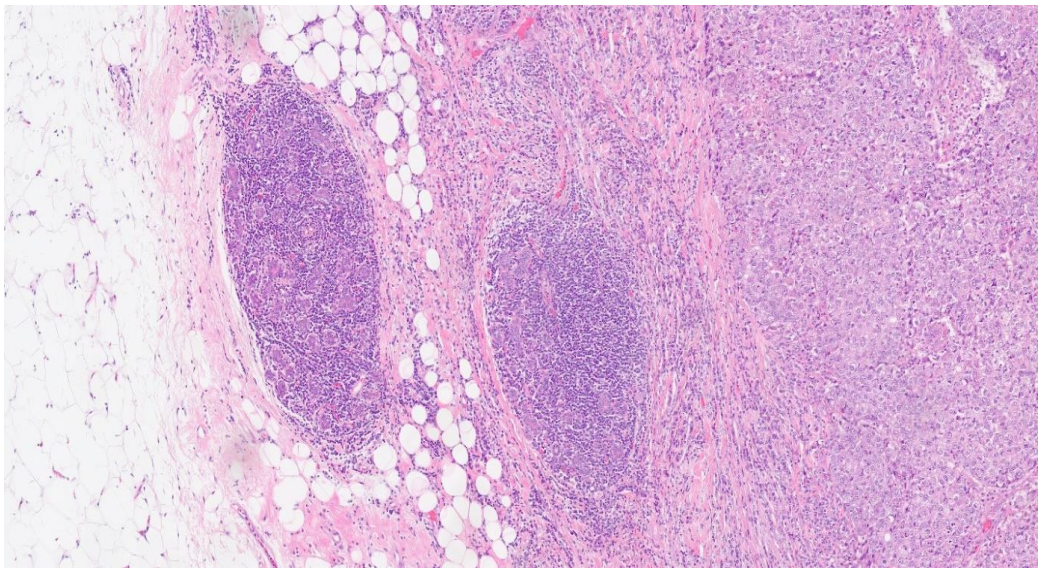
Slika 6. Trostruko negativni karcinom dojke s malim udijelom sTIL (HE, 400x)



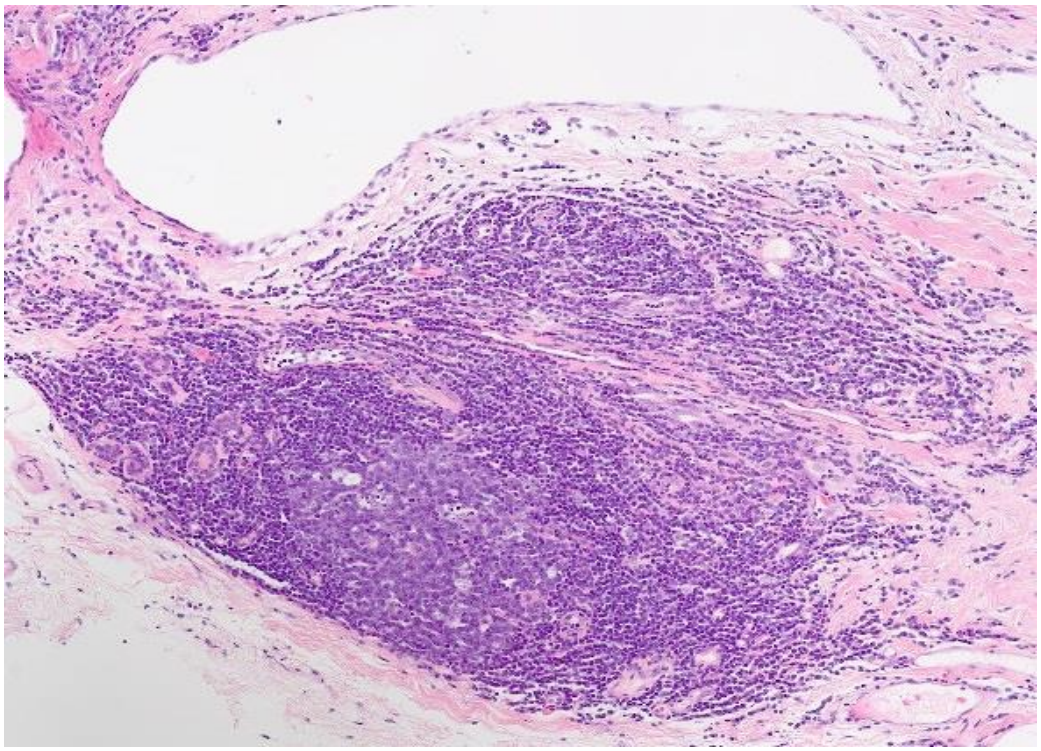
Slika 7. Trostruko negativni karcinom dojke s visokim udjelom sTIL između otočića tumorskog tkiva i na invazivnom tumorskom rubu (centralni i periferni sTIL) (HE, 400x)



Slika 8. Trostruko negativni karcinom s velikim brojem limfocita u izravnom dodiru s tumorskim stanicama (itTIL) (HE, 400x)



Slika 9. Limfatične nakupine bez germinativnog centra na periferiji tumora (primarne LN) (HE, 100x)

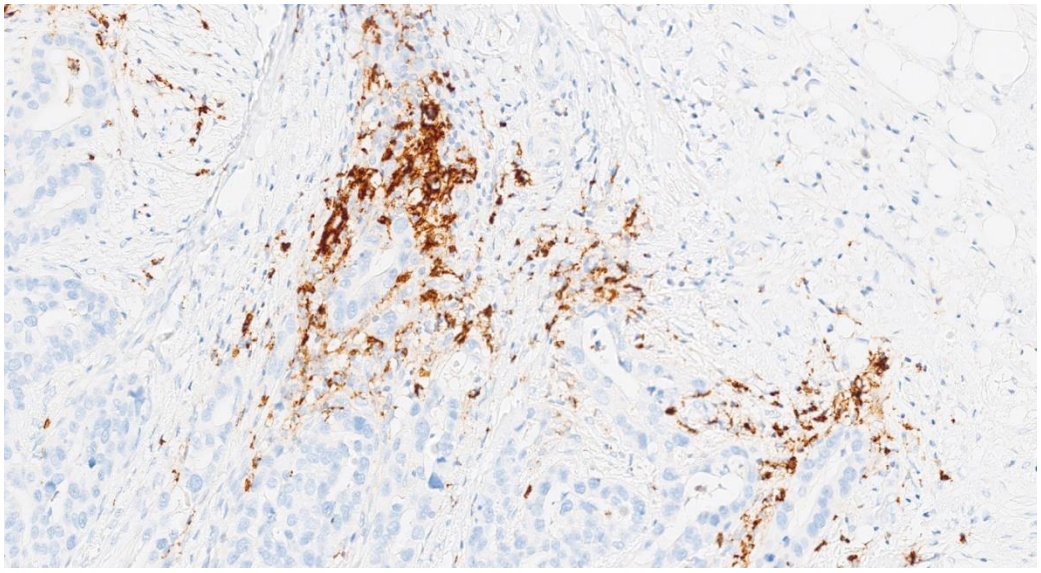


Slika 10. Limfatične nakupine s germinativnim centrom (sekundarne LN) (HE, 200x)

3.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKE ANALIZE

Arhivirani parafinski blokovi s uzorcima tumora dodatno su rezani na 3-5µ debele rezove za imunohistokemijsku analizu. U stroju Ventana Ultrabenchmark GX (Ventana, Tuscon, Arizona) proveden je standardni predanalitički postupak deparafiniranja, rehidracije, otkrivanja antigenskih epitopa, blokade aktivnosti endogene peroksidaze i analitički postupak imunohistokemijskog bojenja primjenom protutijela PD-L1 Ventana SP142, NY-ESO-1 (monoklonsko protutijelo {mAb} D8.38), multi MAGE A (mAb 57B) i MAGE A1 (mAb 77B). Za vizualizaciju reakcije korišten je Optiview detekcijski kit (Ventana, Roche).

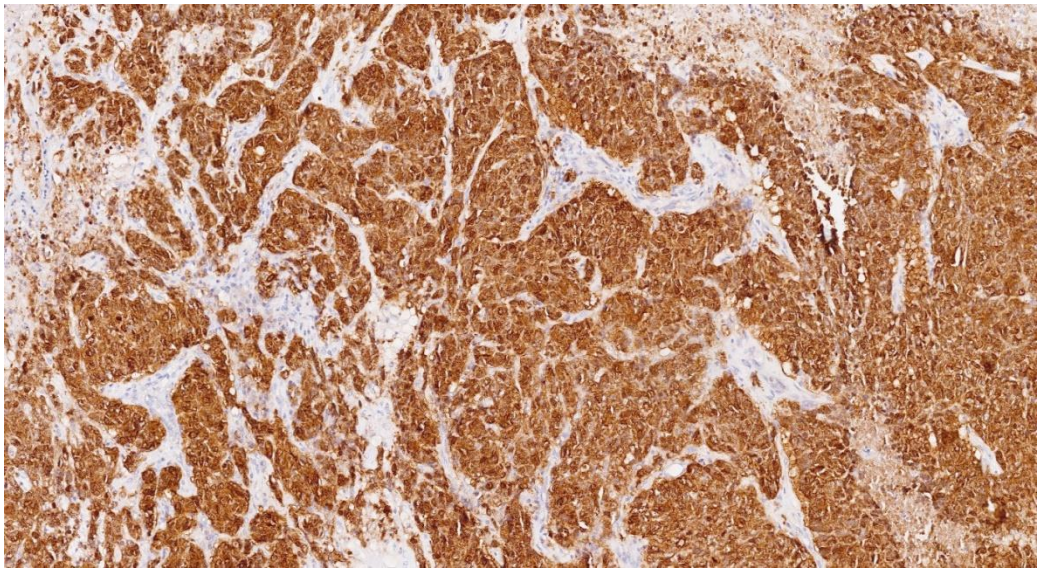
PD-L1 ICS (engl. PD-L1 immune cell score) očitavan je od strane dvoje patologa i smatran je pozitivnim ukoliko je bojenje bilo kojeg intenziteta bilo vidljivo u ≥ 1% površine tumora s obojenjem bilo kojeg intenziteta u imunim stanicama (69) (Slika 11).



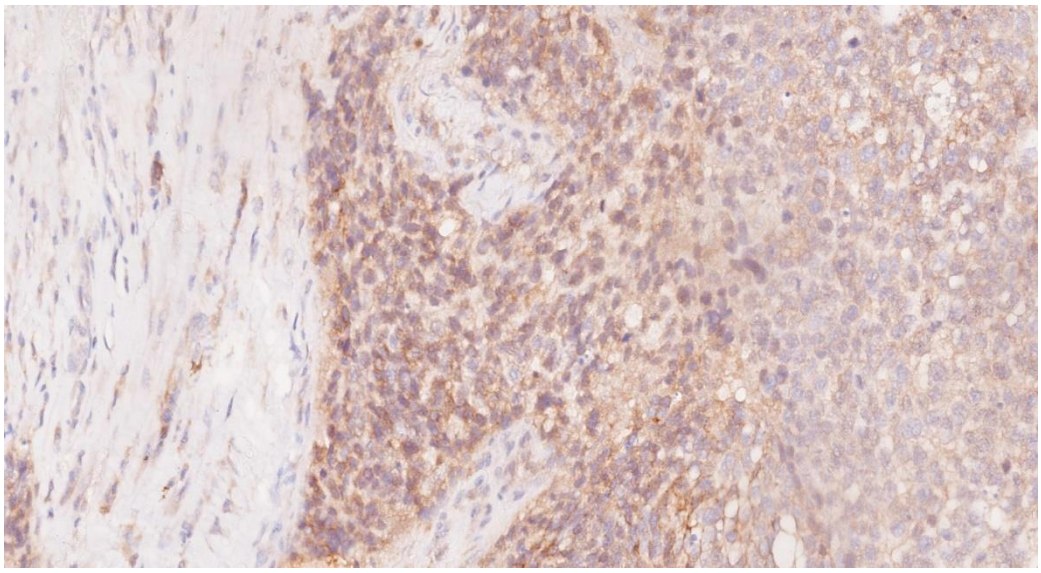
Slika 11. PD-L1 ICS prikazan primjenom imunohistokemijskog bojenja s protutijelom SP142 vidljivo kao granularno i točkasto citoplazmatsko obojenje u ≥1% imunih stanica (400x)

Proliferacijski indeks mjeren je primjenom Ki-67 protutijela u područjima najviše proliferacijske aktivnosti u invazivnoj komponenti tumora, a definiran je kao postotak pozitivnih jezgara na 1000 tumorskih stanica (70).

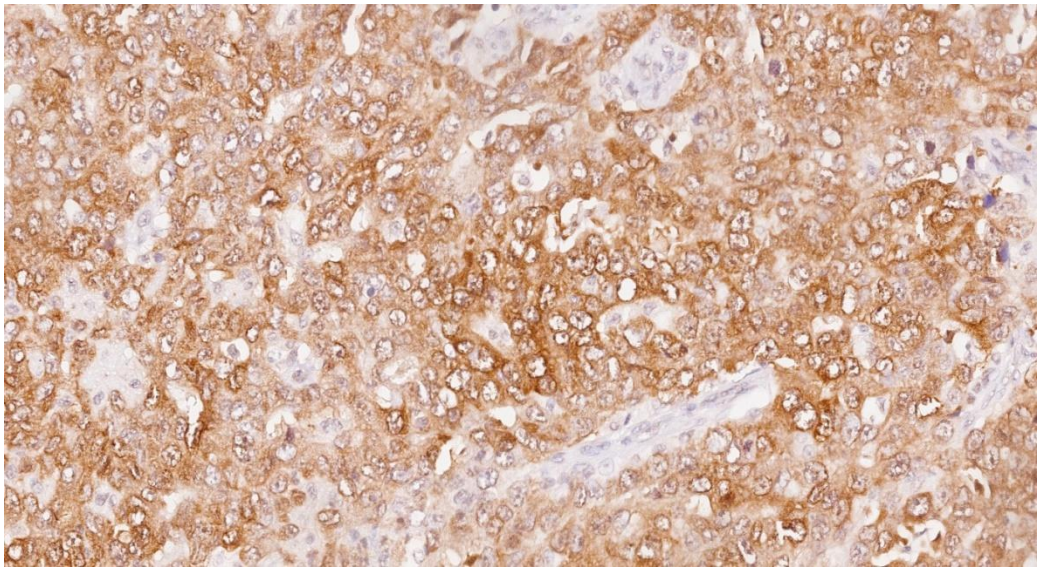
Pri očitavanju NY-ESO-1, MAGE A1 i multi MAGE A u evaluaciju su uključene sve tumorske stanice s vidljivim nuklearnim i/ili citoplazmatskim obojenjem (Slike 12-14). U obradi podataka korištene su dvije granične vrijednosti za pozitivan izražaj CTA. U prvoj, izražaj je smatran pozitivnim ukoliko je broj pozitivnih stanica (%) bio veći od medijana vrijednosti u ispitivanoj kohortnoj skupini, a u drugoj, prema arbitrarno postavljenoj graničnoj vrijednosti, ukoliko je broj pozitivnih stanica (%) bio ≥10% ukupnog broja tumorskih stanica (59,62,71,72).



Slika 12. Imunohistokemijsko bojenje primjenom protutijela za NY-ESO-1 (400x)



Slika 13. Imunohistokemijsko bojenje primjenom protutijela za MAGE A1 (400x)



Slika 14. Imunohistokemijsko bojenje primjenom protutijela za multi MAGE A (400x)

Sve analize napravljene su na standardnim tkivnim rezovima što omogućava bolji uvid u heterogenost tumorskog mikrookoliša, te procjenu centralnih i perifernih dijelova tumora, kao i okolne tumorom nezahvaćene strome. Sva očitavanja odrađena su neovisno od strane pristupnika i od strane mentorice na mikroskopu Olympus 51BX (Olympus, Tokyo, Japan).

3.3. STATISTIČKE ANALIZE

Prikupljeni podaci bilježeni su u programu Microsoft Exel za Windows 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD), a za izračun statističke značajnosti koristio se program Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (verzija 20 za Windows; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Rezultati su prikazani tablično i grafički, a interpretirani na razini značajnosti $P < 0.005$.

Za usporedbu kategorijskih varijabli koristio se $\chi 2$ test i test logističke regresije. Za usporedbu kvantitativnih varijabli i ispitivanih karakteristika tumora koristio se Mann-Whitney test. Coxovom regresijskom analizom utvrđivali smo povezanost svih istraživanih varijabli s dužinom DFS bolesnika (u mjesecima). U analizi preživljenja prema svim varijablama koristila se Kaplan-Meierova krivulja preživljenja i log-rank test.

4. REZULTATI

4.1. OBILJEŽJA ISPITANICA

U istraživanje je uključeno 97 bolesnica s ranim (nemetastatskim) trostruko negativnim karcinomima dojke koje prije operativnog zahvata nisu primale neoadjuvantnu terapiju, a operirane su u četiri velika Klinička bolnička centra u razdoblju od 1. siječnja 2017. do 31. prosinca 2018. godine.

Sve bolesnice kod kojih je proveden poštedni operativni zahvat primile su postoperativnu radioterapiju. Sistemska adjuvantna kemoterapija je primijenjena u 90 (92.7%) bolesnica. Od sedam bolesnica koje nisu primile adjuvantnu kemoterapiju, tri su istu odbile primiti, dok su četiri imale multiple komorbiditete te nisu bile kandidati za provođenje adjuvantne terapije. U Tablicama 2 i 3 prikazane su kvalitativne i kvantitativne varijable proučavane u istraživanju.

Tablica 2. Prikaz bolesnica oboljelih od TNBC prema kvalitativnim varijablama ili medijan (q1-q3, minimum-maksimum) kvantitativnih varijabli

Varijable		
Dob (godine)		65 (55-74; 29-91)
Vrsta operativnog zahvata	Tumorektomija	3 (3.1)
	Kvadrantektomija	48 (49.5)
	Mastektomija	46 (47.4)
Veličina tumora (cm)	0.5-1	5 (5.2)
	1-2	42 (43.3)
	2-5	45 (46.4)
	≥5	5 (5.2)
Veličina tumora (cm)		2.1 (1.5-3;0.9-10)
Histološki gradus	1	1 (1)
	2	18 (18.6)
	3	78 (80.4)
Histološki tip	Invazivni NST	79 (81.4)
	Invazivni lobularni	4 (4.1)
	Ostali	14 (14.4)
Pozitivni limfni čvorovi	Ne	69 (71.1)
	Da	27 (27.8)
	Nepoznato	1 (1)
TNM stadij	I	40 (41.2)
	II	41 (42.2)
	III	15 (15.5)
	Nepoznato	1 (1.1)
PD-L1 ICS	<1%	50 (51)
	≥1%	47 (49)
Vrsta adjuvantnog liječenja	Kemoterapija i radioterapija	64 (66)
	Kemoterapija	26 (26.8)
	Nije provedeno	7 (7.2)
Naknadna pojava metastaza	Ne	86 (88.7)
	Da	11 (11.3)
Recidiv bolesti	Ne	92 (94.8)
	Da	5 (5.2)
Ki-67 medijan		56 (35-75; 5-98)
Ki-67 Roc analiza		55.5

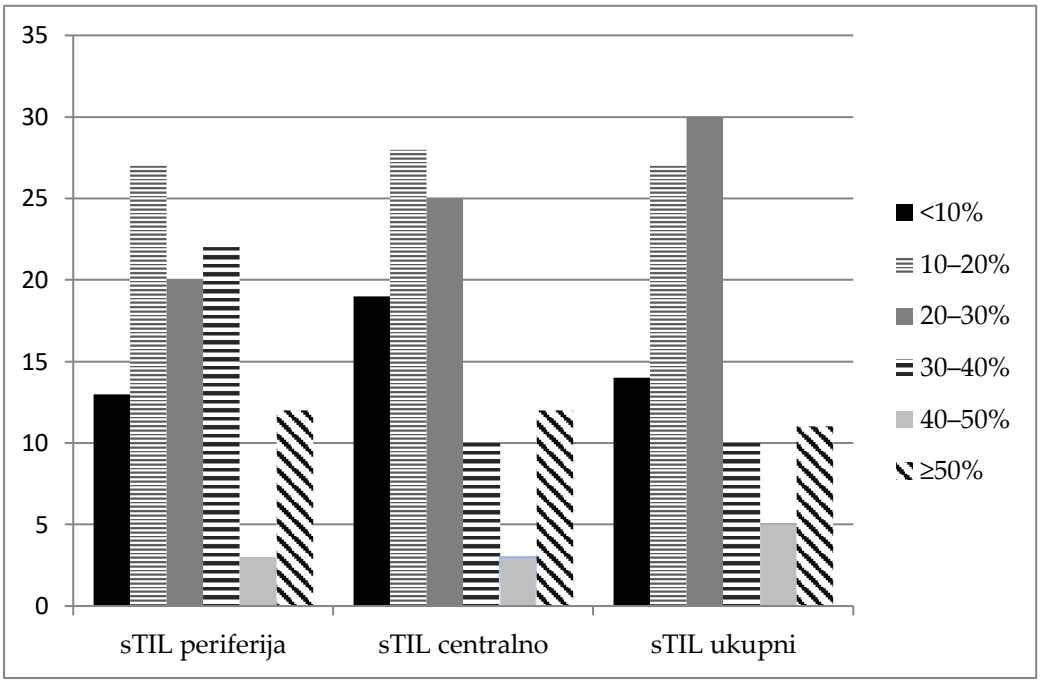
Tablica 3. Prikaz broja i postotka, te medijani ispitivanih varijabli

Varijabla			Medijan vrijednosti
sTIL periferni	<10%	13 (13.4)	25 (10-30; 0-80)
	10-20%	27 (27.8)	
	20-30%	20 (20.6)	
	30-40%	22 (22.7)	
	40-50%	3 (3.1)	
	≥50%	12 (12.4)	
sTIL centralni	<10%	19 (19.5)	20 (10-30; 1-85)
	10-20%	28 (28.9)	
	20-30%	25 (25.8)	
	30-40%	10 (10.3)	
	40-50%	3 (3.1)	
	≥50%	12 (12.4)	
sTIL ukupni	<10%	14 (14.4)	20 (10-30; 1-85)
	10-20%	27 (27.8)	
	20-30%	30(30.9)	
	30-40%	10 (10.3)	
	40-50%	5 (5.2)	
	≥50%	11 (11.3)	
itTIL	<10%	85 (88)	2 (1-5; 0-15)
	≥10%	12 (12)	
Primarne LN	Ne	31 (32)	
	Da	66 (68)	
Sekundarne LN	Ne	83 (86)	
	Da	14 (14)	
BLm	Ne	50 (51)	
	Da	47 (49)	
NY-ESO-1	<10%	78 (80)	0
	≥10%	19 (20)	
MAGE A1*	<10%	4 (4)	80 (55-100; 0-100)
	≥10%	92 (96)	
Multi MAGE A*	<10%	19 (20)	40 (15-70;0-100)
	≥10%	77 (80)	

***** rezultati bojenja na MAGE A1 i multi MAGE A za jednu bolesnicu nisu dostupni zbog istrošenosti uzorka

4.2. TUMORSKI MIKROOKOLIŠ

Tumor infiltrirajući limfociti očitavani su kao postotak strome infiltrirane upalnim stanica prema smjernicama Međunarodne radne skupine za TIL, i podijeljeni su u 6 grupa (<10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%. 40-50% i ≥50%) (Slika 15).



Slika 15. Raspodjela broja (%) stromalnih tumor infiltrirajućih limfocita (sTIL) na periferiji, u centralnom dijelu tumora i ukupno

U ovom istraživanju nismo dokazali da izdvojeno evaluiranje sTIL na invazivnom rubu (sTIL periferija) i u centralnom dijelu tumora (sTIL centralno) donosi dodatne informacije u odnosu na procjenu ukupnog broja sTIL (sTIL ukupni). Statistički značajne korelacije pronađene su pri izdvajanju grupe s visokim udjelom ukupnog sTIL, takozvanih „lymphocyte predominant“ (LP) karcinoma (Tablica 4).

U Tablici 4 prikazane su kliničko-patološke varijable u odnosu na PD-L1 ICS status i LP (engl. lymphocyte predominant) status.

Tablica 4. Prikaz broja (%) i medijana (q1-q3; min-max) ispitivanih varijabli u odnosu na PD-L1 ICS status i LP status

Varijable		PD-L1 ICS <1% (50; 51%)	PD-L1 ICS ≥ 1% (47; 49%)	p	LP - (86; 89%)	LP + (11; 11%)	p
Dob (godine)		66 (54-78; 39-91)	65 (55-72; 34-88)	0.509	66.5 (55-64; 29-91)	60 (54-80; 45-83)	0.820
Ki67		42 (30-70; 5-90)	65 (50-80; 24-98)	0.005	51 (35-75; 5-91)	65 (60-80; 50-98)	0.040
Veličina tumora		2.1 (1.6-4.5; 0.9-10)	2 (1.5-3; 0.9-5)	0.411	2.1 (1.6-3; 0.9-10)	1.9 (1.1-3; 1-5)	0.588
Histološki gradus*	2	15 (31)	3 (6)	0.005	17 (20)	1 (9)	0.644
	3	34 (69)	44 (94)		68 (80)	10 (91)	
Histološki tip	NST	37 (74)	42 (89)	0.092	70 (81)	9 (82)	0.999
	Ostali	13 (26)	5 (11)		16 (19)	2 (18)	
Pozitivni limfni čvorovi	Ne	33 (66)	36 (78)	0.268	63 (73)	6 (60)	0.609
	Da	17 (34)	10 (22)		23 (27)	4 (40)	
itTIL	<10%	50 (100)	35 (74)	<0.001	79 (92)	6 (55)	0.002
	≥10%	0	12 (26)		7 (8)	5 (45)	
Primarne LN	Ne	23 (46)	8 (17)	0.004	29 (34)	2 (18)	0.486
	Da	27 (54)	39 (83)		57 (66)	9 (82)	
Sekundarne LN	Ne	46 (92)	37 (79)	0.116	75 (87)	8 (73)	0.406
	Da	4 (8)	10 (21)		11 (13)	3 (27)	
PD-L1 ICS	<1%				50 (58)	0	0.001
	≥1%				36 (42)	11 (100)	

*iz analize je isključena jedna bolesica s karcinomom histološkog gradusa 1

Nismo dokazali statistički značajnu razliku u životnoj dobi bolesnica u trenutku dijagnoze u odnosu na PD-L1 ICS (p=0.509) i LP status (p= 0.820).

Medijan proliferacijskog indeksa Ki-67 bio je za 23% (95% CI: 7.8-38.2) veći u skupini ispitanica s PD-L1 ICS pozitivnim statusom u odnosu na ispitanice s PD-L1 ICS negativnim statusom (z=2.62; p=0.005). U skupini bolesnica koje su imale

pozitivan LP status medijan proliferacijskog indeksa Ki-67 za 14% (95% CI -1.28 do 29.3) se razlikovao od Ki-67 medijana u LP negativnoj skupini (z=2.1; p=0.040).

Udio tumora histološkog gradusa 2 u skupini s PD-L1 ICS negativnim statusom bio je 5 puta veći nego u skupini s PD-L1 ICS pozitivnim statusom. Udio ispitanica s histološkim gradusom 3 bio je 1.4 puta veći u skupini PD-L1 ICS pozitivnim nego u skupini s PD-L1 ICS negativnim statusom (χ^2 =7.7; p=0.005).

Postojala je statistički značajna povezanost histološkog podtipa s PD-L1 ICS statusom uz razinu značajnosti 91% (χ^2 =2.8; p=0.092). Udio „ostalih“ histoloških podtipova bio je 2.4 puta veći u skupini s PD-L1 ICS negativnim statusom u odnosu na skupinu s PD-L1 ICS pozitivnim statusom. Relativni broj NST histološkog podtipa u odnosu na „ostale“ histološke podtipove bio je 2.9 puta veći kod tumora s PD-L1 ICS pozitivnim statusom nego kod tumora s PD-L1 ICS negativnim statusom (95% CI 0.96-9; p=0.059).

Intratumoralni TIL podijeljeni u grupe s graničnom vrijednosti 10% statistički bili su značajno povezani s PD-L1 ICS statusom (χ^2 =12.3; p<0.001). Niti jedna ispitanica iz grupe itTIL ≥ 10% nije imala PD-L1 ICS negativan status. Postoji i statistički značajna povezanost intratumoralnih TIL (χ^2=9.3; p=0.002) s LP statusom. Udio ispitanica s itTIL ≥ 10% u skupini LP status pozitivnih bio je 5.6 puta veći nego udio istih u skupini LP status negativnih. Izgled za pojavnost itTIL skupine ≥ 10% u skupini LP status pozitivnih bio je 9.4 puta veći nego u skupini LP status negativnih (OR:9.4; 95% CI 2.3-39; p=0.002).

Postojala je statistički značajna povezanost pojavnosti limfatičnih nakupina s PD-L1 ICS statusom (χ^2 =8.1; p=0.004). Udio ispitanica bez limfatičnih nakupina bio je 3 puta veći u skupini s PD-L1 ICS negativnim statusom nego u skupini s PD-L1 ICS

pozitivnim statusom, a udio ispitanica s prisutnim limfatičnim nakupinama bio je 1.5 puta veći u skupini s PD-L1 ICS pozitivnim statusom nego u ispitanica s PD-L1 ICS negativnim statusom. Izgled za pojavnost limfatičnih nakupina u skupini PD-L1 ICS pozitivnih ispitanica bio je 4 puta veći nego u skupini PD-L1 ICS negativnih ispitanica (OR: 4; 95% CI 1.6-10.6; p=0.003).

Postojala je značajna povezanost PD-L1 ICS statusa s LP statusom (χ^2 =10.9; p=0.001). Sve bolesnice s LP pozitivnim statusom (N=11) imale su i pozitivan PD-L1 ICS.

Pri podjeli bolesnica u skupine prema PD-L1 ICS statusu nismo pronašli statistički značajnu razliku u medijanu veličine (p=0.411), zahvaćenosti limfnih čvorova u trenutku operacije (p=0.268) ni postojanju sekundarnih LN (p=0.116). Medijan veličine (p=0.588), histološki tip (p=0.999), histološki gradus (p=0.644), zahvaćenost limfnih čvorova (p=0.609) te postojanje primarnih (p=0.486) i sekundarnih LN (p=0.406) nisu se statistički značajno razlikovali pri podijeli bolesnica u grupe ovisno o LP statusu.

Tablica 5. Povezanost ispitivanih varijabli s prisutnošću BLm

Varijable		BLm + (50; 51%)	BLm - (47; 49%)	p
Dob (godine)		68.5 (57-78;34-87)	61 (53-72; 29-91)	0.139
Ki-67		49 (30-70; 10-91)	65 (40-80; 5-98)	0.001
Veličina medijan		2 (1.5-3; 0.9-10)	2.3 (1.8-3.5; 0.9-6.5)	0.324
Histološki gradus*	2	15 (31)	3 (6.4)	0.005
	3	34 (69)	44 (94)	
Histološki tip	NST	37 (74)	42 (89)	0.92
	Ostali podtipovi	13 /26)	5 (11)	
Pozitivni limfni čvorovi	Ne	33 (66)	36 (78)	0.268
	Da	17 (34)	10 (22)	
itTIL	<10%	44 (88)	41 (87)	0.909
	≥10%	6 (12)	6 (13)	
Primarne LN	Ne	16 (32)	15 (32)	0.999
	Da	34 (68)	32 (68)	
Sekundarne LN	Ne	40 (80)	43 (92)	0.187
	Da	10 (20)	4 (8)	
PD-L1 ICS	<1%	29 (58)	21 (45)	0.268
	≥1%	21 (42)	26 (55)	

* iz analize je isključena jedna bolesnica s karcinomom histološkog gradusa 1

Medijan Ki-67 bio je za 16% veći u tumorima s prisutnom „basal-like“ morfologijom (BLm +) nego u tumorima bez nje (BLm-) (z=3.2; p=0.001).

Udio ispitanica s histološkim gradusom 3 bio je 1.4 puta veći u skupini tumora s „basal-like“ morfologijom (BLm+) u odnosu na udio istih u skupini kod kojih ona nije bila prisutna (BLm-). Udio tumora s histološkim gradusom 2 bio je 5.2 puta veći u skupini tumora bez „basal like“ histoloških karakeristika (BLm-) u odnosu na udio tumora kod kojih su bile prisutne (BLm+) (χ^2 =7.7; p=0.005). Izgled za pojavnost histološkog gradusa 3 u odnosu na gradus 2 bio je 6.5 puta veći u skupini BLm+ u odnosu na skupinu BLm- (OR: 6.5; 95% CI: 17-24; p=0.005).

Pri podjeli bolesnica u skupine ovisno o postojanju BLm nismo našli statistički značajnu razliku u dobi bolesnica (p=0.139), veličini tumora (p=0.324), PD-L1 ICS statusu (p=0.268), statusu limfnih čvorova (p=0.268) te postojanju primarnih (p=0.999) i sekundarnih LN (p=0.187).

4.3. ANTIGENI ZA RAK TESTISA

U Tablicama 6–8 prikazane su korelacije ispitivanih varijabli s NY-ESO-1, multi MAGE A te MAGE A1 s graničnim vrijednostima određenim prema medijanu.

Tablica 6. Prikaz odnosa ispitivanih varijabli s izražajem multi MAGE A (granična vrijednost prema medijanu)

Varijable		Multi MAGE A <40% (44)	Multi MAGE A ≥40% (52)	p
Dob (godine)		69 (56-78; 35-91)	63 (54-72; 29-86)	0.178
Ki67 (%)		50 (33-74; 5-98)	60 (38-80; 10-90)	0.360
Veličina (cm)		1.95 (1.5-4.8; 0.9-10)	2.2 (1.8-3; 0.9-5.5)	0.520
Histološki gradus*	2	13 (30)	5 (10)	0.026
	3	31 (70)	47 (90)	
Histološki tip	NST	35 (79)	44 (85)	0.704
	Ostali podtipovi	9 (21)	8 (15)	
Pozitivni limfni čvorovi	Ne	30 (70)	38 (73)	0.899
	Da	13 (30)	14 (27)	
itTIL	<10%	49 (89)	45 (86)	0.999
	≥10%	5 (11)	7 (14)	
Primarne LN	Ne	11 (25)	19 (36)	0.320
	Da	33 (75)	33 (64)	
Sekundarne LN	Ne	35 (79)	47 (90)	0.227
	Da	9 (21)	5 (10)	
BLm	Ne	27 (61)	22 (42)	0.098
	Da	17 (39)	30 (58)	
PD-L1 ICS	<1%	26 (59)	23 (44)	0.213
	≥1%	18 (41)	29 (56)	

* iz analize je isključena jedna bolesnica s karcinomom histološkog gradusa 1

Pri korištenju granične vrijednosti od 40% za multi MAGE A, određenog prema medijanu, zabilježena je statistički značajna korelacija s histološkim gradusom tumora. Udio tumora s histološkim gradusom 2 u skupini multi MAGE A <40% bio je 3 puta veći nego u skupini multi MAGE A ≥40%. Udio tumora s histološkim gradusom 3 u skupini multi MAGE A ≥40% bio je 1.3 puta veći nego u skupini multi MAGE A <40% (χ^2 =4.9; p=0.026).

Nije pronađena statistički značajna povezanost multi MAGE A s dobi bolesnica (p=0.178), medijanom Ki-67 (p=0.360), veličinom tumora (p=0.520), histološkim tipom tumora (p=0.704), statusom limfnih čvorova (p=0.899), brojem itTIL (p=0.999), postojanjem primarnih (p=0.320) i sekundarnih LN (p=0.227), prisutnošću BLm (p=0.098) ni PD-L1 ICS statusom (p=0.213).

Tablica 7. Prikaz odnosa ispitivanih varijabli s izražajem NY-ESO-1 (granična vrijednost prema medijanu)

Varijable		NY-ESO-1 0% (60)	NY-ESO-1≥1% (37)	P
Dob (godine)		63 (51-73; 34-91)	70 (58-76; 29-90)	0.154
Ki67 (%)		58.5 (38-76; 10-90)	50 (35-77; 5-98)	0.529
Veličina (cm)		2.2 (1.5-3.2; 0.9-10)	2 (1.5-3; 0.9-6.5)	0.363
Histološki gradus*	2	11 (18)	7 (19)	0.999
	3	49 (82)	29 (81)	
Histološki tip	NST	50 (83)	29 (78)	0.733
	Ostali podtipovi	10 (17)	8 (22)	
Pozitivni limfni čvorovi	Ne	44 (73)	25 (69)	0.860
	Da	16 (27)	11 (31)	
itTIL	<10%	56 (93)	29 (78)	0.064**
	≥10%	4 (7)	8 (22)	
Primarne LN	Ne	21 (35)	10 (27)	0.553
	Da	39 (65)	27 (73)	
Sekundarne LN	Ne	54 (90)	29 (78)	0.199
	Da	6 (10)	8 (22)	
BLm	Ne	32 (53)	18 (49)	0.811
	Da	28 (47)	19 (51)	
PD-L1 ICS	<1%	33 (55)	17 (46)	0.511
	≥1%	27 (45)	20 (54)	

*iz analize je isključena jedna bolesnica s karcinomom histološkog gradusa 1
**odnosi su dodatno prikazani u Tablici 10

Pri podjeli bolesnica prema izražaju NY-ESO-1 nije bilo statistički značajne razlike u dobi (p=0.154), medijanu Ki-67 (p=0.529) i medijanu veličine tumora (p=0.363).

Izražaj NY-ESO-1 nije bio povezan s histološkim gradusom tumora (p=0.999), histološkim tipom tumora (p=0.733) niti zahvaćanjem limfnih čvorova (p=0.860).

Postojanje primarnih LN (p=0.553), sekundarnih LN (p=0.199), BLm (p=0.811) te PD-L1 ICS (p=0.511) nisu korelirali s izražajem NY-ESO-1.

Korelacija izražaja NY-ESO-1 s brojem itTIL dodatno je prikazana u Tablici 10.

Tablica 8. Prikaz odnosa ispitivanih varijabli s izražajem MAGE A1 (granična vrijednost prema medijanu)

Varijable		MAGE A1≤80% (45)	MAGE A1>80% (51)	P
Dob (godine)		65 (52-73;35-90)	66.5 (56-78;29-91)	0.555
Ki67 (%)		48 (30-72;10-91)	62 (40-80;5-98)	0.055
Veličina (cm)		2.3 (1.8-3.3;1-10)	1.85 (1.5-3; 0.9-10)	0.060
Histološki gradus*	2	10 (22)	8 (16)	0.578
	3	35 (78)	43 (84)	
Histološki tip	NST	33 (73)	45 (88)	0.099
	Ostali podtipovi	12 (27)	6 (12)	
Pozitivni limfni čvorovi	Ne	33 (73)	36 (71)	0.765
	Da	12 (29)	15 (29)	
itTIL	<10%	41 (91)	43 (85)	0.509
	≥10%	4 (9)	8 (15)	
Primarne LN	Ne	14 (31)	17 (33)	0.868
	Da	31 (69)	34 (67)	
Sekundarne LN	Ne	36 (80)	46 (90)	0.245
	Da	9 (20)	5 (10)	
BLm	Ne	23 (51)	27 (52)	0.936
	Da	22 (49)	24 (48)	
PD-L1 ICS	<1%	23 (51)	27 (52)	0.936
	≥1%	22 (49)	24 (48)	

*iz analize je isključena jedna bolesnica s karcinom histološkog gradusa 1

Pri podjeli bolesnica prema izražaju MAGE A1 nije postojala statistički značajna razlika u dobi (p=0.555).

Medijan vrijednosti Ki-67 bio je za 14 veći u skupini MAGE A1 >80% nego u skupini MAGE A1 ≤80 (z=1.92; p=0.055).

Medijan veličine tumora u skupini MAGE A1 ≤80 bio je veći za 0.45 cm nego medijan veličine u MAGE A1 >80, na razini statističke značajnosti od 94% (z=1.88; p=0.060).

Izražaj MAGE A1 nije bio statistički značajno povezan s histološkim gradusom tumora (p=0.578), histološkim tipom tumora (p=0.099) niti sa zahvaćanjem limfnih čvorova (p=0.943).

Izražaj MAGE A1 nije bio povezan s povećanim brojem itTIL (p=0.461), postojanjem primarnih LN (p =0.868) ni postojanjem sekundarnih LN (p=0.245).

Izražaj MAGE A1 nije korelirao s postojanjem BLm (p=0.936) ni PD-L1 ICS (p=0.836).

U Tablici 9 prikazane su korelacije izražaja multi MAGE A prema provizorno određenoj graničnoj vrijednosti od 10% s ispitivanim varijablama.

Tablica 9. Prikaz odnosa ispitivanih varijabli s izražajem multi MAGE A (granična vrijednost 10%)

Varijable		Multi MAGE A<10% (19)	Multi MAGE A≥10% (77)	p
Dob (godine)		65 (51-77;45-82)	66 (55-73; 29-91)	0.669
Ki67 (%)		50 (30-70; 10-98)	56 (38-80; 5-91)	0.287
Veličina (cm)		2.2 (1.1-3; 0.9-10)	2.1 (1.6-3; 0.9-10)	0.675
Histološki gradus*	2	6 (32)	12 (17)	0.214
	3	13 (68)	64 (83)	
Histološki tip	NST	14 (74)	64 (83)	0.538
	Ostali podtipovi	5 (26)	13 (17)	
Pozitivni limfni čvorovi	Ne	13 (67)	57 (74)	0.736
	Da	6 (33)	20 (26)	
itTIL	<10%	16 (84)	68 (88)	0.923
	≥10%	3 (16)	9 (12)	
Primarne LN	Ne	4 (21)	26 (34)	0.427
	Da	15 (79)	51 (66)	
Sekundarne LN	Ne	16 (84)	66 (86)	0.999
	Da	3 (16)	11 (14)	
BLm	Ne	14 (74)	35 (45)	0.051 **
	Da	5 (26)	42 (55)	
PD-L1 ICS	<1%	5 (26)	12 (16)	0.356
	≥1%	14 (74)	65 (84)	

* iz analize je isključena jedna bolesnica s karcinom histološkog gradusa 1
**odnosi su dodatno prikazani u Tablici 10

Pri podjeli bolesnica prema izražaju multi MAGE A nije bilo statistički značajne razlike u dobi (p=0.669), medijanu Ki67 (p=0.287) ni veličini tumora (p=0.675).

Izražaj multi MAGE A nije statistički značajno korelirao s histološkim gradusom tumora (p=0.214), histološkim tipom tumora (p=0.538) ni zahvaćenosti limfnih čvorova (p=0.736).

Izražaj multi MAGE A nije bio povezan s povećanim brojem itTIL (p=0.923), postojanjem primarnih LN (p=0.427), sekundarnih LN (p=0.999) i PD-L1 ICS (p=0.356).

Korelacija izražaja multi MAGE A s pojavom BLm prikazana je u Tablici 10.

Pri podjeli bolesnica prema izražaju NY-ESO-1 i MAGE A1 uz graničnu vrijednost 10% nije pronađena niti jedna statistički značajna korelacija s ispitivanim kliničko-patološkim parametrima (rezultati nisu prikazani).

Tablica 10. Odnos izražaja NY-ESO-1 (granična vrijednost 0%) s itTIL, te izražaja multi MAGE A (granična vrijednost 10%) s pojavom BLm, dodatno prikazani kao omjer izgleda (OR)

Varijable		NY–ESO-1 0% (60)	NY-ESO-1 ≥1% (37)	p	Multi MAGE A <10% (19)	Multi MAGE A ≥10% (77)	p	OR (95% CI)	p
itTIL	<10%	56 (93)	29 (78)	0.064				3.9 (1.1-14)	0.039
	≥10%	4 (7)	8 (22)						
BLm	Ne				14 (74)	35 (45)	0.051	3.4 (1.1-10)	0.033
	Da				5 (26)	42 (55)			

Udio intratumoralnih TIL ≥10% bio je 3 puta veći u tumorima s pozitivnim NY-ESO-1 izražajem (≥1%) nego u tumorima s negativnim NY-ESO-1 izražajem (0%) (χ^2=3.44; p=0.064). Izgled za pojavnost intratumoralnih TIL ≥10% u odnosu na intratumoralne TIL <10% bio je 3.9 puta veći u skupini tumora s pozitivnim NY-ESO-1 izražajem (≥1%) nego u skupini s negativnim NY-ESO-1 izražajem (0%) (OR:3.9; 95%CI 1.1-14; p=0.039).

Postojala je statistički značajna povezanost pojave BLm s izražajem multi MAGE A (χ^2 =3.8; p=0.051). Udio tumora s prisutnom BLm bio je 2 puta veći u skupini s multi MAGE A izražajem ≥10% nego u skupini s multi MAGE A izražajem <10%. Udio tumora bez „basal-like“ morfoloških karakteristika (BLm-) bio je 1.6 puta veći u

skupini s multi MAGE A <10% nego u skupini s multi MAGE A ≥10%. Izgled za pojavnost BLm bio je 3.4 puta veći u skupini tumora s multi MAGE A ≥10% nego u skupini s multi MAGE A <10% (OR:3.4; 95% CI 1.1-10; p=0.033).

4.4. ANALIZA PREŽIVLJENJA ZA INTERVAL BEZ ZNAKOVA POVRATA BOLESTI (DFS)

U Tablici 10 prikazana je analiza preživljenja upotrebom Log rank testa i Coxove regresijske uninominalne analize za slobodni interval bez znakova povrata bolesti (DFS). Prosječna vrijednost DFS bila je 43.3 mjeseca (SE: 1.3; 95% CI 40.8-46)

Tablica 11. Analiza preživljenja Log rank testom i Coxova regresijska uninominalna analiza za slobodni interval bez znakova povrata bolesti (DFS) prema ispitivanim pokazateljima

Varijable		Log rank test				Coxova regresijska uninominalna analiza		
		Prosjek DFS (mjeseci) (SE)	95% CI	LR	p	RR	95% CI	p
Veličina po medijanu	≤2.1 cm	48 bolesnica nije imalo recidiv niti metastazu tijekom 48 mjeseci				Analiza nije moguća zbog uspostavljanja relativnih odnosa s 0 bolesnica		
	>2.1 cm	38.5 (2.4)	34-43					
Histološki gradus*	2	41.9 (3.2)	35.7-48	0.404	0.525	0.698	0.189-2.6	0.590
	3	41.8 (1.3)	39-44					
Histološki tip	NST	41.7 (1.3)	39-44	0.570	0.450	1.45	0.39-5.4	0.577
	Ostali podtipovi	41.6 (3.6)	35-48					
Pozitivni limfni čvorovi	Ne	45 (1.1)	43-48	6.4	0.011	4.1	1.3-12.8	0.017
	Da	36.4 (3.2)	30-43					
LP	Ne	43 (1.4)	41-46	0.108	0.743	0.730	0.094-5.6	0.763
	Da	342 (4)	35-49					
itTIL	<10%	42.6 (1.4)	39-45			0.040	0-61	0.389
	≥10%	12 bolesnica nije imalo recidiv niti metastazu tijekom 48 mjeseci						
PD-L1 ICS	Negativan	41.4 (2)	37-45	2.97	0.085	0.351	0.095-1.3	0.117
	Pozitivan	43.3 (1.5)	40-46					
MAGE A1	≤80%	43.3 (1.8)	40-47	0.040	0.842	0.894	0.288-2.8	0.846
	>80%	41.5 (1.7)	38-45					
NY-ESO-1	0%	42.4 (1.7)	39-46	0.841	0.359	0.518	0.14-1.9	0.324
	≥1%	43 (1.6)	40-46					
Multi MAGE A	≥40%	42.9 (1.9)	39-47	0.115	0.735	0.827	0.27-2.6	0.742
	>40%	42 (1.6)	37-45					
BLm	Ne	44.3 (1.6)	41-47	0.476	0.490	1.56	0.5-4.9	0.450
	Da	40.5 (1.9)	37-44					
Ki-67	≤55.5%	45.1 (1.4)	42-48	1.39	0.238	2.11	0.64-7	0.221
	>55.5%	40 (2)	36-44					
Primarne LN	Ne	37.7 (2.7)	32-43	4.9	0.027	0.319	1-9.9	0.051
	Da	45.1 (1.3)	42.6-4.6					
Sekundarne LN	Ne	42.5 (1.5)	39.6-45			0.039	0-36	0.351
	Da	14 bolesnica nije imalo recidiv niti metastazu tijekom 48 mjeseci						

* iz analize je isključena jedna bolesnica s karcinomom histološkog gradusa 1

Prosjek preživljenja bez znakova povrata bolesti (DFS) u ispitanica s negativnim limfnim čvorovima bio je 9 mjeseci duži nego u ispitanica s pozitivnim limfnim čvorovima (p=0.011).

Prosjek DFS u ispitanica s primarnim LN bio je 7 mjeseci duži nego u ispitanica bez primarnih LN (p=0.027).

Nismo dokazali statistički značajnu razliku DFS u odnosu na LP status (p=0.743), histološki tip (p=0.450), histološki gradus (p=0.525), PD-L1 ICS status (p=0.085), niti za bilo koji od ispitivanih CTA prema obe ispitivane granične vrijednosti.

Iako nismo dokazali statistički značajnu korelaciju, kod niti jedne od ispitanica s prisutnim sekundarnim LN (N=14) te niti jedne od ispitanica s itTIL ≥ 10% (N=12) tijekom razdoblja praćenja od 48 mjeseci nije zabilježena pojava udaljenih metastaza niti lokalni povrat bolesti. Također niti jedna bolesnica s veličinom tumora ≤2.1 cm u navedenom razdoblju nije imala povrat bolesti.

5. RASPRAVA

Trostruko negativni karcinomi dojke (TNBC) su podtip karcinoma dojke koji se očituje agresivnijim kliničkim tijekom i ograničenim terapijskim mogućnostima. Zbog izostanka izražaja hormonskih receptora te receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER 2) kemoterapija je, do uvođenja inhibitora kontrolnih točaka i PARP inhibitora za bolesnice s nasljednim tipom mutacije BRCA 1 i 2 gena, uz kirurško liječenje bila jedina terapijska mogućnost za ovu skupinu tumora (8).

Većina TNBC pripada NST histološkom podtipu, što se podudara s rezultatima našeg istraživanja (73,74). Ova skupina tumora karakterizirana je višim histološkim gradusom i visokom proliferacijskom aktivnošću, na što ukazuju i rezultati našeg istraživanja (73,74).

Poznavanje biologije tumora i njegovog mikrookoliša, razumijevanje mehanizama kojima tumor izbjegava djelovanje imunog sutava te razvoj ciljane imunoterapije unijeli su dozu entuzijazma u liječenje različitih vrsta tumora, među kojima su i trostruko negativni karcinomi dojke. U tumorskom mikrookolišu nalazimo veliki broj čimbenika koji bi mogli utjecati na prognozu i odgovor na terapiju, stoga smo u ovom istraživanju pažnju usmjerili na stratifikaciju imunih stanica na osnovu smještaja i odnosa s tumorskim stanicama, uz korelaciju s izražajem CTA te PD-L1 ICS, koji mogu kočiti ili stimulirati njihovo nakupljanje.

„Limfocitima bogati tumori dojke“ (engl. lymphocyte predominant breast cancer - LP), karakterizirani su visokim brojem TIL-a u stromalnom odjeljku, koji se prema različitim publikacijama kreće između 50-60% (42,45,50). U našem je istraživanju u 11% trostruko negativnih karcinoma ≥50% stromalnog odjeljka bilo prožeto limfocitima na osnovu čega spadaju u skupinu tumora s LP statusom, što je je u skladu s rezultatima prethodnih studija (45,75). Dodatno, LP status je u našem istraživanju bio povezan s povećanim nakupljanjem itTIL i PD-L1 ICS ≥1% (42), što

ovu skupinu bolesnica čini idealnim kandidatkinjama za PD-L1 ciljanu terapiju (76,77). U skladu s prijašnjim istraživanjima, zabilježena je i povezanost LP statusa s visokom Ki-67 proliferacijskom aktivnošću (78,79). Ova korelacija nije do kraja razjašnjena, ali pretpostavlja se da genomski nestabilni tumori imaju višu proliferacijsku aktivnost koja uz izražaj sve većeg broja neoantigena, rezultira povećanom imunogeničnošću tumora (80,81). Iako su prijašnja istraživanja dokazala povoljan prognostički utjecaj LP statusa u TNBC, u ovom istraživanju nismo uspjeli potvrditi statistički značajan utjecaj LP statusa na DFS (51-54).

Postoje različiti mehanizmi uz pomoć kojih tumor može izbjeći imunosni odgovor. Jedan od čimbenika koji mogu narušiti ciklus protutumorske imunosti jest ligand programirane stanične smrti 1 (PD-L1) koji vezivanjem na specifične receptore na citotoksičnim T limfocitima smanjuje njihovu aktivnost (82). PD-L1 ICS određuje se primjenom SP142 protutijela i smatra se pozitivnim ukoliko je granularno ili točkasto citoplazmatsko obojenje imunih stanica vidljivo u ≥1% površine tumora (69). Pozitivan PD-L1 ICS zabilježen je u 49% TNBC u ovom istraživanju, a bio je povezan s negativnim kliničko-patološkim karakteristikama tumora, kao što su viši histološki gradus te povećana Ki-67 proliferacijska aktivnost što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja (83-87). Kao što je od ranije poznato, pozitivan PD-L1 ICS je i u našem istraživanju bio povezan s povećanim nakupljanjem sTIL, ali i s povećanim nakupljanjem itTIL (87,88). Dodatno, pronašli smo statistički značajnu povezanost između pozitivnog PD-L1 ICS i formiranja primarnih limfatičnih nakupina. Poznato je da PD-L1 mogu aktivirati molekule kao što je interferon gamma (IFN γ) kojega luče CD4+ Th1 limfociti, tako da je jedno od mogućih objašnjenja da antitumorski upalni odgovor dovodi do paradoksalne aktivacije liganda koji taj odgovor utišava (89).

Temeljem transkripcijskog profiliranja većina (oko 85%) TNBC pripada „basal-like“ podskupini tumora (14). Međutim, termin „basal-like“ je višeznačan, pa osim molekularne implikacije, također ima i imunohistokemijsko te morfološko značenje. Poznato je više histoloških karakteristika koje upućuju na BL morfologiju kao što su visoki gradus, visoki mitotski indeks, sincicijalni način rasta, naglašeni stanični pleomorfizam, gurajući invazivni rub, bogati limfocitni infitrat unutar i oko tumora, nekroza, fibroza te nalaz metaplastične komponente (15,17-22).

BLm je u našem istraživanju bila prisutna u 49% TNBC, što se slaže s rezultatima prethodnih istraživanja (90). Potvrdili smo i prethodne navode prema kojima je BLm povezana s višim histološkim gradusom te visokim proliferacijskim indeksom (73,74). Iako je prethodno opisana, u našem istraživanju nismo potvrdili povezanost BLm s dobi, LP statusom niti s veličinom tumora (15,17-22) .

Od ranije je poznat pozitivan izražaj CTA u karcinomima dojke, pri čemu su najviše istraživani NY-ESO-1 i antigeni iz porodice MAGE (58,59,62,71,72,91-94). CTA potiču nastajanje specifične B i T stanične imunosti, pa ih se razmatra kao potencijalne mete u razvoju ciljane imunoterapije, ali nedovoljno je istražen njihov utjecaj na aktivaciju i organizaciju imunog odgovora (63,65). Obzirom da se CTA antitijela koriste na eksperimentalnoj razini, ne postoji jasno određena granična vrijednost pri kojoj bi se tumor smatrao CTA pozitivnim. U našem istraživanju proučavali smo izražaj CTA koristeći dvije granične vrijednosti: arbitrarno određenu graničnu vrijednosti od 10% koja je korištena u prethodnim studijama (59,62,71,72), te graničnu vrijednost dobivenu prema medijanu za određeni CTA u našoj istraživanoj skupini.

Prema rezultatima dosadašnjih studija, izražaj NY-ESO-1 zabilježen u 9.3-28.6% TNBC (58,59,62,71,72,91-94). Pri korištenju granične vrijednosti od 10%, u

našem je istraživanju 20% tumora bilo NY-ESO-1 pozitivno, dok je pri korištenju granične vrijednosti prema medijanu, 38% tumora bilo pozitivno. Nismo dokazali statistički značajnu povezanost pozitivnog NY-ESO-1 izražaja s ispitivanim varijablama pri korištenju granične vrijednosti od 10%, ali prilikom korištenja granične vrijednosti prema medijanu pronašli smo statistički značajnu povezanost pozitivnog NY-ESO-1 izražaja s povećanim brojem itTIL-a, što je u skladu s pretpostavkom da tumorski antigeni pojačavaju imunološki odgovor te da je NY-ESO-1 izrazito imunogeničan. Povezanost TIL i NY-ESO-1 istraživana je do sada u malom broju radova (72,95), a prema dostupnoj literaturi do sada nije opisan pozitivan utjecaj NY-ESO-1 izražaja na akumulaciju itTIL-a.

Iako biološka uloga NY-ESO-1 nije još detaljno istražena, navodi se da ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, apoptozi te staničnom rastu (65). Prema rezultatima nekih istraživanja zabilježena je povezanost pozitivnog NY-ESO-1 izražaja s kliničko-patološkim karakteristikama tumora. Primjerice, u studiji Tessari i sur. NY-ESO-1 pozitivni tumori su bili povezani s visokim gradusom i zahvaćanjem limfnih čvorova (62). U našoj studiji nije zabilježena statistički značajna korelacija izražaja NY-ESO-1 antigena s kliničko-patološkim karakteristikama, što je u skladu s istraživanjem Hee Jin Lee i sur. (72).

Ono što MAGE A grupu antigena čini posebno zanimljivom je moguća povezanost s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (67). Za razliku od prethodnih radova, u našem istraživanju zabilježena je statistički značajna povezanost multi MAGE A izražaja s postojanjem bazalne morfologije pri korištenju granične vrijednosti od 10% (58,60,96). Čak 89% TNBC-a s BL morfološkim karakteristikama u našem istraživanju je bilo multi MAGE A pozitivno, što prema dostupnoj literaturi nije do sada opisano. Pri korištenju granične vrijednosti prema medijanu, jedina statistički značajna povezanost

pronađena je između izražaja multi MAGE A i višeg histološkog gradusa tumora, što je u skladu s prethodnim saznanjima (67).

Iako nismo potvrdili statističku značajnost, pri korištenju granične vrijednosti dobivene medijanom u našoj istraživanoj skupini, izražaj MAGE A1 je bio povezan s visokom proliferacijskom aktivnošću te većim promjerom tumora, na razini značajnosti 94% i 94.5%, što je u skladu s prethodnim studijama koje su utvrdile isto i za druge CTA (62,67).

Za duljinu preživljenja bez znakova povrata bolesti, u našem istraživanju potvrđene su neke ranije poznate korelacije, kao što je kraći DFS kod tumora s pozitivnim limfnim čvorovima, ali nismo uspjeli dokazati statističku povezanost DFS s histološkim gradusom, histološkim podtipom, Ki-67 proliferacijskim indeksom, povećanim brojem sTIL, PD-L1 ICS statusom te pojavom BL morfoloških karakteristika. Iako su ranije studije zabilježile različite rezultate vezane za prognostički utjecaj CTA izražaja u TNBC (57-62), u našoj studiji DFS nije korelirao s izražajem NY-ESO-1, multi MAGE A ni MAGE A1. Ono što iz našeg istraživanja možemo povezati s duljim DFS je do sada slabo istražen utjecaj formiranja limfatičnih nakupina te jednako slabo istražen utjecaj povećanog broja itTIL.

Postotak upalnih stanica u izravnom kontaktu s tumorskim stanicama (itTIL) ne očitava se u svakodnevnom kliničkom radu, jer se smatra da njihovo očitavanje nije jednako reproducibilno kao očitavanje sTIL, te da nemaju dodatnu kliničku vrijednost budući da većinom prate povećan broj sTIL. U našem istraživanju visoki broj itTIL zabilježen je kod 12% TNBC, što se podudara s rezultatima prethodnih istraživanja (97). U istraživanju Liu S. i sur., itTIL su bili povezani s mlađom životnom dobi bolesnica te s višim tumorskim gradusom (40). U našem istraživanju takvu poveznicu nismo pronašli, ali smo primjetili da su sve bolesnice s visokim brojem

itTIL-a bile PD-L1 ICS pozitivne, te da nijedna od 12 bolesnica s visokim itTIL nije imala povrat bolesti tijekom 48 mjeseci praćenja. Iako je za statističku potvrdu potrebno provesti istraživanje s većim brojem ispitanica, naši rezultati kao i rezultati studije Liu i sur. upućuju da bi broj itTIL-a mogao predstavljati prognostički vrijedan klinički podatak (40).

Iako je dobro poznato njihovo prognostičko značenje u drugim sijelima kao što je karcinom debelog crijeva, formiranje limfatičnih nakupina s ili bez germinativnog centra ne evaluira se kod karcinoma dojki u svakodnevnom kliničkom radu (98-100). Prema rezultatima prethodnih istraživanja postojanje LN povezuje se s višim histološkim gradusom tumora (101). Pretpostavka je da T stanični upalni odgovor dovodi do intratumorskog sazrijevanja B limfocita u karcinomima dojke (102), što dovodi do proizvodnje antitumorskih protutijela (103,104). Prema dostupnoj literaturi samo je u nekoliko radova istraživan prognostički utjecaj prisutnosti limfatičnih nakupina u TNBC, ali rezultati su oprečni. Prema rezultatima studije Lee i sur. (105) limfatične nakupine imaju povoljan prognostički utjecaj u TNBC, dok Vihervouri i sur. nisu dokazali njihovu prognostičku vrijednost (97).

U našem istraživanju primarne LN zabilježene su u 68%, a sekundarne u 14% uzoraka. Postojanje primarnih LN statistički je značajno koreliralo s duljim DFS u našem istraživanju, a niti jedna od 14 bolesnica sa sekundarnim LN nije imala progresiju bolesti tijekom intervala praćenja, što upućuje na prognostički značaj limfatičnih nakupina u TNBC koji bi trebalo dodatno istražiti na većem broju ispitanica (105).

U trenutnom razdoblju brzog napretka medicine i brojnih terapijskih opcija, sve je manje karcinoma koji imaju tako ograničene terapijske opcije i lošu prognozu kao TNBC. Razumijevanje biologije ove vrste tumora i njegove interakcije s

mikrookolišom, uz korelaciju sa markerima kao što su PD-L1 i CTA, koji mogu kočiti ili poticati imuni odgovor, mogu nam donijeti nova saznanja koja će doprinjeti unaprijeđenju načina liječenja, osobito stoga jer se CTA smatraju potencijalnim kandidatima za ciljano liječenje, te za razvoj antitumorskih cjepiva. Identifikacija i karakterizacija imunih stanica u tumorskom mikrookolišu na osnovu smještaja, stupnja organizacije i odnosa s tumorskim stanicama mogla bi pomoći u dodatnoj subklasifikaciji trostruko negativnih tumora u različite prognostičke skupine.

6. ZAKLJUČCI

1. „Lymphocyte predominant“ status zabilježen je u 11% trostruko negativnih karcinoma, a statistički je značajno korelirao s pozitivnim PD-L1 ICS statusom, povećanim brojem intratumoralnih TIL te višim Ki-67 proliferacijskim indeksom.

2. Pozitivan PD-L1 ICS zabilježen je u 49% trostruko negativnih karcinoma, a bio je statistički značajno povezan s višim Ki-67 proliferacijskim indeksom, višim histološkim gradusom, nakupljanjem intratumoralnih TIL te pojavom primarnih limfatičnih nakupina.

3. „Basal-like“ morfološke karakteristike zabilježene su u 49% trostruko negativnih karcinoma, a bile su statistički značajno povezane s višim Ki-67 proliferacijskim indeksom i višim histološkim gradusom tumora.

4. Izražaj multi MAGE A određen graničnom vrijednošću prema medijanu bio je pozitivan u 55% tumora, a bio je statistički značajno povezan s višim histološkim gradusom.

5. Izražaj NY-ESO-1 određen graničnom vrijednošću prema medijanu bio je pozitivan u 38% trostruko negativnih karcinoma, a bio je statistički značajno povezan s povećanim brojem intratumoralnim TIL.

6. Izražaj MAGE A1 određen graničnom vrijednošću prema medijanu bio je pozitivan u 53% trostruko negativnih karcinoma, a bio je povezan s većim promjerom tumora te višim Ki-67 proliferacijskim ineksom na razini značajnosti 94% i 94.5%.

7. Izražaj multi MAGE A određen graničnom vrijednošću od 10% bio je pozitivan u 80% trostruko negativnih karcinoma, a bio je statistički značajno povezan s pojavom „basal-like“ morfoloških karakteristika.

8. NY-ESO-1 i MAGE A1 izražaj određen graničnom vrijednošću od 10% nisu korelirali s ispitivanim kliničko-patološkim varijablama.

9. Dulje preživljenje bez znakova povrata bolesti (DFS) bilo je statistički značajno povezano s negativnim limfnim čvorovima te prisutnošću primarnih limfatičnih nakupina.

10. Iako nismo uspjeli dokazati statistički značaj, niti jedna od ispitanica s intratumoralnim TIL ≥10% (N=12), te s prisutnim sekundarnim limfatičnim nakupinama (N=14) nije imala znakove povrata bolesti u intervalu praćenja od 48 mjeseci.

11. Razumijevanje biologije trostruko negativnih karcinoma i njihove interakcije s mikrookolišom, uz korelaciju s markerima kao što su PD-L1 i CTA, koji mogu kočiti ili poticati imuni odgovor, mogu donijeti nova saznanja koja će doprinjeti unaprijeđenju načina liječenja, osobito stoga jer se CTA smatraju potencijalnim kandidatima za ciljano liječenje, te za razvoj antitumorskih cjepiva.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja. Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi povezanost povećanog broja stromalnih limfocita (sTIL), intratumoralnih limfocita (itTIL), limfatičnih nakupina i izražaja antigena za rak testisa (CTA) u trostruko negativnim karcinomima dojke s dužinom preživljenja bez znakova povrata bolesti (DFS). Također, željeli smo istražiti utjecaj izražaja CTA na broj TIL, formiranje limfatičnih nakupina i pojavu „basal-like“ morfoloških karakteristika u ovoj skupini karcinomima dojke. Dodatno smo željeli utvrditi povezanost analiziranih pokazatelja s kliničko-patološkim prognostičkim pokazateljima kao što su dob, klinički stadij, veličina tumora, histološki gradus, histološki podtip, „basal-like“ morfologija i proliferacijska aktivnost mjerena primjenom Ki-67 protutijela.

Materijali i metode. U studiju je uključeno 97 bolesnica s dijagnozom ranog TNBC-a koje su u razdoblju u razdoblju od 1. siječnja 2017. do 31. prosinca 2018. godine operirane u četiri Klinička bolnička centra, kod kojih nije provedeno neoadjuvantno liječenje. Na hemalaun-eozinom obojenim patohistološkim uzorcima analizirana su obilježja tumora i tumorskog mikrookoliša. Uzorci su dodatno bojani imunohistokemijski primjenom protutijela za PD-L1 (SP-142) i CTA (NY-ESO-1, MAGE A1 i multi MAGE A). Pri očitavanju izražaja CTA korištene su dvije granične vrijednosti: granična vrijednost određena prema medijanu određenog CTA u ispitivanoj skupini, te arbitrarno postavljena granična vrijednost od ≥10% ukupnog broja tumorskih stanica.

Za usporedbu kategorijskih varijabli korišten je $\chi 2$ test i test logističke regresije. Za usporedbu kvantitativnih varijabli i ispitivanih karakteristika tumora korišten je Mann-Whitney test. Coxovom regresijskom analizom utvrđena je povezanost istraživanih varijabli s dužinom DFS bolesnika (u mjesecima). U analizi preživljenja korištena je Kaplan-Meierova krivulja preživljenja i log-rank test.

Rezultati. PD-L1 ICS ≥1% zabilježen je u 47 uzoraka (49%), a statistički je značajno korelirao s histološkom gradusom, povećanim brojem sTIL i formiranjem LN. BL morfološke karakteristike zabilježene su u 47 (49%) TNBC, a statistički su značajno korelirale s višim Ki-67 proliferacijskim indeksom (p=0.001) i višim histološkim gradusom (p=0.005). Na osnovu visoke razine sTIL 11 TNBC (11%) svrstano je u LP skupinu, a bili su statistički značajno povezani s pozitivnim PD-L1 ICS (p=0.001), višim Ki-67 proliferacijskim indeksom (p=0.04) te većim brojem itTIL (p<0.001). Izražaj NY-ESO-1 bio je pozitivan u 37 TNBC (38%), uz značajnu korelaciju s povećanim brojem itTIL (p = 0.039). Izražaj multi MAGE A bio je pozitivan u 77 (79%) TNBC, a korelirao je s pojavom BL morfologije. Dulje preživljenje bez znakova povrata bolesti (DFS) bilo je statistički značajno povezano s negativnim limfnim čvorovima (p=0.011) te prisutnošću primarnih LN (p = 0.027). Iako nismo uspjeli dokazati statističku značajnost, niti jedna od ispitanica s intratumoralnim TIL ≥10% (N=12), te s prisutnoću sekundarnih limfatičnih nakupina (N=14) nije imala znakove povrata bolesti u intervalu praćenja od 48 mjeseci.

Zaključak. Dokazali smo da prisutnost primarnih LN ima prognostički značaj u trostruko negativnim karcinomima dojke, te da identifikacija i karakterizacija imunih stanica u tumorskom mikrookolišu na osnovu smještaja, stupnja organizacije i odnosa s tumorskim stanicama može pomoći u dodatnoj subklasifikaciji trostruko negativnih tumora u različite prognostičke skupine.

CTA se smatraju potencijalnim kandidatima za ciljano liječenje i za razvoj antitumorskih cjepiva. Tome u prilog govori i pozitivan izražaj NY-ESO-1 zabilježen u 38% TNBC u ovom istraživanju, uz statistički značajnu povezanost s povećanim brojem itTIL.

Razumijevanje biologije trostruko negativnih tumora i njegove interakcije s mikrookolišem, uz korelaciju sa markerima kao što su PD-L1 i CTA, koji mogu kočiti ili poticati imuni odgovor, donosi nova saznanja koja mogu doprinjeti unaprijeđenju načina liječenja za ovu terapijski vrlo ograničenu skupinu tumora.

8. SUMMARY

Objectives. The aim of this study was to determine the association of increased number of stromal lymphocytes (sTIL), intratumoral lymphocytes (itTIL), lymphoid aggregates and expression of cancer testis antigen (CTA) in triple negative breast cancers with disease-free survival (DFS). We also wanted to investigate the influence of CTA expression on the amount of TIL, the formation of lymphoid aggregates and the occurance of "basal-like" morphological characteristics in this group of breast cancers. Additionally, we wanted to study the relationship of the analyzed variables with clinical-pathological prognostic characteristic such as age, clinical stage, tumor size, histological grade, histological subtype, "basal-like" morphology and Ki-67 proliferation activity.

Materials and methods. The study included 97 patients with a diagnosis of early TNBC who underwent surgery in four Clinical Hospital Centers between January 1st, 2017 and December 31st, 2018, with no neoadjuvant treatment administration. Tumor characteristics and tumor microenvironment were analyzed on hemalaun-eosin stained pathohistological slides. The samples were additionally immunostained using antibodies for PD-L1 (SP-142) and CTA (NY-ESO-1, MAGE A1 and multi MAGE A). In evaluating CTA expression, two cut-off values were used: a value determined according to the median value for each CTA in the examined group, and an arbitrarily set value of ≥10%.

The $\chi 2$ test and the logistic regression test were used to compare categorical variables. The Mann-Whitney test was used to compare quantitative variables and examined tumor characteristics. Cox regression analysis was used to determine the association of all investigated variables with the DFS (in months). For the survival analysis, the Kaplan-Meier survival curve and the log-rank test were used.

Results. PD-L1 ICS ≥1% was recorded in 47 samples (49%), and statistically significantly correlated with histological grade, increased number of sTIL and LA formation. BL morphological characteristics were recorded in 47 (49%) TNBC, and statistically significantly correlated with higher Ki-67 proliferation index (p=0.001) and higher histological grade (p=0.005). Based on the level of sTIL, 11 TNBCs (11%) were assigned to the LP group and were statistically significantly associated with positive PD-L1 ICS (p=0.001), higher Ki-67 proliferation index (p=0.04) and higher number of itTIL (p<0.001). NY-ESO-1 expression was positive in 37 TNBCs (38%), with a significant correlation with increased number of itTIL (p = 0.039). The expression of multi MAGE A was positive in 77 (79%) TNBC and correlated with occurance of BL morphology. Longer disease-free survival (DFS) was associated with negative lymph nodes (p=0.011) and the presence of primary LA (p = 0.027). Although we failed to prove statistical significance, none of the patients with intratumoral TIL ≥10% (N=12) and with the presence of secondary LA (N=14) had signs of disease recurrence in 48 months long follow-up period.

Conclusion. We proved that the presence of primary LA has a prognostic significance in the triple negative breast cancer, so identification and characterization of immune cells in the tumor microenvironment based on location, degree of organization and relationship with tumor cells can help in additional subclassification of triple-negative cancers into different prognostic groups.

CTAs are considered potential candidates for targeted treatment and for the development of antitumor vaccines. This is supported by the positive expression of NY-ESO-1 recorded in 38% of TNBC in this study, with a statistically significant association with increased number of itTIL.

Understanding of triple-negative breast cancer biology and its interaction with the microenvironment, along with correlations with markers such as PD-L1 and CTA, which can inhibit or stimulate the immune response, brings new knowledge that can contribute to the improvement of treatment for this group of tumors with limited treatment options.

9. LITERATURA

1. Global Burden of Disease 2019 Cancer Collaboration. Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *JAMA Oncol.* 2022;8(3):420–444.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2020. Bilten br.45.
3. ECIS – European Cancer Information System, dostupno na https://ecis.jrc.ec.europa.eu
4. Jani C, Salciccioli I, Rupal A i sur. Trends in Breast Cancer Mortality Between 2001 and 2017: An Observational Study in the European Union and the United Kingdom. JCO Global Oncology. 2021;7:1682-93.
5. Lokuhetty D, White VA, Watanabe R, Cree IA, ur. WHO Classification of Tumors, Breast Tumours, 5th ed.; IARC: Lyon, France, 2019.
6. Burstein HJ, Curigliano G, Thürlimann B i sur. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. Annals of Oncology. 2021;32(10):1216-35.
7. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. Stable portrait of breast tumors during progression: Data from biology, pathology and genetics. Endocr.-Relatated Cancer. 2004;11:497–522.
8. Carey LA, Dees EC, Sawyer L i sur. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. Clin. Cancer Res. 2007;13:2329–34.
9. Allison KH, Hammond ME, Dowsett M i sur. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. Journal of Clinical Oncology. 2020;38(12):1346-66.
10. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB i sur. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406(6797):747-52.

11. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X i sur. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. J Clin Invest. 2011;121(7):2750-67.
12. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X i sur. (2016). Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. PLoS ONE. 2016;11(6):e0157368.
13. Jiang YZ, Ma D, Suo C i sur. (2019). Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. Cancer Cell. 2019;35(3):428-40.
14. Prat A, Pineda E, Adamo B i sur. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. The Breast. 2015;24:S26-35.
15. Gazinska P, Grigoriadis A, Brown JP i sur. Comparison of basal-like triple-negative breast cancer defined by morphology, immunohistochemistry and transcriptional profiles. Mod Pathol. 2013;26(7):955-66.
16. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. Mod pathol. 2010;23(1):123-33.
17. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. J Clin Oncol 2008;26:2568–81.
18. Livasy CA, Karaca G, Nanda R i sur. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Mod Pathol. 2006;19:264–71.
19. Haupt B, Ro JY, Schwartz MR. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. Arch Pathol Lab Med. 2010;134:130–3.
20. Da Silva L, Clarke C, Lakhani SR. Demystifying basal-like breast carcinomas. J Clin Pathol. 2007;60:1328–32.

21. Putti TC, El-Rehim DM, Rakha EA i sur. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. Mod Pathol. 2005;18:26–35.
22. Winter J. Morphological and immunophenotypic analysis of basal-like carcinoma of the breast. Biosci Horiz. 2008;1:19–27.
23. Amin MB, Edge SB, Greene FL, ur. AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed. Springer, 2019.
24. Wang L. Early diagnosis of breast cancer. Sensors. 2017;17(7):1572.
25. American College of Radiology (ACR) Breast Imaging Reporting and Data System Atlas (BI-RADS Atlas). Reston, Va: American College of Radiology; 2003.
26. Belac Lovasić I , Martina Bašić Koretić M , Podolski P i sur. Smjernice Hrvatskoga onkološkog društva za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnica/ka oboljelih od invazivnog raka dojke. Liječ Vjesn. 2022;144:295–305
27. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S i sur. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-updagger. Ann Oncol. 2019;30(8):1194–220
28. Balatoni T, Mohos A, Papp E i sur. Tumor-infiltrating immune cells as potential biomarkers predicting response to treatment and survival in patients with metastatic melanoma receiving ipilimumab therapy. Cancer Immunol. Immunother. 2018;67:141–51.
29. Zheng X, Song X, Shao Y i sur. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: A meta-analysis. Oncotarget; 2017;8:e57386.
30. Galon J, Pagès F, Marincola FM i sur. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. J. Transl. Med. 2012;10:1-4.

31. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG i sur. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. J. Clin. Oncol. 2011;29:1949–55.
32. Liu S, Foulkes WD, Leung S i sur. Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. Breast Cancer Research. 2014;16(5):1-2.
33. Bates GJ, Han CL, Garcia JF, Banham AH. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. Journal of clinical oncology. 2006;24(34):5373-80.
34. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N i sur. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer research. 2009;69(5):2000-9.
35. West NR, Kost SE, Martin SD i sur. Tumour-infiltrating FOXP3+ lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. British journal of cancer. 2013;108(1):155-62.
36. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S i sur. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. The Journal of clinical investigation. 2013;123(7):2873-92.
37. Teschendorff AE, Gomez S, Arenas A i sur. Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. BMC cancer. 2010;10:1-20.
38. Qi W, Huang X, Wang J. Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment. Cellular Immunology. 2013;285(1-2):18-22.

39. Shen M, Wang J, Ren X. New insights into tumor-infiltrating B lymphocytes in breast cancer: clinical impacts and regulatory mechanisms. Frontiers in immunology. 2018;9:470.
40. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. Breast Cancer Res. 2012;14:1-14.
41. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ i sur. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. Ann. Oncol. 2014;25:1536–43.
42. Salgado R, Denkert C, Demaria S i sur. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann Oncol. 2015;26:259–71.
43. Loi S, Michiels S, Adams S i sur. The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: clinical utility in an era of checkpoint inhibition. Annals of Oncology. 2021;32(10):1236-44.
44. Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: Clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. Ann. Oncol. 2017;28: 2977–84.
45. Denkert C, Loibl S, Noske A i sur. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J. Clin. Oncol. 2010;28:105–13.
46. Ahn S, Cho J, Sung J i sur. The prognostic significance of tumor-associated stroma in invasive breast carcinoma. Tumor Biol. 2012;33:1573–80.
47. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W i sur. Predicting therapeutic efficacy of endocrine therapy for stage IV breast cancer by tumorinfiltrating lymphocytes. Mol. Clin. Oncol. 2020;13: 195–202.

48. Luen SJ, Salgado R, Fox S i sur. Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and docetaxel: A retrospective analysis of the CLEOPATRA study. Lancet Oncol. 2017;18:52–62.
49. Emens LA, Cruz C, Eder JP i sur. Long-term clinical outcomes and biomarker analyses of atezolizumab therapy for patients with metastatic triple-negative breast cancer: A phase 1 study. JAMA Oncol. 2019;5:74–82.
50. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC i sur. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without Carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. J Clin Oncol. 2015;33:983–91.
51. Loi S, Sirtaine N, Piette F, i sur. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. J Clin Oncol. 2013;31(7):860–7.
52. Adams S, Gray RJ, Demaria S i sur. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Triple Negative Breast Cancers (TNBC) from two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. J Clin Oncol. 2014;32:2959–66.
53. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes is prognostic and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. Ann Oncol. 2014.
54. Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V i sur. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. Ann Oncol. 2015;26(8):1698–704.

55. Nin DS, Deng LW. Biology of Cancer-Testis Antigens and Their Therapeutic Implications in Cancer. Cells. 2023;12(6):926.
56. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: Review, standardization, and commentary. Cancer Immun. 2004;4:1.
57. Grigoriadis A, Caballero OL, Hoek KS i sur. CT-X antigen expression in human breast cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009;106:13493–98.
58. Curigliano G, Viale G, Ghioni M i sur. Cancer–testis antigen expression in triple-negative breast cancer. Ann. Oncol. 2011;22:98–103.
59. Ademuyiwa FO, Bshara W, Attwood K i sur. NY-ESO-1 cancer testis antigen demonstrates high immunogenicity in triple negative breast cancer. PLoS ONE. 2012;7:e38783.
60. Mrklić I, Spagnoli GC, Juretić A, Pogorelić Z, Tomić S. Co-expression of cancer testis antigens and topoisomerase 2-alpha in triple negative breast carcinomas. Acta Histochem. 2014;116:740–6.
61. Karn T, Pusztai L, Ruckhäberle E i sur. Melanoma antigen family A identified by the bimodality index defines a subset of triple negative breast cancers as candidates for immune response augmentation. Eur. J. Cancer. 2012;48:12–23.
62. Tessari A, Pilla L, Silvia D i sur. Expression of NY-ESO-1, MAGE-A3, PRAME and WT1 in different subgroups of breast cancer: An indication to immunotherapy?. Breast. 2018;42:68–73.
63. Vansteenkiste JF, Cho BC, Vanakesa T i sur. Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2016;17:822–5.

64. Gjerstorff MF, Burns J, Ditzel HJ. Cancer-germline antigen vaccines and epigenetic enhancers: future strategies for cancer treatment. Exp. Opin. Biol. Ther. 2010;10(7):1061–75.
65. Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J i sur. NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives. Front. Immunol. 2018;9:947.
66. Nicholaou T, Ebert L, Davis ID i sur. Directions in the immune targeting of cancer: lessons learned from the cancer-testis Ag NY-ESO-1. Immunol Cell Biol. 2006;84:303–17.
67. Mahmoud AM. Cancer testis antigens as immunogenic and oncogenic targets in breast cancer. Immunotherapy. 2018;10(9):769-78.
68. Schooten E, Di Maggio A, van Bergen en Henegouwen PMP, Kijanka MM. MAGE-A antigens as targets for cancer immunotherapy. Cancer Treatment Reviews. 2018;67:54–62.
69. Schmid P, Adams S, Rugo HS i sur. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. N. Engl. J. Med. 2018;379:2108–21.
70. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R i sur. Assessment of Ki67 in breast cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. J. Natl. Cancer Inst. 2011;103:1656–64.
71. Chen YT, Ross DS, Chiu R i sur. Multiple cancer/testis antigens are preferentially expressed in hormone-receptor negative and high-grade breast cancers. PLoS ONE. 2011;6:e17876.
72. Lee HJ, Kim JY, Song IH, Park IA, Yu JH, Gong G. Expression of NY-ESO-1 in triple-negative breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and a good prognosis. Oncology. 2015;89:337–44.

73. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K i sur. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. Breast Cancer Res. 2007;9:R4.
74. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS i sur. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. Histopathology. 2006;49:22-34.
75. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. JAMA oncology. 2016;2(10):1354-60.
76. Planes-Laine G, Rochigneux P, Bertucci F i sur. PD-1/PD-L1 targeting in breast cancer: the first clinical evidences are emerging. A literature review. Cancers. 2019;11(7):1033.
77. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH i sur. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 2014;515:568-71;
78. Yoon CI, Park S, Cha YJ i sur. Associations between absolute neutrophil count and lymphocyte-predominant breast cancer. The Breast. 2020;50:141-8.
79. Pruneri G, Vingiani A, Bagnardi V i sur. Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. Annals of oncology. 2016;27(2):249-56.
80. Wang Y, Zong B, Yu Y i sur. Ki67 Index Changes and Tumor-Infiltrating Lymphocyte Levels Impact the Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer Patients With Residual Disease After Neoadjuvant Chemotherapy. Frontiers in Oncology. 2021;11:e668610.
81. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L i sur. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. Mol Cancer Ther. 2017;16(11):2598–608.

82. Chen L, Han X. Anti–PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: Past, present, and future. J. Clin. Investig. 2015;125:3384–91.

83. Wang X, Liu Y. PD-L1 expression in tumor infiltrated lymphocytes predicts survival in triple-negative breast cancer. Pathol.-Res. Pract. 2020;216:e152802.

84. Cerbelli B, Pernazza A, Botticelli A i sur. PD-L1 expression in TNBC: A predictive biomarker of response to neoadjuvant chemotherapy?. Annals of Oncology. 2017;28:v30

85. Li Y, Vennapusa B, Chang CW i sur. Prevalence study of PD-L1 SP142 assay in metastatic triple-negative breast cancer. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2021;29:258.

86. Polónia A, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Schmitt FC, Paredes J. Prognostic value of stromal tumour infiltrating lymphocytes and programmed cell death-ligand 1 expression in breast cancer. J. Clin. Pathol. 2017;70:860–7.

87. Evangelou Z, Papoudou-Bai A, Karpathiou G i sur. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: Clinicopathological analysis in women younger than 40 years old. Vivo. 2020;34:639–47.

88. Catacchio I, Silvestris N, Scarpi E, Schirosi L, Scattone A, Mangia A. Intratumoral, rather than stromal, CD8+ T cells could be a potential negative prognostic marker in invasive breast cancer patients. Transl. Oncol. 2019;12:585–95.

89. Chen S, Crabill GA, Pritchard TS i sur. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. Journal for immunotherapy of cancer. 2019;7:1-2.

90. Badowska-Kozakiewicz AM, Budzik MP, Liszcz A i sur. Clinicopathological factors associated with novel prognostic markers for patients with triple negative breast cancer. Archives of Medical Science: AMS. 2019;15(6):1433.

91. Badovinac Crnjevic T, Spagnoli G, Juretic A, Jakic-Razumovic J, Podolski P, Saric N. High expression of MAGE-A10 cancer-testis antigen in triple-negative breast cancer. Med. Oncol. 2012;29:1586–91.
92. Raghavendra A, Kalita-de Croft P, Vargas AC i sur. Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens is enriched in triple-negative invasive breast cancers. Histopathology. 2018;73:68–80.
93. Bandic D, Juretic A, Sarcevic B i sur. Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: Retrospective immunohistochemical study. Croat. Med. J. 2006;47;32–41.
94. Curigliano G, Bagnardi V, Ghioni M i sur. Expression of tumor-associated antigens in breast cancer subtypes. Breast. 2020;49:202–9.
95. Theurillat JP, Ingold F, Frei C i sur. NY-ESO-1 protein expression in primary breast carcinoma and metastases—correlation with CD8+ T-cell and CD79a+ plasmacytic/B-cell infiltration. International journal of cancer. 2007;120(11):2411-7.
96. Hamai A, Memeo L, Colarossi C i sur. Expression of MAGE-A antigens is frequent in triple-negative breast cancers but does not correlate with that of basal-like markers. Annals of oncology. 2011;22(4):986-7.
97. Vihervuori H, Autere TA, Repo H i sur. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8+ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2019;145:3105–14.
98. Remark R, Alifano M, Cremer I i sur. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: Influence of tumor origin. Clin. Cancer Res. 2013;19:4079–91.

99. Di Caro G, Bergomas F, Grizzi F i sur. Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. Clin. Cancer Res. 2014;20:2147–58.

100. Dieu-Nosjean MC, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. Immunol. Rev. 2016;271:260–75.

101. Figenschau SL, Fismen S, Fenton KA, Fenton C, Mortensen ES. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. BMC Cancer. 2015;15:1-11.

102. Coronella JA, Spier C, Welch M i sur. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. J. Immunol. 2002;169:1829–36.

103. Goenka R, Barnett LG, Silver JS i sur. Cutting edge: Dendritic cellrestricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. J. Immunol. 2011;187:1091–5.

104. Roncati L, Barbolini G, Piacentini F, Piscioli F, Pusiol T, Maiorana A. Prognostic factors for breast cancer: An immunomorphological update. Pathol. Oncol. Res. 2016;22;449–52.

105. Lee HJ, Park IA, Song IH i sur. Tertiary lymphoid structures: Prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. J. Clin. Pathol. 2016;69:422–30.

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Toni Čeprnja, dr. med.

Datum rođenja: 5.2.1993.

Adresa: Mandalinski put 7, 21 000 Split

Mobitel: +385 91 988 7251

E-mail: tceprnja@mefst.hr

ŠKOLOVANJE

1999. – 2007.	Osnovna škola „Petar Kanavelić“, Korčula
2007. – 2011.	III. (Prirodoslovno-matematička) gimnazija, Split
2011. – 2017.	Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
2019. – 2022.	Poslijediplomski doktorski znanstveni studij "Biologija novotvorina", Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

RADNO ISKUSTVO

- 23.10.2017. – 22.3.2018. KBC Split, doktor medicine pripravnik
- 20.4.2018. – 9.10.2019. Zavod za hitnu medicinu Dubrovačko-neretvanske županije, Doktor medicine u timu T1 hitne pomoći – ispostava Korčula
- od 24.10.2019. KBC Split, Klinički zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Doktor medicine - specijalizant patologije i citologije

KONGRESI

- **10. MEDIP**, Zagreb, 4. ožujka - 6. ožujka 2022.
- **15. Hrvatski onkološki kongres**, Opatija, 31. ožujka - 4. travnja 2022.
- **XL Saltykow Memorial Meeting - Vinkovci Dermatopathology Symposium**, Vinkovci, 31. ožujka - 1. travnja 2023.
- **16. Hrvatski onkološki kongres**, 20. travnja - 23. travnja 2023.

OBJAVLJENI ZNANSTVENI RADOVI

- **Toni Čeprnja** , Marion Tomičić , Maja Vrebalov Cindro , Sanja Žužić Furlan , Marko Rađa. Liječenje streptokoknog tonzilofaringitisa u ambulantama opće/ obiteljske medicine Doma zdravlja Splitsko-dalmatinske županije. Medicina familiaris Croatica : časopis Hrvatske udružbe obiteljske medicine, Vol. 26 No. 1-2, 2018
- Asija Rota Čeprnja , Mirjana Jukica , Vesna Bilanđić , **Toni Čeprnja** , Dinko Pivalica. Bobath koncept u habilitaciji visokoneurorizične djece. Paediatr Croat. 2019; 63 (Supl 1): 112-119.
- Meter M, Meter D, **Čeprnja T**, Perkovic D. Left Atrial Myxoma and Antiphospholipid Syndrome—A Case Report. International Journal of Angiology. 2021 Dec 11.
- Rota Čeprnja A, Parlov M, Kuzmičić S, Bilandžić V, Rota M, **Čeprnja T**. Ravno stopalo u djece. Hrvatski časopis zdravstvenih znanosti. 2022 May 3;2(1):53-8.
- **Čeprnja T**, Mrklić I, Perić Balja M, Marušić Z, Blažićević V, Spagnoli GC, Juretić A, Čapkun V, Tečić Vuger A, Vrdoljak E, Tomić S. Prognostic Significance of Lymphocyte Infiltrate Localization in Triple-Negative Breast Cancer. Journal of Personalized Medicine. 2022 Jun;12(6):941.
- Rota Čeprnja A, Kuzmanić Šamija R, Šitum Čeprnja Z, Jakus N, Bečić K, **Čeprnja T**. The effect of the Covid-19 pandemic on pediatric physiatric health care in Croatia among children with neurological risk: a retrospective study. PM & R: the Journal of Injury, Function, and Rehabilitation. 2022 Oct 17.

STRUČNA PREDAVANJA

- **Stručni kolegij Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split:** *Patohistološke promjene posteljice kod Covid-19 infekcije*, Split, 30. svibnja 2022.

- **Stručni kolegij Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb:** *Tumori pinealne regije*, Zagreb, 29. ožujka 2023.

EDUKACIJA

- **Edukacija mrtvozornika**, Zagreb, 03. veljače 2023.

AKTIVNOSTI

- Od 2015. do 2017. član Studentskog zbora Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu kao predstavnik studenata

- Od 2015. do 2017. član Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu kao predstavnik studenata

- Od 2017. član Hrvatske liječničke komore

- Od 2019. član Hrvatskog društva patologa

- Od 2019. član Hrvatskog liječničkog zbora

- Od 2019. član Europskog društva patologa

VJEŠTINE

- Aktivno se služim **engleskim jezikom**

- Završena **osnovna glazbena škola – smjer glasovir**

- Posjedujem **vozačku dozvolu** (B kategorije)