



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET  
AKADEMSKE DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

KLINIČKA VREDNOST ODREĐIVANJA PRISUSTVA  
TUMOR INFILTRIŠUĆIH LIMFOCITA U BOLESNICA SA  
KARCINOMOM DOJKE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Doc. dr Tatjana Ivković Kapiel

Kandidat: Asist. dr Ivana Kolarov Bjelobrk

Novi Sad, 2015. godine

## REČ AUTORA:

*Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, doc. dr Tatjani Ivković-Kapicl na pomoći i podršci tokom celog procesa izrade disertacije.*

*Takođe se zahvaljujem i osoblju odeljenja za patohistološku dijagnostiku i molekularnu patologiju Instituta za onkologiju Vojvodine na pruženoj pomoći.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem mojoj tetki prof. dr Darjani Jovanović i prof. dr Dušanu Jovanoviću na podsticaju, sugestijama i praktičnim savetima tokom izrade disertacije.*

*Iznad svega sam zahvalna svojoj porodici koja je bila nezamenjivi oslonac u ovom radu.*

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ivana Kolarov Bjelobrk
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Doc. dr Tatjana Ivković-Kapicl, docent
Naslov rada: NR	Klinička vrednost određivanja prisustva tumor infiltrišućih limfocita u bolesnica sa karcinomom dojke
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Republika Srbija, Novi Sad, Ulica Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 7 / stranica 154 / slika 14 / grafikona 24 / tabela 11 / referenci 259/
Naučna oblast: NO	Medicinske nauke
Naučna disciplina: ND	Onkologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Karcinom dojke; Tumor infiltrišući

	limfociti; CD4+, CD8+ T limfociti; Imunološki faktori; Prognoza
UDK	618.19-006.6-037
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>UVOD: Glavni problem u lečenju karcinoma dojke je kako na osnovu kliničke klasifikacije i morfoloških osobina tumora predvideti njegovo dalje ponašanje. Vrlo često ni kombinacija standardnih prognostičkih faktora ne daje odgovor o potrebi davanja adjuvantne hemioterapije. U cilju sprovođenja adekvatne dalje terapije karcinoma dojke i otkrivanja agresivnih tipova tumora, a nakon hirurškog lečenja, postoji stalna potreba za pronalaženjem novih pokazatelja pomoću kojih bi se identifikovale bolesnice koje imaju povećan rizik od razvoja relapsa bolesti.</p> <p>CILJEVI: Ciljevi su bili da se utvrdi prisustvo, lokalizacija i distribucija tumor infiltrišućih limfocita, kako ukupnih, tako i CD4+ i CD8+ T limfocita u tumoru dojke, njihova povezanost sa standardnim prognostičkim parametrima, kao i njihov prognostički značaj tj. razlike u nivou infiltracije limfocita u tumoru u odnosu na pojavu relapsa bolesti i dužinu preživljavanja.</p> <p>METOD: Istraživanjem je obuhvaćeno 120 bolesnica sa invazivnim duktalnim karcinomom, sa tumorom lokalizovanim samo u dojci, bez zahvatanja kože i grudnog mišića, sa veličinom tumora do 5 cm, bez udaljenih visceralnih i koštanih metastaza, koje su operisane u Institutu za onkologiju Vojvodine. U istraživanje su</p>

uključene bolesnice bez metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame i bolesnice sa metastazama u limfnim čvorovima pazušne jame. Istraživanjem nisu obuhvaćene bolesnice koje su primale neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju, kao ni bolesnice sa multifokalnim i multicentričnim tumorima.

**REZULTATI:** Gust limfocitni infiltrat uočen je u 14% tumora dojke, umeren limfocitni infiltrat uočen je u 38%, a oskudan u 43% tumora dojke. Limfocitni infiltrat nije uočen u 5% tumora. Gust infiltrat CD4+ limfocita uočen je u 8% tumora dojke, umeren u 44%, a oskudan u 43% tumora dojke. CD4+ limfociti nisu uočeni u 5% tumora. Gust infiltrat CD8+ limfocita uočen je u 1% tumora dojke, umeren u 23%, a oskudan u 66% tumora dojke. CD8+ limfociti nisu uočeni u 10% tumora. Utvrđena je pozitivna povezanost između nivoa TIL-a i CD4+ limfocita i veličine tumora, histološkog stepena diferentovanosti tumora, prisustva metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame, HER-2 statusa, tripl negativnog tumora i relapsa bolesti. Utvrđena je negativna povezanost između nivoa TIL-a i CD4+ limfocita i estrogen i progesteron receptora, kao i godina starosti. Utvrđena je pozitivna povezanost između nivoa CD8+ limfocita i histološkog gradusa tumora, kao i HER-2 statusa. Utvrđena je negativna povezanost između nivoa CD8+ limfocita i estrogen i progesteron receptora, kao i godina starosti.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati ovog istraživanja pokazuju povezanost tumor infiltrirajućih limfocita i CD4+ limfocita sa brojnim negativnim prognostičkim faktorima, te kraćim vremenom slobodnog intervala bez bolesti, što sve ukazuje na to da su

	tumor infiltrišući limfociti kao i CD4+ limfociti loš prognostički faktor kod bolesnica sa rakom dojke.
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	06.02.2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član:

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
MEDICAL FACULTY**

**KEY WORD DOKUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD. Thesis
Author: AU	Ivana Kolarov Bjelobrk
Mentor: MN	Doc. dr Tatjana Ivković-Kapicl, MD, PhD
Title: TI	The clinical value of determining the presence of tumor infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer
Language of text: LT	Serbian(roman)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova st.3
Physical description: PD	chapters 7 / pages 154 / tables 11 /graphics 24 / pictures 14 / reference 259 /
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Oncology
Subject, Key words SKW	Breast cancer; Tumor Infiltrating Lymphocytes; CD4+, CD8+ T Lymphocytes; Immunologic Factors; Prognosis;

UC	618.19-006.6-037
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	none
Abstract: AB	<p><b>INTRODUCTION:</b> The main problem in the treatment of breast cancer that based on clinical classification and morphological characteristics of the tumor to predict its future behavior. Very often, not a combination of standard prognostic factors does not answer the need of giving adjuvant chemotherapy. In order to implement adequate further treatment of breast cancer and detection aggressive types of tumor, after surgical treatment, there is a constant need to find new indicators by which we can identify patients who have an increased risk of relapse.</p> <p><b>OBJECTIVES:</b> The objectives were to determine the presence, localization and distribution of tumor infiltrating lymphocytes, in total, as well as CD4+ and CD8+ T lymphocytes in breast cancer, their correlation with standard prognostic parameters, as well as their prognostic value i.e. differences in the level of infiltration of lymphocytes in a tumor in relation to the occurrence of disease relapse and survival.</p> <p><b>METHOD:</b> The study included 120 patients with invasive ductal carcinoma, tumor localized only in the breast without involvement of the skin and pectoral muscle, the size of tumors up to 5 cm without distant visceral and bone metastases, which are operated at the Institute of Oncology. The study included patients without metastases in axillary lymph nodes and patients with metastases in axillary lymph nodes. The research not covered by patients receiving neoadjuvant chemotherapy, or patients with multifocal and multicentric tumors.</p> <p><b>RESULTS:</b> The high amount of lymphocytic infiltrate was observed in the 14% a breast tumor, a moderate amount of lymphocytic infiltrate was observed in 38%, and the low in 43% breast tumors. Lymphocytic infiltrate was not observed in 5% of the tumor. High</p>



	<p>CD4+ lymphocyte infiltration was observed in 8% of breast, moderate in 44%, and the low in 43% of breast tumors. CD4+ lymphocytes were not observed in 5% tumors. High infiltration of CD8+ lymphocytes was observed in 1% of breast, moderate in 23%, and the low 66% breast tumors. CD8+ lymphocytes have not been observed in 10% tumors. There is a positive correlation between the level of TIL and CD4+ lymphocytes and tumor size, histological grade of tumor differentiation, presence of metastases in axillary lymph nodes, HER-2 status, triple negative tumors and relapses of disease. There was a negative correlation between the level of TIL and CD4+ cell counts and estrogen and progesterone receptors, as well as age. There is a positive correlation between the level of CD8+ cells and histological grade of the tumor, and HER-2 status. There was a negative correlation between the level of CD8+ lymphocytes and estrogen and progesterone receptors, as well as age.</p> <p><b>CONCLUSION:</b> The results of this study demonstrate the association between tumor infiltrating lymphocytes and CD4+ lymphocytes with a number of negative prognostic factors, and shorter free interval without the disease, all of which indicates that the tumor infiltrating lymphocytes and CD4+ lymphocytes bad prognostic factor in patients with breast cancer.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	6 <sup>th</sup> February 2014.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member:

## SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	7
1.1.	EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE.....	7
1.2.	FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK KARCINOMA DOJKE.....	8
1.2.1.	Životno doba .....	8
1.2.2.	Genetski faktori u nastanku karcinoma dojke .....	8
1.2.3.	Faktori spoljašnje sredine.....	9
1.2.4.	Životni stil kao faktor rizika.....	10
1.2.5.	Reproduktivni faktori rizika .....	10
1.2.6.	Endokrini činioci .....	11
1.2.7.	Benigne bolesti dojke .....	11
1.3.	PROGNOSTIČKI I PREDIKTIVNI PARAMETRI KARCINOMA DOJKE.....	12
1.3.1.	Određivanje kliničkog stadijuma raka dojke.....	12
1.3.2.	Veličina tumora .....	17
1.3.3.	Status limfnih čvorova .....	17
1.3.4.	Prisustvo udaljenih metastaza .....	18
1.3.5.	Histološki tipovi tumora.....	18
1.3.6.	Stepen histološke diferencijacije tumora (gradus) .....	20
1.3.7.	Estrogen i progesteron receptorni status .....	21
1.3.8.	Receptori faktora rasta (EGF receptori).....	22
1.3.9.	Indeks proliferacije Ki-67 .....	24
1.3.10.	Limfovaskularna invazija i perineuralna invazija .....	25
1.3.11.	Nekroza .....	25
1.3.12.	Angiogeneza.....	26

1.3.13.	Proteaze .....	26
1.3.14.	Ekspresija citokeratina kao prognostički faktor .....	27
1.3.15.	Tumor-supresorski geni i onkogeni kod tumora dojke .....	28
1.3.16.	Molekularna klasifikacija karcinoma dojke .....	29
1.4.	<b>IMUNOLOŠKI SISTEM I RAK</b> .....	31
1.4.1.	Tumorski antigeni .....	32
1.4.2.	Kategorije tumorskih antigena .....	32
1.4.3.	Imunološka reakcija protiv tumora .....	33
1.4.4.	Kako tumor izbegava imunološki odgovor .....	40
1.4.5.	Teorije imunološkog nadzora .....	42
1.4.6.	Tumorska mikrookolina .....	45
1.5.	<b>TUMOR INFILTRIŠUĆI LIMFOCITI I KARCINOM DOJKE</b> .....	48
<b>2.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE</b> .....	51
<b>3.</b>	<b>BOLESNICE, MATERIJALI I METODE</b> .....	53
3.1.	Bolesnice i uzorci .....	53
3.2.	Metode rada.....	54
3.3.	Imunohistohemijske analize.....	55
3.4.	Statistička obrada .....	59
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	61
4.1.	Kliničko patološke karakteristike karcinoma dojke i deskripcija uzorka .....	61
4.2.	Rezultati prisustva i distribucije tumor infiltrirajućih limfocita u tumoru dojke.....	64
4.3.	Hi-kvadrat testovi.....	66
4.4.	Povezanost nivoa tumor infiltrirajućih limfocita sa kliničko patološkim pokazateljima (koeficijenti korelacije) .....	83
4.5.	Kaplan-Meierova analiza .....	88

4.6.	Coxsova regresiona analiza.....	94
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b> .....	<b>97</b>
5.1.	Tumor infiltrišući limfociti i potencijalna imunoterapija kod karcinoma dojke.....	111
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>127</b>

## LISTA SKRAĆENICA

ADCC - engl. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*; antitelo zavisna - ćelijski posredovana citotoksićnost

AFP -  $\alpha$ -fetoprotein

ARG - arginaze

BRCA1 - engl. *breast cancer gen 1*; gen vezan uz rak dojke - 1

CD - engl. *cluster of differentiation*; limfocitni beleg

CEA - karcinoembrionalni antigen

CHEK 2 - engl. *cell – cycle checkpoint kinase*

CK - engl. *cytokeratin*; citokeratin

CTL - engl. *cytotoxic T lymphocyte*; citotoksićni T limfociti

CTLA-4 - engl. *cytotoxic T-lymphocyt antigen 4*

DCIS - duktalni karcinom in situ

DFS - engl. *disease-free survival*; preživljavanje bez znakova bolesti

EGF - engl. *epidermal growth factor*; epidermalni faktor rasta

ER - estrogen receptor

EU - Evropska unija

FDA - engl. *United States Food and Drug Administration*

FGF - engl. *fibroblast growth factor*; fibroblastni faktor rasta

Foxp3 - engl. *forkhead box p3*

G - histološki gradus

GCN2 - engl. *general control nonderepressible 2*

GM-CSF - engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; faktor rasta granulomonocitopoeze

gp-100 - melanocitni diferencijacijski antigen

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

HIF1 $\alpha$  - engl. *Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$*

HMGB1 - engl. *High-mobility group protein B1*

HPV-E6, HPV-E7 - onkoviralni proteini, produkti humanog papiloma virusa

IDO - engl. *indoleamine 2,3-dioxygenase*; indoleamin 2,3-dioksigenaza

IFN - interferon

IL - interleukin

LGL - limfni čvor

MAGE/GAGE - tkivni antigeni iz porodice tumor-testis antigena

MDSC - engl. *myeloid-derived suppressor cell*; supresorske ćelije mijeloidnog porekla

Melan-A/MART-1 - melanocitni diferencijacijski antigen

MHC - engl. *major histocompatibility complex*; glavni kompleks tkivne podudarnosti

MMP - Matriks metaloproteinaze

MUC-1 - tumorski antigen, posttranslacijski modifikovani vlastiti protein

NF- $\kappa$ B - engl. *Nuclear Factor- $\kappa$ B*

NK - engl. *natural killer*; ćelije prirodne ubice

NKT - engl. *natural killer T*

NPI - engl. *Nottingham prognostic index*

NY-ESO-1 - tkivni antigen iz porodice tumor-testis antigena

OS - engl. *cancer-specific overall survival*; ukupno preživljavanje

p53 - tumorski antigen, prekomerno izraženi produkt tumor-supresorskog gena TP53

PAI-1 - inhibitor-1 aktivatora plazminogena

PD-1R - engl. *programmed death 1 receptor*; receptor za programiranu ćelijsku smrt-1

PR - progesteron receptor

RANK - engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B*

STAT3 - engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TAA - engl. *tumor-associated antigens*; tumor asocirani antigeni

TAM - engl. *Tumor-associated macrophages*; tumor asocirani makrofagi

TCR - engl. *T cell receptor*; T ćelijski receptor

TGF- $\beta$  - engl. *transforming growth factor- $\beta$* ; transformišući faktor rasta- $\beta$

Th - engl. *T helper*; pomagački T limfociti

TIL - tumor infiltrišući limfociti

TLR4 - engl. *toll like receptor 4*

TNF - engl. *tumor necrosis factor*; faktor nekroze tumora

Treg - engl. *T regulatory*; regulatorni T limfociti

TRIPL- - trostruko negativan tumor

uPA - urokinazni aktivator plazminogena

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

$\chi^2$  - Hi-kvadrat

# 1. UVOD

## 1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE

Karcinom dojke je najčešći zloćudni tumor kod žena širom sveta i čini više od 20% svih malignih bolesti u ženskoj populaciji. Godišnje u svetu se registruje preko 1,5 miliona novih slučajeva bolesti (u Evropi preko 360.000) i preko 500.000 smrtnih ishoda sa ovom dijagnozom (u Evropi oko 92.000) (1).

Kumulativna verovatnoća obolevanja iznosi oko 12,5%, odnosno jedna od osam žena može očekivati da će tokom svoga života oboleti od ove bolesti (2).

Epidemiski talas raka dojke pogađa i razvijene i zemlje u razvoju. Geografska distribucija karcinoma dojke na globalnom nivou nije ravnomerna. Područja u kojima se registruje najviša učestalost bolesti su zapadna Evropa, severna Amerika, Australija, Novi Zeland i neke zemlje južne Amerike (Argentina), što se pripisuje višoj prevalenciji poznatih faktora rizika za ovu bolest u pomenutim regionima. Nešto niži rizik od pojave oboljenja javlja se u manje razvijenim regionima subsaharske Afrike, južne i istočne Azije, uključujući i Japan, gde je verovatnoća za pojavu karcinoma dojke tri puta manja nego u zemljama Evrope i Amerike. Što se tiče Evrope, najviše stope incidencije registruju se u zapadnoj i severnoj, dok su stope u južnoj i istočnoj Evropi niže (3).

Tokom 2011. godine u Vojvodini kod žena najčešći tumor je bio maligni tumor dojke sa ukupnim brojem od 1310, odnosno 26%. Od raka dojke je umrlo ukupno 550 žena. Navedene godine evidentirano je i 35 novoobolelih muškaraca (4). Poslednjih godina u Vojvodini uočen je porast obolevanja muškaraca od karcinoma dojke (5).

Prosečna standardizovana stopa incidencije raka dojke u centralnoj Srbiji u periodu 1999-2009. godine iznosila je 60,8/100.000, a mortalitetna stopa 20,2/100.000 (2).



Uvođenjem organizovanog skrininga za karcinom dojke, novih metoda rane dijagnostike i ciljane onkološke terapije, smrtnost od ove bolesti u Americi i zemljama EU opada iz godine u godinu, tako da je u poslednjih 35 godina smanjena za 35% (6).

## **1.2. FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK KARCINOMA DOJKE**

### **1.2.1. Životno doba**

Životno doba je pojedinačni najznačajniji faktor rizika za nastanak karcinoma dojke. Učestalost karcinoma dojke raste sa godinama života, udvostručuje se svakih deset godina do menopauze i dostiže svoj pik između 50. i 60. godine života (7,8). Više studija je potvrdilo da je nastanak bolesti u starijem životnom dobu udružen sa povoljnijim biološkim profilom tumora, uključujući veću učestalost pozitivne ekspresije estrogenskih receptora (9-11).

### **1.2.2. Genetski faktori u nastanku karcinoma dojke**

Karcinom dojke nastaje poput drugih vrsta karcinoma, kao posledica oštećenja gena koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa. Ekspresija oštećenih onkogeni, gubitak funkcije tumor supresorskih gena usled mutacija ili bilo kojih drugih genetskih promena dovodi do nekontrolisane deobe i rasta ćelija, što dovodi do daljeg oštećenja genoma (12).

Dugo je poznato da žene koje imaju pozitivnu porodičnu anamnezu imaju veći rizik za nastanak raka dojke. Tako žene kojima je majka ili tetka obolela od raka dojke imaju procenjeni relativni rizik za nastanak raka dojke 8 puta veći od slične populacije bez pozitivne porodične anamneze (13). Bolest se kod takvih bolesnica obično dijagnostikuje u mlađoj životnoj dobi (14).

Otkrivena su dva supresorska gena BRCA1 i BRCA2 (engl. *breast cancer gen 1 and 2*) koji su dovedeni u vezu sa nastankom porodičnog karcinoma dojke (7). Glavna uloga ovih gena je popravka oštećenja DNK i održavanje integriteta genoma; gubitak njihove funkcije doprinosi genomskoj nestabilnosti, mehanizmima koji još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (15,16). Bolesnice sa BRCA1 i BRCA2 mutacijama imaju lošiju prognozu i kraće preživljenje od onih koje nemaju mutirane te gene (16). Mutacije u BRCA1/2 genu mogu dovesti do pojave i drugih tumora kao što su karcinom jajnika, pankreasa, prostate i melanoma. Potomstvo nosilaca mutacije u BRCA1/2 genima ima 50% šanse da nasledi mutirani genski alel od jednog od roditelja (17,18).

Kod obolelih od raka dojke nađene su brojne nasledne i stečene mutacije p53 gena (7). Nasledne mutacije u Li-Fraumeni-jevom sindromu karakteriše učestala i rana pojava tumora dojke, leukemije, sarkoma, tumora mozga i karcinoma kore nadbubrežne žlezde (19).

Nasledne mutacije gena CHEK 2 (engl. *Cell – cycle checkpoint kinase*) povećavaju sklonost ka nastanku tumora dojke i prostate (20).

### **1.2.3. Faktori spoljašnje sredine**

U grupu specifičnih karcinogena koji utiču na pojavu i razvoj karcinoma dojke ubrajaju se izloženost jonizujućem zračenju (naročito kod mlađih žena), izloženost hemijskim agensima i virusne infekcije (7,12).

Nekoliko godina unazad, raste broj dokaza o potencijalno štetnom riziku od izlaganja veštačkim supstancama koje imaju hormonsku aktivnost. Nekoliko epidemioloških studija ukazuje na značaj različitih organohlornih pesticida koji zaostaju u životnom okruženju duže vreme, kao i u masnom tkivu različitih životinja, uključujući i čoveka (12).

Na osnovu eksperimenata na životinjama postavljena je i hipoteza o virusima kao mogućim uzročnicima karcinoma dojke. Istraživanja su pokazala da retrovirus i Epstein-Barr-ov virus mogu imati kancerogeni efekat (12).

#### **1.2.4. Životni stil kao faktor rizika**

Ishrana bogata životinjskim mastima, nedovoljna fizička aktivnost, preterana konzumacija alkohola kao i dugotrajni stres, takođe spadaju u faktore rizika. Žene pušači, naročito one koje puše u mlađoj životnoj dobi, pre menopauze, imaju veći rizik za pojavu raka dojke. Ishrana obogaćena voćem i povrćem smanjuje rizik od pojave karcinoma dojke (7,21,22). U faktore rizika spadaju i preterana gojaznost, a naročito povećanje telesne mase posle menopauze. Patofiziološka podloga je u većoj izloženosti estrogenima kod gojaznih žena. Naime estrogeni, kod postmenopauzних žena nastaju perifernom konverzijom, najvećim delom u masnom tkivu, pomoću aromatoznog sistema (13).

#### **1.2.5. Reproktivni faktori rizika**

Što se tiče uticaja reproduktivnog ponašanja na rizik od pojave raka dojke, utvrđeno je da se karcinom češće javlja kod žena sa ranom menarhom (pre 12. godine) i kasnom menopauzom (posle 50. godine). Poznato je da ranija trudnoća i porođaj imaju protektivnu ulogu u nastanku raka dojke. Broj porođaja je obrnuto proporcionalno povezan s nastankom tumora (7,13). Neke studije dokazale su blago smanjenje rizika za nastanak karcinoma kod žena koje su dojile (23). Nerotkinje imaju četiri puta veću šansu da obole od raka dojke nego žene koje su rađale. U osnovi je ista patofiziološka podloga-izloženost delovanju estrogena. Što je duža izloženost delovanju ovog hormona veća je verovatnoća nastanka raka dojke.

Stoga, kasna menarha, rana menopauza, veći broj trudnoća i rana prva trudnoća zapravo smanjuju izloženost i time smanjuju verovatnoću nastanka raka dojke (13)

#### **1.2.6. Endokrini činioci**

Uzimanje oralnih kontraceptiva ima slabu vezu sa nastankom karcinoma dojke, ipak dokazano je da žene koje su uzimale oralne kontraceptive pre 25. godine i duže od 4 godine, imaju povećan rizik za nastanak ove bolesti. Uzimanje kontraceptiva u starijoj životnoj dobi (iznad 25 godina) nema uzročno-posledičnu povezanost s nastankom raka dojke (13).

Hormonska terapija kod postmenopauzalnih žena povećava rizik za nastanak raka dojke, a rizik je u korelaciji sa dužinom upotrebe hormonske terapije (7,12).

Hronična hiperinsulinemija može dovesti do povećane ovarijalne ili adrenaln sinteze seksualnih steroida, naročito androgena. Kod žena u postmenopauzi, povećanje androgena u plazmi dovodi do povećanja sinteze estrogena u adipoznom tkivu i otuda povećanje estrona i estradiola što sve zajedno znatno povećava rizik od pojave i razvoj karcinoma dojke (12).

#### **1.2.7. Benigne bolesti dojke**

Atipična duktalna hiperplazija povećava rizik nastanka raka dojke za 4 do 5 puta, dok sklerozirajuća adenoza i papilomi povećavaju rizik za 1,5-2 puta (13).

### **1.3. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI PARAMETRI KARCINOMA DOJKE**

Rak dojke je heterogena bolest koja obuhvata brojne entitete sa specifičnim patološkim karakteristikama i različitim biološkim ponašanjem. Prognoza bolesti vrlo je različita, te se izbor najprikladnijeg terapijskog pristupa procenjuje individualno prema čitavom nizu prognostičkih pokazatelja. Prognostički faktori kod raka dojke mogu se grubo podeliti na one tradicionalne i novije koji obuhvataju niz faktora od kojih su mnogi još predmet ispitivanja i kliničkih studija.

Najvažnij prognostički faktori kod ranog karcinoma dojke su: zahvaćenost limfnih čvorova pazušne jame, veličina tumora, ekspresija estrogenskih i progesteronskih receptora (ER/PR), ekspresija receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER-2), tumorska histologija, stepen histološke diferencijacije tumora, marker proliferacije i prisustvo limfovaskularne invazije (21).

#### **1.3.1. Određivanje kliničkog stadijuma raka dojke**

Kako bi se izabrao najprikladniji način lečenja i procenila prognoza, bolesnice se u zavisnosti od proširenosti bolesti, svrstavaju u određene grupe.

TNM klasifikacija uključuje veličinu primarnog tumora, proširenost tumora u regionalne limfne čvorove i udaljene metastaze.

TNM klasifikacija tumora dojke (24):

T - primarni tumor:

TX - primarni tumor se ne može odrediti

T0 - primarni tumor nije dokazan

Tis - karcinom in situ

T1 - tumor  $\leq$  2 cm

T1a: tumor  $>$  0,1 cm, ali ne veći od 0,5 cm

T1b: tumor  $>$  0,5 cm, ali ne veći od 1 cm

T1c: tumor  $>$  1 cm, ali ne veći od 2 cm

T2 - tumor  $>$  od 2 cm, ali ne veći od 5 cm

T3 - tumor  $>$  5 cm

T4 - tumor bilo koje veličine sa direktnim širenjem na zid grudnog koša ili kožu

T4a: širenje u zid grudnog koša

T4b: ulceracija kože dojke, istostrani satelitski čvorovi u koži ili edem kože (uključujući peau d'orange)

T4c: 4a i 4b

T4d: inflamatorni karcinom

Klinička klasifikacija regionalnih limfnih čvorova (N):

NX - regionalni limfni čvorovi se ne mogu proceniti (npr. prethodno su uklonjeni)

N0 - regionalni limfni čvor bez metastaze

N1 - metastaza u pokretnom istostranom aksilarnom limfnom čvoru/čvorovima nivoa I i II

N2 - metastaze u istostranom aksilarnom limfnom čvoru/čvorovima nivoa I i II, klinički fiksirani ili sliveni ili klinički evidentnom istostranom limfnom čvoru/čvorovima oko arterije mamarne interne (ili unutrašnje mamarne arterije) u odsustvu klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

N2a - metastaze u aksilarnom limfnom čvoru/čvorovima fiksirane međusobno (slivene) ili za druge strukture

N2b - metastaze samo u klinički evidentnom limfnom čvoru/čvorovima oko arterije

mamarije interne (ili unutrašnje mamarne arterije) u odsustvu klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

N3 - metastaze u istostranom infraklavikularnom (nivo III aksile) limfnom čvoru/čvorovima sa ili bez zahvatanja limfnih čvorova nivoa I i II aksile ili u klinički evidentnom limfnom čvoru/čvorovima oko arterije mamarije interne (ili unutrašnje mamarne arterije) sa klinički evidentnim metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima ili metastaza u istostranom supraklavikularnom limfnom čvoru/čvorovima sa ili bez zahvatanja aksilarnih ili limfnih čvorova oko arterije mamarije interne

N3a - metastaze u infraklavikularnom limfnom čvoru/čvorovima

N3b - metastaze u limfnom čvoru/čvorovima aksile ili oko arterije mamarije interne

N3c - metastaze u supraklavikularnom limfnom čvoru/čvorovima

Patohistološka klasifikacija regionalnih limfnih čvorova (pN):

pNX - regionalni limfni čvorovi se ne mogu proceniti (nisu uklonjeni radi ispitivanja ili su prethodno uklonjeni)

pN0 - regionalni limfni čvor bez metastaze

pN1 - mikrometastaze ili metastaza u 1 do 3 istostrana aksilarna limfna čvora, odnosno istostranim unutrašnjim čvorovima dojke sa metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog čvora, ali klinički nije očigledna.

pN1mi - mikrometastaza (veća od 0,2 mm i/ili više od 200 ćelija, ali ne veće od 2 mm)

pN1a - metastaza u 1 do 3 aksilarna limfna čvora, uključujući bar jedan čija najveća dimenzija prelazi 2 mm

pN1b - unutrašnji limfni čvorovi dojke sa mikroskopskom metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog čvora, ali koja klinički nije očigledna

pN1c - metastaza u 1 do 3 limfna čvora, a unutrašnji limfni čvorovi dojke sadrže mikroskopsku metastazu otkrivenu disekcijom stražarskog limfnog čvora, koja nije klinički očigledna

pN2 - metastaze u 4-9 istostranih aksilarnih limfnih čvorova, ili klinički očigledan limfni čvor duž mamarije interne u odsustvu aksilarnih limfonodalnih metastaza

pN2a - metastaza u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova, uključujući bar jedan koji je veći od 2 mm

pN2b - metastaza u klinički očiglednom unutrašnjem limfnom čvoru/čvorovima dojke, u odsustvu metastaze aksilarnog limfnog čvora.

pN3 - metastaze opisane kao:

pN3a - metastaza u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova (od kojih je bar jedan veći od 2 mm) ili metastaza u infraklavikularnim limfnim čvorovima

pN3b - metastaza u klinički očiglednom unutrašnjem limfnom čvoru/čvorovima) dojke u prisustvu pozitivnog aksilarnog limfnog čvora/čvorova ili metastaza u više od 3 aksilarna limfna čvora i u unutrašnjim limfnim čvorovima dojke sa mikroskopskom metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog čvora, a koja nije klinički očigledna.

pN3c - metastaza u supraklavikularnom limfnom čvoru (čvorovima).

M - udaljene metastaze:

MX - postojanje udaljenih metastaza ne može se odrediti

M0 - nema udaljenih metastaza

M1 - udaljene metastaze



Tabela 1. Stadijumi karcinoma dojke prema TNM klasifikaciji (25).

Stadijum			
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	svaki T	N3	M0
IV	svaki T	svaki N	M1

### **1.3.2. Veličina tumora**

Veličina tumora je jedan od važnijih prognostičkih faktora, pogotovo u bolesnica s negativnim pazušnim limfnim čvorovima (7). Između veličine tumora i preživljenja postoji pozitivna korelacija, odnosno bolesnice sa manjim tumorima imaju bolju prognozu. Petogodišnja stopa recidiva je približno 10% za bolesnice sa tumorom manjim od 10 milimetara, a približno 30-50% za one sa tumorom od 50 milimetara i više (26). Za tumore manje od 10 mm, uobičajeni prognostički faktori, kao što je histološki gradus, nisu dovoljni da svrstaju pacijentkinje u različite prognostičke kategorije. U ovim slučajevima, postojanje udruženog DCIS, njegova rasprostranjenost i njegov gradus (G) su novoustanovljeni značajni prognostički faktori. Mali invazivni tumor udružen sa ekstenzivnom DCIS G.III komponentom ima lošiju prognozu od malih tumora bez DCIS ili sa DCIS G.I (27).

Kod multifokalnih tumora, još se ne zna sa sigurnošću da li prognoza korelira sa promerom najvećeg žarišta ili zavisi od ukupne veličini svih žarišta zajedno. Prema jednoj studiji, promer najvećeg žarišta je najpouzdanija mera za staging, ali je prognoza multifokalnih tumora ipak lošija od unifokalnih tumora sličnih dimenzija (češće aksilarne metastaze) (28).

### **1.3.3. Status limfnih čvorova**

Ovo je jedan od najvažnijih prognostičkih faktora u bolesnica s karcinomom dojke koji ukazuje na verovatnoću recidiva bolesti, takođe predstavlja značajan parametar pri selekciji pacijentkinja kod kojih treba primeniti adjuvantnu hemioterapiju (7,29).

Rizik pojave recidiva i ukupno preživljenje zavise od broja zahvaćenih limfnih čvorova. Bolesnice sa negativnim limfnim čvorovima imaju petogodišnje preživljenje bez bolesti preko 80%, a ako su čvorovi pozitivni, preživljenje je ispod 65%, odnosno prognoza je

lošija što je broj zahvaćenih limfnih čvorova veći. Nivo zahvćenosti limfnih čvorova takođe je prognostički značajan. Naime, metastaze u viši nivo aksile i apeks ukazuju na lošiju prognozu (30).

Nakon pazuha, drugo po važnosti drenažno područje je u limfne čvorove duž unutrašnje mamarne arterije. Oni su zahvaćeni ukupno u 22% slučajeva, češće kod tumora u medijalnoj polovini dojke i kod pozitivne aksile. Supraklavikularni limfni čvorovi zahvaćeni su u oko 20% slučajeva sa pozitivnom aksilom, a gotovo nikad nisu zahvaćeni kod negativne aksile (31).

#### **1.3.4. Prisustvo udaljenih metastaza**

Prisustvo udaljenih metastaza je dokazano najznačajniji prognostički faktor (7,29). Hematogene metastaze vode generalizovanoj diseminaciji karcinoma dojke u kosti, pluća, jetru, jajnike, nadbubrežne žlezde, pleuru i druga mesta. Najčešće zahvaćene kosti su rebra, lobanjske kosti, kičmeni pršljenovi, humerus i klavikula. Metastaze karcinoma dojke u kosti su, slično drugim tipovima karcinoma, najčešće osteolitičke, a u oko 10% slučajeva su osteoblastičnog tipa (27). Ukoliko je metastatska bolest prisutna samo u kostima, takve bolesnice imaju bolju prognozu nego one sa visceralnim metastazama (13).

#### **1.3.5. Histološki tipovi tumora**

Imajući u vidu odnos malignih ćelija prema bazalnoj membrani, karcinomi mogu biti neinvazivni (*in situ*), koji ne prelaze bazalnu membranu, ili invazivni, ukoliko prelaze bazalnu membranu. Svetska zdravstvena organizacija je, obzirom na histološki tip tumora, predložila sledeću podelu invazivnih karcinoma dojke (32):

1. Invazivni duktalni karcinom
2. Invazivni lobularni karcinom
3. Tubularni karcinom
4. Invazivni kribriformni karcinom
5. Medularni karcinom
6. Mucinozni karcinom
7. Invazivni papilarni karcinom
8. Invazivni mikropapilarni karcinom
9. Apokrini karcinom
10. Metaplastični karcinom
11. Karcinom bogat lipidima
12. Sekretorni karcinom
13. Onkocitni karcinom
14. Adenoidno-cistični karcinom
15. Karcinom acinarnih ćelija
16. Karcinom svetlih ćelija-bogat glikogenom
17. Sebacealni karcinom
18. Maligni mioepiteliom
19. Mukoepidermoidni karcinom
20. Skvamozni karcinom
21. Adenoskvamozni karcinom

Lošiju prognozu imaju duktalni karcinom, lobularni i medularni, dok nešto bolju prognozu imaju tubularni, mucinozni i kribriformni karcinom (33). Duktalni karcinom je najčešći tip raka dojke, koji čini ukupno 65-80% svih karcinoma dojke. Lobularni karcinom je na drugom mestu po učestalosti među invazivnim karcinomima dojke i na njega otpada od 5-10% svih karcinoma dojke. Medularni karcinom se češće sreće kod mlađih žena koje su nosioci BRCA1 i BRCA2 mutacija, dok je mucinozni karcinom češći kod starijih žena (34).

### **1.3.6. Stepen histološke diferencijacije tumora (gradus)**

Stepen histološke diferencijacije odnosno histološki gradus ima za cilj da ukaže na manju ili veću agresivnost tumora i samim tim predstavlja jedan od standardnih prognostičkih parametara, naročito za invazivne karcinome veće od 10 mm (7,35).

Prilikom određivanja histološkog gradusa (G) analiziraju se tri osobine tumora, koje se graduiraju od 1 do 3: 1. formiranje tubula, 2. nuklearni polimorfizam i 3. broj mitoz. Histološki gradus izračunava se iz zbira bodova iz čega proizlaze gradusi (36):

G1 (dobro diferentovani) - 3 do 5 bodova

G2 (umereno diferentovani) - 6 do 7 bodova

G3 (slabo diferentovani) - 8 do 9 bodova

Dobro diferentovani tumori (gradus 1) imaju petogodišnje preživljavanje u oko 75% bolesnica, a deset godina preživi 47% bolesnica. Sa umereno diferentovanim tumorima (gradus 2) pet godina preživi 53% bolesnica, a deset godina preživi 27% bolesnica. U grupi bolesnica sa slabo diferentovanim tumorima (gradus 3) pet godina preživi 31%, a deset godina preživi 18% (36).

Prognostička vrednost histološkog gradusa raste u kombinaciji s drugim prognostičkim faktorima od kojih su najvažniji veličina tumora i histološki status limfnih

čvorova, na osnovi čega je sastavljen Nottinghamski prognostički index (NPI – tabela 2) (7,37).

*Tabela 2. Nottinghamski prognostički indeks (NPI)*

NPI = veličina tumora (cm) x 0,2 + status limfnih čvorova (1-3) + histološki gradus (1-3)

NPI	Prognoza	Preživljavanje 15 godina
<3,4	Dobra	80%
3,4-5,4	Osrednja	42%
>5,4	Loša	13%

### **1.3.7. Estrogen i progesteron receptorni status**

Oko 75% svih karcinoma dojke je hormonski pozitivno (38). Hormonski receptori kod karcinomima dojke nemaju samo prognostički već i prediktivni značaj. Tumori koji su visoko hormonski pozitivni bolje će reagovati na hormonsku terapiju od onih koji su slabo hormonski pozitivni. ER negativni (ER-) tumori bolje reagiraju na hemioterapiju u odnosu na ER pozitivne tumore (ER+) (7).

Pacijenti sa ER+ tumorima imaju duže preživljenje bez bolesti u odnosu na one sa ER- tumorima. ER+ tumori češći su kod starijih žena, češće su dobro diferentovani, niže mitotske aktivnosti te rede pokazuju ekspresiju p53 i HER2/neu (27,29).

Progesteronski receptor je protein čija je sinteza pod kontrolom estrogenskih receptora. Međutim, oko 5% karcinoma dojke su ER-PR+ što se može objasniti ili lažno negativnim rezultatom u određivanju ER ili sinteza PR može biti indukovana nezavisno od estrogenskih receptora. Značaj PR kao nezavisnog prognostičkog faktora je vrlo mala (39).

### **1.3.8. Receptori faktora rasta (EGF receptori)**

Do sada su nađena četiri HER membranska receptora (proteina): HER1/EGFR, HER2, HER3 i HER4 (7). HER receptori se sastoje iz tri regiona: ekstracelularno područje za vezivanje liganda, područje u kome se receptor vezuje za ćelijsku membranu i intracelularno područje sa aktivnošću tirozin kinaze. U inaktivnom stanju HER receptori su monomeri. Vezivanjem liganda i aktivacijom receptora dolazi do njihove homo i heterodimerizacije i aktivacije enzima tirozin kinaze. Na taj način aktivira se kaskadni mehanizam biohemijских promena u samoj ćeliji što dovodi do ćelijske proliferacije, apoptoze, angiogeneze, promena u adhezivnosti i motilitetu ćelija (40,41). Poremećaj neke faze ovog mehanizma dovodi do prekomerne proliferacije, migracije ćelija i njihovog metastaziranja (41).

#### **a) Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR)**

EGFR (poznat i kao c-erbB-1) prisutan je u malim količinama u normalnom epitelu dojke i u drugim tkivima. Kod određenog broja invazivnih karcinoma dojke postoji prekomerna ekspresija EGFR. Tumori koji su EGFR+ obično su ER- ili PR-, slabije diferentovani i agresivniji. EGFR je loš prognostički faktor, pogotovo u slučajevima koekspresije EGFR i c-erbB-2 (42).

#### **b) HER2/neu (c-erbB-2)**

HER2/neu onkogen nalazi se na lokusu 17q21, a odgovara neu onkogenu čija amplifikacija dovodi do prekomerne ekspresije HER2/neu glikoproteina koji je član porodice transmembranskih receptora epidermalnih faktora rasta (7).

HER2 pozitivnost je negativan prognostički faktor, povezana je sa agresivnim tokom bolesti, kraćim vremenskim intervalom do relapsa i lošijim preživljavanjama (43). Povećana ekspresija HER2 udružena je i sa drugim faktorima loše prognoze karcinoma dojke, kao što su pozitivni limfni čvorovi, veći promer tumora, loš stepen histološke diferencijacije, visoka proliferaciona stopa i negativan estrogen i progesteron receptorni status (44).

Amplifikacija HER2/neu proto-onkogeni i/ili prekomerna ekspresija HER2/neu proteina nađena je u 10-40% invazivnih duktalnih karcinoma dojke dok se ređe sreće kod lobularnog karcinoma (33).

#### c) HER3 (c-erbB-3)

HER3 ekspresija (citoplazmatska!) prisutna je u oko četvrtini karcinoma dojke. Povezana je sa ekspresijom HER2/neu i zahvaćenim limfnim čvorovima, ali je veza slaba i verovatno se ne radi o važnijem prognostičkom faktoru (42).

#### d) HER4 (c-erbB-4)

HER4 receptor ima važnu ulogu u rastu i diferencijaciji ćelije, a njegova ekspresija izgleda je povezana s povoljnijom prognozom. Ovaj receptor funkcioniše drugačije od ostalih članova porodice receptora epidermalnih faktora rasta. U slučajevima u kojima postoji koekspresija HER4 i HER2/neu, HER4 ublažava loš prognostički efekt HER2/neu (42).

Kada je u pitanju HER2 receptor, poslednjih godina najveće interesovanje postoji oko njegove uloge u ciljanoj (target) terapiji kod karcinoma dojke. Kod bolesnica sa HER2 pozitivnim tumorom dojke primenjuje se sledeća anti-HER2 terapija:

1. Trastuzumab je monoklonsko antitelo koje se vezuje za HER2 receptor i pokreće antitelo zavisnu i ćelijski posredovanu citotoksičnost (ADCC), sprečava nastanak p95HER2



fragmenta čime dodatno ograničava prenos signala za malignu transformaciju, prouzrokuje nishodnu regulaciju i endocitozu receptora ograničavajući signal za dalji rast i deobu i inhibira HER2 regulisanu angiogenezu (40).

2. Pertuzumab je nova ciljana terapija kod HER2 pozitivnog karcinoma dojke, prevenira dimerizaciju (uparivanje) HER2 receptora sa drugim receptorima (EGFR/HER1, HER3, HER4). Pertuzumab i trastuzumab imaju komplementarna dejstva, vezuju se za različite regione HER2 receptora. Dejstvo pertuzumaba i trastuzumaba na HER2 signalni put može da blokira rast tumorskih ćelija karcinoma dojke i dovede do njihove smrti (45).

3. Trastuzumab emtansine (T-DM1) predstavlja konjugat trastuzumaba i potentnog citotoksičnog agensa. Trastuzumab emtansine ima efekte trastuzumaba i uvodi citotoksični agens DM1 u ćelije karcinoma (46).

4. Lapatinib je inhibitor intracelularnih područja tirozin kinaze oba EFGR (ErbB1) i HER2 (ErbB2) receptora (47).

### **1.3.9. Indeks proliferacije Ki-67**

Indeks proliferacije takođe se ubraja u prognostičke faktore za karcinom dojke. Tumori koji imaju veću proliferativnu aktivnost imaju lošiju prognozu i kraći interval do pojave relapsa (7,48). Studije koje su ispitivale prediktivni značaj indeksa proliferacije kod pacijentkinja koje su primale hemio ili endokrinu terapiju, nisu pokazale da se protein Ki67 može smatrati samostalnim prediktorom odgovora na terapiju. Generalno, podaci ukazuju na to da pacijentkinje sa visokim indeksom proliferacije imaju bolji odgovor na delovanje taksana u odnosu na netaksansku terapiju, kao i na delovanje terapije letrozolom u odnosu na tamoksifen (49).

Jedna od metoda za određivanje stepena proliferacije u tumoru je imunohistohemijska, korišćenjem anti-Ki-67 antitela (MIB-1) koje markira jedra u svim fazama ćelijskog ciklusa osim G0 i rane G1 fazi (50).

### **1.3.10. Limfovaskularna invazija i perineuralna invazija**

Više studija je pokazalo da nalaz tumorskih ćelija unutar lumena krvnih ili limfnih prostora znači lošiju prognozu (7).

Vaskularna invazija nađena je u gotovo četvrtini slučajeva karcinoma dojke, a češće se vidi kod slabo diferentovanih, većih tumora, uz duktalni invazivni karcinom, te u slučajevima sa pozitivnom aksilom (33).

PNI je obično prisutna u tumorima visokog histološkog gradusa, često uz limfatičku invaziju. Do sada nije dokazano da predstavlja nezavisan prognostički faktor (33).

### **1.3.11. Nekroza**

Prisustvo nekroze kod karcinomima dojke, kao i u drugim tumorima, predstavlja loš prognostički znak. Može biti jače ili slabije izražena, ali ne postoji usaglašen stav koji opseg nekroze je klinički značajan. Najčešće se vidi u duktalnom invazivnom karcinomu (7). Budući da je nekroza povezana sa veličinom i slabije diferentovanim tumorima, teško je reći da li predstavlja nezavisan prognostički faktor (33).

### **1.3.12. Angiogeneza**

Pod angiogenezom (neovaskularizacijom) podrazumeva se formiranje novih, funkcionalnih krvnih sudova iz prepostojeće vaskularne mreže. Neovaskularizacija omogućava rast tumora i povećava metastatski potencijal tumora otvaranjem puteva za prodor tumorskih ćelija u cirkulaciju. Najznačajniji stimulatori angiogeneze su članovi porodice faktora rasta fibroblasta (FGF) i faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF) (51).

Neki autori su našli da je angiogeneza izraženija u tumorima mlađih bolesnica, u većim tumorima i tumorima većeg histološkog gradusa, a prema drugim autorima, neovaskularizacija je povezana s histološkim tipom tumora, pa je slabija u lobularnim invazivnim karcinomima u odnosu na duktalne te u tom histološkom tipu nije značajniji prognostički faktor (52).

### **1.3.13. Proteaze**

#### **a) Katepsin D**

Katepsin D je lizosomalna aspartil proteaza izražena u svim tkivima, učestvuje u procesuiranju antigena, ćelijskoj proliferaciji, obnavljanju tkiva te aktivaciji različitih prohormona. Razgrađuje bazalnu membranu tumora i tako ima važnu ulogu u rastu i metastaziranju tumora (53). Neke imunohistohemijske studije su pokazale da bolesnice koje imaju visoki sadržaj katepsina D u tumoru imaju veći histološki gradus i kraće preživljavanje (54).

#### **b) Matriks metaloproteinaze**

Matriks metaloproteinaze (MMPs) su familija funkcionalno i strukturno povezanih endopeptitaza, te je do danas poznato oko četrdesetak MMPs. Prema njihovom specifičnom

supstratu dele se u nekoliko grupa: kolagenaze, želatinaze, stromelizinaze, matrilizinaze, membranski tip MMPs i druge. Učestvuju u degradaciji vezivnog stromalnog tkiva i bazalne membrane, što su ključni događaji u invaziji i metastaziranju tumora. Cepaju faktore rasta, receptore na površini ćelija, adhezijske molekule, hemokine i citokine i tako učestvuje u agresivnijem biološkom ponašanju tumora. Ove proteaze regulišu angiogenezu u tumoru putem aktivacije proangiogeničkih faktora ili je inhibiraju kroz nastajanje inhibitornih faktora (55). Aktivnost enzima regulisana je tkivnim inhibitorima matriks metaloproteinaza i očuvanom ravnotežom između enzima i inhibitora unutar ćelije. Visoka ekspresija MMPs u karcinomu dojke, posebno MMP-2 i MMP-9, povezana je s visokim histološkim gradusom, relapsom bolesti i kraćim preživljavanjem (56,57).

c) Urokinazni aktivator plazminogena (uPA) i inhibitor-1 aktivatora plazminogena (PAI-1)

Urokinaza plazminogen aktivator (uPA) sistem i njegov inhibitor PAI-1 (inhibitor-1 aktivator plazminogena) su faktori invazije tumora i imaju prognostičko i prediktivno značenje (7). Studije su pokazale da bolesnice sa negativnim limfnim čvorovima pazuha i niskim vrednostima odnosa uPA/PAI-1 imaju dobru prognozu bez primene sistemske adjuvantne terapije, dok bolesnice s visokim vrednostima odnosa uPA/PAI-1 imaju visoki rizik relapsa tumora. Visoke vrednosti uPA i PAI-1 u bolesnica sa primarnim rakom dojke povezane su sa većom koristi od adjuvantne hemioterapije u poređenju sa bolesnicama koje su imale niže vrednosti (58).

#### **1.3.14. Ekspresija citokeratina kao prognostički faktor**

U više studija pokazano je da ekspresija različitih citokeratina (CK) može imati značaja u biološkom ponašanju i prognozi bolesti. Tumori dojke koji ekspimiraju bazalne

citokeratine, odnosno bazalnog su fenotipa, generalno su histološki loše diferentovani, ER i PR-negativni, visokog proliferativnog indeksa, p53 i EGFR pozitivni (59).

### **1.3.15. Tumor-supresorski geni i onkogeni kod tumora dojke**

#### a) p53

p53 je tumor-supresorski gen koji se nalazi na hromozomu 17p i ima glavnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i DNK reparacije. Mutacije tumor supresornog p53 gena spadaju u najčešće molekularne abnormalnosti koje se detektuju kod solidnih tumora, a čest su nalaz u invazivnom duktalnom karcinomu dojke. Dokazano je da su abnormalnosti ovog gena udružene sa agresivnijim biološkim fenotipom tumora i lošijom prognozom za bolesnice sa karcinomom dojke (60).

#### b) nm23

Smanjena ekspresija nm23 proteina povezana je s lošijom prognozom, metastazama u aksilarne limfne čvorove, vaskularnom invazijom i češćim recidivima karcinoma dojke (61).

#### c) Bcl-2

Protonkogen bcl-2 programira protein koji inhibira programiranu ćelijsku smrt (apoptozu). Bcl-2 blokira apoptozu preko mitohondrijskog puta inhibirajući oslobađanje citohroma C iz mitohondrija. Visoka izraženost bcl-2 prisutna je u ER i PR pozitivnim tumorima i dobar je prognostički pokazatelj, tj. bolesnice sa rakom dojke i visokom ekspresijom bcl-2 imaju bolje preživljavanje. Poznata je i njegova uloga kao prediktivnog faktora. Tako je pokazano da bolesnice sa hormonski pozitivnim rakom dojke imaju bolji odgovor na tamoksifen ako je prisutna visoka izraženost bcl-2 (62).

#### d) C-myc

Gen c-myc kodira transkripcijski faktor koji se veže sa proteinima iz Max i Myc ( Myc associated factor X ) porodice i ima važnu ulogu u rastu, proliferaciji i diferencijaciji ćelija, stabilnosti genoma i apoptozi. Prekomerna ekspresija gena c-myc je jedna od najčešćih genetskih promena kod obolelih od raka dojke, a javlja se kod jedne trećine bolesnica. Amplifikacija gena c-myc povezana je sa lošijom prognozom bolesti i kraćim preživljenjem bolesnica (63).

Testovi multigenских profila tumora poput MammaPrint® (*Agendia, Amsterdam, the Netherlands*) ili Oncotype DX® Recurrence Score (*Genomic Health, Redwood City, USA*), mogu se koristiti kako bi se preciznije definisao fenotip tumora i dobile dodatne informacije o riziku od relapsa bolesti i potrebi za adjuvantnom hemioterapijom. Poseban značaj imaju kod hormonski pozitivnog ranog karcinoma dojke (HER-2 negativnog), ali se njihov pravi klinički značaj i dalje procenjuje u velikim randomizovanim kliničkim studijama (21,64).

Važan parametar koji određuje dužinu preživljavanja bolesnica sa rakom dojke je i ordinirana terapija. Odgovarajuća adjuvantna terapija povećava verovatnoću petogodišnjeg preživljavanja za gotovo 25% (13).

### **1.3.16. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke**

U poslednjih nekoliko godina istraživači su posebnu pažnju posvetili ispitivanju značaja i primene molekularne klasifikacije karcinoma dojke u procesu odabira odgovarajuće terapije. Na temelju genskih ekspresionih profila (engl. *gene expression profiling*) nastala je molekularna klasifikacija karcinoma dojke, koja karcinome pozitivne na hormonske receptore deli u dve grupe: luminal A i luminal B, a karcinome negativne na hormonske receptore na HER2 pozitivni i bazaloidni tip. Osim spomenutih tipova, u literaturi se spominju i tip luminal C i tip karcinoma sličan normalnoj dojci, ali ovi tipovi su još uvek slabo definisani (7,65,66).

Molekularni tipovi karcinom dojke mogu se približno utvrditi i imunohistohemijskim reakcijama. Ova klasifikacija je izvedena na osnovu ekspresije estrogen i progesteron receptora, HER2 receptora i proliferativnog indeksa (Ki-67) (21):

1. LUMINALNI A TIP: (ER+, PR+ , HER2-, Ki-67 nizak nivo ekspresije)
2. LUMINALNI B TIP: (ER+, HER2 -, Ki-67 visok nivo ekspresije ili PR nizak nivo ekspresije) (ER+, HER2 +, bilo koje vrednosti Ki-67 i PR)
3. HER2 POZITIVNI TIP: (ER-, PR-, HER2 +)
4. BAZALOIDNI TIP (trostruko negativni duktalni): (ER-, PR-, HER2 -)

Kod luminalnog tipa karcinoma dojke, matične ćelije nastaju iz luminalne epitelne ćelije. Ovaj tip karcinoma može se podeliti u dve različite grupe: luminalni tip A i luminalni tip B, koji se razlikuju u molekularnim karakteristikama tumora i kliničkom toku bolesti (67,68).

Luminalni A tip karcinoma dojke, čini više od 40% svih tipova karcinoma dojke, obično ima visoku ekspresiju ER, nisku ekspresiju HER2 receptora, kao i nizak nivo ekspresije markera proliferacije, manje od 14%. Karcinom dojke luminalnog tipa A, obično ima niski histološki gradus, pa ovaj tip tumora karakteriše najbolja prognoza bolesti u odnosu na druge tipove karcinoma dojke (67,68).

Karcinomi luminalnog tipa B uglavnom imaju pozitivne ER i amplifikaciju HER-2, visoki histološki gradus, visoki indeks proliferacije i lošiju prognozu nego oni luminalnog tipa A (67,68).

Karcinomi HER-2 tipa imaju visoku izraženost HER-2 i gena povezanih sa HER-2 signalnim putevima. Amplifikacija HER-2 gena povećava ćelijsku proliferaciju, koči apoptozu, podstiče angiogenezu, invazivni rast i metastaziranje. Ove tumore karakteriše visoki histološki gradus i indeks proliferacije (67,68).

Bazalni karcinomi dojke čine do 15% svih karcinoma dojke. Ova podgrupa je nazvana tako, jer neoplastične ćelije bazalnog karcinoma ekspimiraju gene koji se uobičajeno nalaze u normalnim bazalnim/mioepitelnim ćelijama, uključujući one odgovorne za citokeratine visoke molekularne mase, HMW (engl. *high molecular weight*) ili „bazalne” citokeratine (CK5/6, CK14 i CK17), kao i neke druge markere bazalne diferencijacije. U više studija dokazano je da su bazalni karcinomi dojke pretežno loše diferencijirani tumori, često sa medularnim i metaplastičnim elementima. Imunohistohemijski, oni su pretežno hormonski i HER-2 negativni (ER-, PR-, HER2-). Pozitivna ekspresija bazalnih markera povezana je sa lošom prognozom i sa BRCA-1 mutacijama, najverovatnije kao odraz visokog proliferativnog kapaciteta ovih tumora, kao i nepostojanja adekvatne, individualizovane, direktno ciljane terapije (69-71).

#### **1.4. IMUNOLOŠKI SISTEM I RAK**

Pretpostavlja se da je jedna od važnih funkcija imunološkog sistema i zaštita od tumora. To je veoma teška uloga, jer tumorske ćelije poseduju brojne sličnosti sa zdravim ćelijama. Stoga su tumorske ćelije dodatni izazov za imunološki sistem, veći od onoga sa kojim se susreće pri interakciji npr. sa bakterijama, koje se mnogo lakše prepoznaju kao strane. Razvoj tumora i njegov efekat na organizam ukazuje da je imunološki odgovor prema tumorima slab i da ga rast tumora lako prevazilazi (7).

Odgovor imunološkog sistema na tumor istražuje se na nekoliko nivoa. Prvi je molekularni nivo na kome se istražuju tumorski antigeni koji čine osnovu i uslov za pokretanje imunološkog sistema. Zatim se proučava imunološka reakcija na tumor. Na kraju se istražuju mehanizmi kojima tumor izbegava imunološki nadzor i širi se (72).



### **1.4.1. Tumorski antigeni**

Tumorski antigeni su molekuli na površini tumorskih ćelija, u citoplazmi ili jedru koji mogu da pokrenu imunološki odgovor (7).

Klasifikacija tumorskih antigena se može izvršiti na osnovu više različitih kriterijuma. Ako se kao kriterijum koristi to da li se tumorski antigeni eksprimiraju isključivo na maligno transformisanoj ćeliji ili na neizmenjenim ćelijama u nekoj fazi njihovog razvoja onda se dele na tumor-specifične i tumor-asocirane antigene (72).

Tumor-specifični antigeni nalaze se skoro isključivo na maligno transformisanim ćelijama, najčešće kao posledica genskih mutacija. Idealne su mete za ciljanu terapiju jer su izraženi samo na malignim ćelijama, ali su izraženi individualno, pa čak i samo u delu ćelije unutar tumora. Češći su antigeni koji su prezentovani i na tumorskim i na normalnim ćelijama, tzv. tumor-pridruženi antigeni (tumor-asocirani antigeni), koji su rezultat prekomerne ili aberantne ekspresije nemutiranih proteina (72).

Tri su načina na koji peptidi normalnih proteina mogu postati tumorski antigeni. Prvi, stvaranjem mutiranog proteina usled nemogućnosti tumorske ćelije da popravi DNK oštećenje, zatim prekomerna ekspresija normalnog proteina zbog mutacije faktora koji reguliše njegovu ekspresiju, te u slučajevima posttranslacijske modifikacije, kada je protein promenjen nakon abnormalnog posttranslacijskog procesuiranja (72).

### **1.4.2. Kategorije tumorskih antigena (72-74)**

Tumor-testis antigeni su proteini normalno izraženi tokom embrionalnog razvoja i u humanom tkivu testisa odraslih, a abnormalno su izraženi na brojnim tumorima uključujući melanom. Primeri su članovi porodica gena MAGE, GAGE, BAGE i gen NY-ESO-1.

Diferencijacijski antigeni su proteini izraženi kod normalnih ćelija, a izraženi su i na tumorskim ćelijama nastalim iz tog tkiva. Primer su melanocitni diferencijacijski antigeni Melan-A/MART-1, tirozinaza i gp-100, te CD20 kod B ćelijskog limfoma i dr.

Onkofetalni antigeni su belančevine embrionalnog i fetalnog tkiva izražene u određenim tipovima tumora. Primer su karcinoembrionalni antigen (CEA) i  $\alpha$ -fetoprotein (AFP). Onkofetalni antigeni su slabo imunogeni, tako da ne izazivaju reakciju odbacivanja tumora.

Mutirani ili prekomerno izraženi produkti onkogeni ili tumor-supresorskih gena. Primer su HER-2/neu i abnormalne forme p53.

Posttranslacijski modifikovani vlastiti proteini: primer je nedovoljno glikozilirani mucin MUC-1 kod karcinoma dojke i pankreasa.

Onkoviralni proteini kodirani su genomom onkogenih virusa. Primer su produkti humanog papiloma virusa HPV-E6 i HPV-E7 u karcinomu vrata materice i EBNA-1 antigen, produkt Epstein-Barr virusa nađen u Burkitt-ovom limfomu i nazofaringealnom karcinomu (72-74).

### **1.4.3. Imunološka reakcija protiv tumora**

Antitumorska imunost je posredovana mehanizmima urođene i stečene imunosti. Pokazalo se da u imunološkom odgovoru protiv tumora važniju ulogu imaju T limfociti nego mehanizmi humoralne imunosti posredovani B limfocitima (7,75).

Različite populacije limfocita izražavaju različite proteine. Površinski (membranski) proteini ćelija se identifikuju monoklonskim antitelima. Pomoću ovih proteina moguće je napraviti razliku između različitih subpopulacija. Standardna nomenklatura za limfocitne proteine je CD klasifikacija (engl. *cluster of differentiation*).

Populacija limfociti se razlikuju u odnosu na istoriju izlaganja antigenu (7,72):

- Naivni limfociti su zreli T i B limfociti koji su izašli iz timusa, odnosno kostne srži, a koji nisu bili u kontaktu sa stranim antigenom.
- Efektorski limfociti su diferencirano potomstvo naivnih ćelija koje su se aktivirali u kontaktu sa stranim antigenima.
- Memorijski limfociti takođe nastaju od potomaka stimulisanih antigenom.

## **T Limfociti**

S obzirom na to da najveći broj limfocita T reguliše funkciju ostalih ćelija imunskog sistema, oni se mogu smatrati glavnim ćelijama imunoloških zbivanja uopšte. Ovaj regulatorni uticaj limfociti T ostvaruju lučeći čitav niz različitih solubilnih supstancija (citokina) kao što su interleukini (IL: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 IL-17), interferoni (INF-gama) i faktori rasta granulo-monocitopoeze (GM-CSF) (76).

Efektorni limfociti mogu samostalno na dva načina da eliminišu invazivni agens. Jedan način eliminacije je preko izlučenih specijalnih toksičnih protein perforina, koji efikasno razaraju membranu napadnute ćelije. Drugi način eliminacije je pomoću apoptoze-programiranja ćelijske smrti, koja se još može opisati i kao indukovano „samoubistvo” ćelije (7,76).

Citotoksični limfociti T ili CTLs (engl. *cytotoxic T lymphocytes*) uništavaju ćelije u čijoj se citoplazmi nalaze mikroorganizmi, tumorske ćelije, a uključeni su i u odbacivanje transplantata. Da bi nastali zreli, efektorski CD8<sup>+</sup> limfociti koji poseduju mehanizme za uništenje ciljne ćelije, moraju se aktivirati naivni CD8<sup>+</sup> limfociti. CD8<sup>+</sup> limfociti prepoznaju antigen ako je vezan uz molekule MHC klase I (engl. *major histocompatibility complex*;

glavni kompleks tkivne podudarnosti). Delovanje CD8<sup>+</sup> limfocita je jako podstaknuto interleukinom-2 (IL-2) kojeg sintetišu CD4<sup>+</sup> limfociti (77,78).

Pomagački limfociti T ili Th (engl. *T helper*) su CD4<sup>+</sup> limfociti koji se aktiviraju nakon prezentacije antigena uz pomoć MHC klase II molekula koji su izraženi na površini antigen prezentujućih ćelija kao što su dendritske ćelije, krvni monociti. Kada su jednom aktivirani, brzo se dele i sekretuju produkte tzv. citokine koji učestvuju u aktivnom imunološkom odgovoru. Pomažu drugim ćelijama u imunološkim zbivanjima npr. maturaciji limfocita B u plazma ćelije i B memorijske ćelije, aktivaciji citotoksičnih T ćelija i makrofaga (72,78). CD4<sup>+</sup> pomagački T limfociti imaju važnu ulogu u regulaciji antitumorske imunosti posredovane CD8<sup>+</sup> T limfocitima (79).

Eksperimenti izvedeni na ozračenim (imunološkim deficijentnim životinjama), kojima su inokulisani ili samo T pomagački ili samo T citotoksični limfociti singene jedinke, pokazali su da je funkcija citotoksičnih T limfocita u procesu odbacivanja tumorskih ćelija veoma slaba bez prisustva pomagačkih T ćelija. To delovanje se popravljalo ukoliko se sa citotoksičnim limfocitima T daje i IL-2. Kako IL-2 može da podstakne citotoksične limfocite T na lučenje citokina, npr. interferona gama (koji aktivise druge ćelije, kao što su makrofagi, da postanu tumoricidne), značaj ove sprege između T pomagačkih, T citotoksičnih limfocita i makrofaga je izuzetno veliki u procesu uništavanja tumorskih ćelija. Navedeni eksperimenti su pokazali da pomagački T limfociti mogu da podstaknu uništavanje tumora i bez prisutva i učestvovanja citotoksičnih T limfocita. Verovatno se ovaj mehanizam odigrava preko izlučenih citokina, npr. interferona gama i drugih solubilnih supstancija koje deluju na monocite-makrofage, aktivišući ih na tumorocidni efekat, ali pospešuju i delovanje NK ćelija (80).

Precizna uloga CD4<sup>+</sup>Th limfocita u antitumorskoj imunosti nije sasvim razjašnjena. Dodatno je komplikovana činjenicom da se CD4<sup>+</sup>Th limfociti mogu podeliti na više

funkcionalnih fenotipova: T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 (Th17), na osnovu sposobnosti da sekretuju različite citokine (81). Najvažniji sekretorni produkti Th1 limfocita su interferon gama (IFN- $\gamma$ ) i IL-2, a Th2 limfocita su IL-4, IL-6, IL-10 i IL-13 (7,82). Th17 limfociti su nova klasa CD4<sup>+</sup> ćelija, koja je ime dobila po glavnom sekretornom produktu IL-17 (83).

Th1 limfociti pokreću ćelijski imunski odgovor u borbi protiv virusa i drugih intracelularnih mikroba, eliminišu ćelije raka i stimulišu kasni tip preosetljivosti (82).

Th2 limfociti imaju širok opseg aktivnosti: deaktivacija makrofaga, aktivacija B limfocita koji sekretuju IgE antitela (koja dominiraju kod parazitarnih infekcija), indukcija alergijskih reakcija kroz aktivaciju mastocita, bazofilnih i eozinofilni leukocita (82).

Th17 citokin-IL-17 stimuliše fibroblaste, endotelne ćelije, makrofage i epitelne ćelije da produkuju brojne proinflamatorne medijatore uključujući IL-1, IL-6, faktor nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) i metaloproteinaze (83). Th17 limfociti su važni za rani imunski odgovor kod velikih povreda, jer obezbeđuju brzo „regrutovanje“ neutrofilnih leukocita i sprečavaju nekroze tkiva i sepse (84). Neka istraživanja su pokazala da Th17 ćelije sa intratumorskom lokalizacijom imaju pro-tumorski efekat tj. stimulišu njegov rast (85,86). Mogući mehanizmi kojima IL-17 doprinosi kancerogenezi jesu indukcija angiogeneze povećanjem produkcije VEGF-a u tumorskim ćelijama i stimulacija produkcije matriks metaloproteinaza koje remodeliraju tumorsko tkivo i olakšavaju invazivnost, angiogenezu i metastaziranje (87).

Regulatorni T limfociti (Treg limfociti, ranije zvani supresorski T limfociti), su posebna subpopulacija CD4<sup>+</sup> limfocita koja konstitutivno izražava CD25 tj.  $\alpha$ -lanac receptora interleukina-2. Karakteristično obeležje ovih limfocita je ekspresija transkripcijskog faktora Foxp3 (engl. *forkhead box p3*). Treg limfociti čine oko 10% CD4<sup>+</sup> limfocita (88). Isto tako, zna se da postoji subpopulacija CD8<sup>+</sup> limfocita sa izraženim Foxp3, ali je zanemarljiva u poređenju sa brojem CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg limfocita (89).

Uopšteto govoreći, Treg limfociti se mogu podeliti na dve subpopulacije ćelija na osnovu različite specifičnosti i mehanizama delovanja. Prva populacija su urođeni Treg limfociti (engl. *natural-n Treg*) koji svoje regulatorne funkcije stiču u timusu i ne menjaju ih na periferiji. Druga populacija su adaptivni (inducibilni) Treg limfociti (engl. *inducible i-Treg*), koji nastaju diferencijacijom zrelih konvencionalnih T limfocita pod specifičnim uslovima suboptimalnog izlaganja antigenima i/ili kostimulaciji (90).

Treg limfociti imaju značajnu ulogu u sprečavanju i ograničavanju imunološkog odgovora i neophodni su za održavanje imunološke tolerancije i preveniranje autoimunosti (90). Imunomodulatorni efekti Treg limfocita se ispoljavaju sprečavanjem sinteze citokina u CD4+ i CD8+ limfocitima (91). Inhibiraju proliferaciju B limfocita (92). Osim ovih efekata Treg limfociti smanjuju citotoksičnu aktivnost NK ćelija i NKT ćelija, kao i funkciju dendritskih ćelija (93-95). Zbog ovakve svoje supresivne aktivnosti ove ćelije mogu negativno da deluju na antitumorski imuni odgovor (96). Nekoliko istraživanja pokazuju povećan broj Treg limfocita u perifernoj krvi osoba sa tumorom dojke, jetre, želuca i jednjaka (97-99).

$\gamma\delta$  limfociti T čine u proseku oko 4% ( od 0,5% do 16%) limfocita T koji poseduju specifičan T ćelijski receptor (engl. *TCR, T cell receptor*) na svojoj površini. Većina limfocita T ima TCR sastavljen od dva glikoproteinska lanca nazvanih  $\alpha$ - i  $\beta$ - TCR lanci. TCR u  $\gamma\delta$  limfocitima T je sačinjen od jednog  $\gamma$ - i jednog  $\delta$ -lanca. Antigeni koji ih aktiviraju nisu poznati, a prepoznavanje im nije vezano za MHC i čini se da su sposobni da prepoznaju cele belančevine, a ne samo peptidne segmente kao većina limfocita T koji antigene prepoznaju vezan uz molekule MHC (72).

Većina  $\gamma\delta$  limfociti T ne izražava CD4 niti CD8 ko-receptore. Ove ćelije mogu da stimulišu rast tumora tako što luče IL-4, IL-10 i TGF- $\beta$  (transformišući faktora rasta  $\beta$ ) i na taj način inhibiraju proliferaciju T limfocita čime je suprimira antitumorski imuni odgovor (100).

Postoje studije koje su pokazale da je veći stepen infiltracije ovih limfocita u tumoru dojke i debelog creva povezan sa lošijom prognozom bolesti (101,102).

Prirodne ubice T ćelije (NKT engl. *natural killer T cells*) posebna su vrsta limfocita T koje prepoznaju lipide i glikolipide prezentovane molekulom CD1d, a ne putem MHC. Sličnost sa NK ćelijama su površinska obeležja CD16 i CD56 (103). Ove ćelije uprkos svom malom broju imaju značajan uticaj na druge ćelije imunog sistema. NKT limfociti imaju dvostruku ulogu, efektorsku i regulatornu, u infekcijama i autoimunim bolestima. U tumoru, tip I NKT limfocita produkuje IFN- $\gamma$ , aktivira CD8+limfocite, NK ćelije i dendritske ćelije koje stvaraju IL-12. Sa druge strane tip II NKT ćelija produkuje IL-13 koji dovodi do oslobađanja TGF- $\beta$  od strane mijeloidnih ćelija, kao i do migracija makrofaga tipa 2 što sve rezultira imunosupresijom T limfocita. Ova dva tipa NKT ćelija međusobno interaguju formirajući imunoregulatornu osu koja ima uticaja na druge ćelije imunog sistema. Buduća istraživanju u pogledu uspostavljanja ravnoteže duž NKT regulatorne ose, mogu imati uticaja na dalji razvoj imunoterapije kod raka (104).

Da bi limfociti T obavili svoju efektorsku funkciju, moraju se aktivirati. Aktivacija limfocita T je niz događaja koji započinje kada T ćelijski receptor (engl. *TCR, T cell receptor*) prepozna peptid prezentovan u sklopu MHC molekula. Tada se stvara tzv. imunološka sinapsa, prostor u kojem te ćelije ostaju u kontaktu. Sinapsa olakšava prenos signala kroz kompleks površnih molekula CD3 koji je udružen sa TCR, a to dovodi do kaskade unutar ćelijskih signala što uzrokuje ekspresiju gena, sintezu citokina, ekspresiju površinskih molekula, izmenu citoskeletalnih proteina i omogućavanje efektorske funkcije (105).

Tumor koji raste izaziva odgovor domaćinog imunološkog sistema. Tumorski antigeni i topivi produkti privlače dendritske ćelije u tumorsko tkivo čime se može pokrenuti dva tipa imunološkog odgovora (72):

### **Imunostimulišući (Th1 odgovor)**

Dendritske ćelije procesuiraju antigene i razvijaju se u zrele ćelije koje proizvode IL-12. Putuju u drenirajuće limfne čvorove gdje stimulišu CD4+Th1 pomoćne limfocite koji stvaraju IFN- $\gamma$ . CD4+Th1 pomoćni limfociti pomažu u ekspanziji CD8+ citotoksičnih limfocita koji mogu uništiti tumorske ćelije lučenjem granzima B i perforina. U prisustvu Th1 citokina tumori ekspiriraju MHC I i kostimulatorne molekule neophodne da ih CTL prepoznaju. Takođe, u takvoj okolini se odvija i nespecifična aktivacija putem Fas liganda i drugih efektorskih molekula (72,73).

### **Imunosupresivni (Th2 odgovor)**

Druga vrsta tumorskih antigena, podstiče razvoj druge vrste dendritskih ćelija, nezrele DC, koja tada luči IL-6. To omogućuje proliferaciju drugog tipa limfocita T, CD4+Th2, koji nisu efektivne u odbacivanju tumora, a luče proupalne citokine IL-4, IL-6 i IL-13. Smanjuje se ekspresija MHC i kostimulatornih molekula, a tumorske ćelije luče imunosupresivne citokine: transformišući faktora rasta  $\beta$ , TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor- $\beta$* ), IL-10 i enzim indoleamine 2,3-dioksigenazu, IDO (engl. *indoleamine 2,3-dioxygenase*) i generišu Treg limfocite, makrofage i supresorske ćelije mijeloidnog porekla, MDSC (engl. *myeloid-derived suppressor cell*) (72,73).

Na osnovu predhodnih istraživanja, može se zaključiti da je Th1 odgovor korisniji u antitumorskoj imunosti (106,107), dok Th2 odgovor inhibira ćelijski antitumorski imunski odgovor i pokreće pro-tumorski odgovor (108,109). Smatra se da centralnu ulogu u polarizaciji imunološkog odgovora imaju citokini. Pored toga, citokini svojim dejstvom na druge ćelije imaju važnu ulogu u regulaciji antitumorske imunosti (110). Kod pacijenata



obolelih od raka uočene su niže vrednosti Th1 citokina (IFN- $\gamma$ , IL-12) i povišene vrednosti Th2 citokina (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) što je suprotno obrascima viđenih kod zdravih osoba (111). Tumorske ćelije menjaju okolinu i u doba otkrivanja tumora ravnoteža je pomerena u korist imunosupresije odnosno imunološke tolerancije tumora (Th2 odgovor). Imunoterapijom se ravnoteža pokušava pomeriti u korist imunostimulacijskog (Th1 odgovora) (73).

#### **1.4.4. Kako tumor izbegava imunološki odgovor**

Nemogućnost imunološkog sistema da spreči pojavu i rast tumora ne znači da se specifična imunološka reakcija na tumor ne javlja za vreme širenja postojećeg tumora i da je prisutna samo na početku procesa maligne transformacije. Međutim, ta reakcija, koja se može otkriti na početku, ali ne i u podmakloj fazi rasta tumora, prilično je nedeletvorna. Zato je vrlo važno da se utvrdi zašto je navedena reakcija nedovoljno efikasna, tj. da se dokažu eventualni mehanizmi pomoću kojih tumorske ćelije izbegavaju ili potiskuju imunološku reakciju, čineći je nedovoljno uspešnom (88).

Opisano je nekoliko mogućih mehanizama pomoću kojih tumor izbegava imunološku reakciju:

Jedan od mehanizama je selekcija tumorskih ćelija (u okviru maligne neoplazme), koje predstavljaju manje imunogene varijante ili su potpuno bez antigena. Takve ćelije imaju selektivnu prednost u rastu. U prvo vreme rasta neoplazme, otkriva se heterogenost u morfologiji ćelija i njihovim fenotipskim markerima na površini. Kloniranjem tumorskih ćelija takve neoplazme, otkrivene su ćelijske linije sa smanjenom ekspresijom tumorskih antigena, neophodnih imunološkom sistemu da prepozna transformisanu ćeliju, a ovakve ćelije imaju prednost u rastu. U podmakloj fazi rasta neoplazme, navedene ćelije čine najveći deo tumorskog tkiva (80).

Nadalje, u tumorskim ćelijama može se smanjiti ekspresija molekula MHC klase I koji su potrebni za prezentaciju antigena CD8<sup>+</sup> limfocitima (7). Budući da su tumorske ćelije genetički, a donekle i antigenski slične zdravim ćelijama organizma i budući da razvoj tumora često nije praćen upalnim procesima, pitanje je u kojoj meri dendritske ćelije prezentuju tumorske antigene i u kojoj se meri, ako ih prezentuju, pretvaraju u aktivirane dendritske ćelije (73).

Tumorske ćelije i same izlučuju neke imunosupresivne citokine (TGF-beta, IL-10) koji podstiču stvaranje Treg ćelija. Ovi limfociti izazivaju tolerogenu funkciju antigen prezentujućih ćelija. Na taj način Treg limfocita i antigen prezentujuće ćelije stvaraju začarani krug koji održava supresiju antitumorskog imunskog odgovora najpre lokalno, a zatim i sistemski (112).

Imunološki odgovor može biti izbegnut zbog nedovoljnog izražavanja kostimulatornih molekula ili tumorskom produkcija koinhibitornih molekula (88).

Prisustvo blokirajućih faktora u serumu organizma sa tumorom koji progresivno raste, opisano je na mnogim primerima, pri čemu su ovi specifični blokatori iz seruma obolelog od neoplazme, inhibisali celularnu i antitelima posredovanu citotoksičnost usmerenu protiv tumorskih ćelija. Neki autori smatraju da se radi o više različitih blokirajućih faktora i da je moguće da oni deluju u nekim fazama rasta neoplazme. Takvu funkciju imaju antitela (iz klase IgA ili IgG4) koja ne vezuju komplement. Ova necitolitička antitela iz seruma obolelog, vezuju se za antigen na ciljnoj (tumorskoj) ćeliji i tako sprečavaju efektorne citotoksične T-ćelije, sposobne da izvrše destrukciju takve transformisane ćelije ili citolitička antitela, koja, posle vezivanja za tumorske antigene, aktivišu komplement ili mehanizam antitelo zavisne celularne citotoksičnosti, sa sledstvenom lizom maligne celije. Kompleksi antigen-antitelo mogu da zauzmu Fc receptore na ćelijama (makrofagima, granulocitima, NK celijama), blokirajući celularnu citotoksičnost posredovanu antitelima. Neki od blokirajućih

faktora su solubilne supstancije koje suprimiraju imunološku reakciju, a luče ih T-limfociti sa supresorskom funkcijom. Ovakva supresija je tumor-specifična. Opisana je i nespecifična supresija, kojom tumorske ćelije nespecifično ometaju ispoljavanje imunološke reakcije domaćina. Naime, neke tumorske ćelije mogu da oslobađaju solubilne faktore, koji suprimiraju imunološku reakciju. Smanjen unos proteina i pothranjenost kod obolelih od raka, mogu da budu uzrok oštećenja celularnog i humoralnog imunološkog reagovanja (80).

#### **1.4.5. Teorije imunološkog nadzora**

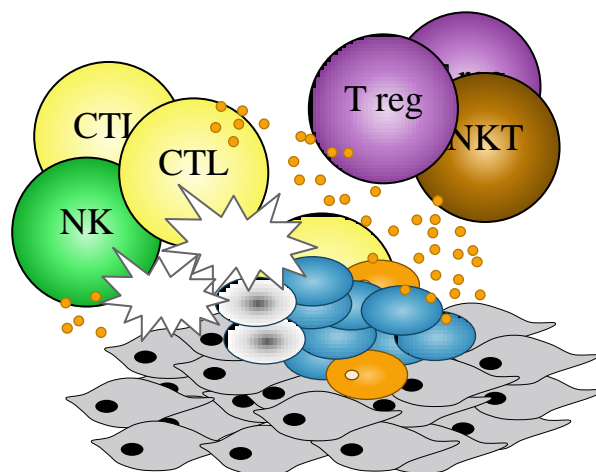
Još 1909. godine, Paul Erlich je pretpostavio da u organizmu čoveka stalno nastaje veliki broj tumorski transformiranih ćelija koje imunološki sistem domaćina eliminiše (72). Sredinom XX veka, Thomas i Burnet razvili su tu ideju u teoriju imunološkog nadzora (engl. *immunosurveillance hypothesis*) (113). Eksperimentalno je dokazano postojanje tumorskih antigena i imunološki nadzor koji štiti domaćina. Po tome je imunološki odgovor na maligne ćelije rani događaj koji, u većini slučajeva, vodi destrukciji pre nego što se razviju u tumore. Naime, osnovna fiziološka uloga imunološkog sistema je nadgledanje ćelija dotičnog viševićijskog organizma i čuvanje njegovog antigenskog i genomskog integriteta. Isto tako, pretpostavljeno je da imunološka reakcija usporava rast, pa čak i uzrokuje regresiju već uspostavljenih tumora. Sa tom pretpostavkom može se povezati porast određenih malignih bolesti u imunokompromitovanih bolesnika (72). Obzirom da postoje tumori uzrokovani virusima, postavljena je sumnja da imunološki sistem kontroliše rast tumora tako što u stvari deluje na virus koji ga je prouzrokovao. Prema teoriji o imunološkom nadzoru, ovaj mehanizam imunološkog sistema odigrao bi se efikasno samo protiv pojedinačnih transformisanih ćelija, tj. protiv prekliničkih početnih tumora. Postavilo se pitanje na koji način se onda vrši imunološki nadzor velike većine malignih tumora koji su nevirusne

etiologije. Isto tako, velika manjkavost teorije bila je u tvrdnji da tumori postaju klinički vidljivi u slučaju oslabljenog imunološkog sistema, jer većina tumora nastaje u imunokompetentnih bolesnika, a mnogi tumori imaju i značajnu upalnu komponentu (72,113).

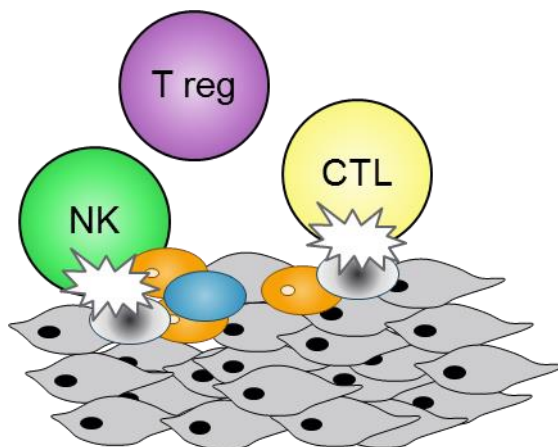
Na to nije bilo odgovora do nedavno, kada je eksperimentalno, putem genetski modifikovanih miševa deficijentnih na pojedine komponente imunosti, dokazano da i urođeni i stečeni imunitet doprinose imunološkom nadzoru i eradikaciji nekih tumora nevirusne etiologije. Saznalo se da verovatno postoji eliminacija imunogeničnih tumorskih ćelija u imunokompetentnog domaćina. Takvom selekcijom, imunološkim uređivanjem (engl. *immunoediting*) preostaju samo slabo imunogeni klonovi ćelija koje čine tumor (114).

Prema teorija imunološkog uređivanja, progresija tumora prolazi u tri faze: faza eliminacije tumora (engl. *elimination phase*), faza ravnoteže (engl. *equilibrium phase*) i faza tumorskog bega (engl. *escape*) (slika 1). U fazi eliminacije i ravnoteže, ćelije imunološkog sistema, a naročito CD8<sup>+</sup> limfociti prepoznaju i eliminišu tumorske ćelije. Međutim, kako se fenotip tumora kontinuirano menja i oblikuje usled delovanja signala iz okolne strome kao i zbog postojanja slabo imunogenih klonova ćelija tumora, pojedine tumorske ćelije izbegavaju imunološki odgovor te on nastavlja sa rastom i progresijom (114). U ovoj fazi anti-tumorski efekat CD8<sup>+</sup> limfocita može biti inhibiran FOXP3<sup>+</sup> Treg ćelijama, supresorskim ćelijama mijeloidnog porekla, M2 makrofagima, Th2 CD4<sup>+</sup>T ćelijama i citokinima kao što su TGF-beta i IL-6 (115). Ovom teorijom se objašnjava zašto tumor nastavlja da raste i širi se uprkos prisustva ćelija imunog sistema.

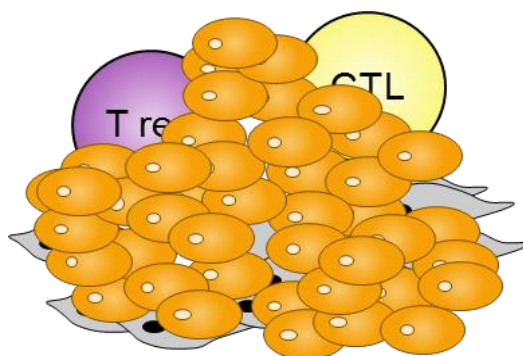
Tumor se kod pacijenata najčešće otkrije u trećoj fazi tj. u fazi tumorskog bega (engl. *escape*), ali čak i u odmakloj fazi bolesti imuni parametri su prepoznati kao faktori koji mogu uticati na prognozu bolesti (116).



FAZA ELIMINACIJE TUMORA



FAZA RAVNOTEŽE



FAZA TUMORSKOG BEGA

*Slika 1. Faze progresije tumora (117)*

*(Modifikovano iz: Mittal D, et al. Curr Opin Immunol.2014;27)*

#### 1.4.6. Tumorska mikrookolina

Tumor je složeni entitet koji se sastoji od ćelija raka, stromalnih ćelija, tumor infiltrišućih ćelija (ćelija imunskog sistema i drugih) kao i ekstracelularnog matriksa. Tumorska mikrosredina predstavlja mesto gde različite vrste ćelija konstantno interreaguju. Ćelije raka, koje čine aproksimativno 30% ćelija u tumoru u većini slučajeva nisu autonomne već za njihov rast i proliferaciju su potrebne ćelije u stromi (118). Tumorske i stromalne ćelije ostvaruju brojne recipročne interakcije, početna neoplazija stvara preneoplastičnu stromu privlačeći i aktivirajući određene tipove stromalnih ćelija. Tada stroma svojim delovanjem podržava neoplastični fenotip što malignim ćelijama omogućuje da dalje evoluiraju i opet šalju drugačije signale u stromu ne bi li je reprogramirali, što osigurava invaziju u okolno tkivo i diseminaciju tumorskih ćelija (118,119).

Ćelije imunološkog sistema koje infiltriraju tumor, danas su shvaćene kao njegov integralni deo i imaju dvojaku funkciju i anti-tumorsku, ali i ulogu i promovisanju rasta tumora i njegovoj progresiji (115).

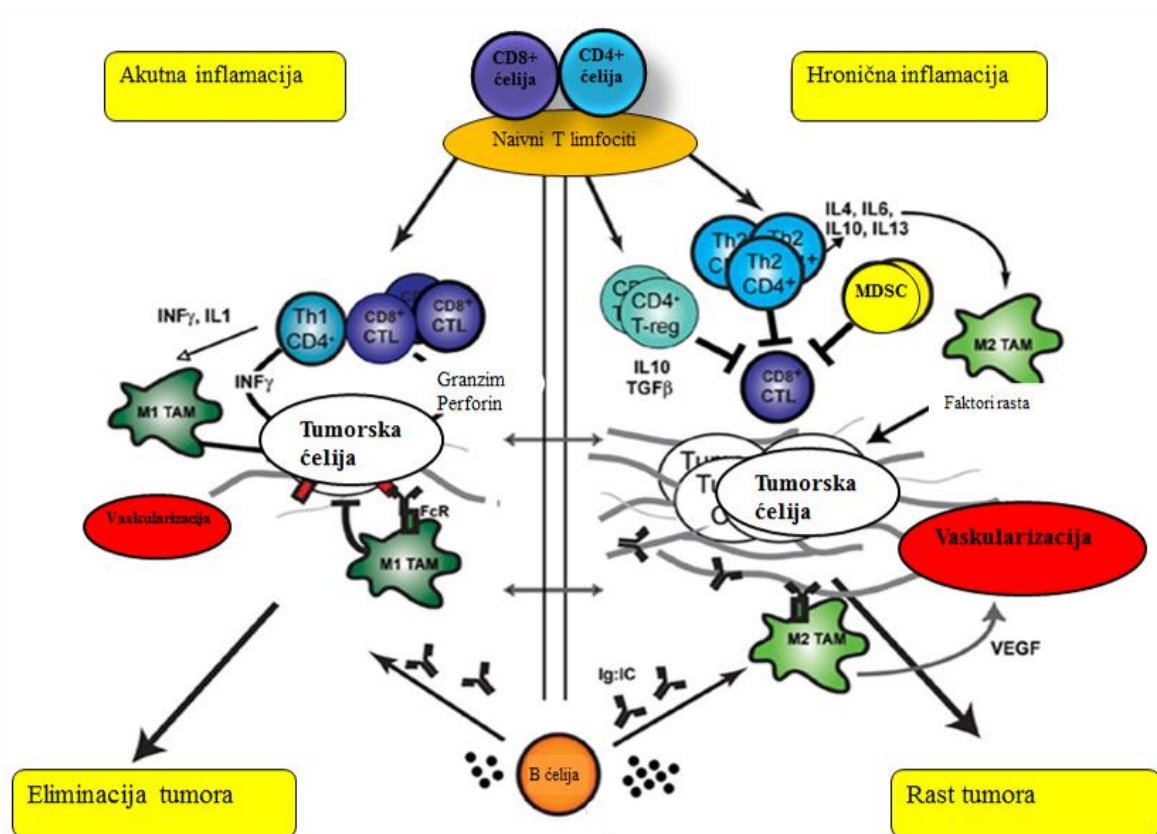
Prisutnost anti-tumorskih CTL i NK ćelija je duže poznata, ali prisutnost pro-tumorskih je tek krajem prošlog veka utvrđena na opažanju udruženosti tumora i hronične upale, što je vodilo do metafore da su tumori „rane koje nikada ne zacele” (120).

U normalnom, fiziološkom zaceljivanju i borbi protiv infekcije, infiltracija leukocitima je tranzitorna pojava. Hronična inflamacija je povezana sa nastankom i razvojem mnogih tipova karcinoma (121). Tokom hroničnog zapaljenja, infiltrišuće ćelije imunološkog sistema oslobađanjem azot-monoksida i slobodnih kiseoničnih radikala, indukuju direktno oštećenje DNK i inhibiraju apoptozu čime izazivaju malignu transformaciju ćelija (122). Kod nekih tipova tumora, pretpostavlja se da i same genetske promene (aktivacija onkogeni i

inaktivacija tumor-supresor gena) tokom maligne transformacije favorizuju razvoj hronične inflamacije u tumorskoj mikrosredini (122).

Pro-tumorsku ulogu mogu imati određeni podtipovi makrofaga (M2), pomagačkih T limfocita (CD4+Th2 i CD4+Th17), zatim regulatorne T ćelije (CD4+FoxP3+ T) i supresorske ćelije mijeloidnog porekla (MDSCs) (123-125). Brojni su signalni molekuli koje te ćelije otpuštaju, a koji imaju pro-tumorsko delovanje: hemokini i citokini, koji pojačavaju upalu, podstiču i održavaju angiogenezu, stimulišu proliferaciju, prisutnošću na marginama tumora olakšavaju invaziju i podržavaju metastaziranje (123). Takođe i maligne ćelije aktivacijom transkripcionih faktora, među kojima su najznačajniji NF- $\kappa$ B (engl. *Nuclear Factor- $\kappa$ B*), STAT3 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) i HIF1 $\alpha$  (engl. *Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$* ), koordiniraju produkciju proinflamatornih citokina, hemokina i proangiogenih faktora (121).

Zbog toga, imunološka reakcija organizma domaćina na tumor obuhvata čitav spektar različitih mehanizama, koji se kreću od pojave izvesne imunološke otpornosti na neoplazmu, do imunološki nastale stimulacije rasta tumora (slika 2).



MDSC - supresorske ćelije mijeloidnog porekla; M1 TAM - tumor asocirani makrofagi tipa 1; M2 TAM - tumor asocirani makrofagi tipa 2; Treg-regulatorni T limfociti; CTL-citotoksični T limfociti

*Slika 2. Interakcija različitih ćelija imunološkog sistema u tumorskom mikrokruženju koje mogu imati pro- ili anti-tumorsko delovanje (126)*

*(Prevedeno iz: Weber D. Inflammation and breast cancer. Complementary oncology [Internet]. 2011 May 31. Available from <http://.com/wp-content/uploads/2011/05/bcr1746-3.jpg>)*



## 1.5. TUMOR INFILTRIŠUĆI LIMFOCITI I KARCINOM DOJKE

U normalnom tkivu dojke nema limfnog tkiva, ali se može detektovati manji broj limfocita u stromi (127). Prethodna istraživanja su pokazala postojanje heterogenog infiltrata ćelija imunološkog sistema: T i B limfocita, ćelija prirodnih ubica (engl. *natural killer NK*) i makrofaga u samom tumoru dojke ili njegovim marginama (110,128,129). Većina tumor infiltrišućih limfocita u solidnim tumorima pripadaju CD3+ T ćelijskom fenotipu (88,128).

Gu-Trantein i sar. su u svom istraživanju utvrdili da T limfociti čine 75%, B limfociti manje od 20%, monociti oko 10%, NK ćelije manje od 5% od ukupnih tumor infiltrišućih leukocita (110). Ruffel i saradnici su takođe dokazali dominaciju CD3+T tumor infiltrišućih limfocita, dok su NK ćelije i CD20+ ćelije bile zastupljene u znatno manjem broju. Većinu CD3+ ćelija su činile CD4+ i CD8+ T ćelije. Interesantno je da CD8+limfociti nisu ekspimirali granzim B na početku, što znači da su bili prisutni u inaktivnoj formi ali su izražavali granzim B nakon neoadjuvantne terapije kod jedne trećine pacijenata (129).

B limfociti su manje zastupljeni u limfocitnom infiltratu malignih tumora, shodno tome manje se zna o njihovoj funkciji (129). Takođe, postoji malo dokaza o efikasnom delovanju tumor infiltrišućih B limfocita protiv ćelija raka. Malo proteina koje ekspimiraju tumorske ćelije su zaista tumor specifični; većina antitela će verovatno biti usmerena protiv autoantigena, a malim procentom protiv tumorskih antigena (130). Ispitivanjem uloge antitela protiv virusnih antigena kod tumora koji su indukovani retrovirusima kod laboratorijskih životinja, potvrđen je izvesni zaštitni efekat antitela koji se odnosi samo na početnu fazu rasta tumora, ali nije mogla biti dokazana bilo kakva kontrola napredovanja već razvijenih neoplazmi. Čak su postojali i navodi stimulacije rasta nekih tumora posle unošenja specifičnih antitela (verovatno zbog pojave blokirajućeg efekta na mogućnost delovanja citotoksičnih T-ćelija, nakon vezivanja ovih antitela za tumorske ćelije). Dakle, antitela koja se stvaraju na

tumorske antigene i koja su prisutna u serumu domaćina sa rastućim tumorom, mogu da pomognu u ograničavanju širenja tumora i metastaziranja, ali ne mogu odigrati efikasnu ulogu u reakciji na primarni tumor, bez istovremene aktivnosti celularnih mehanizama (pre svega T-limfocita) (80).

Ćelije prirodne ubice (NK), za razliku od CD8+ limfocita, mogu uništiti tumorsku ćeliju bez prethodne interakcije sa molekulima MHC kompleksa. Ne izražavaju karakteristične površinske receptore niti limfocita T niti limfocita B, kao ni pan-T ćelijski marker CD3, već su im karakteristični površinski markeri CD16 i CD56 (72). Pokazano je da se citotoksično delovanje NK limfocita znatno pojačava delovanjem interleukina-2. Stimulisane NK luče interferon gama, faktor nekroze tumora (TNF-alfa), zatim faktore rasta granulo-monocitopoeze GM-CSF i druge solubilne supstancije, koje ispoljavaju značajne efekte u imunološkim zbivanjima (7,72).

Kod karcinoma dojke uočena je smanjena ekspresija MHC molekula klase I, čineći ih vulnerabilnim na NK ćelije. Međutim, istraživanja su pokazala da su tumori dojke slabo infiltrirani NK ćelijama, dok je gubitak MHC molekula više povezan sa infiltracijom T limfocita u tumoru nego ćelijama prirodnim ubicama (131,132).

Primećeno je da kod malignih tumora dojke postoji znatno veći stepen infiltracije limfocita nego kod benignih lezija što se može objasniti prisustvom većeg broja antigena na malignim ćelijama kao što su p53, BRCA1 i BRCA2 (133). Ovi antigeni mogu izazvati lokalnu aktivaciju i proliferaciju tumor infiltrišućih limfocita. Pored toga ćelije raka mogu proizvoditi citokine koji regrutuju veći broj limfocita (134).

Uprkos postojanju imunološkog odgovora, mnogi tumori dojke progresivno rastu i šire se, pa se postavlja pitanje značaja tumor infiltrišućih limfocita. Ne postoje definitivni zaključci u pogledu efikasnosti T ćelijskog imuniteta niti korelacija sa obimom i tipom limfocitnog infiltrata i progresije bolesti kod karcinoma dojke.

U istraživanjima vezanim za ulogu tumor infiltrirajućih limfocita kod karcinoma dojke procenjavani su intratumorski i stromalni limfociti odvojeno. Limfociti koji su u kontaktu sa tumorskim epitelom klasifikovani su kao intratumorski (iTIL), a limfociti koji se nalaze u intersticijalnom prostoru kao stromalni (sTIL). Prema prvobitnoj hipotezi posmatrani su limfociti koji su u kontaktu sa tumorskim ćelijama i koji su smatrani relevantima za dijagnostičke procene. Iako ova hipoteza i dalje može biti biološki i klinički relevantna, intratumorski limfociti su zastupljeni u znatno manjem broju, heterogeni su i teško se uočavaju na hematoksilin-eozin (HE) preparatima. Kako su obe grupe lokalizovane u regionu definisanom kao tumorsko tkivo, trebalo bi da obe kategorije predstavljaju tumorski infiltrat limfocita. Osim toga, tumor infiltrirajući limfociti mogu slobodno da se kreću iz jednog dela tumora u drugi tako da podela na intratumorske i stromalne limfocite može biti veštačka i odražava statično stanje na histološkim preparatima (135).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Glavni problem u lečenju karcinoma dojke je kako na osnovu kliničke klasifikacije i morfoloških osobina tumora predvideti njegovo dalje ponašanje. Vrlo često ni kombinacija standardnih prognostičkih faktora ne daje odgovor o potrebi davanja adjuvantne hemioterapije.

U cilju sprovođenja adekvatne dalje terapije karcinoma dojke i otkrivanja agresivnih tipova tumora, a nakon hirurškog lečenja, postoji stalna potreba za pronalaženjem novih pokazatelja pomoću kojih bi se identifikovale bolesnice koje imaju povećan rizik od razvoja relapsa bolesti. Takođe, kurativna ograničenja trenutnih hemioterapijskih protokola kao i njihovo štetno dejstvo na okolno tkivo, dovelo je do povećanja potrebe za pronalaženjem novih imuno-bioloških prognostičkih markera i razvoja ciljane (target) terapije.

Osnovni ciljevi ovog istraživanja su da se ispita:

1. Prisustvo, lokalizacija i distribucija tumor infiltrišućih limfocita, kako ukupnih, tako i CD4+ i CD8+ T limfocita u tumoru dojke.
2. Povezanost tumor infiltrišućih limfocita, kao i CD4+ i CD8+ limfocita sa hormonskim receptorima (estrogenskim i progesteronskim), sa ekspresijom HER-2/neu proteina u tumoru, kao i sa histološkim gradusom i veličinom tumora.
3. Povezanost tumor infiltrišućih limfocita, kao i CD4+ i CD8+ limfocita sa limfonodusnim statusom aksile.
4. Prognostički značaj tumor infiltrišućih limfocita, kao i CD4+ i CD8+ limfocita kod obolelih od karcinoma dojke, tj. razlike u nivou infiltracije limfocita u tumoru u odnosu na pojavu relapsa bolesti i dužinu preživljavanja.

## Hipoteze:

1. Kod bolesnica sa karcinomom dojke postoji pozitivna korelacija između visokog nivoa tumor infiltrišućih limfocita (kao i CD4+ i CD8+ limfocita) i histološkog gradusa, veličine tumora i ekspresije HER-2/neu proteina u tumoru.
2. Kod bolesnica sa karcinomom dojke postoji negativna korelacija između visokog nivoa infiltracije limfocita u tumoru (kao i CD4+ i CD8+ limfocita) i hormonskog statusa.
3. Kod bolesnica sa karcinomom dojke postoji pozitivna korelacija između nivoa infiltracije limfocita u tumoru (kao i CD4+ i CD8+ limfocita) i prisustva metastaza u limfnim čvorovima aksile.
4. Bolesnice sa karcinomom dojke kod kojih se detektuje veći nivo tumor infiltrišućih limfocita (kao i CD4+ i CD8+ limfocita) imaju kraće preživljavanje bez znakova bolesti (engl. *disease-free survival, DFS*) odnosno imaju kraće ukupno preživljavanje (engl. *cancer-specific overall survival OS*).

### **3. BOLESNICE, MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Bolesnice i uzorci**

Ovim istraživanjem je obuhvaćeno 120 bolesnica sa invazivnim duktalnim karcinomom, sa tumorom lokalizovanim samo u dojci bez zahvatanja kože i grudnog mišića, sa veličinom tumora do 5 cm, bez udaljenih visceralnih i koštanih metastaza i koje su operisane u Institutu za onkologiju Vojvodine. U istraživanje su uključene i bolesnice bez metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame i bolesnice sa metastazama u limfnim čvorovima pazušne jame. Istraživanjem nisu obuhvaćene bolesnice koje su primale neoadjuvantnu (preoperativnu) hemioterapiju, kao ni bolesnice sa multifokalnim i multicentričnim tumorima. Praćenje bolesnica, tok i ishod bolesti, dužina preživljavanja ili uzrok smrti su utvrđeni na osnovu medicinske dokumentacije tj. istorije bolesti, ili podataka dobijenih intervjuom sa bolesnicama ili njihovom porodicom.

U radu je određeno opšte preživljavanje bolesnica sa karcinomom dojke i preživljavanje bolesnica bez progresije bolesti. Pod relapsom (progresijom) bolesti je smatrana pojava lokalnog recidiva, metastaza ili novog tumora dojke u periodu praćenja bolesnica. Cenzorisani status bolesnica je određen datumom zaključenja studije (01.11.2014.); kao živa - bez relapsa bolesti, živa- sa relapsom bolesti, umrla od posledica tumorske bolesti i umrla od interkurentne bolesti.

### 3.2. Metode rada

Tkivo dojke sa tumorom, je nakon hirurškog odstranjenja, dostavljeno na patohistološku obradu, pri čemu je materijal pregledan i opisan. Veličina tumora određena makroskopskim pregledom ekscidiranog čvora definisana je kao najveći dijametar najvećeg invazivnog fokusa. Serijskim presecima kroz tkivo evakuisane aksile, izvršena je makroskopska identifikacija limfnih čvorova. Odabrani uzorci tkiva za histološku analizu fiksirani su u 10%-nom rastvoru formalina, ukalupljeni u parafin i sečeni na rezove debljine 5 µm. Deparafinisani tkivni isečci su bojeni metodom hematoksilin-eozin (HE) i analizirani.

Patohistološkom analizom HE preparata definisani su:

- Stepent histološke diferentovanosti dukalnog infiltrativnog karcinoma dojke
- Prisustvo limfocitnog infiltrata u tumoru
- Postojanje metastaza u regionalnim limfnim čvorovima

Histološki tip tumora određen je na osnovu predloga patohistološke klasifikacije karcinoma dojke Svetske zdravstvene organizacije (32).

Stadijum tumorske bolesti karcinoma dojke je utvrđen na osnovu procene veličine tumora, statusa limfnih čvorova (nodus) i prisustva metastaza - TNM sistema Američkog udruženog odbora za karcinome (AJCC – engl. *American Joint Committee on Cancer*) (24,25). Stadijum tumorske bolesti je određen na osnovu p (patološke) TNM klasifikacije karcinoma dojke.

Za utvrđivanje stepena histološke diferentovanosti korišćen je semikvantitativni Bloom-Richardson sistema gradiranja modifikovan od strane Elston i Ellis-a (136).

Prisustvo limfocitnog infiltrata u tumoru određivano je semikvantitativnim metodama, svrstavanjem uzoraka u četiri kategorije: 0 - bez prisunog infiltrata, 1 - oskudan limfocitni infiltrat, 2 - umeren limfocitni infiltrat, 3 - gust limfocitni infiltrat. Nadalje, prilikom

statističke obrade podataka gustina infiltracije 0 i 1 posmatrana je kao niska, a 2 i 3 kao visoka (137).

Na osnovu HE bojenih preparata izabran je reprezentativan uzorak za imunohistohemijska ispitivanja kao i određivanje amplifikacije HER-2 gena metodom hromogene in situ hibridizacije (CISH).

### **3.3. Imunohistohemijske analize**

Za imunohistohemijske analize su korišćeni uzorci tumorskog tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafin sečeni na preseke debljine 4  $\mu\text{m}$ . Posle deparafinizacije i blokiranja endogene peroksidaze sa 3%-nim rastvorom  $\text{H}_2\text{O}_2$  u trajanju od 5 minuta, iseći su zbog demaskiranja antigena, tretirani u 10mM citratnom puferu (0,1 M limunska kiselina  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , 0,1 M natrijum citrat  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ , pH 6,0) u mikrotalasnoj rerni, 2x10 minuta, nakon čega su ispirani dejonizovanom vodom. Imunohistohemijska identifikacija ispitivanih antigena je vršena primenom Streptavidin-biotin-peroksidaza tehnike, prema standardnoj LSAB+ proceduri (DAKO).

Primenjena su sledeća primarna monoklonska antitela u optimalnim ili komercijalnim koncentracijama (LSAB DAKO prediluted):

- Estrogen receptor alfa, 1D5, M7047, DAKO
- Progesteron receptor, 1A6, M3529, DAKO
- HER2 /c-erbB-2 protein, A0485, DAKO
- CD4 (FLEX Monoclonal Mo a Hu CD4, Clone 4B12, DAKO, RTU)
- CD8 (FLEX Monoclonal Mo a Hu CD8, Clone 144B, DAKO, RTU)

Iseći su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi sa biotiniziranim antimišijim antitelom, a zatim su inkubirani streptavidin-peroksidaza kompleksom, u trajanju od 30



minuta. Kao hromogeni substrat primenjen je 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, DAKO). Nakon svakog inkubiranja uzorci su ispirani u Tris puferisanom rastvoru (TBS: 0,05 M, pH 7,6) i kontrastirani hematoksilinom. Isečci su pokriveni specijalnim vodenim medijumom.

Imunohistohemijska analiza je vršena svetlosno-mikroskopski, kvalitativnom i semikvantitativnom analizom, uz korišćenje kontrola.

### **Imunohistohemijska analiza CD4+ i CD8+ limfocita u tumoru**

Rezultate imunohistohemijske reakcije procenjivao je patolog semikvantitativnom metodom, a gustina infiltrata CD4+ i CD8+ limfocita svrstana je u jednu od četiri grupe: 0 - bez prisunog infiltrata, 1 - oskudan limfocitni infiltrat, 2 - umeren limfocitni infiltrat, 3 - gust limfocitni infiltrat. Nadalje, prilikom statističke obrade podataka gustina infiltracije 0 i 1 posmatrana je kao niska, a 2 i 3 kao visoka (137).

### **Imunohistohemijska analiza hormonskih receptora (estrogen receptor i progesteron receptor)**

Za određivanje ekspresije hormonskih receptora u uzorcima tumorskog tkiva korišćena je imunohistohemijska metoda upotrebom estrogen i progesteron primarnih antitela koji markiraju nuklearne steroidne receptore. Određivanje intenziteta imunoreaktivnosti kod ER i PR vršeno je sabiranjem intenziteta imunoreaktivnosti bojenja i procenta obojenih nukleusa tumorskih ćelija - *Allred score* (138). Maksimalan zbir (skor) za procenu ekspresije receptora svakog ponaosob (ER ili PR), koja se dobija sabiranjem vrednosti za procenat imunoreaktivnih jedara i intenziteta imunoreaktivnog bojenja, iznosi 8. Vrednosti ekspresije

ER i PR označene vrednošću 0 - 2 su smatrane negativnim nalazom, dok je u svim ostalim slučajevima, kada je ekspresija iznosila 3 i više, nalaz smatran pozitivnim (138).

Vrednost za procenu broja imunoreaktivnih jedara:

- 1 - manje od 1% obojenih nukleusa
- 2 - 1-10% obojenih nukleusa
- 3 - 11-33% obojenih nukleusa
- 4 - 34-66% obojenih nukleusa
- 5 - 67-100% obojenih nukleusa

Vrednost za intenzitet imunoreaktivnog bojenja:

- 0 - nema nukleusnog bojenja
- 1 - slab intenzitet nukleusnog bojenja
- 2 - umeren intenzitet nukleusnog bojenja
- 3 - veoma intenzivno nukleusno bojenje

### **Imunohistohemijska analiza c-erbB-2 (HER2) proteina**

U proceni ekspresije c-erbB2 proteina korišćen je scoring sistem sa četiri kategorije (0-3), preporučan od strane proizvođača (DAKO), pri čemu su rezultati interpretirani na sledeći način (139):

- 0 - nema membranskog bojanja ili u <10% tumorskih ćelija
- 1 - slabo/jedva vidljivo membransko bojanje u >10% tumorskih ćelija (delimično obojane membrane)
- 2 - slabo/umereno, kompletno membransko bojanje u >10% tumorskih ćelija
- 3 - jako, kompletno membransko bojanje koje se nalazi u >10% tumorskih ćelija

Pri određivanju HER2 statusa citoplazmatska imunoreaktivnost nije vrednovana, obzirom da je malo verovatno da predstavlja rezultat genske amplifikacije (139,140).

Kao unutrašnja negativna kontrola korišćene su tumorski neizmenjene epitelne ćelije duktusa dojke. Kao pozitivna kontrola služili su uzorci tumorskog tkiva sa IHH HER2 skorom 3+, i dokazanom HER2 genskom amplifikacijom.

Slučajevi sa skorom 2+ retestirani su metodom hromogene in situ hibridizacije (CISH), dok je skor 3+ IHH testiranja tumačen kao pozitivan. Slučajevi sa skorom 0 i 1 vrednovani su kao negativni (139,140).

### **Hromogena in situ hibridizacija (CISH)**

U slučajevima nalaza proteinske ekspresije HER2 skor 2, primenjena je CISH metoda, u cilju provere postojanja amplifikacije HER2 gena. U detekciji HER2 genske amplifikacije, korišćen je Zymed SpOT-Light®HER2 CISH™Kit.

Serijski rezovi debljine do 4 µm, istog isečka tumorskog tkiva koji je korišćen za imunohistohemijsku analizu, su deparafinisani, a zatim zagrevani iznad 98°C 15 minuta u CISH™ rastvoru. Nakon digestije pepsinom 10 minuta na sobnoj temperaturi rezovi su ispirani u destilovanoj vodi i dehidratirani alkoholnim rastvorima. Posle toga, uzorci su tretirani i HER2 probom, prekriveni pokrovnicom, denaturisani na toploj ploči (94°C, 5 minuta), i ostavljeni na njoj radi hibridizacije tokom noći na temperaturi od 37°C. U sledećem koraku, isecci su ispirani SSC puferom i destilovanom vodom. Posle blokiranja endogene peroksidaze i tretiranja sa mišijim antidigiksinom antitelom, HER2 detekcija je vršena pomoću diaminobenzidina (DAB) koji je korišćen kao hromogen. Isecci su zatim bojani hematoksilinom. U radu su korišćene pozitivne i negativne kontrole.

Uzorci su analizirani svetlosnim mikroskopom na 40x uvećanju i interpretirani prema priloženim preporukama proizvođača (Zymed® HER2 CISH™ Test Interpretation Guide).

Prisustvo amplifikacije HER2 gena tumačeno je kao:

amplifikacija nije prisutna - 1-5 signalnih tačaka u više od 50% tumorskih ćelija

amplifikacija prisutna - 6 ili više signalnih tačaka po nukleusu u preko 50% tumorskih ćelija.

### **3.4. Statistička obrada**

Za unos i obradu podataka korišćen je kompjuterski program SPSS 11.5 for Windows. Kako bi se prikazali deskriptivni podaci (aritmetička sredina, standardna devijacija, medijana i raspon) o prikupljenim merama, primenjen je deskriptivni statistički metod. Kako bi se dovela u relaciju učestalosti različitih kliničko patoloških pokazatelja tumora (navedenih u tabeli 3) u grupama sa visokom i niskom infiltracijom ukupnih, CD4+ i CD8+ limfocita primenjen je  $\chi^2$  test za nezavisne uzorke. Da bi se utvrdila povezanost između niskog i visokog nivoa infiltracije limfocita u tumoru sa kliničko patološkim pokazateljima tumora, primenjen je Spirmanov koeficijent rang korelacije (Spearman's rho).

Kako bi se ispitaio odnos aktivnosti CD4+, CD8+ i ukupnih limfocita i broja meseci proteklih od operacije do ponovne pojave bolesti (relapsa) i smrtnog ishoda bolesti, kao kofaktora za verovatnoću ponovnog javljanja bolesti i preživljavanje bolesnica, primenjene su Kaplan – Majerove analize kao i Long Rank test za poređenje preživljavanja između ispitivanih grupa. U sve tri analize „status” varijabla je bila ishod (pojava ili odsustvo relapsa/smrtnog ishoda) dok je „time” varijabla predstavljala broj meseci proteklih od operacije do pojave relapsa bolesti/smrtnog ishoda. Kategorijalna („factor”) varijabla je u prvoj analizi bila TIL (nizak ili visok), u drugoj CD4+ limfociti (nizak ili visok), a u trećoj CD8+limfociti (nizak ili visok).

Za ispitivanje uticaja različitih prognostičkih pokazatelja, kao i nivoa limfocita u tumoru, na ponovnu pojavu bolesti i na smrtni ishod bolesti, primenjena je Coxova regresiona analiza. Prediktorske varijable, odnosno kovarijati, u obe analize predstavljaju prognostički pokazatelji i nivo limfocita. U prvoj Coxovoj analizi, „status” varijabla je prisustvo/odsustvo relapsa, dok je „time” varijabla vreme do relapsa (meseci). U drugoj Coxovoj analizi, „status” varijabla je pojava smrtnog ishoda kod bolesnika, dok je „time” varijabla vreme proteklo do smrtnog ishoda (meseci).

U svim navedenim metodama statističke obrade podataka, kriterijum za statističku značajnost sličnosti ili razlika bila je verovatnoća greške manja od 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Kliničko patološke karakteristike karcinoma dojke i deskripcija uzorka

Tabela 3. Kliničko patološke karakteristike karcinoma dojke u ispitivanoj grupi sa podacima o relapsu bolesti i preživljavanju bolesnica

Parametar	Bolesnice sa malignim tumorom	
	N (120)	%
<b>Veličina tumora</b>		
2 cm i manji	59	49,2%
Veći od 2cm	61	50,8%
<b>Histološki gradus</b>		
G1	14	11,7%
G2	51	42,5%
G3	55	45,8%
<b>Aksilarni limfni čvorovi</b>		
Pozitivni	53	44,2%
Negativni	67	55,8%
<b>Estrogen receptor</b>		
Negativan	33	27,5%
Pozitivan	87	72,5%
<b>Progesteron receptor</b>		
Negativan	43	35,8%
Pozitivan	77	64,2%

<b>HER2 ekspresija</b>			
Negativna	98	81,7%	
Pozitivna	22	18,3%	
<b>Tripl –</b>			
Da	17	14,2%	
Ne	103	85,8%	
<b>Stadijum bolesti</b>			
I	43	35,8%	
II	61	50,8%	
III	16	13,3%	
<b>Godine starosti</b>			
50 i manje	38	31,7%	
Više od 50	82	68,3%	
<b>Preživljavanje</b>			
Bez relapsa	89	74,2%	
Relaps	31	25,8%	
Umrli	14	11,7%	
	Minimum	Maksimum	AS(SD)
<b>Starost</b> (godine)	31	77	56,18(10,51)
<b>Umrli</b> (meseći)	11	75	45,21 (18,48)
<b>Vreme praćenja</b>	11	93	77,00 (Md)
<b>Veličina tumora</b> (cm)	0,7	3,7	1,99 (0,74)

Uzorak se sastojao od 120 bolesnica sa operativno lečenim tumorom dojke histološkog tipa duktalnog infiltrativnog karcinoma. Prosečna starost bolesnica u vreme dijagnostikovanja bolesti je bila 56,18 godina (SD=10,51). Opseg starosti bolesnica se kretao u rasponu od 31 do 77 godina (tabela 3).

Većim delom (68,3%) bolesnica sa malignim tumorom dojke bile su starije od 50 godina (Tabela 3). Prosečna vrednost veličine tumora je bila 1,99 cm (SD=0,73), sa rasponom 0,7-3,7 cm odnosno kod 59 bolesnice (49,2%) je tumor bio manji ili jednak 2 cm, a kod 61 (50,8%) bolesnica tumor je bio veći od 2 cm (tabela 3).

Analizirajući stepen histološke diferentovanosti tumora u ispitivanom uzorku, može se uočiti da je 14 (11,7%) malignih tumora bilo dobro diferentovano (G1), 51 (42,5%) tumora bilo je umereno (G2), a 55 tumora (45,8%) slabo diferentovano (G3) (tabela 3).

Rezultati prikazani u tabeli 3 sugerišu da u ispitivanoj grupi, 67 bolesnice (55,8%) nisu imale metastaze u limfnim čvorovima pazušne jame.

U ispitivanom uzorku 87 (72,5%) tumora imalo je pozitivnu ekspresiju estrogen receptora (ER), dok je u znatno manjoj meri bilo tumora bez ekspresije ER (27,5%). Progesteronski receptori bili su pozitivni u 77 karcinoma dojke (64,2%). HER-2 je bio pozitivan u 22 tumora (18,3%). U 17 tumora (14,2%) su bila negativna sva tri receptora.

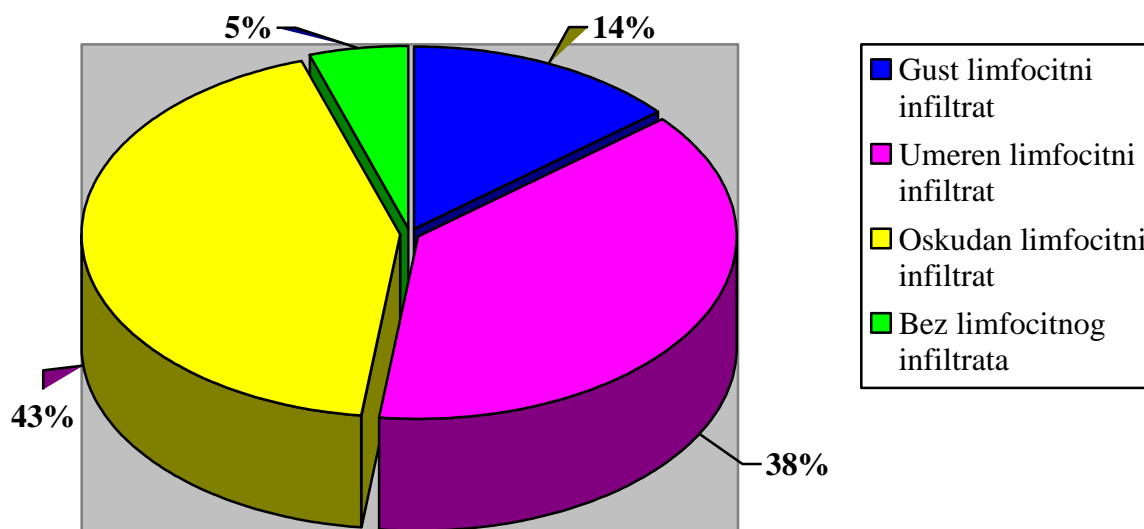
Medijana praćenja bolesnica je bila 77 meseci (raspon od 11 do 93 meseci). Tokom ovog perioda 31 bolesnica je imala relaps bolesti od kojih je 14 umrlo (tabela 3).



#### 4.2. Rezultati prisustva i distribucije tumor infiltrirajućih limfocita u tumoru dojke

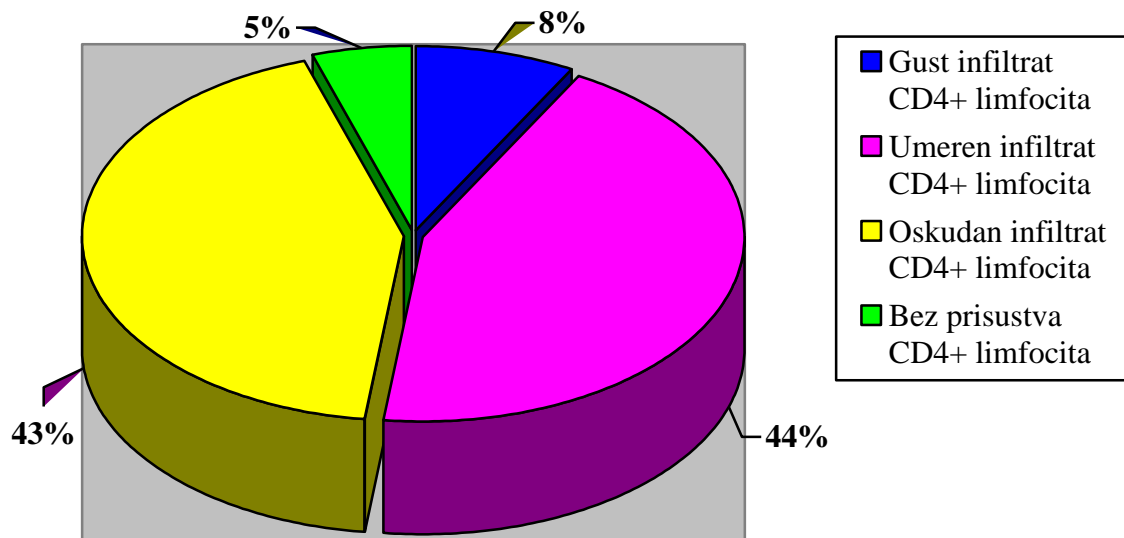
Gust limfocitni infiltrat uočen je u 17 (14%) tumora dojke, umeren limfocitni infiltrat uočen je u 45 (38%), a oskudan u 52 (43%) tumora dojke. Limfocitni infiltrat nije uočen u 6 (5%) tumora (grafikon 1).

U najvećem broju tumora sa limfocitnim infiltratom, infiltrat je uočen na tumorskim marginama (u 115 tumora), a u 45 tumora uočen je i infiltrat lokalizovan centralno. U većini tumora tip limfocitnog infiltrata je okarakterisan kao difuzan (u 87 tumora), a u 33 tumora kao mešovit (difuzan i nodularan).



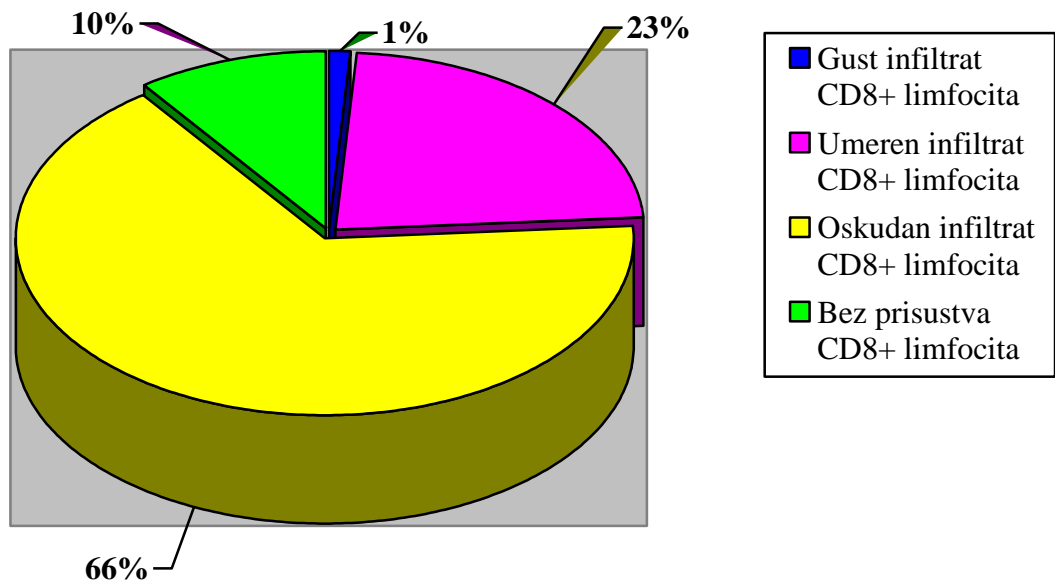
Grafikon 1: Prisustvo limfocitnog infiltrata u tumoru

Gust infiltrat CD4+ limfocita uočen je u 9 (8%) tumora dojke, umeren u 53 (44%), a oskudan u 52 (43%) tumora dojke. CD4+ limfociti nisu uočeni u 6 (5%) tumora (grafikon 2).



*Grafikon 2: Prisustvo CD4+ limfocita u tumoru*

Gust infiltrat CD8+ limfocita uočen je u 1 (1%) tumora dojke, umeren u 28 (23%), a oskudan u 79 (66%) tumora dojke. CD8+ limfociti nisu uočeni u 12 (10%) tumora (grafikon 3).



*Grafikon 3: Prisustvo CD8+ limfocita u tumoru*

### 4.3. Hi-kvadrat testovi

Kako bi se ispitala povezanost imunog odgovora, izraženog preko pokazatelja: tumor infiltrirajućih limfocita (TIL), CD4+ i CD8+ limfocita, sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame, veličinom i gradusom tumora, estrogen i progesteron receptorom, HER-2 statusom, starosti bolesnica, kao i njihova povezanost sa relapsom i smrtnim ishodom bolesti, primenjen je niz  $\chi^2$  testova za nezavisne uzorke. Rezultati su prikazani tabelama i grafikonima koje slede.

Kada je posmatran nivo infiltracije ukupnih limfocita u tumoru (TIL), dobijeni su sledeći rezultati (tabela 4):

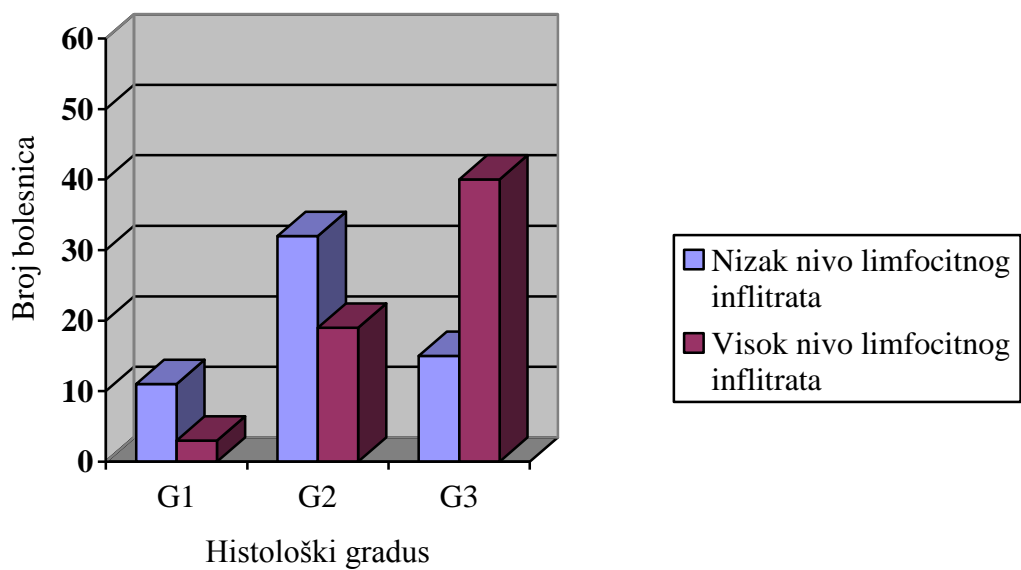
- Visok nivo infiltracije limfocita u tumoru je u relaciji sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame, tumorom većim od 2 cm, pozitivnom HER-2 ekspresijom, tripl negativnim i loše diferentovanim tumorom (G3).

- Viši stadijum bolesti je u relaciji s visokim vrednostima TIL-a. Što se tiče ponovne pojave bolesti (relapsa), visok nivo TIL-a je u pozitivnoj relaciji sa relapsom bolesti, tj. za bolesnice sa visokim nivoom limfocita u tumoru karakteristično je pogoršanje bolesti koje se javilo tokom perioda praćenja.
- Nizak nivo infiltracije limfocita je u relaciji sa dobro i srednje diferentovanim tumorom, ekspresijom estrogen i progesteron receptora. Takođe, uočena je statistički značajna relacija između starosti bolesnica i limfocitnog infiltrata, tj. bolesnice starije od 50 godina imaju niži nivo infiltracije limfocita.
- Nivo limfocitne infiltracije u tumoru nije u relaciji sa smrtnim ishodom bolesti. Statistički značajne relacije su prikazane grafikonima 4-20.

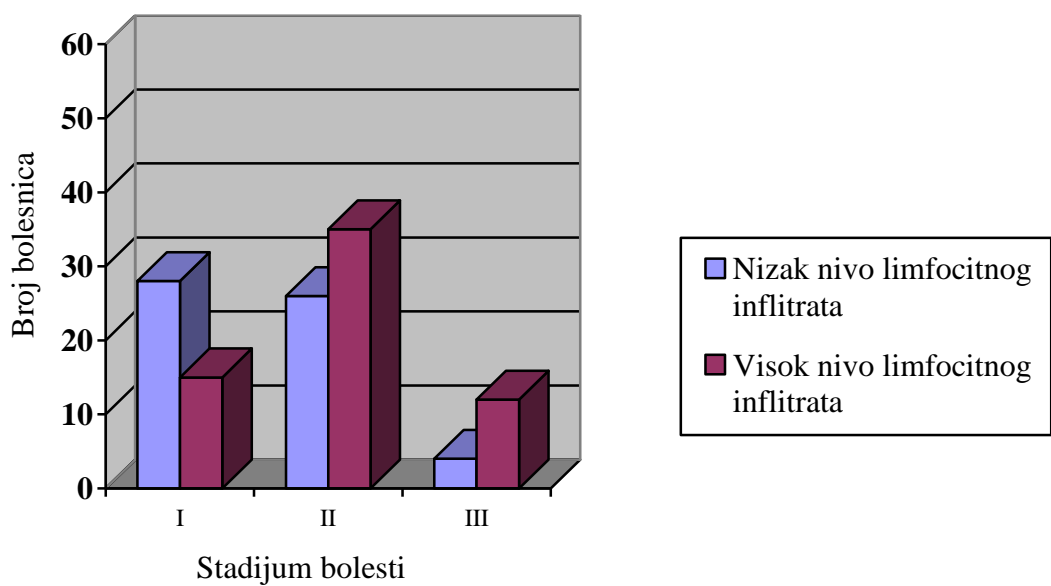
Tabela 4. Relacije TIL-a i kliničko patoloških pokazatelja

Parametar	TIL		$\chi^2^*$	p nivo
	Nizak	Visok		
<b>Gradus 1</b>			5,803	<b>0,016</b>
Nije	47(44,34%)	59(55,66%)		
Jeste	11(78,57%)	3(21,43%)		
<b>Gradus 2</b>			7,377	<b>0,007</b>
Nije	26(37,68%)	43(62,32%)		
Jeste	32(62,74%)	19(37,26%)		
<b>Gradus 3</b>			18,035	<b>0,000</b>
Nije	43(66,15%)	22(33,85%)		
Jeste	15(27,27%)	40(73,73%)		
<b>ER</b>			8,085	<b>0,004</b>
Negativan	9(27,27%)	24(0,73%)		
Pozitivan	49(56,32%)	38(43,68%)		
<b>PR</b>			11,197	<b>0,001</b>
Negativan	12(27,90%)	31(72,10%)		
Pozitivan	46(59,74%)	31(40,26%)		
<b>HER-2</b>			12,987	<b>0,000</b>
Negativan	55(56,12%)	43(43,88%)		
Pozitivnan	3(13,63^%)	19(86,37%)		
<b>TRIPL-</b>			4,880	<b>0,027</b>
Da	54(52,4%)	49(47,6%)		
Ne	4(23,5%)	13(76,5%)		
<b>LGL</b>			10,047	<b>0,002</b>
Negativan	41(61,19%)	26(38,81%)		
Pozitivnan	17(32,07%)	36(67,93%)		
<b>Veličina tumora</b>			7,544	<b>0,006</b>
2cm i manji	37(60,65%)	24(39,35%)		
Veći od 2 cm	21(35,59%)	38(64,41%)		
<b>Godine starosti</b>			6,251	<b>0,012</b>
50 i manje	12(31,58%)	26(68,43%)		
Više od 50	46(56,10%)	36(43,90%)		
<b>Stadijum bolesti</b>			9,135	<b>0,010</b>
I	28(65,1%)	15(34,9%)		
II	26(42,6%)	35(57,4%)		
III	4(25%)	12(75%)		
<b>Relaps bolesti</b>			11,100	<b>0,001</b>
Nije	51(57,3%)	38(42,7%)		
Jeste	7(22,6%)	24(77,4%)		
<b>Umrli</b>			1,011	0,315
Da	5(35,7%)	9(64,3%)		
Ne	53 (50%)	53(50%)		

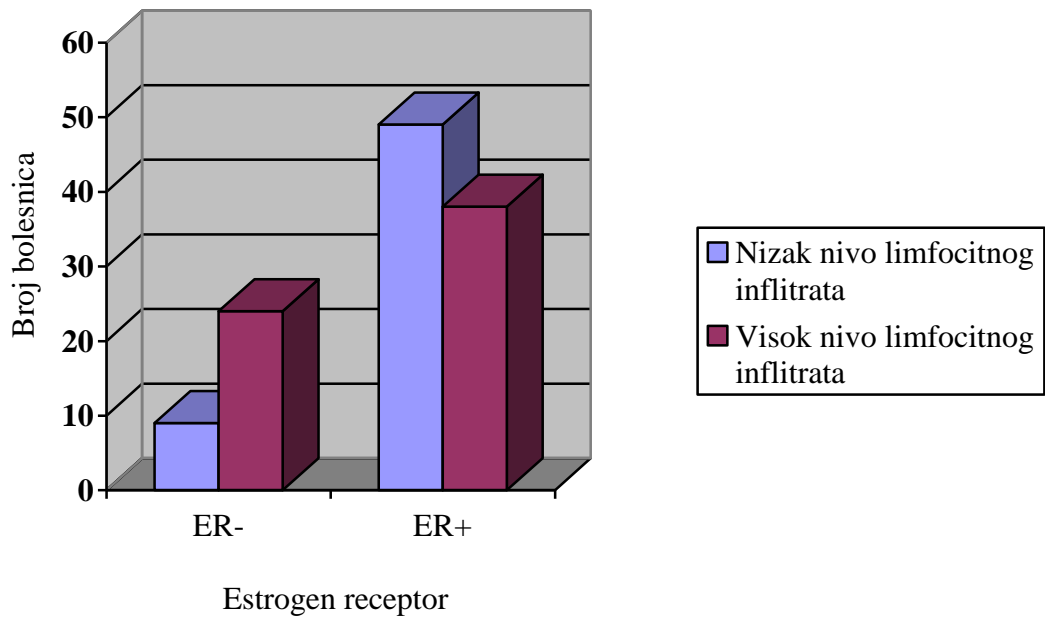
\* broj stepeni slobode za sve analize iznosi df =



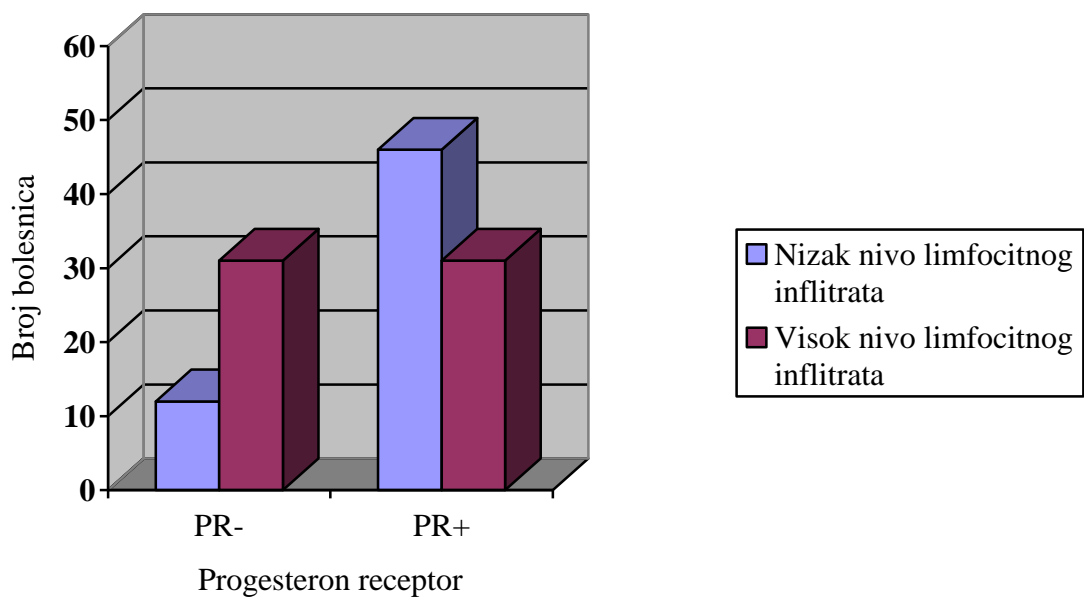
*Grafikon 4: Odnos nivoa prisutnog limfocitnog infiltrata u tumoru i histološkog gradusa*



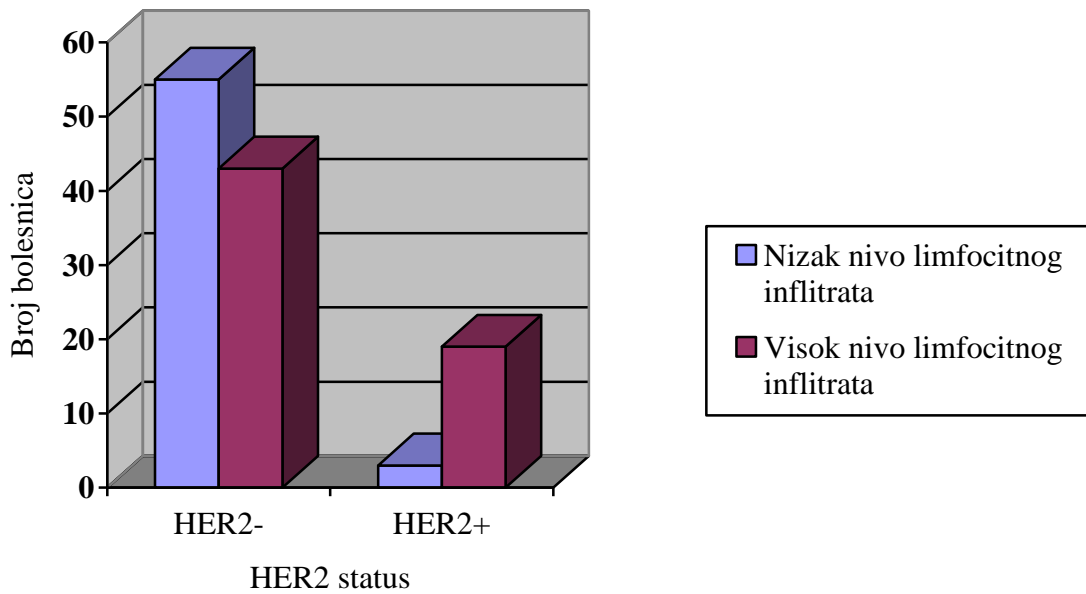
*Grafikon 5: Odnos nivoa prisutnog limfocitnog infiltrata u tumoru i stadijuma bolesti*



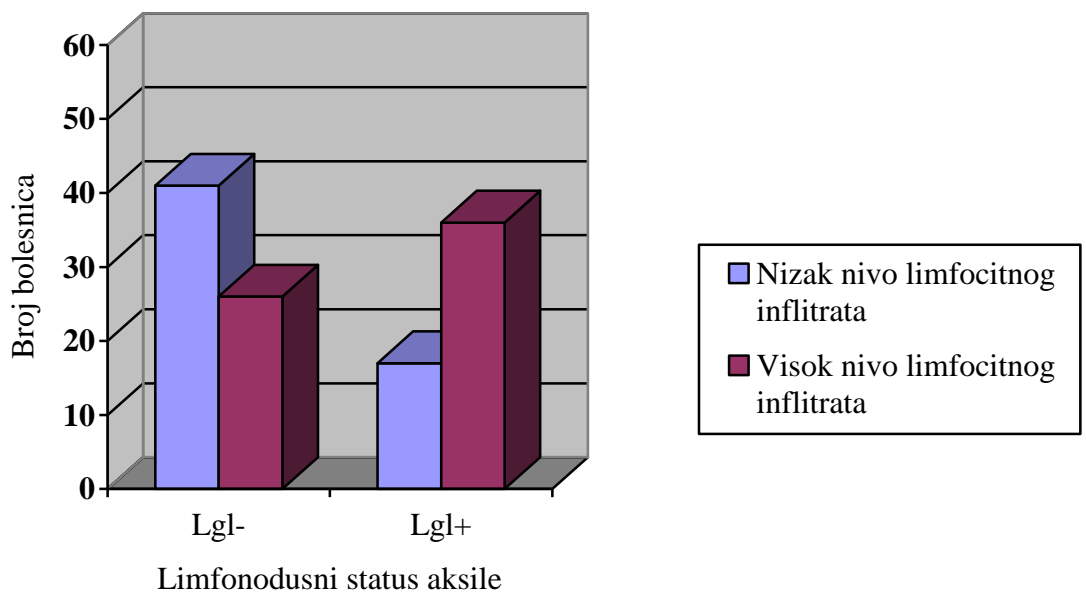
Grafikon 6: Odnos nivoa prisutnog limfocitnog infiltrata u tumoru i estrogen receptora



Grafikon 7: Odnos nivoa prisutnog limfocitnog infiltrata u tumoru i progesteron receptora

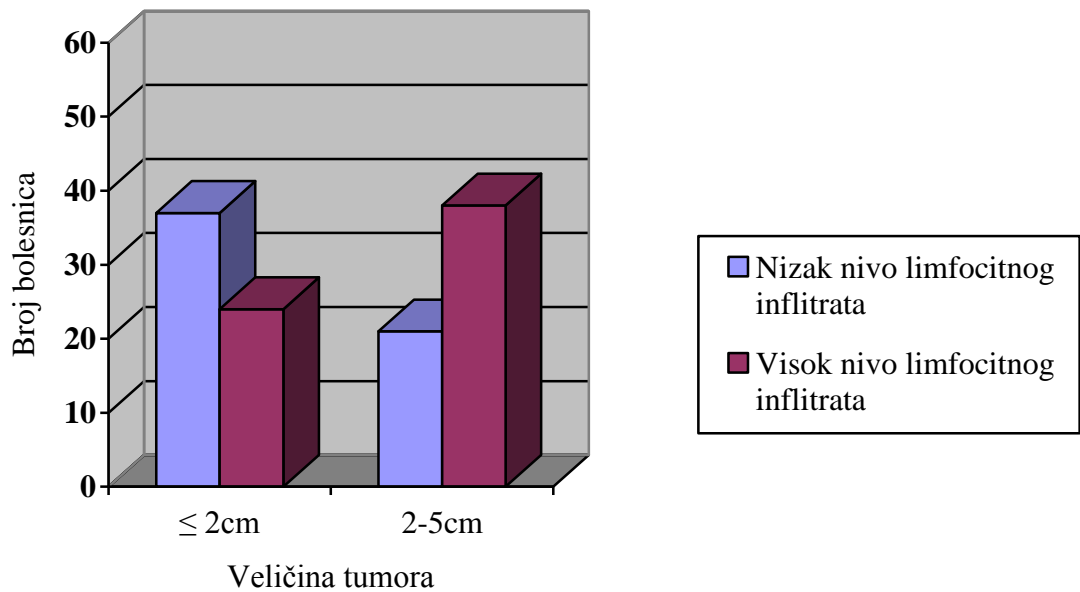


*Grafikon 8: Odnos nivoa prisutnog limfocitnog infiltrata u tumoru i HER2 statusa*

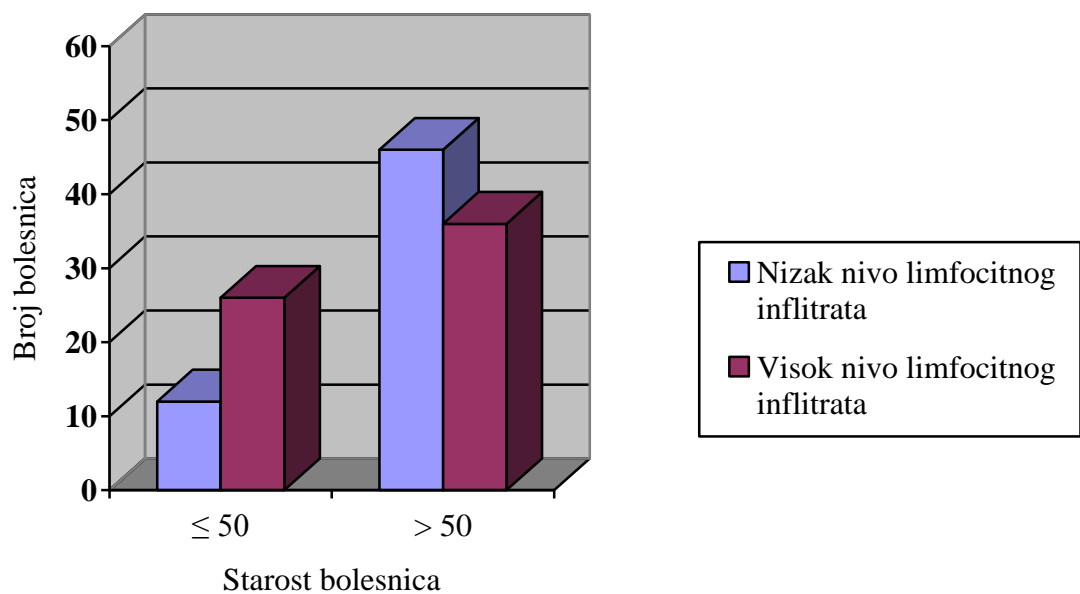


*Grafikon 9: Odnos nivoa prisutnog limfocitnog infiltrata u tumoru i limfonodusnog statusa aksile*

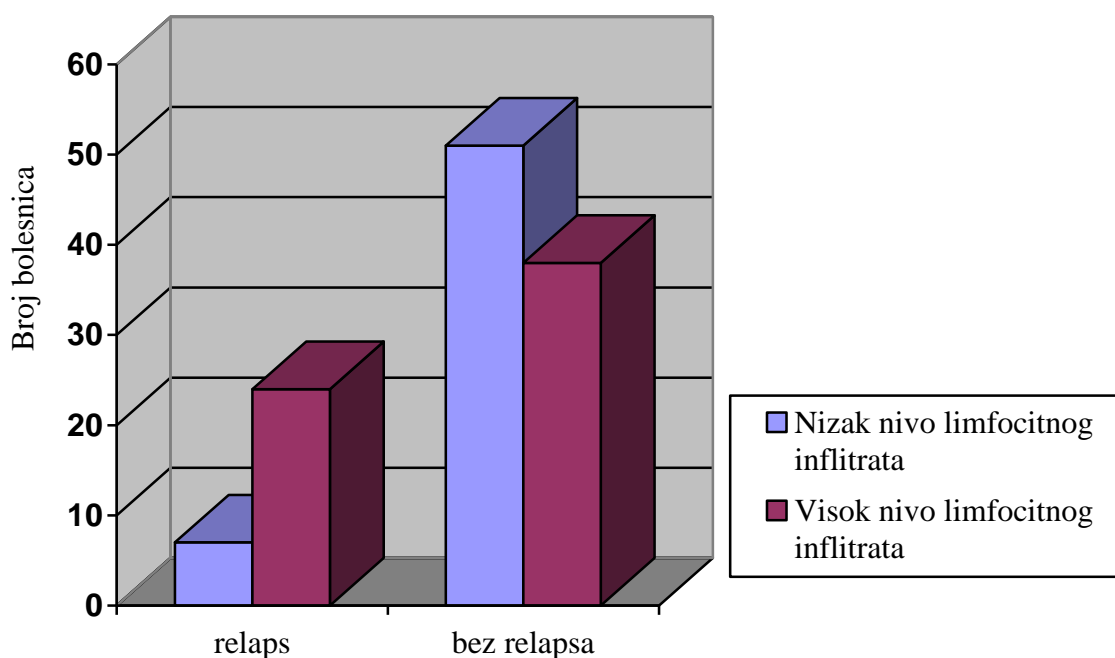




*Grafikon 10: Odnos nivoa prisutnog limfocitnog infiltrata u tumoru i njegove veličine*



*Grafikon 11: Odnos nivoa prisutnog limfocitnog infiltrata u tumoru i starosti bolesnica*



*Grafikon 12: Odnos nivoa prisutnog limfocitnog infiltrata u tumoru i relapsa bolesti*

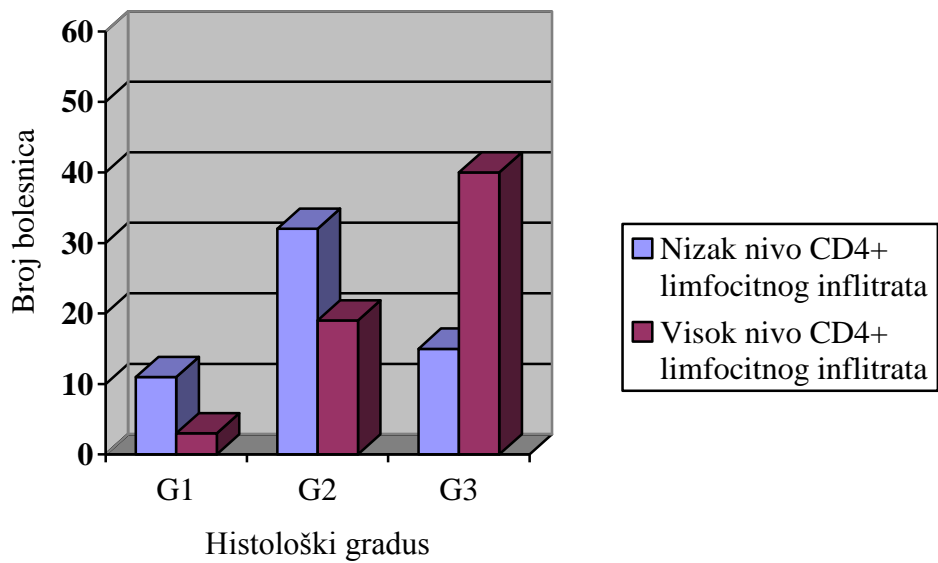
Kada su u pitanju CD4+ limfociti, dobijeni su sledeći rezultati (tabela 5):

- Visok nivo infiltracije CD4+ limfocita u tumoru je u relaciji sa loše diferentovanim tumorom (G3), prisustvom metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame, tripl negativnim i tumorom većim od 2 cm, pozitivnom HER-2 ekspresijom, ali takođe i sa odsustvom ekspresije estrogen i progesteron receptora.
- Viši stadijum bolesti je u relaciji s visokim vrednostima CD4+ limfocita. Kada je u pitanju relaps bolesti, i ovde se pokazalo da visok nivo CD4+ limfocita ostvaruje pozitivnu relaciju sa ponovnom pojavom bolesti tj. za bolesnice sa visokim nivoom CD4+ limfocita u tumoru karakteristično je pogoršanje bolesti koje se javilo tokom perioda praćenja.
- Nizak intezitet infiltracije CD4+ limfocita ostvaruje relaciju sa dobro i srednje diferentovanim tumorom.
- Nivo CD4+ limfocita u tumoru nije u relaciji sa smrtnim ishodom bolesti, kao ni sa godinama starosti bolesnica u vreme postavljanja dijagnoze.

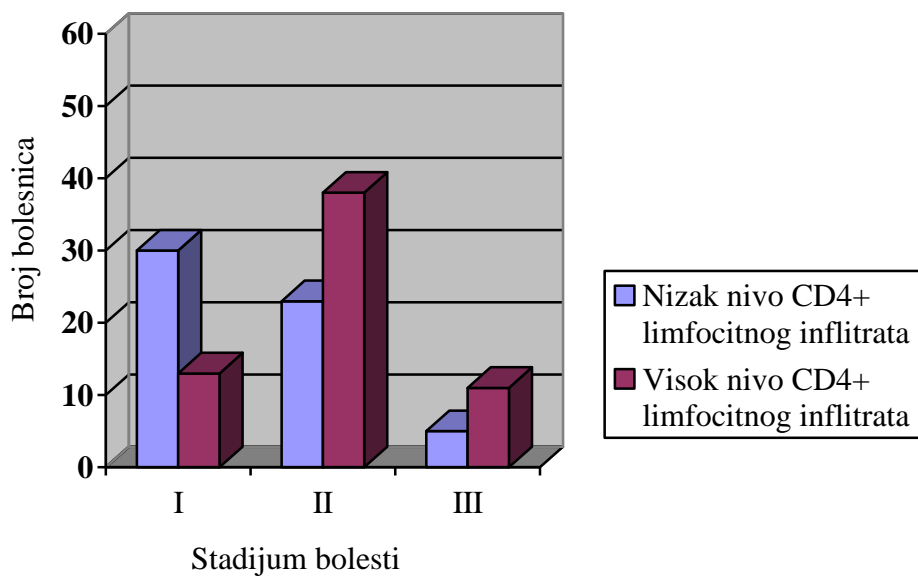
Tabela 5. Relacije CD4+ limfocita i kliničko patoloških pokazatelja

Parametar	CD4+		$\chi^2$ *	p nivo
	Nizak	Visok		
<b>Gradus 1</b>			5,803	<b>0,016</b>
Nije	47(44,33%)	59(55,67%)		
Jeste	11(78,57%)	3(21,43%)		
<b>Gradus 2</b>			7,377	<b>0,007</b>
Nije	26(37,68%)	43(62,32%)		
Jeste	32(62,74%)	19(37,26%)		
<b>Gradus 3</b>			18,035	<b>0,000</b>
Nije	43(66,15%)	22(33,86%)		
Jeste	15(27,27%)	40(72,73%)		
<b>ER</b>			8,085	<b>0,004</b>
Negativan	9(27,27%)	24(72,73%)		
Pozitivnan	49(56,32%)	38(43,68%)		
<b>PR</b>			11,197	<b>0,001</b>
Negativan	12(27,90%)	31(72,10%)		
Pozitivnan	46(59,74%)	31(40,26%)		
<b>HER2</b>			7,073	<b>0,008</b>
Negativan	53(54,08%)	45(45,92%)		
Pozitivnan	5(22,72%)	17(77,28%)		
<b>TRIPL-</b>			4,880	<b>0,027</b>
Da	54(52,4%)	49(47,6%)		
Ne	4(23,5%)	13(76,5%)		
<b>LGL</b>			7,851	<b>0,005</b>
Negativan	40(59,70%)	27(40,30%)		
Pozitivan	18(33,96%)	35(66,04%)		
<b>Veličina tumora</b>			12,092	<b>0,001</b>
2cm i manji	39(63,93%)	22(36,07%)		
Veći od 2 cm	19(32,20%)	40(67,80%)		
<b>Godine starosti</b>			2,941	0,086
50 i manje	14(36,84%)	24(63,16%)		
Više od 50	44(53,65%)	38(46,36%)		
<b>Stadijum bolesti</b>			12,540	<b>0,002</b>
I	30(69,8%)	13(30,2%)		
II	23(37,7%)	38(62,3%)		
III	5(31,3%)	11(68,7%)		
<b>Relaps bolesti</b>			8,484	<b>0,004</b>
Nije	50(56,2%)	39(43,8%)		
Jeste	8(25,8%)	23(74,2%)		
<b>Umrlji</b>			1,011	0,315
Da	5(35,7%)	9(64,3%)		
Ne	53(50%)	53(50%)		

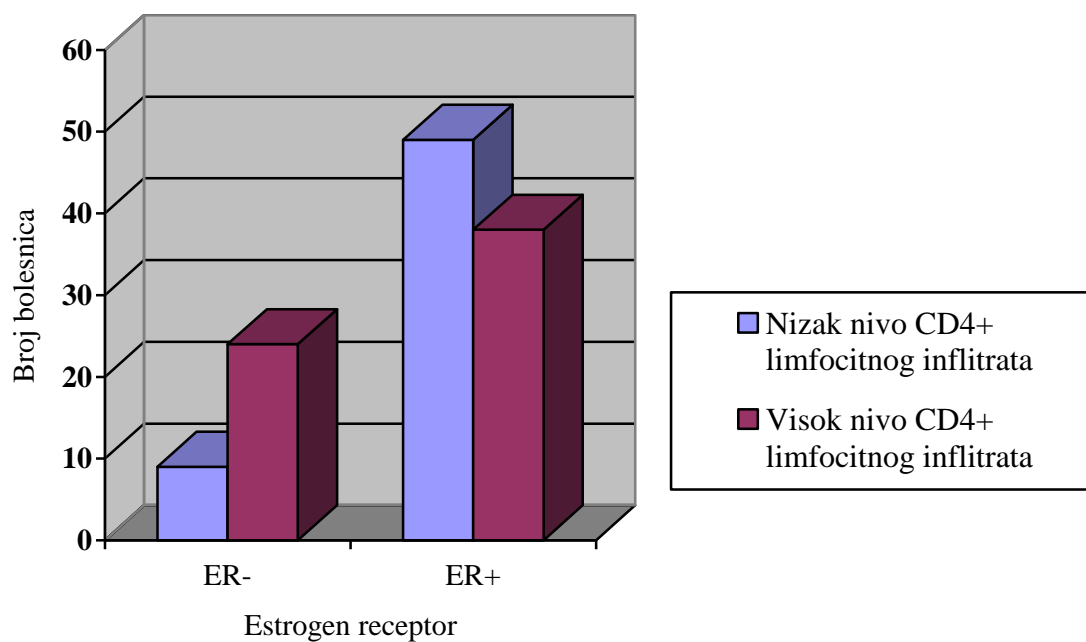
\* broj stepeni slobode za sve analize iznosi df = 1



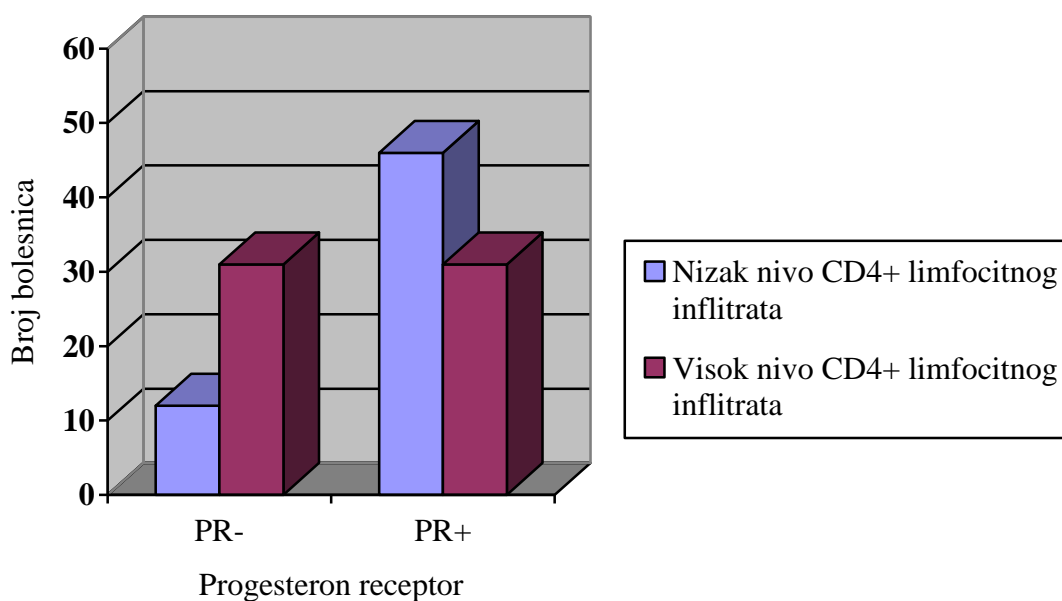
*Grafikon 13: Odnos nivoa prisutnog CD4+ limfocitnog infiltrata u tumoru i histološkog gradusa*



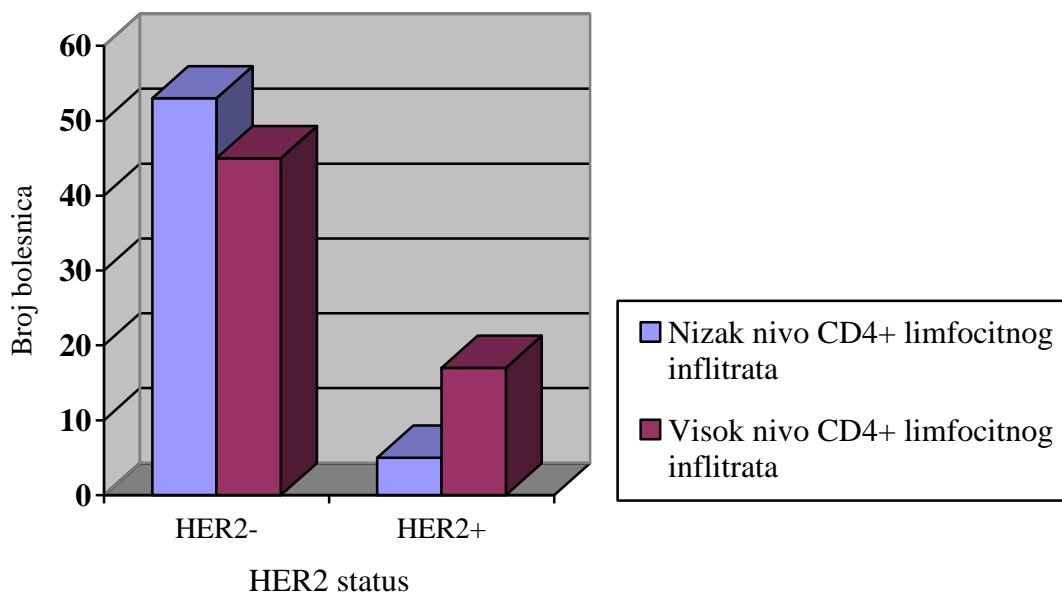
*Grafikon 14: Odnos nivoa prisutnog CD4+ limfocitnog infiltrata u tumoru i stadijuma bolesti*



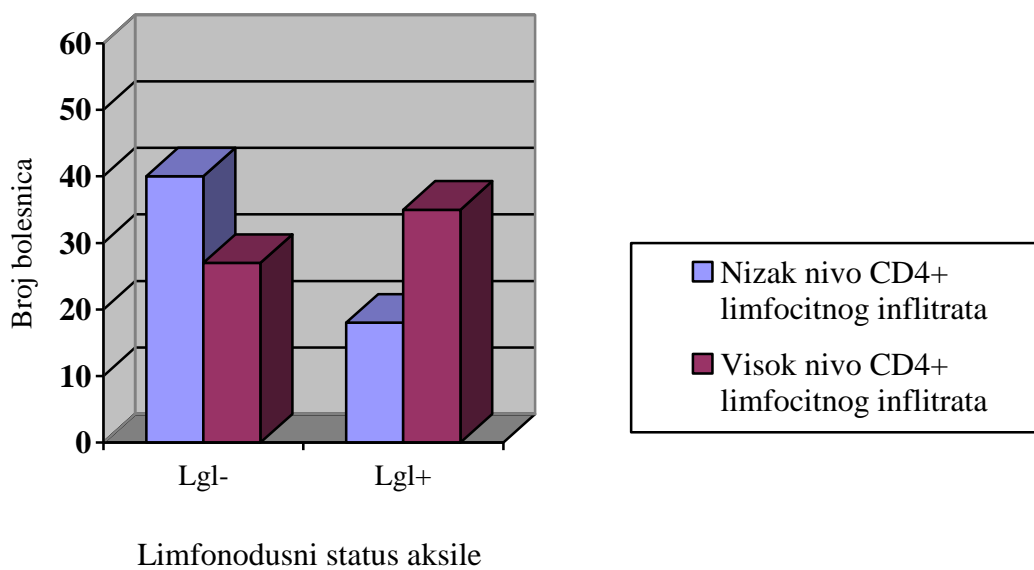
*Grafikon 15: Odnos nivoa prisutnog CD4+ limfocitnog infiltrata u tumoru i estrogen receptora*



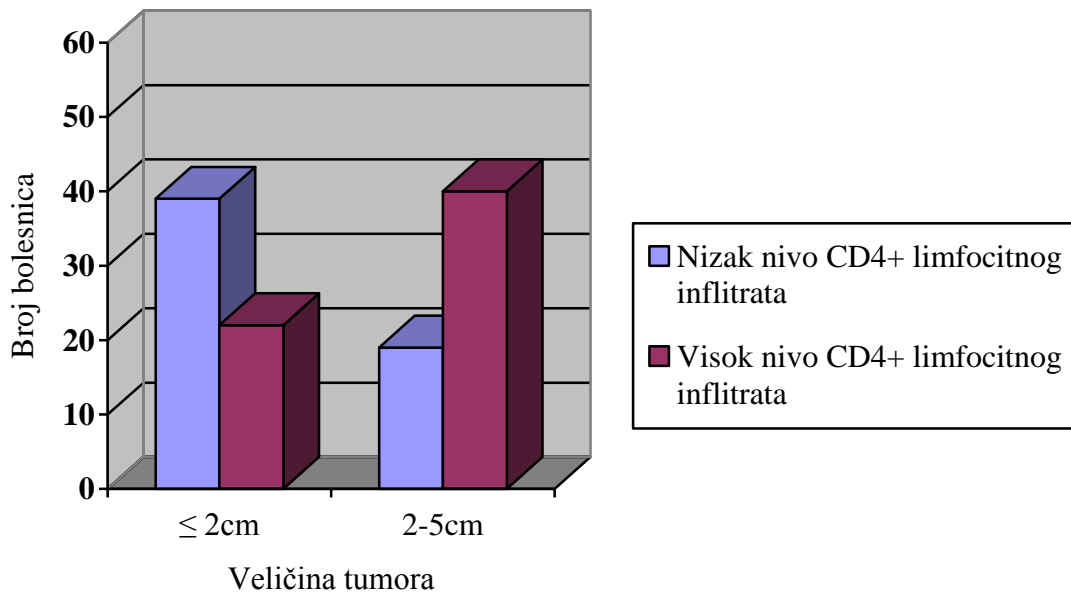
*Grafikon 16: Odnos nivoa prisutnog CD4+ limfocitnog infiltrata u tumoru i progesteron receptora*



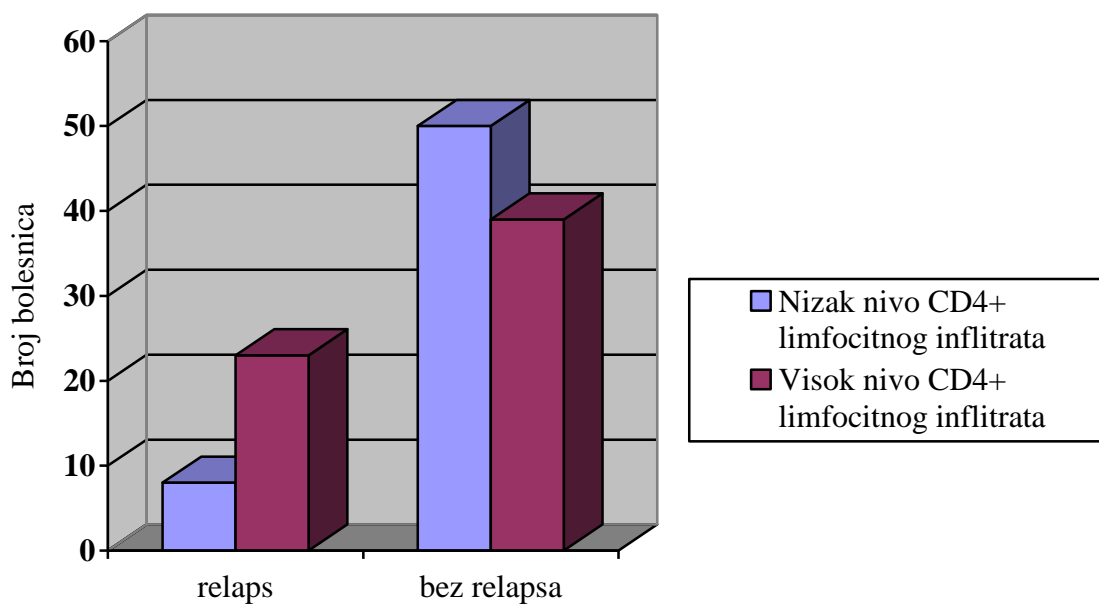
*Grafikon 17: Odnos nivoa prisutnog CD4+ limfocitnog infiltrata u tumoru i HER2 statusa*



*Grafikon 18: Odnos nivoa prisutnog CD4+ limfocitnog infiltrata u tumoru i limfonodusnog statusa aksile*



*Grafikon 19: Odnos nivoa prisutnog CD4+ limfocitnog infiltrata u tumoru i njegove veličine*



*Grafikon 20: Odnos nivoa prisutnog CD4+ limfocitnog infiltrata u tumoru i relapsa bolesti*

Kada su u pitanju CD8+ limfociti, dobijeni su sledeći rezultati (tabela 6):

- Nizak nivo infiltracije CD8+ limfocita je u relaciji sa HER-2 negativnim tumorom, estrogen i progesteron pozitivnim tumorom i sa odsustvom loše diferentovanog tumora (G3). Bolesnice starije od 50 godina imaju nizak nivo infiltracije CD8+ limfocita u tumoru.
- Nivo CD8+ limfocita u tumoru nije u relaciji sa njegovom veličinom, tripl negativnim tumorima, prisustvom metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame, stadijumom i relapsom bolesti, kao ni sa smrtnim ishodom bolesti.

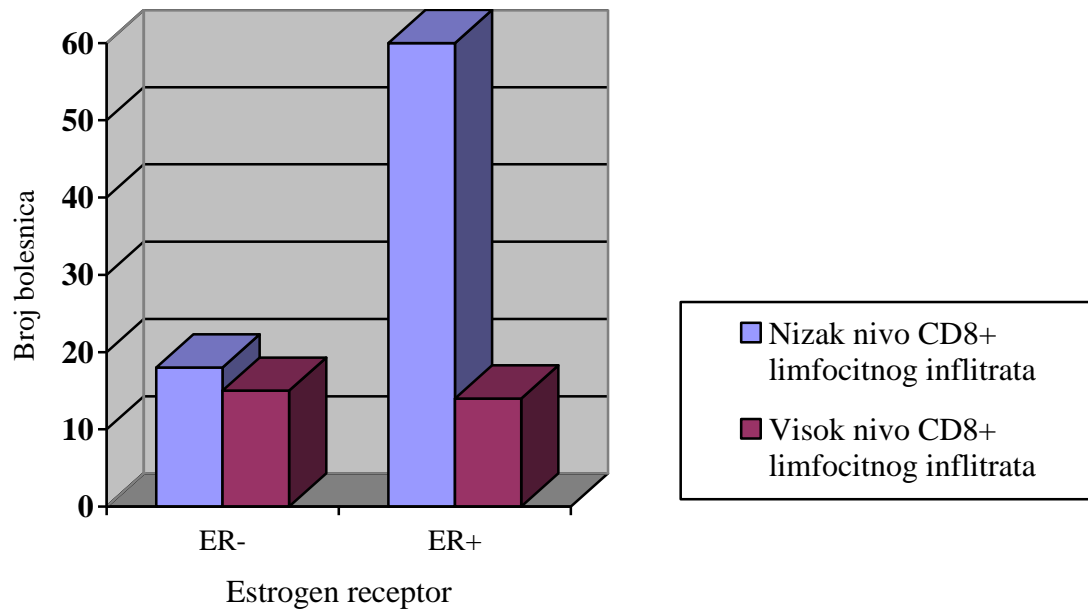
Statistički značajne relacije su prikazane grafikonima 21-24.



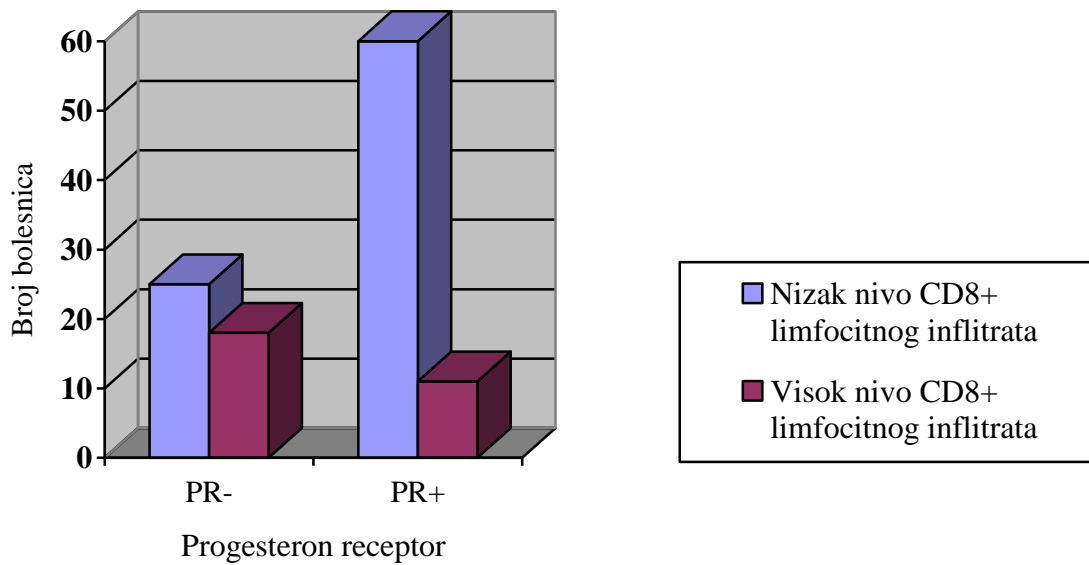
Tabela 6. Relacije CD8+ limfocita i kliničko patoloških pokazatelja

Parametar	CD8+		$\chi^2$ *	p nivo
	Nizak	Visok		
<b>Gradus 1</b>			2,506	0,113
Nije	78(73,58%)	28(26,42%)		
Jeste	13(92,85%)	1(7,15%)		
<b>Gradus 2</b>			2,057	0,151
Nije	49(71,01%)	20(28,99%)		
Jeste	42(82,35%)	9(17,65%)		
<b>Gradus 3</b>			5,968	<b>0,015</b>
Nije	55(84,61%)	10(15,39%)		
Jeste	36(65,45%)	19(34,55%)		
<b>ER</b>			11,255	<b>0,001</b>
Negativan	18(54,54%)	15(45,45%)		
Pozitivan	73(83,90%)	14(16,1%)		
<b>PR</b>			11,448	<b>0,001</b>
Negativan	25(58,13%)	18(41,87%)		
Pozitivan	66(85,71%)	11(14,29%)		
<b>HER2</b>			6,661	<b>0,010</b>
Negativan	79(80,61%)	19(19,39%)		
Pozitivan	12(54,54%)	10(45,46%)		
<b>TRIPL-</b>			3,127	0,077
Da	81(78,6%)	22(21,4%)		
Ne	10(58,8%)	7(41,2%)		
<b>LGL</b>			1,878	0,171
Negativan	54(80,59%)	13(19,60%)		
Pozitivan	37(69,81%)	16(30,19%)		
<b>Veličina tumora</b>			1,368	0,242
2cm i manji	49(80,32%)	12(19,68%)		
Veći od 2 cm	42(71,18%)	17(28,89%)		
<b>Godine starosti</b>			4,875	<b>0,027</b>
50 i manje	24(63,15%)	14(36,85%)		
Više od 50	67(81,70%)	15(18,30%)		
<b>Stadijum bolesti</b>				
I	34(79,1%)	9(20,9%)	0,690	0,708
II	46(75,4%)	15(24,6%)		
III	11(68,8%)	5(31,3%)		
<b>Relaps bolesti</b>			2,921	0,087
Nije	71(79,8%)	18 (20,2%)		
Jeste	20 (64,5%)	11 (35,5%)		
<b>Umrlji</b>			1,153	0,283
Da	9(64,3%)	5(35,7%)		
Ne	82(77,4%)	24(22,6%)		

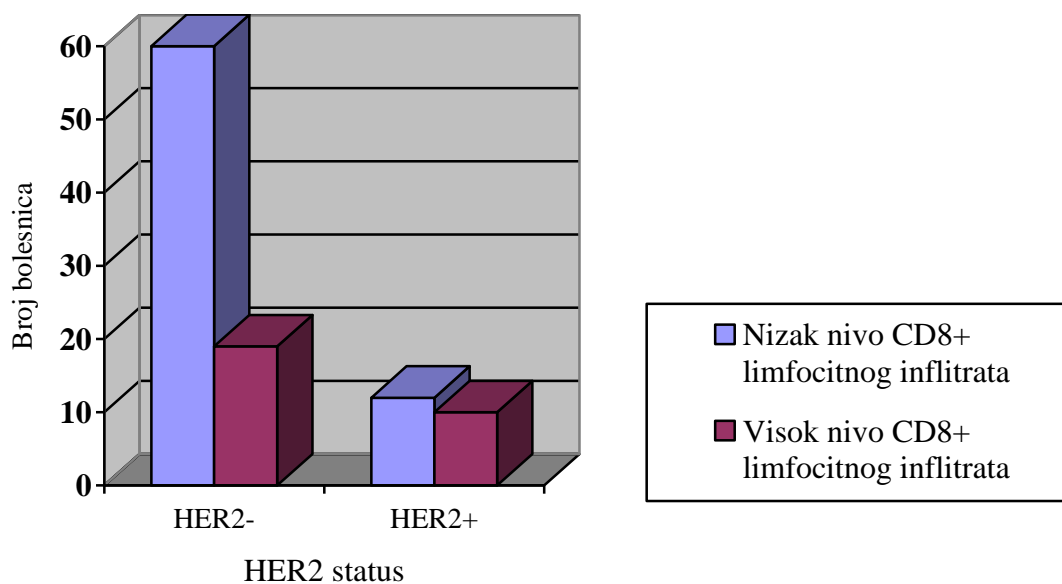
\* broj stepeni slobode za sve analize iznosi df = 1



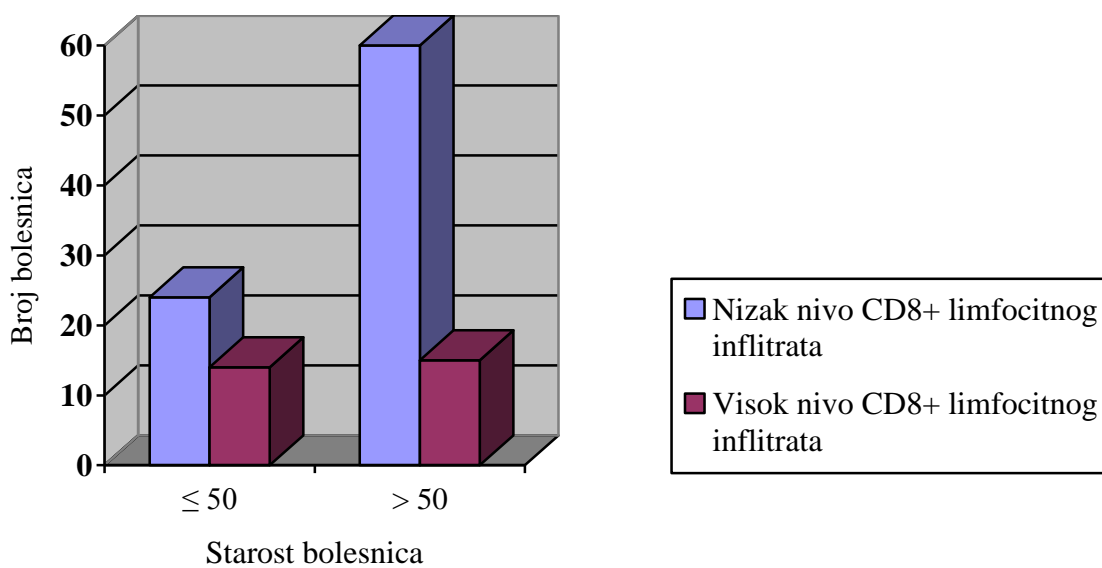
*Grafikon 21: Odnos nivoa prisutnog CD8+ limfocitnog infiltrata u tumoru i estrogen receptora*



*Grafikon 22: Odnos nivoa prisutnog CD8+ limfocitnog infiltrata u tumoru i progesteron receptora*



*Grafikon 23: Odnos nivoa prisutnog CD8+ limfocitnog infiltrata u tumoru i HER2 statusa*



*Grafikon 24: Odnos nivoa prisutnog CD8+ limfocitnog infiltrata u tumoru i starosti bolesnica*

#### **4.4. Povezanost nivoa tumor infiltrirajućih limfocita sa kliničko patološkim pokazateljima (koeficijenti korelacije)**

Kako bi se ispitala međusobna relacija tumor infiltrirajućih limfocita (TIL), CD4+, CD8+ limfocita, kao i relacije navedenih limfocita sa kliničko patološkim pokazateljima (hormonskim i HER2 statusom, histološkim gradusom, veličinom tumora, limfonodalni status aksile, stadijumom bolesti i starosti bolesnika) i drugim varijablama od interesa (relaps bolesti i preživljavanje bolesnika), primenjen je Spearmanov koeficijent rang korelacije (engl. *Spearman's rho*). Utvrđen je koeficijent korelacije te je značajnost prihvaćena uz statistički nivo od  $p < 0,05$ . Rezultati navedenih relacija su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Koeficijenti korelacije

		CD4+	CD8+	TIL
CD4+	r	1,000	<b>0,468</b>	<b>0,833</b>
	p	.	0,000	0,000
CD8+	r	<b>0,468</b>	1,000	<b>0,507</b>
	p	0,000	.	0,000
TIL	r	<b>0,833</b>	<b>0,507</b>	1,000
	p	0,000	0,000	.
Lgl	r	<b>0,256</b>	0,125	<b>0,289</b>
	p	0,005	0,173	0,001
Velična tumora	r	<b>0,246</b>	0,096	<b>0,201</b>
	p	0,007	0,297	0,028
Gradus	r	<b>0,398</b>	<b>0,235</b>	<b>0,398</b>
	p	0,000	0,010	0,000
ER receptor	r	<b>-0,260</b>	<b>-0,306</b>	<b>-0,260</b>
	p	0,004	0,001	0,004
PR receptor	r	<b>-0,305</b>	<b>-0,309</b>	<b>-0,305</b>
	p	0,001	0,001	0,001
HER2 receptor	r	<b>0,243</b>	<b>0,236</b>	<b>0,329</b>
	p	0,008	0,010	0,000
TRIPL–	r	<b>0,202</b>	0,161	<b>0,202</b>
	p	0,027	0,078	0,027
Starost bolesnica	r	<b>-0,243</b>	<b>-0,299</b>	<b>-0,357</b>
	p	0,007	0,001	0,000
Stadijum bolesti	r	<b>0,311</b>	0,072	<b>0,276</b>
	p	0,001	0,435	0,002
Relaps bolesti	r	<b>0,266</b>	0,156	<b>0,304</b>
	p	0,003	0,089	0,001
Smrtni ishod bolesti	r	-0,092	-0,098	-0,092
	p	0,319	0,287	0,319

\* r - Spirmanov koeficijent korelacije; p - nivo značajnosti: Korelacije su značajne na nivou  $p < 0,05$ .

Kao što se vidi iz tabele 7, u istraživanju je dobijena visoka pozitivna povezanost između ekspresije CD4+ limfocita i ukupnog limfocitnog infiltrata ( $r = 0,833$ ;  $p < 0,001$ ), dok je između ekspresije CD8+ limfocita i ukupnog infiltrata ( $r = 0,507$ ;  $p < 0,001$ ), kao i između CD4+ i CD8+ ( $r = 0,468$ ;  $p < 0,001$ ), dobijena umerena pozitivna korelacija.

Kada su u pitanju tumor infiltrišući limfociti (TIL) dobijene su sledeće statistički značajne korelacije i utvrđena je:

- Niska pozitivna povezanost između nivoa TIL-a i veličine tumora ( $r = 0,201$ ;  $p = 0,028$ ), odnosno što je veći tumor viši je nivo infiltracije limfocita u tumoru.
- Umerena pozitivna povezanost između nivoa TIL-a i histološkog stepena diferentovanosti tumora ( $r = 0,398$ ;  $p < 0,001$ ), odnosno što je veći gradus tumora viši je nivo infiltracije limfocita u tumoru.
- Niska pozitivna povezanost između nivoa TIL-a i prisustva metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame ( $r = 0,289$ ;  $p = 0,001$ ).
- Umerena pozitivna povezanost između nivoa TIL-a i HER-2 statusa, odnosno uočen je viši nivo limfocitnog infiltrate kod HER-2 pozitivnog tumora ( $r = 0,329$ ;  $p < 0,001$ ).
- Niska pozitivna povezanost između nivoa TIL-a i tripl negativnog tumora, odnosno uočen je viši nivo limfocitnog infiltrate kod trostruko negativnog tumora ( $r = 0,202$ ;  $p = 0,027$ ).
- Niska negativna povezanost između nivoa TIL-a i prisustva estrogen ( $r = -0,260$ ;  $p = 0,004$ ) i progesteron receptora ( $r = -0,305$ ;  $p = 0,001$ ), odnosno viši nivo infiltracije limfocita uočen je u tumoru koji je hormonski negativan.
- Niska pozitivna povezanost između nivoa TIL-a i stadijuma bolesti ( $r = 0,276$ ;  $p = 0,002$ ), odnosno što je bolest više uznapredovala viši je nivo infiltracije limfocita u tumoru.
- Umerena negativna povezanost između nivoa TIL-a i starosti bolesnica ( $r = -0,357$ ;  $p < 0,001$ ), odnosno sa godinama se smanjuje gustina limfocitnog infiltrata u tumoru.

- Umerena pozitivna povezanost između nivoa TIL-a i ponovne pojave bolesti ( $r = 0,304$ ;  $p=0,001$ ), odnosno veća je pojava relapsa ukoliko je viši nivo infiltracije limfocita u tumoru.
- Nije utvrđena povezanost između nivoa TIL-a i smrtnog ishoda bolesti.

Kada su u pitanju CD4+ T limfociti, dobijene su sledeće statistički značajne korelacije i utvrđena je:

- Niska pozitivna povezanost između nivoa CD4+ limfocita i veličine tumora ( $r = 0,246$ ;  $p=0,007$ ), odnosno što je veći tumor viši je nivo infiltracije CD4+ limfocita u tumoru.
- Umerena pozitivna povezanost između nivoa CD4+ limfocita i histološkog stepena diferentovanosti tumora ( $r = 0,398$ ;  $p < 0,001$ ), odnosno što je veći gradus viši je nivo infiltracije CD4+ limfocita u tumoru.
- Niska pozitivna povezanost između nivoa CD4+ limfocita i prisustva metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame ( $r = 0,256$ ;  $p = 0,005$ ).
- Niska pozitivna povezanost između nivoa CD4+ limfocita i HER-2 statusa ( $r = 0,243$ ;  $p=0,008$ ), odnosno uočen je viši nivo CD4+ limfocitnog infiltrate kod HER-2 pozitivnog tumora.
- Niska pozitivna povezanost između između nivoa CD4+ limfocita i tripl negativnog tumora ( $r = 0,202$ ;  $p = 0,027$ ), odnosno kod tripl negativnog tumora postoji viši nivo infiltracije CD4+ limfocita.
- Niska negativna povezanost između nivoa CD4+ limfocita i prisustva estrogen ( $r = -0,260$ ;  $p = 0,004$ ) i progesteron receptora ( $r = -0,305$ ;  $p = 0,001$ ), odnosno viši nivo infiltracije CD4+ limfocita uočeno je u tumoru koji je hormonski negativan.

- Umerena pozitivna povezanost između nivoa CD4+ limfocita i stadijuma bolesti ( $r=0,311$ ;  $p=0,001$ ), odnosno što je bolest više uznapredovala viši je nivo infiltracije CD4+ limfocita u tumoru.
- Niska negativna povezanost između nivoa CD4+ limfocita i starosti bolesnica ( $r = -0,243$ ;  $p = 0,007$ ).
- Niska pozitivna povezanost između nivoa CD4+ limfocita i relapsa bolesti ( $r = 0,266$ ;  $p=0,003$ ).
- Nije utvrđena povezanost između nivoa CD4+ limfocita i smrtnog ishoda bolesti.

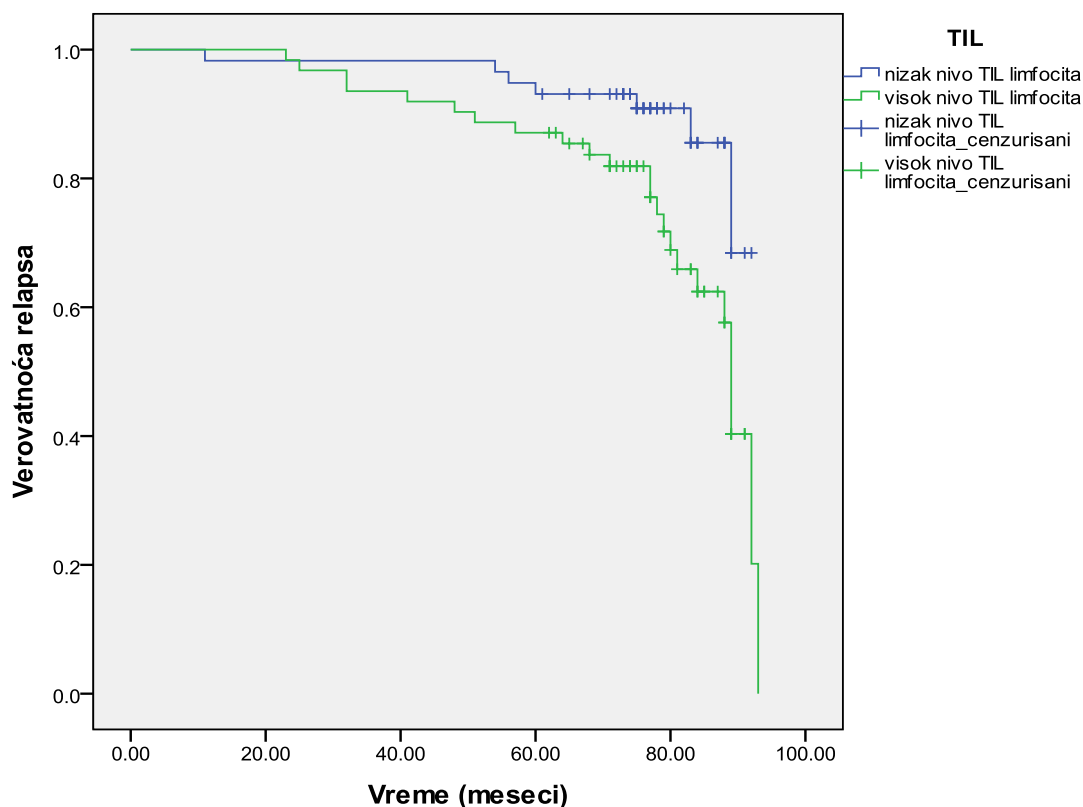
Kada su u pitanju CD8+ T limfociti, dobijene su sledeće statistički značajne korelacije i utvrđena je:

- Niska pozitivna povezanost između nivoa CD8+ limfocita i histološkog gradusa tumora ( $r=0,235$ ;  $p=0,010$ ), odnosno što je veći gradus tumora viši je nivo infiltracije CD8+ limfocita.
- Niska pozitivna povezanost između nivoa CD8+ limfocita i HER-2 statusa ( $r = 0,236$ ;  $p=0,010$ ).
- Umerena negativna povezanost između nivoa CD8+ limfocita i prisustva estrogen ( $r=-0,306$  ;  $p = 0,001$ ) i progesteron receptora ( $r = -0,309$ ;  $p = 0,001$ ).
- Niska negativna povezanost između nivoa CD8+ limfocita i starosti bolesnica ( $r = -0,299$ ;  $p = 0,001$ ).
- Nije utvrđena povezanost između nivoa CD8+ limfocita i veličine tumora, trostruko negativnih tumora, prisustva metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame, stadijuma i relapsa bolesti, kao ni sa smrtnim ishodom bolesti.



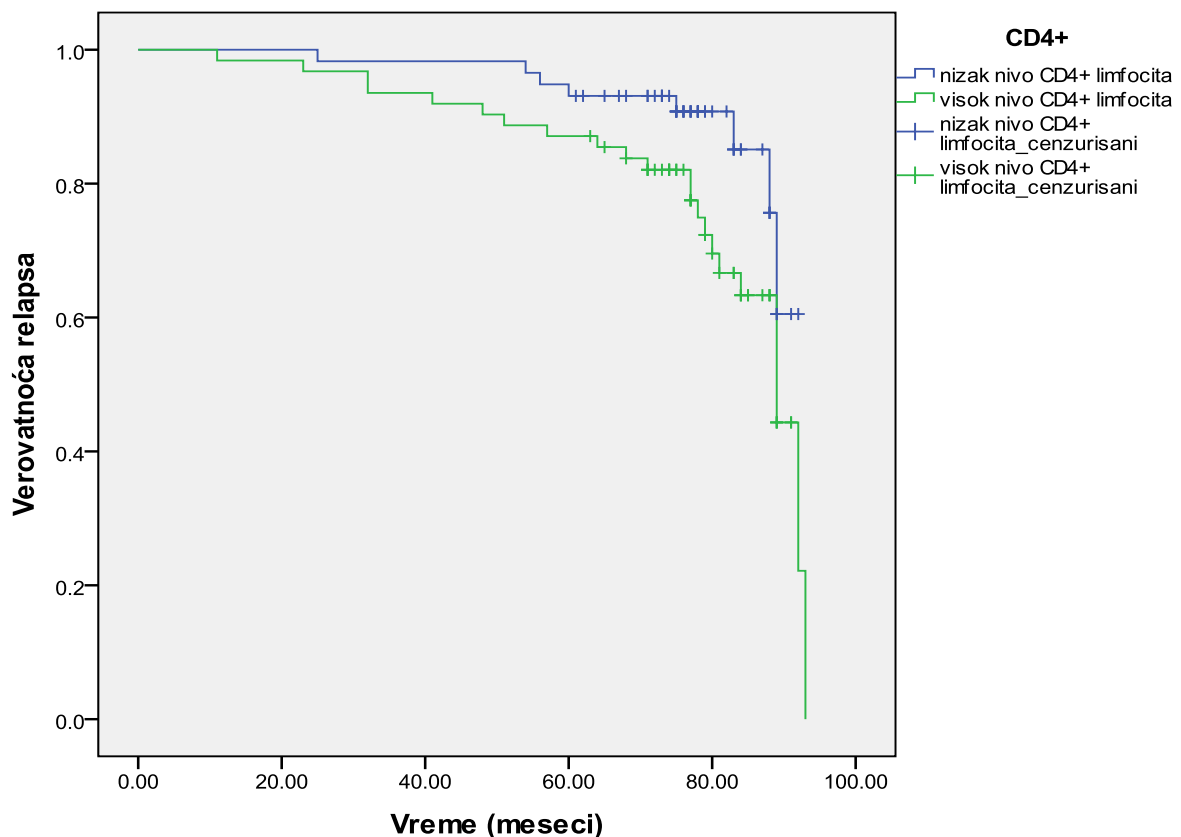
#### 4.5. Kaplan - Meierova analiza

Za analizu odnosa nivo TIL-a i broja meseci proteklih od operacije do ponovne pojave bolesti (relapsa) kao kofaktora za verovatnoću ponovnog javljanja bolesti korišćena je Kaplan – Meierova analiza. Prosečno vreme do pojave relapsa u grupi ispitanika sa niskim nivoom TIL-a iznosi 87,40 meseci, dok prosečno vreme do pojave relapsa u grupi ispitanika sa visokim nivoom TIL-a iznosi 80,95 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći pojave relapsa, za dve ispitivane grupe (niske vrednosti TIL i visoke vrednosti TIL, log rank testom, utvrđene su statistički značajne razlike [log rank (df = 1) = 6,28, p=0,012]. Bolesnice sa višim nivoom tumor infiltrišućih limfocita imaju kraće preživljavanje bez znakova bolesti (slika 3).



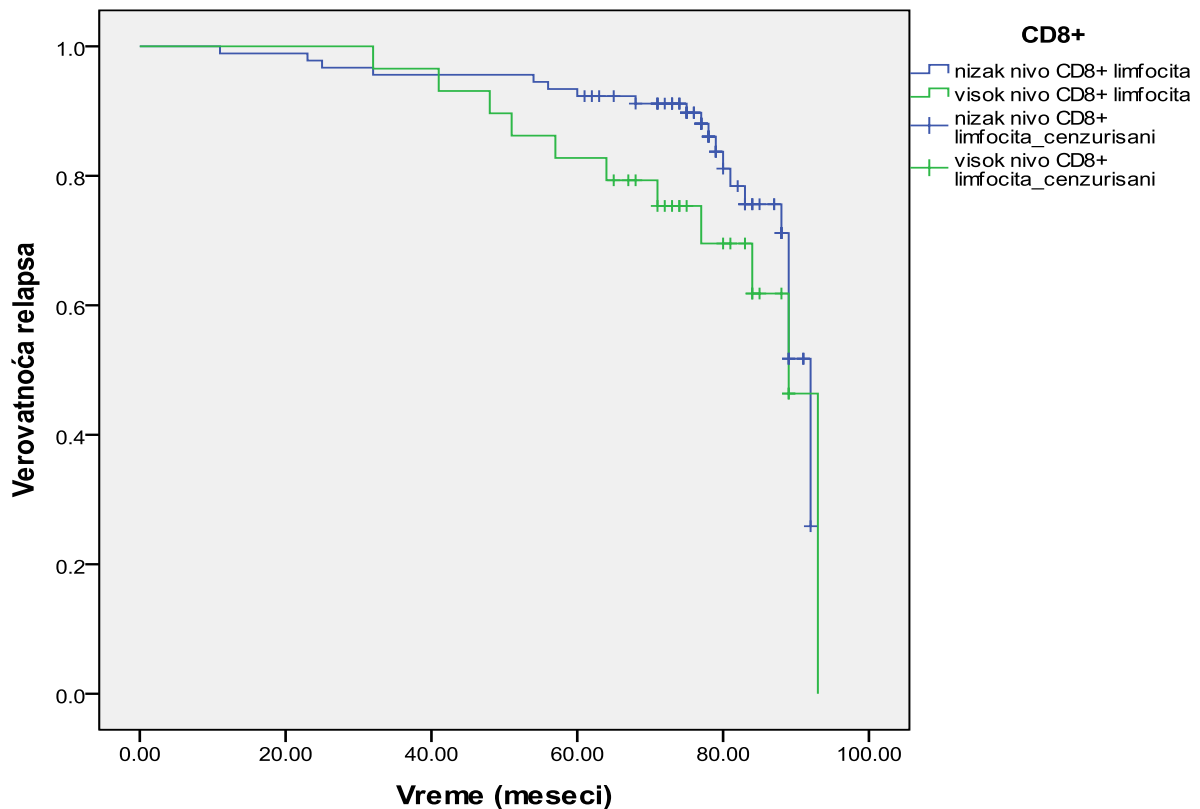
Slika 3. Kaplan-Meierova kriva relapsa bolesti u odnosu na nivo limfocitnog infiltrata u tumoru.

Za analizu odnosa nivoa CD4+ limfocita u tumoru i broja meseci proteklih od operacije do ponovne pojave bolesti (relapsa) kao kofaktora za verovatnoću ponovnog javljanja bolesti korišćena je Kaplan – Meierova analiza. Prosečno vreme do pojave relapsa u grupi ispitanika sa niskim nivoom infiltracije CD4+ limfocita iznosi 87,28 meseci, dok prosečno vreme do pojave relapsa u grupi ispitanika sa visokim nivoom CD4+limfocita iznosi 81,02 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći pojave relapsa, za dve ispitivane grupe (niske vrednosti CD4+ i visoke vrednosti CD4+limfocita), log rank testom, utvrđene su statistički značajne razlike [log rank (df = 1) = 4,15, p = 0,042]. Bolesnice sa višim nivoom CD4+ limfocita u tumoru imaju kraće preživljavanje bez znakova bolesti (slika 4).



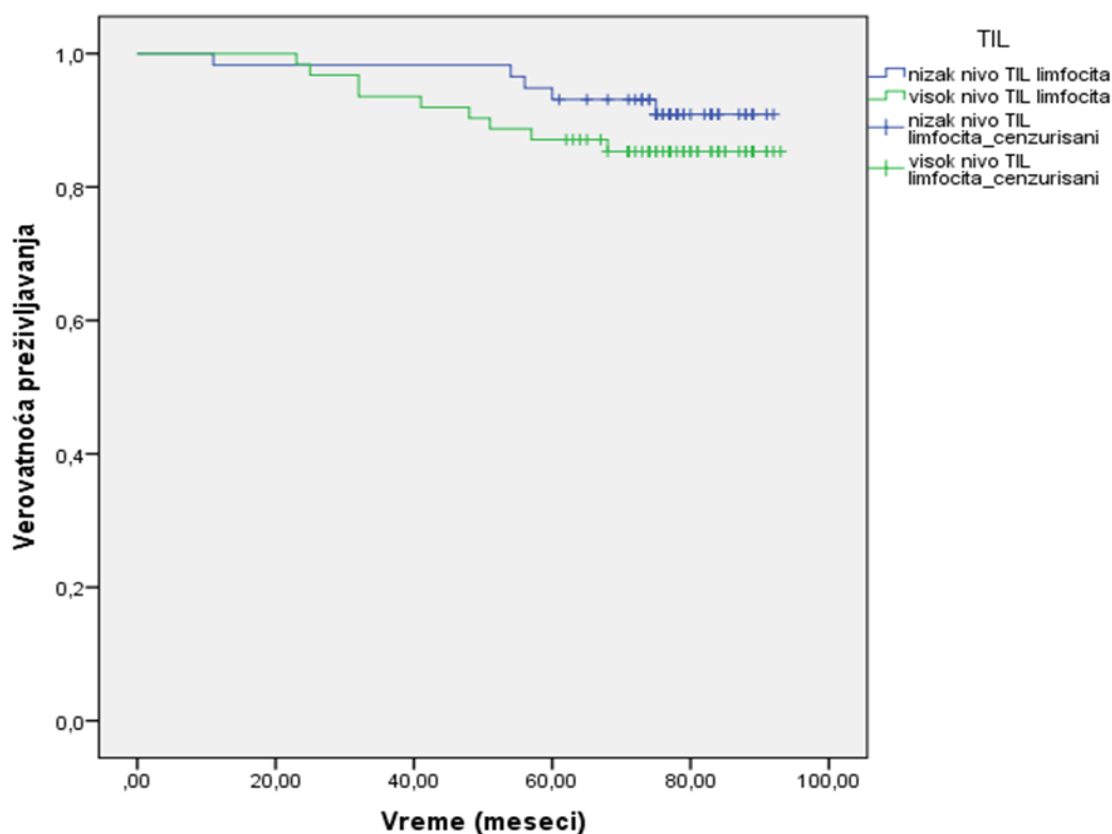
Slika 4. Kaplan-Meierova kriva relapsa bolesti u odnosu na nivo infiltracije CD4+limfocita u tumoru.

Za analizu odnosa nivoa CD8+ T limfocita i broja meseci od operacije do ponovne pojave bolesti (relapsa) kao kofaktora za verovatnoću ponovnog javljanja bolesti, korišćena je Kaplan – Meierova analiza. Prosečno vreme do pojave relapsa u grupi ispitanika sa niskim nivoom CD8+ limfocita iznosi 84,82 meseci, dok prosečno vreme do pojave relapsa u grupi ispitanika sa visokim nivoom CD8+ limfocita iznosi 80,75 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći pojave relapsa, za dve ispitivane grupe (niske vrednosti CD8+ i visoke vrednosti CD8+, log rank testom, nisu utvrđene statistički značajne razlike [log rank (df = 1) = 1,47, p = 0,226] (slika 5).



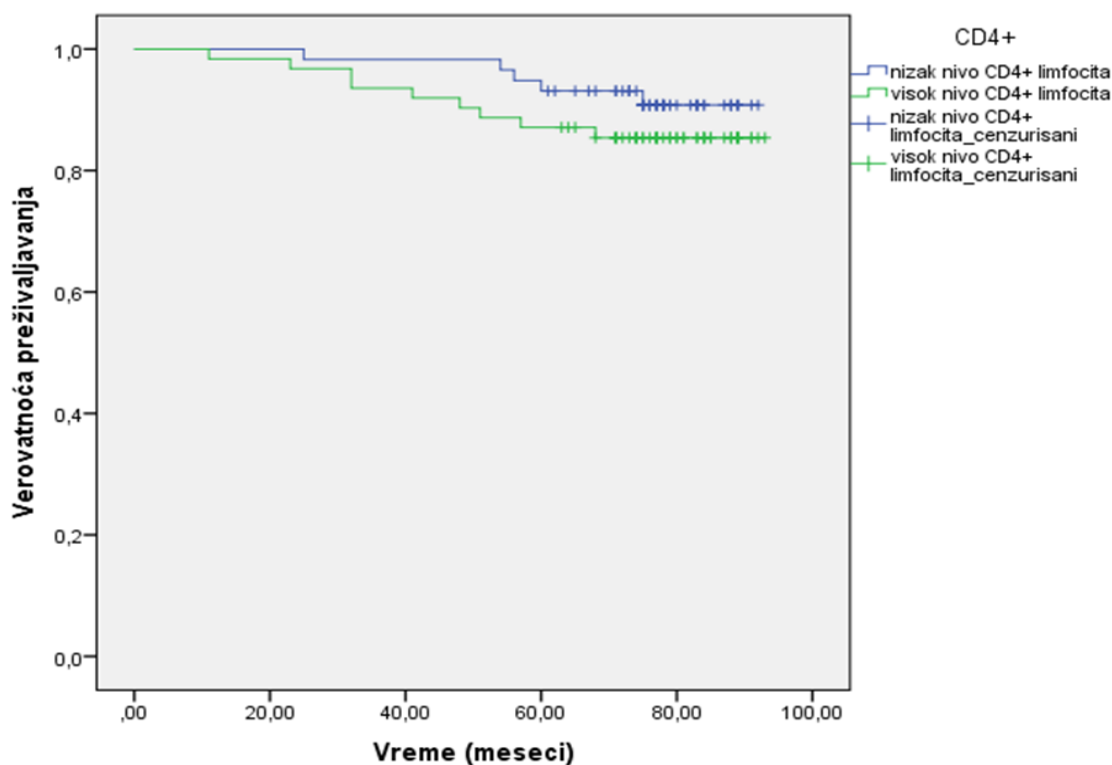
Slika 5. Kaplan-Meierova kriva relapsa bolesti u odnosu na nivo infiltracije CD8+ limfocita u tumoru.

Za analizu odnosa nivoa TIL-a na preživljavanje bolesnica, korišćena je Kaplan – Meierova analiza preživljavanja. Prosečno vreme preživljavanja u grupi ispitanika sa niskim nivoom TIL-a iznosi 88,4 meseci, dok prosečno preživljavanje u grupi ispitanika sa visokim nivoom TIL-a iznosi 85,54 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći preživljavanja, za dve ispitivane grupe (niske vrednosti TIL i visoke vrednosti TIL, log rank testom, nisu utvrđene statistički značajne razlike [log rank (df = 1) = 1,13, p=0,288] (slika 6).



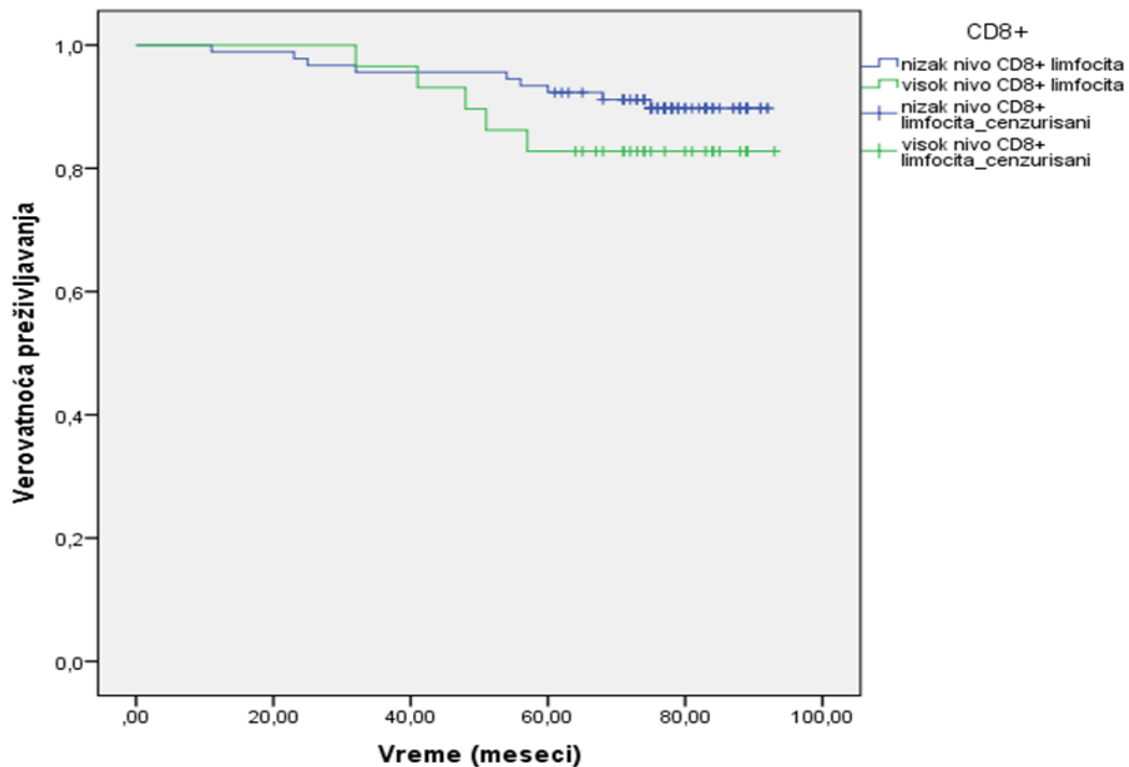
Slika 6. Kaplan-Meierova kriva preživljavanja bolesnica u odnosu na nivo limfocitnog infiltrata u tumoru.

Za analizu odnosa nivoa CD4+ T limfocita na preživljavanje bolesnica, korišćena je Kaplan – Meierova analiza preživljavanja. Prosečno vreme preživljavanja u grupi ispitanika sa niskim nivoom CD4+ limfocita iznosi 88,62 meseci, dok prosečno vreme preživljavanja u grupi ispitanika sa visokim nivoom CD4+ ćelija iznosi 85,33 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj preživljavanja, za dve ispitivane grupe (niske vrednosti CD4+ i visoke vrednosti CD4+ limfocita), log rank testom, nisu utvrđene statistički značajne razlike [log rank (df = 1) = 1,09, p = 0,295] (slika 7).



Slika 7. Kaplan-Meierova kriva preživljavanja bolesnica u odnosu na nivo infiltracije CD4+ limfocita u tumoru.

Za analizu odnosa nivoa CD8+ T limfocita na preživljenje bolesnica korišćena je Kaplan – Meierova analiza preživljenja. Prosečno vreme preživljavanja u grupi ispitanika sa niskim nivoom CD8+ limfocita iznosi 87,28 meseci, dok prosečno vreme preživljavanja u grupi ispitanika sa visokim nivoom CD8+ limfocita iznosi 84,86 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći preživljavanja, za dve ispitivane grupe (niske vrednosti CD8+ i visoke vrednosti CD8+ limfocita, log rank testom, nisu utvrđene statistički značajne razlike [log rank (df = 1) = 1,28, p = 0,257] (slika 8).



Slika 8. Kaplan-Meierova kriva preživljavanja bolesnica u odnosu na nivo infiltracije CD8+ limfocita u tumoru.

#### 4.6. Coxsova regresiona analiza

Kako bi se ispitaio uticaj veličine tumora, gradusa, hormonskog i HER-2 statusa, limfonodusnog statusa aksile, TIL-a, CD4+ i CD8+ limfocita na relaps bolesti korišćena je Coxova regresiona analiza. Rezultati prikazani tabelom 8 ukazuju na zaključak da je regresioni model značajan ( $p < 0,001$ ). Kao značajni prediktori izdvojili su se: gradus, u pozitivnom smeru ( $B = 0,912$ ,  $p = 0,037$ ) i pozitivan progesteronski receptor, u negativnom smeru ( $B = -1,08$ ,  $p = 0,045$ ) (tabela 9).

*Tabela 8. Značajnost regresionog modela*

-2 Log verodostojnost	$\chi^2$	df	p nivo
207,63	34,25	10	0,00

Tabela 9. Parcijalni doprinos pojedinačnih prediktora modelu

Prediktor	B	Standardna greška (SE)	df	p nivo	HR	95,0% interval poverenja	
						Donja granica	Gornja granica
TIL	0,985	1,064	1	0,355	2,678	0,333	21,568
CD4+	-1,531	1,066	1	0,151	0,216	0,027	1,748
CD8+	-0,219	0,464	1	0,637	0,803	0,324	1,993
Histološki gradus	<b>0,912</b>	0,436	1	<b>0,037</b>	2,490	1,059	5,858
ER	-0,237	0,642	1	0,712	0,789	0,224	2,778
PR	<b>-1,080</b>	0,538	1	<b>0,045</b>	0,340	0,118	0,975
HER2	0,761	0,554	1	0,170	2,140	0,723	6,336
TRIPL-	-0,258	0,76	1	0,734	0,773	0,174	3,424
LGL	0,732	0,461	1	0,112	2,080	0,843	5,131
Veličina	0,823	0,529	1	0,120	2,278	0,807	6,427

Kako bi se ispitaio uticaj veličine tumora, gradusa, hormonskog i HER-2 statusa, limfonodusnog statusa aksile, TIL-a, CD4+ i CD8+ limfocita na preživljavanje bolesnika korišćena je Coxova regresiona analiza. Rezultati prikazani u tabeli 10 ukazuju na zaključak da je regresioni model značajan ( $p < 0,001$ ). Kao značajni prediktori u ovom slučaju izdvojili su se: histološki gradus, u pozitivnom smeru ( $B = 1,600$ ,  $p = 0,048$ ) i veličina tumora, takođe u pozitivnom smeru ( $B = 1,825$ ,  $p = 0,046$ ) (tabela 11).



Tabela 10. Značajnost regresionog modela

-2 Log verodostojnost	$\chi^2$	df	p nivo
109,87	18,85	10	0,042

Tabela 11. Parcijalni doprinos pojedinačnih prediktora modelu

Prediktor	B	Standardna greška (SE)	df	p nivo	HR	95,0% interval poverenja	
						Donja granica	Gornja granica
TIL	-0,078	1,675	1	0,963	0,925	0,035	24,664
CD4+	-0,925	1,628	1	0,570	0,397	0,016	9,651
CD8+	0,209	0,755	1	0,782	1,233	0,281	5,413
Histološki gradus	<b>1,600</b>	0,809	1	<b>0,048</b>	4,954	1,014	24,198
ER	-1,420	0,973	1	0,145	0,242	0,036	1,628
PR	-0,692	0,779	1	0,374	0,500	0,109	2,302
HER2	-1,361	0,957	1	0,155	0,256	0,039	1,672
TRIPL-	-1,452	1,055	1	0,169	0,234	0,030	1,850
LGL	0,169	0,634	1	0,789	1,185	0,342	4,104
Veličina	<b>1,825</b>	0,916	1	<b>0,046</b>	6,203	1,030	37,362

## 5. DISKUSIJA

Karcinom dojke je najčešća maligna bolest kod žena. U većini razvijenih zemalja broj obolelih u stalnom je porastu, a sve češće se pojavljuje kod mladih žena, što se objašnjava promenama u načinu života (1).

Za uspešno lečenje raka dojke najvažnija je rana dijagnostika, te kako predvideti, na osnovu kliničke klasifikacije i morfoloških osobina tumora, njegovo dalje ponašanje. U praksi se koriste prognostički faktori koji uključuju veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova u pazuhu, histološki gradus, status hormonskih receptora, HER-2 status, limfovaskularnu, perineuralnu invaziju i indeks proliferacije Ki-67. Međutim, vrlo često ni kombinacija navedenih prognostičkih faktora ne daje sigurnost i odgovor o potrebi sprovođenja odgovarajuće terapije. Poznato je da je princip modernog terapijskog pristupa kod obolelih od raka dojke pronaći one bolesnice koje imaju povećani rizik od razvoja relapsa bolesti i kraće preživljenje uzimajući u obzir tradicionalne i nove prognostičke faktore.

Interakcija između malignih i ćelija imunološkog sistema je složen i dinamičan proces, kojem brojni istraživači pripisuju glavnu ulogu u rastu i razvoju tumora. U ovoj interakciji maligne ćelije raspolažu nizom mehanizama kojim moduliraju imuni odgovor (141). Tumor može da oblikuje „imuno” mikrookruženje tako što regrutuje ćelije imunološkog sistema koje proizvode inflamatorne medijatore sa proangiogenim i prometastatskim efektom (141,142). Klasični pogled o ulozi ćelija imunološkog sistema kod raka sve više zamenjuju shvatanja da ove ćelije mogu imati obe funkcije i anti-tumorsku, ali i ulogu u promovisanju rasta tumora i njegovoj progresiji (115). Sa jedne strane pokazano je da neke vrste imunih ćelija, kao što su ćelije prirodne ubice (NK ćelije), imaju ulogu u suzbijanju rasta tumora, te je prisustvo većeg broja ovih ćelija povezano sa boljom prognozom bolesti (143). Sa druge strane, istraživanja su pokazala da druge vrste imunih ćelija kao što su određeni podtipovi makrofaga, supresorske

ćelije mijeloidnog porekla (MDSCs), pomagački (Th) i regulatorni T (Treg) limfociti, mogu imati pro-tumorsku ulogu tj. omogućiti širenje raka (88,115,144-146).

Pomagački limfociti tipa 2 (CD4+Th2) luče proupalne citokine IL-4, IL-6 i IL-13, te nisu efektivni u odbacivanju tumora (73). Pomagački limfociti tipa 17 (CD4+Th17) sekretuju IL-17 koji indukuje angiogeneze povećanjem produkcije VEGF-a u tumorskim ćelijama i stimuliše produkciju matriks metaloproteinaza koje remodeliraju tumorsko tkivo i olakšavaju invazivnost, angiogenezu i metastaziranje (87). Polarizacija Th limfocita ima višestruk uticaj na antitumorski odgovor. Mnoga istraživanja ukazuju na povezanost Th1 imunskog odgovora i regresije tumora, dok se odsustvo regresije ili progresija tumora vezuju za Th2 imunski odgovor (108,109).

U ranoj fazi rasta, tumori su generalno infiltrirani tipom 1 makrofaga (M1) koji sekretuju IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL-12 i imaju anti-tumorsku ulogu (147). Sa druge strane, u uznapređaloj fazi bolesti dominira tip 2 makrofaga (M2) koji oslobađaju citokine kao što su: TGF  $\beta$ 1, IL-10 i IL-13, čime se indukuje Th2 diferencijacija, nakupljanje Treg ćelija i stimulacija angiogeneze (148,149). U istraživanju sprovedenom na duktalnom karcinom dojke u koje su uključeni i duktalni karcinom in situ, kao i normalno tkivo dojke utvrđeno je da je povećanje M2-TAM (engl. *tumortumor-associated macrophages*) bilo povezano sa agresivnim fenotipom tumora i kraćim ukupnim preživljavanjem, dok su M1-TAM bili povezani sa dobro diferenciranim tumorima (88).

Treg limfociti mogu da dovedu do apoptozu T limfocita, bilo pomoću granzima, bilo aktivacijom receptora smrti (150). Takođe, Treg limfociti povećavaju ekspresiju indolamin-2,3-dioksigenaze (IDO) u dendritskim ćelijama. Povećana ekspresija IDO, odgovorna za katabolizam triptofana, suprimira funkciju efektorskih T limfocita i to tako što istovremeno indukuje iscrpljivanje esencijalnog triptofana i stvaranje imunosupresivnih metabolita triptofana (151). Pokazano je da Treg limfociti razgrađuju adenzintrifosfat do adenzina.

Ovo stvaranje adenoza također za posledicu ima supresiju funkcija efektorskih T limfocita (152). Također, Treg limfociti mogu da oslobađaju imunosupresivne citokine kao što su IL-10 i TGF- $\beta$  (88). Sve ove činjenice ukazuju da povećanje broja Treg limfocita u tumoru dovodi do stvaranja imunosupresivne mikrosredine što može dovesti do daljeg rasta i širenja tumora. Facciabene i sar. su ukazali da Treg limfociti značajno ograničavaju antitumorski imuni odgovor i podstiču angiogenezu, što ubrzava rast tumora (153). U eksperimentima na životinjama pokazano je da uklanjanje Treg limfocita omogućava efikasan antitumorski imuni odgovor i regresiju tumora (154).

Supresorske ćelije mijeloidnog porekla (MDSCs) u tumorskom mikrookruženju ispoljavaju imuno supresivnu funkciju, a ovi efekti su u velikoj meri zavisni od citokina TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6 i celularnih faktora uočenih u tumorskom okruženju (145). Cole i saradnici su pokazali da je veći broj ovih ćelija kod bolesnika sa metastatskim karcinomom dojke bio povezan sa lošijom prognozom bolesti (OS: 6,9 nasuprot 19,6 meseci) (155). Ovi podaci sugerišu da bi supresorske ćelije mijeloidnog porekla (MDSCs) mogle biti potencionalni biomarker i meta ciljane terapije kod karcinoma dojke (88).

Prognostički značaj tumor infiltrišućih limfocita tj. pozitivna korelacija između prisustva limfocita u tumoru i dužeg preživljavanja pokazan je kod različitih tipova tumora: kolorektalnog karcinoma (156), tumora jednjaka (157,158), pluća (159,160), ovarijalnog karcinoma (161) i melanoma (162). Sa druge strane, kod tumora bubrega (163), prostate (164) i jetre (165) pokazano je da je limfocitni infiltrat povezan sa lošom prognozom bolesti.

Zašto tumori „bogati” limfocitnim infiltratom imaju značajno različito ponašanje i klinički tok? Odgovor je nepoznat, ali je sugerisano nekoliko mehanizama. Svaki organ ima svoje specifične imunološke karakteristike i slično tome svaki tumorski entitet verovatno da poseduje jedinstvene infiltrate imunih ćelija. Prema teoriji imunološkog uređivanja, koja je podržana od strane istraživača iz oblasti imuno-biologije raka, prognostički značaj ćelija

imunološkog sistema će zavisiti od tipa i subtipa imunih ćelija prisutnih u tumoru i njegovoj mikrookolini (166).

Klinički značaj tumor infiltrišućih limfocita kod karcinoma dojke je još uvek kontraverzan. Današnja saznanja i rezultati istraživanja o povezanosti tumor infiltrišućih limfocita i karcinoma dojke sa njegovim agresivnim ponašanjem i sa preživljenjem bolesnica nisu jednoznačni niti jasni.

Brojne studije su pokazale da gustina infiltracije limfocita u tumoru dojke ima prediktivan značaj tj. može poslužiti kao pokazatelj odgovora na terapiju.

Citotoksični tretman poput hemioterapije i radioterapije može ponekad da pokrene imuni odgovor kao posledicu prisustva šireg opsega antigena povezanih sa karcinomom dojke (167,168). Ova hipoteza podržana je istraživanjima u kojima je pokazano da je veći stepen infiltracije limfocita u tumoru povezan sa boljim odgovorom na neoadjuvantu, adjuvantu hemiterapiju i terapiju sa trastuzumabom (169-172).

U vlastitom istraživanju, gust limfocitni infiltrat uočen je u 17 (14%) tumora dojke, umeren limfocitni infiltrat uočen je u 45 (38%), a oskudan u 52 (43%) tumora dojke. Limfocitni infiltrat nije uočen u 6 (5%) tumora. Gust infiltrat CD4+ limfocita uočen je u 9 (8%) tumora dojke, umeren u 53 (44%), a oskudan u 52 (43%) tumora dojke. CD4+ limfociti nisu uočeni u 6 (5%) tumora. Gust infiltrat CD8+ limfocita uočen je u 1 (1%) tumora dojke, umeren u 28 (23%), a oskudan u 79 (66%) tumora dojke. CD8+ limfociti nisu uočeni u 12 (10%) tumora. CD4+ limfocit bili su prisutniji u tumorima dojke u odnosu na CD8+ limfocite. Thanaa i sar. (133) su u svom istraživanju na uzorku od 48 bolesnica, utvrdili prisustvo TIL u 81% tumora dojke, sa prevalencijom CD4+ limfocita u odnosu na CD8+ limfocite, a Matkowski i sar. (173) su na uzorku od 88 karcinoma dojke ustanovili prisustvo TIL u 90% tumora, minimalna ekspresija nađena je u 44%, umerena u 32%, a visoka u 14% tumora. Slični nivoi ekspresije potvrđeni su i za CD4+ i CD8+ limfocite, bez značajnije međusobne

razlike. Kuroda i sar. (174) su u svom istraživanju pokazali dominaciju CD8+ limfocita u odnosu na CD4+ limfocite kod medularnog karcinoma dojke.

U prethodnim istraživanjima je pokazano da su u tumoru dojke T limfociti zastupljeni u većem broju u odnosu na B limfocite (110,133). Precizna uloga tumor infiltrišućih B ćelija trenutno nije dobro definisana i ostaje kontraverza (175).

U ovom istraživanju, u većini tumora limfocitni infiltrat je uočen na marginama tumora, takođe, u većini tumora tip limfocitnog infiltrata je okarakterisan kao difuzan što je u skladu sa podacima iz literature (173,176). Trenutno nema dokaza da se tumor infiltrišući limfociti lokalizovani periferno tj. na margini tumora funkcionalno razlikuje od onih lokalizovanih u centralnim delovima tumora (135).

Najznačajniji, nezavisni prognostički faktori kod raka dojke su veličina tumora i broj pozitivnih limfnih čvorova pazušne jame (29). Čak i pacijenti sa malim tumorima i minimalnom zahvaćenošću limfnih čvorova pazušne jame imaju lošiju prognozu u odnosu na pacijente koji nemaju pozitivne čvorove u pazušnoj jami (177).

Takođe u ovom istraživanju je ustanovljeno da postoji pozitivna povezanost između nivoa tumor infiltrišućih limfocita, kao i CD4+ limfocita i prisustva pozitivnih limfnih čvorova u pazušnoj jami. Korelacija nije bila statistički značajna u slučaju CD8+ limfocita. I u studiji Loi i saradnika (172) je ustanovljena pozitivna povezanost između infiltracije limfocita i prisustva metastaza u limfnim čvorovima aksile. Macchetti i sar. (132) su na uzorku od 23 tumora dojke takođe dokazali pozitivnu korelaciju između visokog stepena infiltracije CD4+ limfocita i prisustva metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame dok korelacija nije bila statistički značajna u slučaju CD8+ limfocita. Rathore i sar. (178) su pokazali da postoji pozitivna korelacija između CD3+ fenotipa limfocita i metastaza u limfnim čvorovima aksile. U istraživanju Tsang-a i sar. nije dobijena korelacija između TIL i metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame, ali su u istraživanju posmatrane bolesnice sa

duktalnim, lobularnim, medularnim i mucinoznim karcinomom dojke, a poznato je da stepen infiltracije limfocita značajno varira u različitim histološki tipovima (137). Rocca i saradnici (179) su pokazali da je broj CD4+ i CD8+ limfocita bio veći u tumoru bolesnica bez metastaza u limfnim čvorovima aksile nego kod onih sa pozitivnim limfnim čvorovima. Međutim, istraživanje je sprovedeno na malom uzorku bolesnica (35) sa tumorom veličine od T1 do T4.

U vlastitom istraživanju, utvrđena je pozitivna povezanost između nivoa infiltracije limfocita u tumoru i njegove veličine. Isti rezultati dobijeni su i za CD4+ limfocite, dok u slučaju CD8+ limfocita nije dobijena statistički značajna povezanost. Tsang i saradnici (137), kao i Loi i saradnici (172), takođe su dobili pozitivnu korelaciju između intenziteta limfocitnog infiltrata veličine tumora. Matkowski i sar. (173) na uzorku od 88 karcinoma dojke nisu utvrdili povezanost između nivo infiltracije CD4+ i CD8+ limfocita u tumoru i njegove veličine.

Ovim istraživanjem ustanovljena je pozitivna povezanost između nivoa infiltracije limfocita u tumoru i HER-2/neu amplifikacije, isti rezultati su dobijeni i za CD4+ i CD8+ limfocite, što je u skladu sa podacima iz literature (137,172,180,181).

Ova povezanost se objašnjava time što signali u okviru EGF familije receptora mogu da dovedu do aktivacije NF- $\kappa$ b (nuklearni faktor kapa b) signalnog puta kod karcinoma dojke (182). Aktivacija ovog signalnog puta prouzrokuje limfocitnu aktivaciju i inflamaciju (183,184).

U ovoj studiji, kao i u većini drugih, utvrđena je negativna povezanost između hormonskih receptora i nivoa limfocitnog infiltrata, isti rezultati su dobijeni i za CD4+ i CD8+ limfocite (137,172,176,180,181,185).

Hormonski pozitivni i negativni tumori dojke predstavljaju dve odvojene grupe tumora koje imaju različito patološko i kliničko ponašanje kao i različite genske ekspresione profile,

pa u skladu sa tim ove dve grupe tumora takođe imaju različite interakcije sa imunološkim sistemom (186). Prisustvo nižeg nivoa tumor infiltrišućih limfocita kod hormonski pozitivnih tumora mogao bi se objasniti i činjenicama da su ER+ karcinomi češći kod starijih žena, češće su dobro diferentovani, niže mitotske aktivnosti, te ređe pokazuju HER2/neu amplifikaciju (27,29). U vlastitom istraživanju niži nivo limfocitnog infiltrata uočen je u dobro diferentovanim tumorima, bez HER2/neu amplifikaciju i kod bolesnica starijih od 50 godina.

U našem radu je ustanovljena pozitivna povezanost između tripl negativnog tumora i nivoa infiltracije limfocita, isti rezultati su dobijeni i za CD4+ limfocite. Međutim, u slučaju CD8+ limfocita nije dobijena statistički značajna povezanost. U svojim istraživanjima Adams i sar. (187) kao i Loi i sar. (172) su pokazali da je kod tripl negativnog tumora izražen gust limfocitni infiltrat. U dostupnoj literaturi nisu pronađene slične studije u kojima je ispitivana povezanost CD4+ limfocita i tripl negativnog tumora.

Na osnovu prethodnih studija kao i na temelju vlastitog istraživanja može se zaključiti da su HER-2 pozitivni i trostruko negativni tumori imunogeniji nego luminalni karcinom tipa A, što je rezultat većeg prisustva limfocita u mikrookruženju ovih tumora (188).

Vlastito istraživanje je pokazalo i da postoji pozitivna povezanost između stadijuma bolesti i nivoa infiltracije limfocita, a isti rezultati su dobijeni i za CD4+ limfocite. U slučaju CD8+ limfocita nije dobijena statistički značajna povezanost. U dostupnoj literaturi pronađena je samo jedna studija na uzorku od 48 bolesnica (133) u kojoj je takođe dobijena pozitivna povezanost između stadijuma bolesti i nivoa infiltracije limfocita kao i CD4+ limfocita. Pozitivna povezanost tumor infiltrišućih limfocita i stadijuma bolesti može biti posledica sposobnosti ovih ćelija da produkuju i oslobađaju vaskularni endotelijalni faktora rasta i faktor rasta fibroblasta koji mogu indukovati limfangiogenezu i angiogenezu što može dovesti do širenja malignih ćelija (189,190).



Rezultati većine studija pokazuju da slabo diferentovani tumori imaju veći stepen infiltracije limfocita (133,137,172,176,180,181,185). Rezultati vlastitog istraživanja su u skladu s tim istraživanjima. Ovo ukazuje na mogućnost da stepen diferencijacije tumora može uticati na stepen imunološkog odgovora. Takođe, veći nivo infiltracije limfocita uočen je u trostruko negativnim (tripl-) i HER-2 pozitivnim tumorima, a poznato je da ove tumore karakteriše visok histološki gradus (67-70).

Ovim istraživanjem je ustanovljena negativna povezanost između inteziteta infiltracije limfocita (isti rezultati dobijeni su i za CD8+ limfocite) u tumoru i starosti bolesnica, što je u skladu sa podacima iz literature (181,185). U slučaju CD4+ limfocita negativna, povezanost je dobijena primenom Spirmanovog koeficijent rang korelacije (Spearman's rho), dok primenom Hi-kvadrat testa nije dobijena statistički značajna povezanost. U dostupnoj literaturi nisu pronađene slične studije u kojima je ispitivana povezanost CD4+ limfocita i starosti bolesnica. U istraživanju Tsanga i sar. nije dobijena značajna statistička povezanost između gustine limfocitnog infiltrata i starosti ali nije posmatran samo duktalni karcinom dojke (137). Ni u studiji Rathore i sar. (178) nije ustanovljena povezanost između CD3+ limfocitnog infiltrata i starosti bolesnica (posmatran je duktalni karcinom veličine od T1 do T4).

Na efekte starenja posebno je osetljiva imunost posredovana limfocitima T. Nakon rođenja, počinje progresivna involucija timusa, što konačno dovodi do atrofije i smanjene produkcije naivnih limfocita T. Starenje uzrokuje poremećaje u ćelijskom signaliziranju, produkciji citokina (dominacija proupalnih citokinskih profila), smanjuje se broj antigena koje prepoznaju limfociti T, neadekvatna je proliferacija nakon antigene stimulacije, smanjuje se aktivnost NKT i CTL ćelija. Proupalna okolina, koja svojim ćelijskim i citokinskim sastavom podstiče upalnu reakciju, dodatno stimuliše kumulaciju Treg limfocita, tako da se i na taj način pokušava objasniti veća incidencija tumora u starijoj životnoj dobi (191,192).

U vlastitom istraživanju, utvrđena je pozitivna povezanost između nivoa tumor infiltrišućih limfocita, kao i CD4+ limfocita i ponovne pojave bolesti. Takođe je ustanovljeno da su bolesnice sa nižim nivoom TIL i CD4+ limfocita u tumoru imale duže preživljavanje bez znakova bolesti. U nekim studijama je pokazano da tumori dojke kod kojih u upalnom infiltratu dominiraju CD4+T limfociti i CD68+ makrofagi, bez značajnog CD8+T ćelijskog infiltrata imaju veći rizik za metastaziranje. U takovoj tumorskoj mikrookolini CD4+ T limfociti stimulišu protumorsku aktivnost makrofaga (TAM) (193,194).

Iako je vlastitim istraživanjem utvrđena povezanost tumor infiltrišućih limfocita, kao i CD4+ limfocita sa brojnim negativnim prognostičkim faktorima, te kraćim vremenom do relapsa bolesti, nije dobijena statistički značajna povezanost između gustine limfocitnog infiltrata i preživljavanja bolesnica (od ukupno 14 bolesnica koje su umrle, 9 (64,3%) je imalo visok nivo infiltracije limfocita u tumoru). Moguće je da je ta nepodudarnost uzrokovana veličinom ispitivanog uzorka, obzirom da je posmatran samo rani karcinom dojke. Raoul i sar. (180) su u svojoj studiji utvrdili uticaj CD4+ limfocita u tumoru na ukupno preživljavanje bolesnica obolelih od karcinoma dojke, tj. uočeno je kraće preživljavanje u slučaju veće infiltracije CD4+ limfocita. Matkowski i sar. (173) su takođe ustanovili da je gust infiltrat CD4+ i CD8+ limfocita u tumoru povezan sa kraćim vremenskim intervalom bez bolesti i kraćim ukupnim preživljavanjem.

U našem istraživanju u multivarijantnoj analizi, primenom Coxove regresione analize, TIL kao ni CD4+ i CD8+ limfociti nisu se izdvojili kao značajni prediktori ponovne pojave bolesti, takođe nisu imali uticaj na ukupno preživljavanje. U multivarijantnoj analizi, Raoul i sar. (180) takođe nisu utvrdili značajnu povezanost između tumor infiltrišućih limfocita i prognoze bolesti.

Calabro i sar. (195) su pokazali da kod hormonski pozitivnih tumora, veći stepen infiltracije limfocita je povezan sa lošom prognozom bolesti, a kod hormonski negativnih

tumora sa dobrom prognozom (u studiji je značaj prisustva limfocitnog infiltrata u karcinomu dojke, ispitivan korišćenjem microarray-bazirane metode skrininga gena povezanih sa limfocitnim infiltratom). Loi i sar. (172) su utvrdili da je kod tripl negativnih tumora veći nivo limfocitne infiltracije povezan sa manjom verovatnoćom relapsa bolesti. Rathore i sar. (178) na uzorku od 127, kao i Mohammed i sar. (176) na uzorku od 468 tumora dojke, su ustanovili da bolesnice sa gustim infiltratom limfocita u tumoru imaju duže ukupno preživljavanje (u istraživanju je posmatran duktalni karcinom veličine od T1 do T3). U multivarijantnoj analizi, Ali i sar. (196) na uzorku od 12 439 bolesnica, kao i Mahmoud i sar. (185) na uzorku od 1 334 tumora dojke su utvrdili da je prisustvo CD8+ T limfocita u tumoru dojke povezano sa boljom prognozom bolesti, istraživanjem nije obuhvaćen samo duktalni karcinom, a prisustvo CD8+ limfocitnog infiltrata u karcinomu dojke ispitivan je korišćenjem microarray-bazirane metode.

Iako su se prve studije koje su ukazivale na značaj inflamatornih ćelija u tumoru dojke, pojavile pre više od 80 godina, prognostički značaj ovih ćelija je i dalje kontraverzan (197). Rezultati dosadašnjih istraživanja nisu jednoznačni verovatno zbog toga što su tumori dojke heterogena grupa tumora koju čine različiti histološki podtipovi, sa različitim molekularnim karakteristikama i različitim biološkim ponašanjem (137). Takođe prognostički značaj tumor infiltrišućih limfocita zavisi i od tipa imunog infiltrata zbog njihove različite funkcije u tumorskoj mikrookolini. Razlike u rezultatima verovatno postoje i zbog drugačijih kriterijuma prilikom izbora tumora dojke koji su analizirani, upotrebe različitih tehnika: protočna citometrija, imunohistohemija, metoda hematoksilin-eozin (engl. *Full section HE*) ili TMA metoda (engl. *tissue microarray*), kao i različite tehnike u interpretaciji.

Tradicionalno, CD8+ citotoksični T limfociti su smatrani kao ključna komponenta antitumorskog imuniteta, a tumori dojke sa većim stepenom infiltracije ovih limfocita povezivani su sa boljom prognozom bolesti (185,198). Međutim, istraživanja su pokazala da CD8+ ćelije često ne funkcionišu u potpunosti u *in vivo* uslovima ukoliko postoji nedostatak

adekvatnih CD4+limfocita, pa se čini da CD4+ limfociti imaju ključnu ulogu u aktiviranju i oblikovanju imunskog odgovora (79,199).

Razlike u rezultatima koji se odnose na CD8+ limfocite u tumoru mogu se objasniti i heterogenošću populacije citotoksičnih limfocita. Slično CD4+ limfocitima i CD8+ limfociti se na osnovu citokina koje eksprimiraju mogu podeliti u različite subgrupe koje imaju različitu funkciju i efekat na prognozu bolesti (200,201). U istraživanju Faghiha i saradnika, utvrđeno je da kod bolesnica sa većim brojem pozitivnih limfnih čvorova u pazušnoj jami, tj. kod bolesnica sa uznapredovalom bolešću, postoji prevalenca dve subpopulacije citotoksičnih limfocita Tc17 (IL-17+CD8+) i Tc2 (IL-4+CD8+) (202). Pokazano je da Tc17 limfociti produkuju daleko manje količine granzima B i perforina, čime je snižen i onemogućen njihov citotoksični efekat na ciljne ćelije u *in vitro* uslovima (203,204). Reome i saradnici su pokazali da tumor infiltrišući Tc2 limfociti mogu proizvoditi IL-4 koji ima imunoinhibitorski efekat i omogućava progresiju tumora (205). Prisustvo većeg broja CD8+ limfocita u tumoru ne mora da bude samo odraz njihovog odgovora na tumorske antigene, ovi limfociti mogu biti privučeni hemotaksičnim faktorima koje sekretuju tumorske ćelije (206).

Nekoliko otkrića u prethodnim istraživanjima moglo bi da objasni povezanost visokog nivoa tumor infiltrišućih limfocita sa lošijom prognozom bolesnica obolelih od raka dojke.

Tumor infiltrišući limfociti imaju mogućnost produkcije i oslobađanja vaskularnog endotelijalnog faktora rasta i faktora rasta fibroblasta koji mogu indukovati limfangiogenezu i angiogenezu što može dovesti do limfogenog širenja malignih ćelija do regionalnih limfnih čvorova (87,153,189,190).

Matriks metaloproteinaze (MMPs) pripadaju grupi endopeptidaza čija je uloga u degradaciji vezivnog stromalnog tkiva i bazalne membrane, što su ključni događaji u invaziji i metastaziranju tumora. Takođe, regulišu angiogenezu u tumoru putem aktivacije proangiogeničkih faktora ili je inhibiraju kroz nastajanje inhibitorskih faktora (55). Visoka

ekspresija MMPs u karcinomu dojke, posebno MMP-2 i MMP-9, povezana je s visokim histološkim gradusom, relapsom bolesti i kraćim preživljenjem (56,57). Owen i saradnici (207) su pokazali da tumor infiltrišući limfociti oslobađaju veći nivo ovog enzima.

Takođe, dokazano je prisustvo aromataza CYP19 gena (19 klasa citohroma P450) u tumor infiltrišućim limfocitima, a on može imati značaja za hormonski pozitivan tumor, kreirajući pogodnu okolinu za širanje malignih ćelija (208).

Tumor infiltrišući limfociti mogu proizvoditi imunoinhibitorne citokine kao što su interleukin 4 (IL-4), interleukin 10 (IL-10) i transformišući faktora rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), koji imaju ulogu u inhibiciji proliferacije i aktivacije limfocita i drugih leukocita. Ovo je jedan od mehanizama kojim bi se mogao objasniti izostanka adekvatne imunološke reakcije na tumor. Ovi citokini nisu detektovani kod benignih lezija dojke, sugerišući na taj način značaj tumor infiltrišućih limfocita u imunosupresiji (134).

Regulatorni limfociti (Treg) u tumorskom mikrokruženju mogu da proizvode RANK ligand (engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*), a interakcija između receptorskog aktivatora za nuklearni faktor  $\kappa$ B (RANK) i njegovog liganda može dovesti do metastatskog širenja tumora (209).

Prethodna istraživanja su pokazala da CD4<sup>+</sup>T limfociti mogu da, indirektno preko IL-4 podstiču invaziju i metastaziranje karcinoma dojke regulacijom polarizacije tumor asociranih makrofaga. Tumor asocirani makrofagi (TAMs) tipa 2 stimulacijom angiogeneze i aktivacijom receptora epidermalnog faktora rasta, dovode do širenja tumora (125,210). Takođe, i CD4<sup>+</sup> limfociti mogu dovesti do pojave metastaza aktivacijom EGF signalnog puta u Th2 tipu tumorskog mikrokruženja (183).

Agresivniji tipovi tumora brže rastu dovodeći do nekroze i posledične lokalne hipoksije, a neke studije su pokazale da hipoksija utiče na rast broja CD4<sup>+</sup> limfocita. Takođe,

i dinamika rasta tumora može uticati na povećanje broja tumor infiltrišućih limfocita (211-213).

U literaturi postoje dokazi koji ukazuju da CD4<sup>+</sup> tumor infiltrišući limfociti mogu menjati svoj fenotip od efektora do supresora tokom progresije tumora. Ova konverzija se može poklopiti sa značajnim smanjenjem ekspresije antigena od strane tumora koji teži ostvarivanju tolerancije (214). Takođe, hronična stimulacija tumor infiltrišućih dendritskih ćelija i makrofaga od strane malignih ćelija mogu da dovedu do indirektno konverzije efektorskih u regulatorne T limfocite izazivajući toleranciju i supresiju antitumorske aktivnosti (215).

Opisano je i postojanje supresorskih CD8<sup>+</sup> T ćelija čiji je broj znatno veći kod bolesnika obolelih od karcinoma. Ove ćelije imaju veoma potentni supresorski kapacitet (216).

Tumorske ćelije proizvode niz imunoinhibitornih faktora koji izazivaju ili lokalne ili sistemske efekte na imunitet domaćina.

Maligne ćelije mogu same da luče TGF- $\beta$  i IL-10, ali i da stimulišu njihovo stvaranje u drugim ćelijama imunološkog sistema. TGF- $\beta$  inhibira produkciju IFN- $\gamma$  od strane CD8<sup>+</sup> i Th1 limfocita. Pored toga što ovi citokini imaju imunoinhibitornu ulogu i što smanjuju broj efektorskih T ćelija, mogu dovesti i do stvaranja inducibilnih Treg ćelija iz Th0 limfocita (naivni pomagački T limfociti) u tumorskoj mikrosredini (217). Takođe, tumorske ćelije uzrokuju migraciju ćelija imunološkog sistema koje imaju imunosupresivnu i pro-tumorsku aktivnost (142).

Ciklooksigenaza (Cox) je enzim koji deluje na konverziju arahidonske kiseline u prostaglandine. Većina karcinoma dojke eksprimira Cox2 što dovodi do povećanja nivoa intratumorskog prostaglandina E2 (PGE2) čime se stvara inhibitorno okruženje za dendritske i

T ćelije koje imaju efektorsku funkciju. Ovi prostaglandini mogu dovesti i do stvaranja i migracije Treg ćelija koje inhibiraju imunski odgovor (218).

Takođe, tumorske ćelije proizvode sledeće enzime: indoleamin-2,3-dioksidaza (IDO), triptofan 2,3-dioksidaza (TDO) i arginaze (ARG). Ovi enzimi učestvuju u metabolizmu amino kiselina i smanjuju njihovu koncentraciju u tumorskoj mikrookolini koja je neophodna za normalnu funkciju T limfocita. Nedostatak triptofana može dovesti i do aktivacije GCN2 signalnog puta (engl. *general control nonderepressible 2*) koji dovodi do inaktivacije T ćelija koje na kraju podležu apoptozi. Enzimi IDO i ARG mogu predstavljati potencijalnu metu ciljane terapije, jer bi se njihovom inhibicijom stimulisao imuni odgovor u tumoru (219-221).

Ćelije raka karakteriše izmenjen metabolizam glukoze tj. laktati se oslobađaju u tumorsku mikrookolinu, a ne metabolišu se dalje u mitohondrijama. Ovaj izmenjen metabolizam regulisan je aktiviranim onkogenima ili/i hipoksijom. Laktat negativno utiče na funkciju ćelija imunskog sistema i T limfocite tj. njihov citotoksični kapacitet (222,223).

Sve ovo rezultira indukcijom tolerancije u tumorskoj mikrosredini i ubrzava invaziju i metastatsko širenje ćelija raka.

Tumorske ćelije mogu da proizvode faktore koji indukuju smrt imunih ćelija kako u samom tumoru tako i u perifernoj cirkulaciji (224). Učestalost apoptoze CD8<sup>+</sup>T ćelija u krvi pacijenata obolelih od raka je značajno veće nego kod zdravih osoba. Takođe, pokazano je da su CD8<sup>+</sup>T ćelije u većem broju bili meta programirane ćelijske smrti, uzrokovane produktima tumora, nego cirkulišući CD4<sup>+</sup>T limfociti (225).

Promovisanjem rasta tumora i posredovanjem u suzbijanju bolesti, imunološki sistem ima integralnu i kompleksnu ulogu kod karcinoma dojke. Shvatanje ovih naizgled kontradiktornih funkcija zahteva razumevanje uloge različitih ćelija imunološkog sistema, tumorskih ćelija i citokina u tumorskom mikrookruženju.

## 5.1. Tumor infiltrišući limfociti i potencijalna imunoterapija kod karcinoma dojke

U sistemskom lečenju raka dojke primenjuje se hemioterapija, hormonska terapija i ciljane (target terapija). Neki od ovih agenasa mogu uticati na imunološki odgovor.

Trastuzumab, monoklonsko antitelo koje se vezuje za HER-2 receptor pokreće antitelo zavisnu i ćelijski posredovanu citotoksičnost (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ADCC*) (226).

Bevacizumab, monoklonsko antitelo se vezuje za receptor vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF). VEGF suprimira imunološki odgovor, a pokazano je da anti-VEGF terapija poboljšava antitumorsku aktivnost imunološkog sistema, ali ostaje da se utvrdi da li bevacizumab povećava antitumorski imunitet kod pacijenata sa rakom dojke (227).

Uvid u patogeni mehanizam može biti od koristi u otkrivanju nove uloge lekova koji se već koriste kod karcinoma dojke. Receptorski aktivator za nuklearni faktor  $\kappa$ B ligand (RANK ligand) izražavaju CD4+ limfociti i njegova uloga u progresiji bolesti može definisati drugi aspekt antitumorske aktivnosti denosumaba monoklonskog antitela za RANK ligand (209).

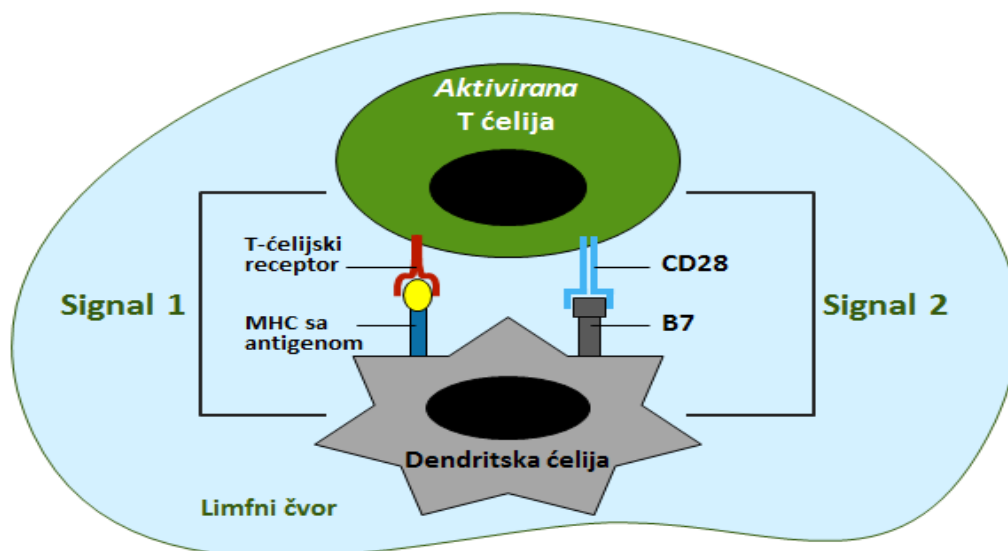
Saznanja o imunološkim zbivanjima u malignim bolestima, kao i razumevanje mehanizama kojima tumor izbegava imunološku reakciju, dovela su do razvoja imunoterapije. Ovim vidom terapije se pojačava imunološka reakcija na tumor i podstiče se destrukcija malignih ćelija imunološkim mehanizmima.

Za razliku od melanoma i karcinoma bubrega za koje se znalo da imaju dobar odgovor na imunoterapiju, za rak dojke se nije smatralo da je imunogena bolest, obzirom da nije uočena veća incidenca u populaciji žena koje su lečene imunosupresivnom terapijom (228). Međutim, sve je više dokaza koji ukazuju na značaj infiltracije imunih ćelija u tumoru dojke (229).



U poslednje vreme se kod karcinoma dojke ispituju monoklonska antitela koja deluju na receptor za programiranu ćelijsku smrt-1 (PD-1) (188,230) i monoklonska antitela koja deluju na citotoksični T-limfocitni antigen 4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyt antigen 4 (CTLA)-4*) (188,231).

Za potpunu aktivaciju T limfocita neophodna su dva signala: prvi signal se ostvaruje posredstvom interakcija T ćelijskog receptora (TCR) i peptida prezentovanih na MHC molekulima. Drugi signal se ostvaruje posredstvom kostimulatornih molekula, tj. interakcija CD28 i B7 na T limfocitima obezbeđuje signal 2 (slika 9) (76).



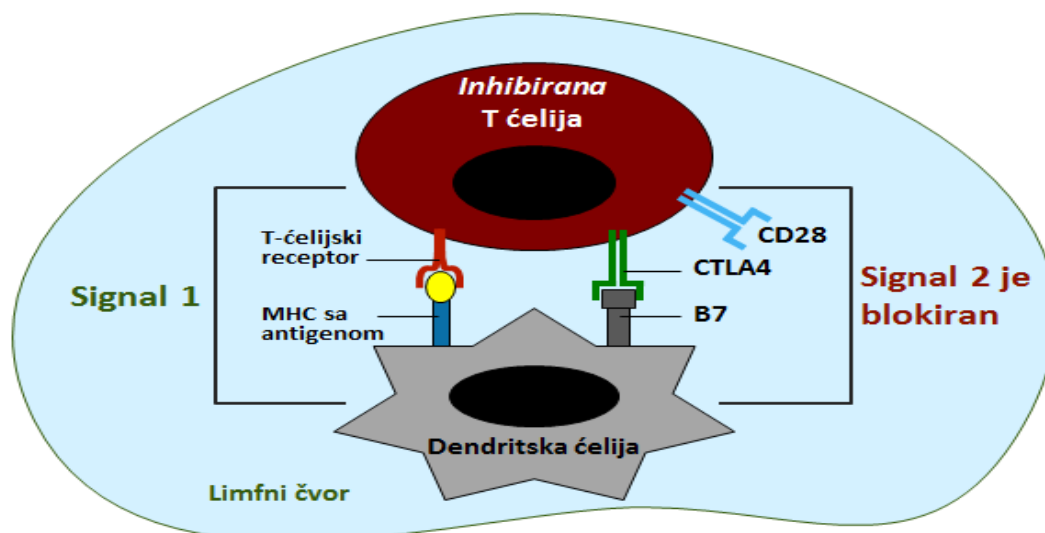
Slika 9. Signali T ćelijske aktivacije (232)

(Modifikovano iz: Postow MA, et al. *J ClinOncol.*2015;33(17):1974-1982)

Najbolje definisani par kostimulatora čine CD28 molekul na T limfocitima i ligand B7. Kada se B7 veže za molekul CD28 na T ćeliji (već stimulisanom vezivanjem liganda za TCR), nastaju signali koji olakšavaju transkripciju gena za IL-2 i stabilizuju tako formiranu „mesendžer” RNK za IL-2. Molekuli koji pojačavaju kostimulativni signal su CD40L (ligand) na T limfocitima i CD40 molekul na antigen prezentujućim ćelijama (APC). Interakcija

CD40:CD40L ne aktivira direktno T limfocit, već stimuliše APĆ da ispolji više B7 molekula i da sekretuje citokine kao što su: IL-12, IL-8 i TNF- $\alpha$  (76,188).

CD28 je član superfamilije imunoglobulina. Ima značajnu ulogu u T-ćelijskoj aktivaciji. Radi se o homodimeru polipeptidnih lanaca, vezanih disulfidnom vezom. Svaki od lanaca ima jednostavni ekstracelularni V domen, zatim transmembranski deo i citoplazmatski region (bez intrinzične aktivnosti kinaze). Homologni molekul CTLA-4 izražen je na aktivisanim T-ćelijama. Identifikovani ligand za oba molekula nazvan je B7 i konstitutivno je izražen na dendritskim ćelijama, a može biti eksprimiran, nakon indukcije, i na B ćelijama i monocitima-makrofagima. Vezivanje B7 sa CD28 molekulom, značajno je za isporuku kostimulatornih signala, neophodnih za punu aktivaciju i kompletan odgovor T limfocita na antigen. Drugi ligand za CD28 i CTLA-4 molekule, izražen je na antigen prezentujućim ćelijama i nazvan je B7-2. CTLA-4 predstavlja inhibitorni molekul, a njegovo vezivanje za B7 prekida T ćelijski odgovor. CTLA-4 ima veći afinitet nego CD28 za B7 molekule (slika 10) (76,188).

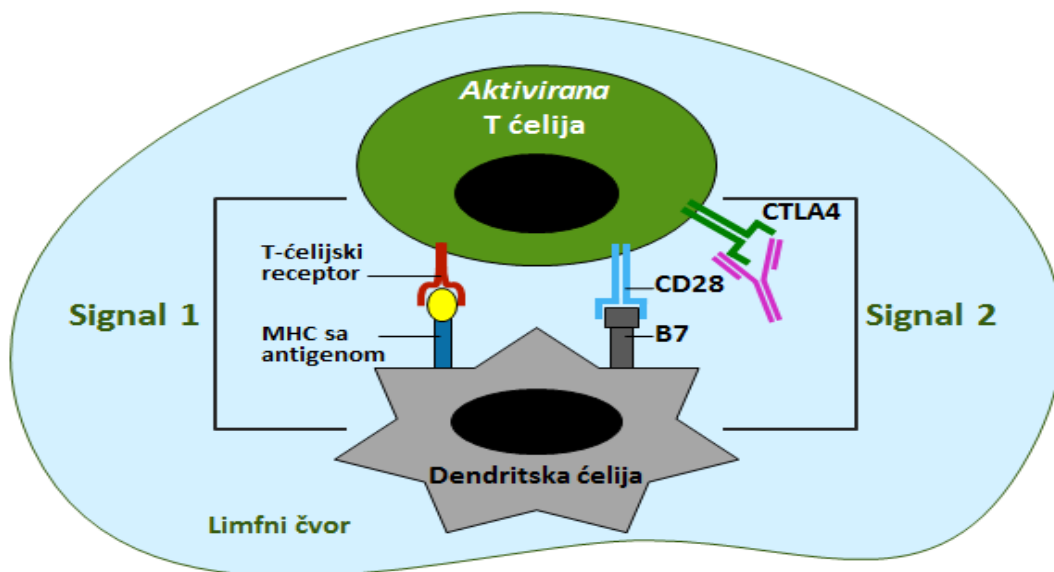


Slika 10. Uloga CTLA-4 molekula u imunološkoj T ćelijskoj deaktivaciji (232)

(Modifikovano iz: Postow MA, et al. *J Clin Oncol.*2015;33(17):1974-1982)

Vezivanjem monoklonskog antitela koje deluje na citotoksični T limfocitni antigen 4 (CTLA-4), blokira se njegovo vezivanje za B7 molekul i na taj način se vraća ponovna sposobnost interakcije B7 i CD28 molekula (slika 11) (76,188).

Kako je ovo molekul negativne imunološke kontrole, blokada ovog receptora može dovesti do stimulacije imunog odgovora protiv tumorskih ćelija. Ovaj vid imunoterapije, baziran na reaktivaciji imunog odgovora, se u kliničkoj praksi koristi kod pacijenata sa metastatskim melanomom. FDA (engl. *United States Food and Drug Administration*) je odobrila primenu ipilimumaba kod pacijenata sa metastatskim melanomom, dok tremelimumab drugo monoklonsko antitelo usmereno na CTLA-4 nije još uvek odobreno od strane FDA, ali se njegov značaj intezivno ispituje u kliničkim studijama (188,233).



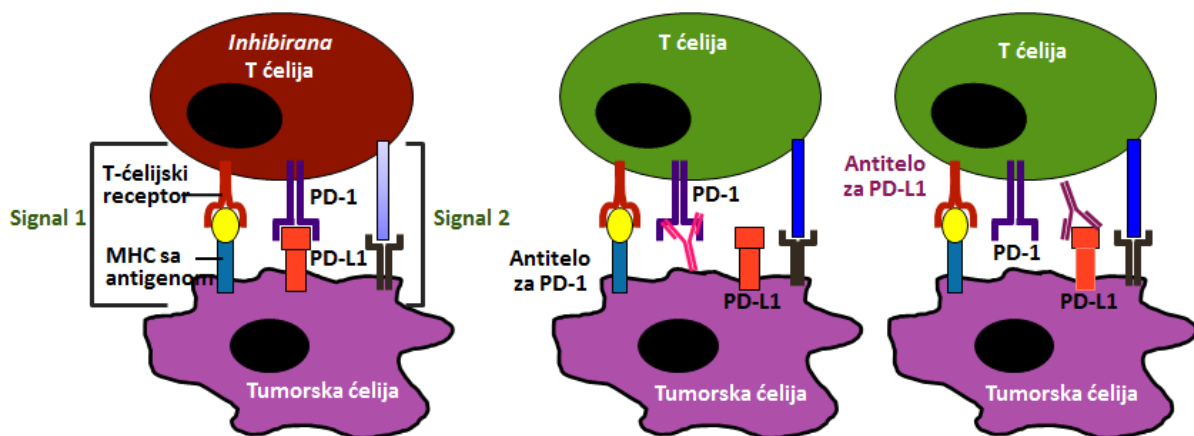
Slika 11. Uloga anti-CTLA-4 antitela u T ćelijskoj aktivaciji (232)

(Modifikovano iz: Postow MA, et al. *J Clin Oncol*.2015;33(17):1974-1982.)

Mao i sar. su ustanovili prisustvo CTLA-4 na tumorskim ćelijama dojke. Nasuprot tome u normalnom tkivu dojke nije uočena CTLA-4 ekspresija ili je uočena vrlo niska.

Bolesnice sa visokim RNA nivoom CTLA-4 imale su metastaze u limfnim čvorovima pazušne jame i lošiju prognozu bolesti. Takođe ekspresija CD3+CTLA-4+ u perifernoj krvi bolesnica sa rakom dojke bila je značajno viša nego u kontrolnoj grupi zdravih (234).

Receptor programirane smrti-1(PD-1) je takođ molekul negativne imunološke kontrole i perspektivna terapijska meta. Ovaj receptor je izražen na T ćelijama posle aktivacije, a njegovi ligandi, PD-L1 i PD-L2, izraženi su na tumorskim ćelijama, antigen-prezentujućim ćelijama i drugim ćelijama u tumorskom mikrokruženju. Tumorska ekspresija PD-L1 je mnogo češća kod karcinoma sa TP53 mutacijom (188). PD-1 receptor je deo B7:CD28 porodice kostimulatornih molekula koji regulišu T ćelijsku aktivaciju. Smatra se da interakcija PD-1 sa njegovim ligandom indukuje T ćelijsku apoptozu (235). Iz ovoga proizilazi hipoteza da tumor može iskoristiti ovaj signalni put PD-1/PD-L1 kako bi izbegao ili umanjio antitumorski imuni odgovor (slika 12). Perzistiranje visokog nivoa ekspresije PD-1 na antigen aktiviranim CD8+T ćelijama povezano je sa CD8+T ćelijskim fenotipom koji ima umanjenu efektorsku funkciju (236).



Slika 12. Uloga PD-1/PD-L1 u imunom odgovoru (237)

(Modifikovano iz: Sznol M, Chen L. Clin Cancer Res. 2013;19:1021-1034)

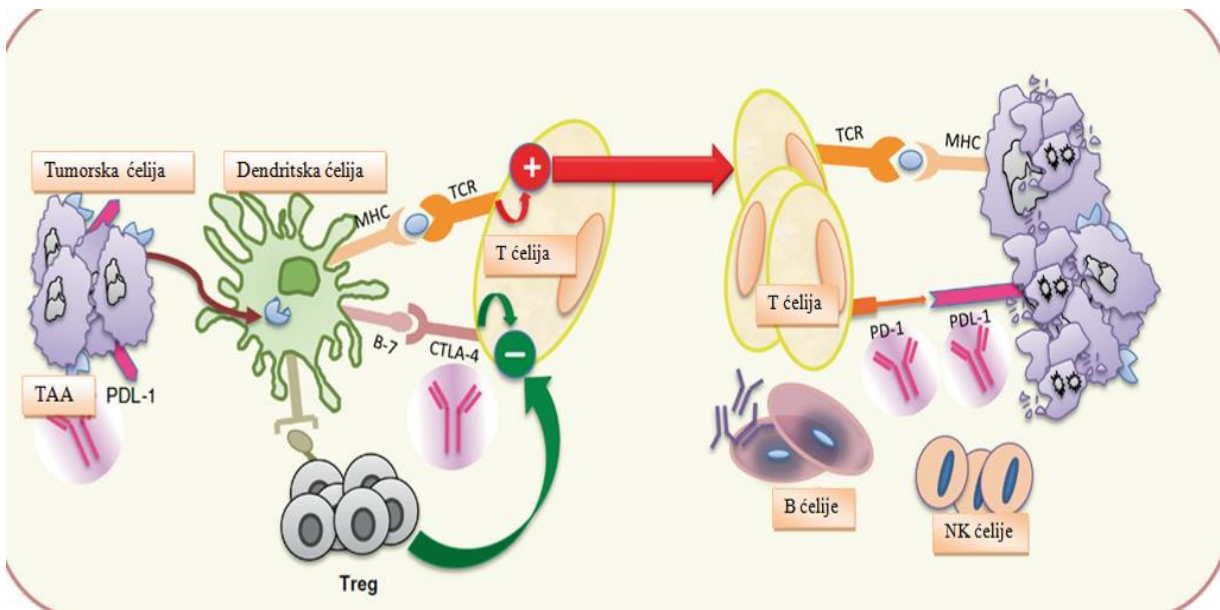
Prethodna istraživanja su pokazala da je prisustvo PD1+TIL povezano sa agresivnijim fenotipom tumora, uključujući visok histološki gradus, nedostatak hormonskih receptora, kao i sa kraćim ukupnim preživljavanjem obolelih od karcinoma dojke (188,238,239). Takođe, tumorska ekspresija PD-L1 je uočena kod hormonski i tripl negativnih tumora, kao i kod loše diferentovanih tumora. Kod trostruko negativnih tumora, tumorska ekspresija PD-L1 je u korelaciji sa CD8+ limfocitnim infiltratom (188).

Ovaj vid imunoterapije usmerene na primeni anti-PD-1 monoklonskog antitela se u kliničkoj praksi koristi kod pacijenata sa metastatskim melanomom i metastatskim karcinomom pluća. FDA je odobrila dva PD-1 antagonista pembrolizumab i nivolumab, za lečenje pacijenata sa uznapredovalim melanomom; nivolumab je odobren za metastatski tumor pluća (188). U toku su istraživanja prediktivne vrednosti ekspresije PD-L1 u tumorskim ćelijama i imunim ćelijama u tumorskom mikrokruženju, kao biomarkera odgovora na blokadu PD-1 signalnog puta (188).

Takođe, u toku je kliničko ispitivanje atezolizumaba (MPDL3280A), anti-PD-L1 monoklonskog antitela koje ima ulogu da smanji antitelo zavisnu i ćelijski posredovanu citotoksičnost (ADCC) i prevenira depleciju T ćelija koje takođe izražavaju PD-L1 (240). Atezolizumaba je zabeležio obećavajuću aktivnost kod tumora mokraćne bešike i tumora pluća u fazi I kliničke studije. Monoklonsko antitelo je bilo efikasnije kod tumora mokraćne bešike sa većim nivoom infiltracije imunih ćelija i visokom ekspresijom PD-L1 sa jednogodišnjim preživljavanjem od 57% naspram 38% kod tumora sa niskim ekspresijom PD-L1, a slični rezultati su zabeleženi i kod tumora pluća (241,242). Pored ovoga u toku je klinička studija u kojoj se procenjuje značaj atezolizumaba u kombinaciji sa nab-paclitaxelom kod metastatskog tripl negativnog karcinoma dojke (243).

Tumor infiltrišući limfociti nisu prisutni u svim tumorima dojke. Identifikacija bolesnica sa visokim nivoom TIL može pomoći u otkrivanju onih bolesnica koje mogu imati

koristi od imunoterapije usmerene na primeni anti-PD-1 i anti CTLA-4 monoklonskih antitela (slika 13) (188,244). Takođe, u prekliničkim istraživanjima na eksperimentalnim modelima je pokazano da kombinacija anti-PD-1 i anti CTLA-4 monoklonskih antitela sa trastuzumabom kod HER-2 pozitivnog tumora može jačanjem imuniteta domaćina da poboljša prognozu bolesti (228).



CTLA-4: citotoksični T-limfocitni antigen 4; PD-1: Receptor programirane smrti-1; PDL-1: PD-1 ligand 1; TAA: tumor-asociran antigen; TCR: T-celijski receptor; MHC: glavni kompleks tkivne podudarnosti

*Slika 13. Funkcija imunog sistema i relevantne komponente za terapiju tumora (228)*

*(Prevedeno iz: Criscitiello C, et al. Breast Cancer Res. 2014;16(1):20).*

CD40 je protein, član TNF (engl. *tumor necrosis factor*) familije receptora koji se nalazi na antigen prezentujućim ćelijama i ima značajnu ulogu u ekspanziji antigen specifičnih CD4<sup>+</sup> ćelija (88,245). U toku su klinička istraživanja antitela agonista za ovaj

receptor (88,246). Nedavno su objavljeni i rezultati kliničke studije u kojoj je uključeno 21 bolesnik sa uznapredovalim karcinomom pankreasa koji su primali kombinaciju gemcitabina i CD40 agoniste CP-870.893. Nakon dva ciklusa rađena je procena odgovora na terapiju (PET-CT) i dobijen impresivan odgovor (engl. *response rate*) od 88%, sa medijanom vremena bez progresije (engl. *progression free*) i ukupnim preživljavanjem (engl. *overall survival*) od 5,6 i 7,4 meseca (246,247). Preklinički podaci su pokazali da kombinovana anti-CTLA-4 i CD40 terapija može biti efikasnija u odnosu na pojedinačnu (248).

OX40 je još jedan imunogen molekul, koji je takođe član TNF (engl. *tumor necrosis factor*) familije receptora. OX40 je prisutan na CD4+ i CD8+ limfocitima, a njegov ligand na aktiviranim antigen prezentujućim ćelijama, B ćelijama i makrofagima. Vezivanje OX40 i OX40L stimuliše proliferaciju i ekspanziju efektorskih T limfocita i memorijskih ćelija. Signalizacija kroz OX40 povećava sekreciju citokina od strane CD4+T ćelija (88,249). Pokazano je da signalizacija kroz OX40 pojačava antitumorski imuni odgovor (88,250). Druga zanimljiva strategija bazira se na kombinaciji OX40 agoniste sa hemioterapijom i/ ili, radioterapijom koja bi doprinela povećanju ekspresije tumorskih antigena. Klinička ispitivanja, čiji je cilj da provere ovu hipotezu, su u toku (251,252).

Kao što je već prethodno rečeno, progresija tumora prolazi u tri faze: faza eliminacije tumora (engl. *elimination phase*), faza ravnoteže (engl. *equilibrium phase*) i faza tumorskog bega (engl. *escape*) (114). Kada je tumor dovoljno veliki da se klinički može detektovati, on se nalazi u trećoj fazi-tumorskog bega. Cilj imunoterapije je da reaktivacijom imunološkog sistema vrati tumor u fazu eliminacije. Međutim, pre faze eliminacije, sledi faza ravnoteže. Ovakvo koegzistiranje tumora sa imunološkim sistemom je od koristi za pacijente, jer njihova bolest ne napreduje.

FOXP3+Treg limfociti imaju značajnu ulogu u sprečavanju i ograničavanju imunološkog odgovora i neophodni su za održavanje imunološke tolerancije i preveniranje

autoimunosti (90,228). Dok vrše svoju funkciju, Treg ćelije mogu suzbiti imunski odgovor na tumorske antigene. Ekspresija FOXP3+Treg ćelijama kod karcinoma dojke povezana je sa kraćim vremenskim periodom bez bolesti i kraćim ukupnim preživljavanjem (228). Deplecija FOXP3+ Treg ćelija može poboljšati antitumorski imunski odgovor, jer se na taj način ublažava supresivna funkcija ovih ćelija. Metronomska hemioterapija se sastoji u davanju niskih doza citostatika, sa ciljem da se smanji angiogeneza u tumoru. Nedavno je istaknuto da je metronomska doza cyclofosfamida kod pacijenata sa uznapredovalim tumorom dovela do smanjenja broja cirkulišućih Treg ćelija, i na taj način je eliminisan njihov supresivan efekat na konvencionalne T i NK ćelije, čime je postignuta bolja kontrola bolesti (88,253).

IL-2 igra važnu ulogu u opstanku Treg limfocita, te neutralizacija ovog citokina sa specifičnim antitelima može značajno smanjiti broj ovih ćelija. Denileukin diftotox (Ontak), rekombinantni fuzioni protein koji se sastoji od IL-2 i toksina difterije, može smanjiti broj Treg limfocita i na taj način smanjiti imunosupresivni efekat ovih ćelija na antitumorski imunitet (slika 14) (254). U toku je klinička studija u kojoj su uključeni pacijenti sa uznapredovalim tumorima, uključujući i karcinom dojke i koja ima za cilj da utvrdi značaj ovog vida terapije (88,255).

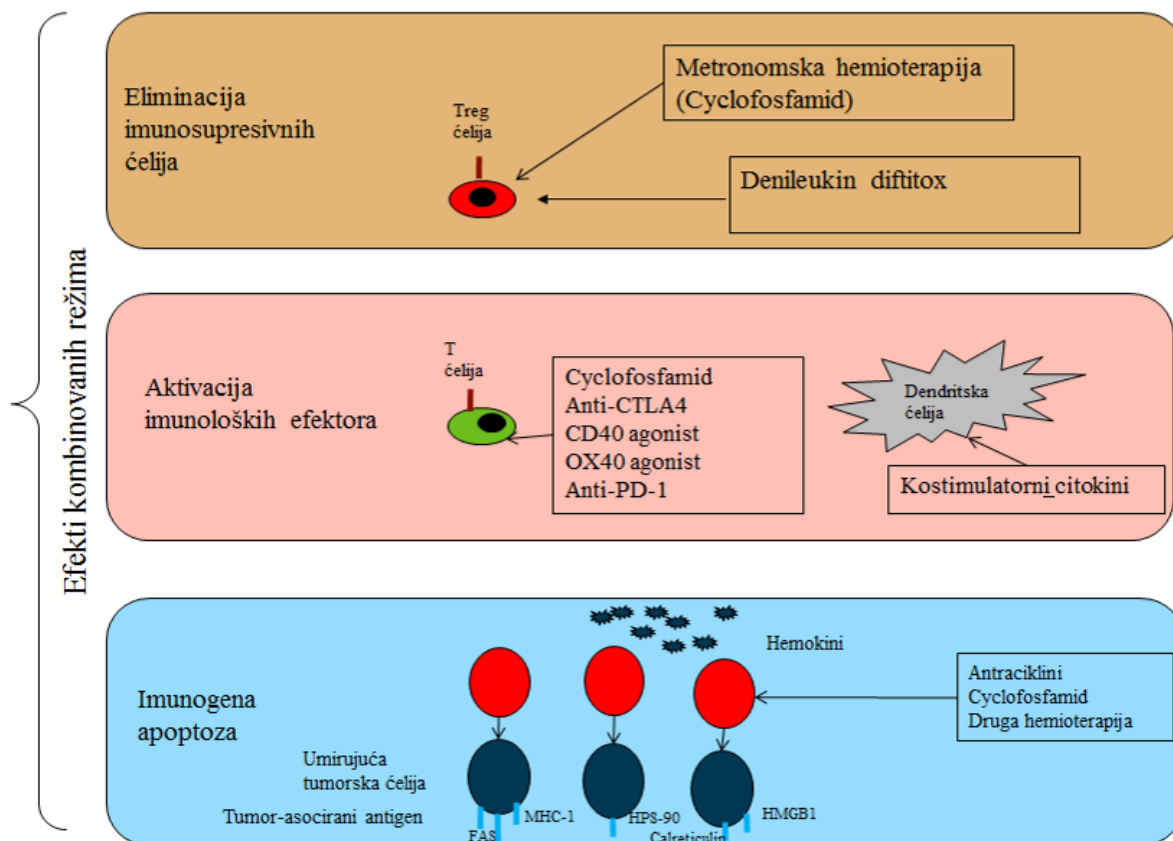
Citostatiki dovode do apoptoze tumorskih ćelija. Neke studije navode mogućnost da neki hemioterapeutici, kao što su gemcitabin, antraciklini i cyclofosfamid, dovode do destrukcije ćelija raka poboljšavanjem prepoznavanja od strane imunološkog sistema. Objašnjenje je u povećanju broja CD8+ limfocita, posredovano širim opsegom tumorskih antigena prezentovanih u sklopu MHC molekula (88,256). Takođe, tokom smrti tumorskih ćelija dolazi do translokacije calreticulina (CRT) na površinu ćelije i nakon toga do interakcije sa više receptora na dendritskim ćelijama i oslobađanja HMGB1 (engl. *High-mobility group protein B1*). HMGB1 može da se veže za TLR4 (engl. *toll like receptor 4*) na dendritskim ćelijama (DĆ) čime je omogućeno da se tumorski antigeni prezentuju u sklopu MHC



molekula i drugih kostimulatornih molekula na DĆ. Ovi mehanizmi zajedno služe za aktiviranje DĆ posredovanog specifičnog antitumorskog odgovora, koji može biti poboljšán upotrebom kostimulatornih molekula (slika 14) (88).

U istraživanjima na mišijim modelima, gemcitabin je pokazao sposobnost smanjenja broja supresorskih ćelija mijeloidnog porekla (MDSCs), koje u tumorskom mikrokruženju ispoljavaju imunosupresivnu funkciju (88).

Pored imunosupresivnih citokina u tumorskom okruženju prisutni su i citokini kao što su faktor rasta granulo-monocitopoeze (GM-CSF) i IL-2 koji imaju kostimulatorne efekte. GM-CSF utiče na mobilizaciju, diferencijaciju i funkciju dendritskih ćelija (DĆ). U istraživanju Honkoopa i sar. bolesnice sa uznapredovalim karcinomom dojke primale su GM-CSF uz hemioterapiju. Ovakvim kombinovanim pristupom produženo je preživljavanje bez znakova bolesti (engl. *disease-free survival, DFS*), odnosno ukupno preživljavanje (engl. *cancer-specific overall survival OS*) (257). Jedna od hipoteza kojom se objašnjavaju ovakvi rezultati je oslobađanje šireg spektra tumorskih antigena (Her-2/neu, CEA, MUC-1) nakon primenjene hemioterapije koji predstavljaju odličnu metu za imunološki sistem, stimulisan citokinom GM-CSF (88,252).



Slika 14. Mehanizmi delovanja konvencionalnih antineoplastika i novih imunostimulativnih lekova (88).

(Prevedeno iz: De la Cruz-Merino L, et al. Clin Dev Immunol. 2013;2013:785317)

U budućnosti će se terapija malignih tumora bazirati na kombinovanom pristupu koji će uključivati imunoterapiju i ciljanu (target) ili hemioterapiju (slika 14). U toku su klinička ispitivanja koja imaju za cilj da procene ulogu i značaj ovakvog vida lečenja kod različitih tumora, kao i da identifikuju pacijente koji bi imali koristi od ovakve kombinovane terapije.

Citokini su našli svoje mesto u imunološkoj antitumorskoj terapiji ili u pokušajima ove terapije. Efekti citokina nisu specifični za tumorske ćelije, jer oni deluju na jednu ili više komponenti imunoloških funkcija (80).

Interleukin 2 u visokim dozama korišćen je u terapijske svrhe, a kao posledica dolazi do povećanja broja limfocita i NK ćelija, kao i do izrazitog podsticanja NK i LAK (citokinom

aktivisane ubilačke ćelije) ćelijske aktivnosti. U serumu je viši nivo TNF i interferona gama. IL-2 stimuliše aktivnost NK ćelija i citotoksičnih limfocita, što se u ovom slučaju ispoljava lizom tumorskih ćelija. *In vivo*, primena IL-2 može da bude veoma toksična (često dolazi do groznice, edema pluća, šoka) (80). Takođe, funkcija tumor infiltrišućih limfociti može biti deaktivirana ćelijama raka i suprimirana u mikrookolini tumora. Ideja terapije sa tumor infiltrišućim limfocitima je da se ovi limfociti, uzeti iz inflamatornog infiltrata u tumoru, umnože u laboratorijskim (*in vitro*) uslovima uz visoke koncentracije IL-2, a zatim vrate u vidu autologne infuzije (228,258).

TNF (faktor nekroze tumora) daje snažne antitumorske efekte *in vitro*, ali *in vivo*, visoke doze TNF indukuju mnoge patološke efekte. Može da bude vrlo toksičan u dozama koje su potrebne za ubijanje tumorskih ćelija *in vivo*. Rezultati istraživanja su pokazali da je nivo solubilnih TNF receptora, utvrđen ELISA testom u serumu obolelih od raka dojke, bio značajno viši u poređenju sa vrednostima u zdravih žena. Najviši nivo nađen je kod bolesnica sa metastazama i bio je značajno viši nego kod obolelih žena bez prisutnih metastaza. Na osnovu toga se zaključilo da je solubilni TNF receptor pokazatelj aktivnosti bolesti (80).

Interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) daje antiproliferativne efekte na ćelijama *in vitro*, povećeva litički potencijal NK ćelija i dovodi do povećane ekspresije HLA molekula klase I, na raznim tipovima ćelija. Povoljan efekat ove terapije opisan je kod tumora bubrega, melanoma, Kapoši sarkoma, nekih limfoma i leukemije B-ćelija. Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) deluje na makrofage i NK ćelije, kao i na ekspresiju HLA molekula, ovaj citokin takođe poboljšava antitumorske efekte (80).

Imunološke sinapse se mogu smatrati kompleksnim „bojnim poljem” gde različiti molekuli i ćelije interaguju. Od presudnog značaja je razumevanje mehanizama koji mogu da izazovu uspešan imunološki odgovor ili nasuprot dovedu do imunotolerancije na ovom nivou,

pa je zbog toga proučavanje prisustva i uloge T ćelija u okviru tumorskog mikrookruženja je od ključnog značaja za razvoj imunoterapije kod karcinoma dojke.

Upotreba imunoterapije u lečenju raka dojke ima nekoliko ključnih prednosti u odnosu na standardnu hemioterapiju i ciljanu terapiju. Efekti ciljane terapije zavise od specifičnih signalnih puteva i onkogenih promena u ćelijama. Međutim, poznato je da ćelije mogu aktivirati kompenzatorne signalne puteve, čineći ih otporne na ovu terapiju. U toku su istraživanja usmerena na ispitivanju kombinacije tirozin kinaza inhibitora za više receptora, kako bi se izbegla gore spomenuta otpornost, ali potencijalna toksičnost ovakvih kombinacija može ograničiti njihovu opravdanost (259).

Patohistolološka evaluacija tumor infiltrišućih limfocita kod karcinoma dojke može doprineti u identifikaciji onih bolesnica koje bi imale koristi od imunoterapije, obzirom da tumori sa gustim i oskudnim limfocitnim infiltratom imaju različito biološko ponašanje (135).

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu vlastitog istraživanja i dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Gust limfocitni infiltrat postoji u 14% tumora dojke histološkog tipa invazivnog dukalnog karcinoma, umeren limfocitni infiltrat u 38%, a oskudan u 43%. Limfocitni infiltrat nije prisutan u 5% tumora.
2. U najvećem broju tumora sa limfocitnim infiltratom, infiltrat je prisutan na tumorskim marginama (u 96% tumora), a u 37% tumora uočen je i infiltrat lokalizovan centralno.
3. U većini tumora tip limfocitnog infiltrata je difuzan (u 72%), a u 28% tumora je mešovit (difuzan i nodularan).
4. Gust infiltrat CD4+ limfocita postoji u 8% tumora dojke histološkog tipa invazivnog dukalnog karcinoma, umeren u 44%, a oskudan u 43%. CD4+ limfociti nisu uočeni u 5% tumora.
5. Gust infiltrat CD8+ limfocita postoji u 1% tumora dojke, umeren u 23%, a oskudan u 66% tumora dojke. CD8+ limfociti nisu uočeni u 10% tumora.
6. Ustanovljena je visoka pozitivna povezanost između ekspresije CD4+ limfocita u tumoru i ukupnog limfocitnog infiltrata, dok je između ekspresije CD8+ limfocita i ukupnog infiltrata, kao i između CD4+ i CD8+ dobijena umerena pozitivna korelacija.
7. Postoji pozitivna povezanost između nivoa infiltracije limfocita u tumoru i njegove veličine, histološkog gradusa, prisustva metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame i stadijuma bolesti.
8. Kod trostruko negativnih i HER-2 pozitivnih tumora postoji viši nivo limfocitne infiltracije.
9. Postoji negativna povezanost između nivoa infiltracije limfocita u tumoru i hormonskih receptora (estrogen i progesteron).

10. Između nivoa infiltracije limfocita u tumoru i starosti bolesnica postoji negativna povezanost.
11. Ustanovljena je pozitivna povezanost između nivoa infiltracije limfocita u tumoru i relapsa bolesti. Za bolesnice sa visokim nivoom limfocita u tumoru karakteristično je pogoršanje bolesti koje se javilo tokom perioda praćenja.
12. Postoji pozitivna povezanost između nivoa infiltracije CD4+ limfocita u tumoru i njegove veličine, histološkog gradusa, prisustva metastaza u limfnim čvorovima pazušne jame i stadijuma bolesti.
13. Kod trostruko negativnih i HER-2 pozitivnih tumora postoji viši nivo infiltracije CD4+ limfocita.
14. Između nivoa infiltracije CD4+ limfocita u tumoru i hormonskih receptora (estrogen i progesteron) postoji negativna povezanost.
15. Postoji negativna povezanost između nivoa infiltracije CD4+ limfocita u tumoru i starosti bolesnica.
16. Postoji pozitivna povezanost između nivoa infiltracije CD4+ limfocita u tumoru i relapsa bolesti. Za bolesnice sa visokim nivoom limfocita u tumoru karakteristično je pogoršanje bolesti koje se javilo tokom perioda praćenja.
17. Između nivoa infiltracije CD8+ limfocita u tumoru i histološkog gradusa tumora i HER-2 statusa postoji pozitivna povezanost.
18. Postoji negativna povezanost između nivoa infiltracije CD8+ limfocita u tumoru i hormonskih receptora (estrogen i progesteron).
19. Postoji negativna povezanost između nivoa infiltracije CD8+ limfocita u tumoru i starosti bolesnica.
20. Ovim istraživanjem nije potvrđena hipoteza o povezanosti CD8+ limfocita u tumoru i njegove veličine, relapsa bolesti, kao ni povezanost sa limfonodusnim statusom aksile.

Takođe, nije potvrđena hipoteza da bolesnice sa karcinomom dojke kod kojih se detektuje viši nivo tumor infiltrišućih limfocita (kao i CD4+ i CD8+ limfocita) imaju kraće ukupno preživljavanje.

21. Zaključno može se utvrditi da rezultati ovog istraživanja pokazuju povezanost tumor infiltrišućih limfocita i CD4+ limfocita sa brojnim negativnim prognostičkim faktorima, te kraćim vremenom slobodnog intervala bez bolesti, što sve ukazuje na to da su tumor infiltrišući limfociti kao i CD4+ limfociti loš prognostički faktor kod bolesnica sa rakom dojke. Patohistolološka evaluacija tumor infiltrišućih limfocita se kod karcinoma dojke rutinski još uvek ne radi jer je potrebno proceniti klinički značaj. Ovo istraživanje može doprineti razvoju „imunološkog gradusa” karcinoma dojke koji bi odražavao intenzitet imunološkog odgovora svakog pojedinačnog pacijenta i imao uticaja na prognozu bolesti zajedno sa ostalim standardnim prognostičkim parametrima. Takođe, razumevanje uloge tumor infiltrišućih limfocita, a posebno T ćelija u imunološkom odgovoru kod tumora je od suštinskog značaja za razvoj nove imunoterapijske strategije u lečenju raka dojke.

## 7. LITERATURA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 13/12/2013.
2. Pekmezović T. Epidemiologija raka dojke. U: Milašinović G, urednik. Vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2013.s.5-7.
3. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69–90.
4. Incidenca i mortalitet raka dojke. Registar za rak Vojvodine. Institut za onkologiju Vojvodine, Novi Sad, 2011.
5. Dugandžija T, Miladinov Mikov M, Malenković G, Ivković-Kapicl T, Prvulović N, Ristić M. Epidemiological analysis of breast cancer in Vojvodina in three periods from 1978 to 2007. Abstract book of 13 th Biennial Meeting of the Interbational Gynecologic Cancer society (IGCS 2010); 2010 October 23-26; Prague, Czech Republic. Prague; 2010.p.256.
6. Filipović S, Filipović A, Stojiljković V, Mišić I, Vrbić S, Pejčić I, et al. Karcinom dojke-kliničke implikacije. *JMB.* 2007;26:134–143.
7. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles & Practice of Oncology* [CD-ROM]. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
8. Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Med.* 2006;3:8-14.
9. Eppenberger-Castori S, Moore H Jr, Thor D, Edgerton SM, Kueng W, Eppenberger U,



- et al. Age-associated biomarker profiles of human breast cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(11):1318–30.
10. Rhodes A, Jasani B, Balaton J, Barnes M, Miller D. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mamographic screening. *J Clin Pathol.* 2000;53(9):688–96.
  11. Ivković-Kapicl T, Knežević-Ušaj S, Panjković M, Ninčić D, Mastilović K. Uticaj životnog doba na patološke i imunobiološke karakteristike duktusnog invazivnog karcinoma dojke. *Vojnosanit Pregl.* 2006;63(11):921–927.
  12. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2000;21:427–433.
  13. Šamija M, Vrdoljak E, Krajina Z. Rak dojke. U: Šamija M, urednik. *Klinička onkologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2006.s.291-304.
  14. Palcios J, Robles-Frias J, Castilla A, Lopez-Garcia A, Benitez J. The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology.* 2008;75:85-94.
  15. Campeau M, Folkes D, Tischkowitz D. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet.* 2008;124:31-42.
  16. Larsen J, Thomassen M, Gerdes A, Kruse A. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast Cancer (Auckl).* 2014;8:145-55.
  17. Petrucelli N, Daly M, Feldman G. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in Medicine.* 2010;12:245–259.
  18. Lindor M, McMaster M, Lindor CJ, Greene MH. *Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes.* 2nd. ed. Monogr: J Natl Cancer Inst; 2008.
  19. Eccles M. Identification of personal risk of breast cancer genetics. *Breast Cancer Res.* 2008;10:1-3.

20. Desrichard A, Bidet Y, Uhrhammer N, Bignon YJ. CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):R119.
21. Cardoso F, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Senkus E, Thompson A, et al. Primary Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.* 2013;24(Suppl 6): vi7-vi23.
22. Chlebowski T. Nutrition and physical activity influence on breast cancer incidence and recurrence. *The Breast.* 2013;22(Suppl 1);S5.(Abstr. SP3.01).
23. Newcomb A, Storer E, Longnecker P, Mittendorf R, Greenberg R, Clapp R, et al. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med.* 1994;330(2):81-7.
24. Marković I. TNM klinička klasifikacija. U: Milašinović G, urednik. Vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2013.s.58-65.
25. Edge B, Byrd R, Compton C. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York: Springer; 2010.
26. Fisher ER, Constantino J, Redmond C. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project. *Cancer.* 1993;71:41-50.
27. Tot T, Tabar L, Dean P. *Practical Breast Pathology.* 1st ed. Thieme: Medical Publishers; 2002.
28. Andea A, Bouwman D, Wallis T, Visscher W. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer.* 2004;100:20-7.
29. Schnitt S. Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst.* 2001;30:22-26.
30. Goldhirsch A, Glick H, Gelber D, Coates S, Senn J. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *Seventh International*

- Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19:3817-27.
31. Rosai J. Ackerman's surgical pathology. In: Rosai J, ed. *Breast*. St.Louis: Mosby-Year Book, Inc; 1996.p.1621-1622.
  32. Tavassoli FA, Devilee P. World health organisation classification of tumors. *Tumors of the breast and female genital organs*. France: IARC Press; 2003.
  33. Elston CW, Ellis IO, Goulding H. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *The Breast*. London:Churchill Livingstone; 1998.p.385-433.
  34. Čović D, Milas I, Vukas D, Čakalo I. Tumori dojke. U: Šamija M, urednik. *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.s.316-326.
  35. Fisher ER, Constantino J, Redmond C. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project. *Cancer*. 1993;71:41-50.
  36. Bloom G, Richardson W. Histological grading and prognosing in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1997;11:359-377.
  37. Elston W, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow- up. *Histopathology*.1991;19:403-10.
  38. Goldhisch A. Breast Cancer. Cavalli F, Hansen H, Kaye S, editors. *Textbook of Medical Oncology*. London: Martin Dunitz; 2001.p.53-86.
  39. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of tissue estrogen and progesteron receptor levels: a survey of current practice, techniques, and quantitation methods. *Breast J*. 2006;6:189-96.
  40. Ros S, Fletcher A, Linette P, Stec J, Clarc E, Ayers M, et al. The HER-2/neu Gene and

- Protein in Breast Cancer: Biomarker and Target of Therapy. *The Oncologist*. 2003;8:307-25.
41. Perez-Soler R. HER1/EGFR targeting: refining the strategy. *The Oncologist*. 2004;9:58-67.
  42. Suo Z, Risberg B, Kalsson MG. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol*. 2002;196:17-25.
  43. Salomon D, Clarc M, Wong G, Levin J, Ullrich A, McGuire L. Human breast cancer: correlation of relaps and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
  44. Prati R, Apple S K, He J, Gornbei J A, Chanh H R. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J*. 2005;11(6):433-9.
  45. Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(2):109-19.
  46. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1783-91.
  47. Ignatiadis M, Desmedt C, Sotiriou C, Azambuja E, Piccart M. HER-2 as a target for breast cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2009;15:1848-1852.
  48. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):539-52.
  49. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010;11:174–83.

50. Keshgegian A, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol.* 1995;104(1):42–9.
51. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995; 333(26):1757–63.
52. Fernandez Acenero J, Galindo Gallego M, Arangoncillo Ballesteros P, et al. Vascular density as a prognostic indicator for invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch.* 1998;432:113-117.
53. Brujan I, Margaritescu C, Simeonascu C. Cathepsin-D expression in breast lesion: on imunohistochemikal study. *Rom J Morpholog embryol.* 2009;50:31-39.
54. Laurent-Matha V, Huesgen F, Masson O, Derocq D, Prébois C, Gary-Bobo M, et al. Proteolysis of cystatin C by cathepsin D in the breast cancer microenvironment. *FASEB J.* 2012;26(12):5172-81.
55. Del Casar JM, González-Reyes S, González LO, González JM, Junquera S, Bongera M, et al. Expression of metalloproteases and their inhibitors in different histological types of breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;136:811-819.
56. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC.* 2009;9:188-208.
57. McGowan M, Duffy J. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Ann Oncol.* 2008;19:1566-1572.
58. Pedersen N, Christensen J, Stephens W, Briand P, Mourdisen T, Dano K. The complex between urokinase and its type-1 inhibitor in primary breast cancer: relation to survival. *Cancer Res.* 2000;60:6927-6934.
59. Abd El-Rehim D, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW. Expression of luminal and

- basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004;203:661-671.
60. Liu Y, Kulesz-Martin M. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis.* 2001;22(6):851–60.
  61. Rosenthal I, Depowski L, Ross S. Decreased expression of nm23-H1 is associated with increased recurrence of breast cancer. *Mod Pathol.* 2000;13:45.
  62. Nadler Y, Camp L, Giltnane JM. Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10:1-12.
  63. Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV. Low molecular weight inhibitors of Myc/Max interaction and function. *Oncogene.* 2003;22:6151-6159.
  64. Azim A, Jr, Michiels S, Zagouri F . Utility of prognostic genomic tests in breast cancer practice: the IMPAKT 2012 working group consensus statement. *Ann Oncol.* 2013;24:647–654.
  65. Schnitt J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol.* 2010;23:6-4.
  66. Geyer C, Rodrigues N, Weigelt B, Reis-Filho S. Molecular classification of estrogen receptor-positive/Luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol.* 2012;19:39–53.
  67. Puztai L. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009;11:S11.
  68. Sotiriou C, Pusztai L. Gene expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009; 360:790-800.
  69. Ivković-Kapicl T, Panjković M, Nikolić I, Djilas-Ivanović D, Knezević-Usaj S. Expression of cytokeratins 5/6 and cytokeratin 17 in invasive breast carcinoma. *Vojnosanit Pregl.* 2012;69(12):1031-8.
  70. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol.*

- 2008;61(5):553-60.
71. Verma S, Bal A, Joshi K, Arora S, Singh L. Immunohistochemical characterization of molecular subtypes of invasive breast cancer: a study from North India. *APMIS*. 2012;120:1008-1019.
  72. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 3rd ed. St. Louis: Mosby; 1993.
  73. Finn J. Molecular origins of cancer. *Cancer Immunology*. *N Engl J Med*. 2008;358:2704-2715.
  74. Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumor antigens: Immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol*. 2007;178:1975-1979.
  75. Šamija M, Vrdoljak E, Krajina Z. Imunološki sistem i rak. U: Šamija M, urednik. *Klinička onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.s.30-37.
  76. Jerant Patic.V. Specifična otpornost U: Jerant Patic.V, urednik. *Imunologija*. N. Sad: Medicinski fakultet; 2000.s.8-24.
  77. Dobrzanski J, Reome B, Hylindand C, Rewers-Felkins A. CD8-mediated type 1 antitumor responses selectively modulate endogenous differentiated and nondifferentiated T cell localization, activation, and function in progressive breast cancer. *J Immunol*. 2006;177:8191–201.
  78. Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med*. 2006;354:1166-1176.
  79. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res*. 2010;70(21):8368–8377.
  80. Jerant Patic.V. Tumorska imunologija. U: Jerant Patic V, urednik. *Imunologija*. N. Sad: Medicinski fakultet; 2000.s.270-278.
  81. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112:1557.
  82. Abbas K, Murphy M, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*.

- 1996;383:787.
83. Miossec P, Korn T, Kuchroo K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med.* 2009;361:888.
  84. McKenzie S, Kastelein A, Cua J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006;27:17–23.
  85. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood.* 2009;114:1141–1149.
  86. Novitskiy V, Pickup W, Gorska E, Owens P, Chytil A, Aakre M, et al. TGF-beta receptor II loss promotes mammary carcinoma progression by Th17 dependent mechanisms. *Cancer Discovery.* 2011;1:430–441.
  87. Numasaki M, Fukushi J, Ono M. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood.* 2003;101:2620–7.
  88. De la Cruz-Merino L, Barco-Sánchez A, Henaó Carrasco F, Nogales Fernández E, Vallejo Benítez A, Brugal Molina J, et al. New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:785317.
  89. Nakamura R, Sakakibara M, Nagashima T, Sangai T, Arai M, Fujimori T, et al. Accumulation of regulatory T cells in sentinel lymph nodes is a prognostic predictor in patients with node-negative breast cancer. *Eur J Cancer.* 2009;45:2123-2131.
  90. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345-52.
  91. Piccirillo A, Shevach M. Cutting edge: control of CD8+T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* 2001;167:1137-40.
  92. Lim W, Hillsamer P, Banham H, Kim H. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2005;175:4180-3.



93. Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- $\beta$  dependent manner. *J Exp Med.* 2005;202:1075-85.
94. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res.* 2003;63:4516-20.
95. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 2004;172:4676-80.
96. Curigliano G. Immunity and autoimmunity: revising the concepts of response to breast cancer. *Breast.* 2011;20:71–74.
97. Liyanage K, Moore T, Joo G, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002;169:2756-61.
98. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2005;65:2457-64.
99. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res.* 2003;9:4404-8.
100. Virginie Lafont, Françoise Sanchez, Emilie Laprevotte, Henri-Alexandre Michaud, Laurent Gros, Jean-François et al. Plasticity of  $\gamma\delta$  T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. *Front Immunol.* 2014;5:622.
101. Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, Wevers E, et al. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol.* 2012;189(10):5029–36.

102. Castiglione F, Taddei A, Buccoliero AM, Garbini F, Gheri CF, Freschi G, et al. TNM staging and T-cell receptor gamma expression in colon adenocarcinoma. Correlation with disease progression. *Tumori*. 2008;94(3):384–8.
103. Van Kaer L, Joyce S. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol*. 2005;15:429-431.
104. Masaki T, Berzofsky J. The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Adv Cancer Res*. 2008;101:277–348.
105. Weiss A, Samelson LE. T-lymphocyte activation. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.p.321-363.
106. Kacha K, Fallarino F, Markiewicz A, Gajewski F. Cutting edge: spontaneous rejection of poorly immunogenic P1.HTR tumors by Stat6-deficient mice. *J Immunol*. 2000; 165:6024–8.
107. Lowes A, Bishop A, Crotty K, Barnetson S, Halliday M. T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. *J Invest Dermatol*. 1997; 108:914–9.
108. Kobayashi M, Kobayashi H, Pollard RB, Suzuki F. A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *J Immunol*. 1998;160:5869–73.
109. Ruffell B, DeNardo G, Affara NI, Coussens M. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(1):3–10.
110. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A et al. CD4+ follicular helper T-cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. 2013;123:2873-2882.
111. Guida M, Casamassima A, Monticelli G, Quaranta M, Colucci G. Basal cytokines

- profile in metastatic renal cell carcinoma patients treated with subcutaneous IL-2-based therapy compared with that of healthy donors. *J. Transl. Med.* 2007;5:51.
112. Huang B, Pan Y, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006;66:1123-31.
  113. Burnet M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27.
  114. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007;121:1-14.
  115. Schreiber D, Old J, Smyth J. Cancer immunoediting: integrating immunity's role in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331(6024):1565–1570.
  116. Willard-Gallo K, Gu-Trantien C, Garaud S, Buisseret L. Organized immune response in cancer. In. *European Patent #12195271:2012.*
  117. Mittal D, Gubin M, Schreiber R, Smyth M. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16–25.
  118. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18:27-34.
  119. Joyce A, Pollard W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009;4:239-252.
  120. Dvorak F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986;315:1650-1659.
  121. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454:436–44.
  122. Macarthur M, Hold GL, El-Omar M. Inflammation and cancer II. Role of chronic

- inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:515–20.
123. Grivennikov I, Greten R, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;6:883-99.
  124. Qian Z, Pollard W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141(1):39-51.
  125. Emens A. Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012;12(12):1597–611.
  126. Weber D. Inflammation and breast cancer. *Complementary oncology* [Internet]. 2011 May 31[cited 2014 Oct 15]. Available from <http://.com/wp-content/uploads/2011/05/bcr1746-3.jpg>.
  127. Ferguson D. Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the normal breast. *Virchows Arch.* 1985;407:369-378.
  128. Gooden J, de Bock H, Leffers N, Daemen T, Nijman W. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2011;105(1):93-103.
  129. Ruffell B, Au A, Rugo S, Esserman J, Hwang ES, Coussens M. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:2796-2801.
  130. Coronella A, Spier C, Welch M, Trevor T, Stopeck T, Villar H, et al. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Immunol.* 2002;169:1829-36.
  131. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:957-64.
  132. Macchetti H, Marana R, Silva S, de Andrade M, Ribeiro-Silva A, Bighetti S. Tumor-infiltrating CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement.

- Clinics. 2006;61(3):203-8.
133. Thanaa E, Hetal A, Eman A, Ibrahim A, Amal I. Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in breast carcinoma: Relation to prognostic variables. *Pathology and Microbiology*. 2013;56:89-93.
  134. Camp J, Dyhrman T, Memoli A, Mott A, Barth RJ Jr. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *Ann Surg Oncol*. 1996;3:176-84.
  135. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259-71.
  136. Symmers W, Elston C, Ellis I. *Systemic Pathology of The Breast*. 2nd ed. Churchill: Livingstone Company; 1997.
  137. Tsang J, Hui W, Ni B, Chan K, Yamaguchi R, Kwong A, et al. Lymphocytic infiltrate is associated with favorable biomarkers profile in HER2-overexpressing breast cancers and adverse biomarker profile in ER-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;143(1):1-9.
  138. Cohen A, Dabbs J, Cooper L, Amin M, Jones E, Jones W, et al. Interobserver agreement among pathologists for semiquantitative hormone receptor scoring in breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2013;31:3997-4013.
  139. Wolff C, Hammond E, Hicks G, Dowsett M, McShane M, Allison H, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Am J Clin Pathol*. 2012;138(6):796-802.
  140. Ellis O, Bartlett J, Dowsett M, Humphreys S, Jasani B. Best Practice No 176: updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol*. 2004;57:233-237.
  141. Croci O, Zacarías Fluck F, Rico J, Matar P, Rabinovich A. Dynamic cross-talk between

- tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56:1687-700.
142. Fridman H, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical out-come. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):298–306.
  143. Lee C, Srivastava M, López-Albaitero A, Ferrone S, Ferris L. Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunol Res.* 2011;50:248–254.
  144. Campbel J, Tonlaar Y, Garwood R, Huo D, Moore H, et al. Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;128(3):703–711.
  145. Gabrilovich D, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology.* 2009;9:162–174.
  146. Mahmoud M, Paish C, Powe G, Macmillan D, Lee H. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;127(1):99–108.
  147. Zamarron B, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International Journal of Biological Sciences.* 2011;7:651–658.
  148. Biswas S, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology.* 2010;11:889–896.
  149. Campbell J, Wolf D, Mukhtar RA, Tandon V, Yau C, Au A, et al. The prognostic implications of macrophages expressing proliferating cell nuclear antigen in breast cancer depend on immune context. *PLoS One.* 2013;8(10):e79114.
  150. D’Abrosio D. Regulatory T cells: how to they find their space in the immunological arena? *Semin Cancer Biol.* 2006;16:91-7.

151. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:1206-12.
152. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204:1257-65.
153. Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res.* 2012;72(9):2162-71.
154. Golgher D, Jones E, Powrie F, Elliott T, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol.* 2002;32:3267-75.
155. Cole S, Montero A, Garret-Mayer E. Elevated circulating myeloid derived suppressor cells (MDSC) are associated with inferior overall survival and correlate with circulating tumor cells (CTC) in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Research.* 2009;69:Abstract 4135.
156. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):5944–5951.
157. Ashida A, Boku N, Aoyagi K, Sato H, Tsubosa Y, Muto M, et al. Expression profiling of esophageal squamous cell cancer patients treated with definitive chemoradiotherapy: clinical implications. *Int J Oncol.* 2006;28(6):1345–1352.
158. Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Oshikiri T, et al. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of the patients with esophageal squamous cell cancer. *Cancer Res.* 2003;63(7):1555–1559.
159. Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y, et al. Concurrent

- infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2006;94(2):275–280.
160. Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T, et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T cells in cancer nests is a statistically relevant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2008;113(6):1387–1395.
  161. Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, Matsumura N, Baba T. The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. *Clin Immunol*. 2011;141(3):338–347.
  162. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun*. 2009;9:3.
  163. Bromwich J, McArdle A, Canna K, McMillan C, McNicol M, Brown M, et al. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br J Cancer*. 2003;89(10):1906–1908.
  164. MacLennan T, Eisenberg R, Fleshman L, Taylor M, Fu P, Resnick I, et al. The influence of chronic inflammation in prostatic carcinogenesis: a 5-year follow-up study. *J Urol*. 2006;176:1012-1016.
  165. Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2328–2339.
  166. Hagemann T, Balkwill F, Lawrence T. Inflammation and cancer: A double-edged sword. *Cancer Cell*. 2007;12:300-1.
  167. Formenti SC, Demaria S. Radiation therapy to convert the tumor into an in situ vaccine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;84:879-880.



168. Ma Y, Kepp O, Ghiringhelli F. Chemotherapy and radiotherapy: cryptic anticancer vaccines. *Semin Immunol.* 2010;22:113-124.
169. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:105–113.
170. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eeno F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* 2013;31:860–867.
171. Park S, Jiang Z, Mortenson ED, Deng L, Radkevich-Brown O, Yang X, et al. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell.* 2010;18:160–170.
172. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial.. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1544-40.
173. Matkowski R, Gisterek I, Halon A, Lacko A, Szweczyk K, Staszek U, et al. The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer Res.* 2009;29(7):2445-51.
174. Kuroda H, Tamaru J, Sakamoto G, Ohnisi K, Itoyama S. Immunophenotype of lymphocytic infiltration in medullary carcinoma of the breast. *Virchows Arch.* 2005;446(1):10-4.
175. Mahmoud M, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res*

- Treat. 2012;132:545-553.
176. Mohammed A, Going J, Edwards J, Elsberger B, Doughty C, McMillan C. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(5):864–873.
  177. Quiet A, Ferguson J, Weichselbaum R and Hellman S. Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long term follow up. *J Clin Oncol*. 1995;13:355-366.
  178. Rathore S, Kumar S, Konwar R, Srivastava N, Makker A, Goel M. Presence of CD3+ tumor infiltrating lymphocytes is significantly associated with good prognosis in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J Cancer*. 2013;50(3):239-44.
  179. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Rappa F, Marasa S, et al. CD1a down-regulation in primary invasive ductal breast carcinoma may predict regional lymph node invasion and patient outcome. *Histopathology*. 2008;52:203-212.
  180. Raoul Drosier, Inti Zlobec, Ergin Kilic, Uwe Güth, Michael Heberer, Giulio Spagnoli, et al. Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers. *BMC Cancer*. 2012;12:134.
  181. 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(2):R48.
  182. Hoesel B, Schmid A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86.
  183. Koumakpayi H, Le Page C, Mes-Masson M, Saad F. Hierarchical clustering of immunohistochemical analysis of the activated ErbB/PI3K/Akt/NF-kappaB signalling

- pathway and prognostic significance in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(7):1163–1173.
184. Biswas K, Iglehart D. Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signaling in breast cancer. *J Cell Physiol*. 2006;209(3):645–652.
185. Mahmoud M, Paish C, Powe G, Macmillan D, Grainge J, Lee H, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1949–1955.
186. Gruvberger S, Ringnér M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res*. 2001;61(16):5979-84.
187. Adams S, Gray R, Demaria S, Goldstein L, Perez E, Shulman L, et al. Towards an immunoscore for triple negative breast cancer (TNBC): lymphocytic infiltrate predicts outcome. *J Immunother Cancer*. 2013;1(Suppl 1):O22.
188. Cimino-Mathews A, Foote B, Emens A. Immune Targeting in Breast Cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2015;29(5).
189. Mor F, Quintana J, Cohen R. Angiogenesis-inflammation cross-talk:vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol*. 2004;172:4618-23.
190. Giles C, Wen J, Tony J, Gareth W, Kelvin G, Mike M. Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer. *Molecular Cancer*. 2008;7:23.
191. Aspinall R, Goronzy J. Immune senescence. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:497- 499.
192. Nikolich-Zugich J, Rudd D. Immune memory and aging: an infinite or finite resource? *Curr Opin Immunol*. 2010;22:535-540.
193. DeNardo G, Barreto B, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor

- properties of macrophages. *Cancer Cell*. 2009;16:91–102.
194. DeNardo G, Brennan J, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao L, Madden F, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov*. 2011;1:54-67.
195. Calabrò A, Beissbarth T, Kuner R, Stojanov M, Benner A, Asslaber M, et al. Effects of infiltrating lymphocytes and estrogen receptor on gene expression and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;116(1):69-77.
196. Ali R, Provenzano E, Dawson J, Blows M, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1536-43.
197. Mohammed Z, Going J, Edwards J, McMillan C. The role of the tumour inflammatory cell infiltrate in predicting recurrence and survival in patients with primary operable breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(8):943-55.
198. Mahmoud S, Lee A, Ellis I, Green A. CD8(+) T lymphocytes infiltrating breast cancer: A promising new prognostic marker? *Oncoimmunology*. 2012;1(3):364–365.
199. Bos R, Marquardt KL, Cheung J, Sherman LA. Functional differences between low- and high-affinity CD8(+) T cells in the tumor environment. *Oncoimmunology*. 2012;1(8):1239–1247.
200. Li J, Huang Z-F, Xiong G, Mo H-Y, Qiu F, Mai H-Q, et al. Distribution, characterization, and induction of CD8+ regulatory T cells and IL-17-producing CD8+ T cells in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Translational Medicine*. 2011;9:1-10.
201. Nam S, Terabe M, Kang J, Chae H, Voong N, Yang Y-a, et al. Transforming Growth Factor  $\beta$  Subverts the Immune System into Directly Promoting Tumor Growth through Interleukin-17. *Cancer Research*. 2008;68:3915-23.
202. Faghih Z, Rezaeifard S, Safaei A, Erfani N. IL-17 and IL-4 producing CD8+ T cells in

- tumor draining lymph nodes of breast cancer patients: positive association with tumor progression. *Iran J Immunol.* 2013;10(4):193-204.
203. Zhang P, Yan J, Xu J, Pang H, Chen S, Li L, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol.* 2009;50:980-9.
204. Kuang M, Peng C, Zhao Q, Wu Y, Zhu LY, Wang J, et al. Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells in hepatocellular carcinoma patients. *J Immunol.* 2010;185:1544-9.
205. Reome B, Hyland C, Dutton W, Dobrzanski J. Type 1 and type 2 tumor infiltrating effector cell subpopulations in progressive breast cancer. *Clin Immunol.* 2004;111:69-81.
206. Baker K, Lachapelle J, Zlobec I, Bismar A, Terracciano L, Foulkes D. Prognostic significance of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. *Histopathology.* 2011;58(7):1107-16.
207. Owen H, Byfield D, Arany R, Karpova S, Stetler-Stevenson G, Roberts B. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . *J Cell Sci.* 2005;118:2143-53.
208. Berstein M, Larionov A, Poroshina E, Zimarina S, Leenman E. Aromatase (CYP19) expression in tumor-infiltrating lymphocytes and blood mononuclears. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128:173-6.
209. Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, et al. Fibroblast-recruited, tumor infiltrating CD4<sup>+</sup> T-cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signaling. *Nature.* 2011;470:548-553.
210. Nickerson K. Autocrine-derived epidermal growth factor receptor ligands contribute to recruitment of tumor-associated macrophage and growth of basal breast cancer cells in

- vivo. *Oncol Res.* 2013;20(7):303–17.
211. Finger C, Giaccia J. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29:285-293.
  212. Osinsky S, Zavelevich M, Vaupel P. Tumor hypoxia and malignant progression. *Exp Oncol.* 2009;31:80-86.
  213. Ben Shoshan J, Maysel-Auslender S, Mor A, Keren G, George J. Hypoxia controls CD4+ CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Immunol.* 2008;38:2412-2418.
  214. Yu P, Fu YX. Tumour-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest.* 2006;86:231-45.
  215. Wang F, Peng G, Wang Y. Regulatory T cells and Toll-like receptors in tumor immunity. *Semin Immunol.* 2006;18:136-42.
  216. Andersen H, Sorensen S, Brimnes M, Svane M, Becker C, Straten P. Identification of heme Oxygenase-1-specific regulatory CD8+ T cells in cancer patients. *J Clin Invest.* 2009;119:2245–2256.
  217. Wang Y, Wang F. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:217-23.
  218. Pockaj A, Basu D, Pathangey B. Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2004;11(3):328–339.
  219. Godin-Ethier J, Hanafi A, Piccirillo A, Lapointe R. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clin Cancer Res.* 2011;17(22):6985–6991.
  220. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol.* 2009;158(3):638–651.
  221. Nowak C, de Vries C, Wasiuk A, Ahonen C, Bennett A, Le Mercier I, et al. Tryptophan

- hydroxylase-1 regulates immune tolerance and inflammation. *J Exp Med.* 2012; 209(11):2127-2135.
222. Droge W, Roth S, Altmann A, Mihm S. Regulation of T-cell functions by L-lactate. *Cell Immunol.* 1987;108:405–416.
223. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 2007;109:3812–3819.
224. Whiteside L. Immune responses to malignancies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125:S272–S283.
225. Hoffmann T, Dworacki G, Tsukihira T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson J, et al. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin. Cancer Res.* 2002;8:2553–2562.
226. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:1789-1796.
227. Gabrilovich I, Chen L, Girgis R, Cunningham T, Meny M, Nadaf S, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med.* 1996;2:1096-1103.
228. Criscitiello C, Esposito A, Gelao L, Fumagalli L, Locatelli M, Minchella I, et al. Immune approaches to the treatment of breast cancer, around the corner? *Breast Cancer Res.* 2014;16(1):204.
229. Dushyanthen S, Savas P, Willard-Gallo K, Carsten Denkert, Salgado R, Loi S. Tumour-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer: a Predictive or a Prognostic Marker? *Current Breast Cancer Reports.* 2015;7:59-70.

230. Nanda R, Chow L, Dees E. A phase Ib study of pembrolizumab (MK-3475) in patients with advanced triple-negative breast cancer. Presented at 2014 San Antonio Breast Cancer Symposium; Dec 9-13, 2014; San Antonio, TX. Abstr S1-09.
231. Vonderheide H, LoRusso M, Khalil M, et al. Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3485-94.
232. Postow M, Callahan M, Wolchok J. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1974-82.
233. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF. Improved survival with ipilimumab in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:711-23.
234. Mao H, Zhang L, Yang Y, Zuo W, Bi Y, Gao W et al. New insights of CTLA-4 into its biological function in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(7):728-36.
235. Robert C, Soria JC, Eggermont AM. Drug of the year: programmed death-1 receptor/programmed death-1 ligand-1 receptor monoclonal antibodies. *Eur J Cancer.* 2013;49(14):2968-71.
236. Flies B, Sandler J, Sznol M, Chen L. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *Yale J Biol Med.* 2011;84(4):409-421.
237. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(5):1021-34.
238. Sun S, Fei X, Mao Y, Wang X, Garfield DH, Huang O, et al. PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(4):395-406.
239. Muenst S, Soysal S, Gao F, Obermann E, Oertli D, Gillanders W. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with



- poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(3):10.
240. Herbst S, Soria C, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515:563-567.
241. Petrylak P, Powles T, Bellmunt J, et al. A phase Ia study of MPDL3280A (anti-PDL1): Updated response and survival data in urothelial bladder cancer (UBC). Program and abstracts of the 2015 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; May 29 - June 2, 2015; Chicago, Illinois. Abstract 4501.
242. Spira A, Park K, Mazieres J, et al. Efficacy, safety and predictive biomarker results from a randomized phase II study comparing MPDL3280A vs docetaxel in 2L/3L NSCLC (POPLAR). Program and abstracts of the 2015 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; May 29 - June 2, 2015; Chicago, Illinois. Abstract 8010.
243. ClinicalTrials.gov. A study of MPDL3280A in combination with nab-paclitaxel compared with placebo with nab-paclitaxel for patients with previously untreated metastatic triple negative breast cancer. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02425891>. Accessed June 30, 2015.
244. Taube M, Klein A, Brahmer R. Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clin Cancer Res.* 2014 [Published ahead of print].
245. Fonsatti E, Maio M, Altomonte M, Hersey P. Biology and clinical applications of CD40 in cancer treatment. *Seminars in Oncology.* 2010;37:517–523.
246. Beatty G, Chiorean E, Fishman M. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science.* 2011;331:1612–1616.
247. L. Diehl, A. T. Den Boer, S. P. Schoenberger. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nature Medicine.* 1999;5(7):774–779.

248. Takeda K, Kojima Y, Uno T. Combination therapy of established tumors by antibodies targeting immune activating and suppressing molecules. *Journal of Immunology*. 2010;184:5493–5501.
249. Redmond W, Ruby C, Weinberg A. The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Critical Reviews in Immunology*. 2009;29:187–201.
250. Jensen M, Maston L, Gough M. Signaling through OX40 enhances antitumor immunity. *Seminars in Oncology*. 2010;37:524–532.
251. Hirschhorn-Cymerman D, Rizzuto A, Merghoub T. OX40 engagement and chemotherapy combination provides potent antitumor immunity with concomitant regulatory T cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206:1103–1116.
252. Gough J, Crittenden R, Sarff M. Adjuvant therapy with agonistic antibodies to CD134 (OX40) increases local control after surgical or radiation therapy of cancer in mice. *Journal of Immunotherapy*. 2010;33:798–809.
253. F. Ghiringhelli, C. Menard, P. Puig. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007;56(5):641–648.
254. M. Litzinger, R. Fernando, T. Curiel, D. Grosenbach, J. Schlom, C. Palena. IL-2 immunotoxin denileukin difitox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T cell immunity. *Blood*. 2007;110(9):3192–3201.
255. T. Curiel. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Current Opinion in Immunology*. 2008;20(2):241–246.
256. N. Haynes, R. van der Most, R Lake, M. Smyth. Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Current Opinion in Immunology*. 2008;20(5):545–557.
257. H. Pinedo, T. De Gruijl, E. Van Der Wall, J. Buter. Biological concepts of prolonged

- neoadjuvant treatment plus GM-CSF in locally advanced tumors. *Oncologist*. 2000;5(6):497–500.
258. Charles T. Tumour-Infiltrating Lymphocytes: Expanding Our Arsenal in the Fight Against Cancer. *Impress magazine* [Internet]. 2014 Mar 6. [cited 2014 Oct 15]. Available from: [www.impresmagazine.com](http://www.impresmagazine.com).
259. Soliman H. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. *Cancer Control*. 2013;20(1):17-21.