



Медицински университет -Варна
„Проф. Д-р Параскев Стоянов”

Факултет „Медицина”

Катедра по обща клинична патология,
съдебна медицина и деонтология

Д-р Василена Росенова Цветкова

МОЛЕКУЛЯРНИ БИОМАРКЕРИ

ПРИ ТРОЙНО НЕГАТИВЕН

КАРЦИНОМ НА ГЪРДАТА

АВТОРЕФЕРАТ на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Научна специалност: Обща и клинична патология

Научен ръководител: Доц. д-р Мария Цанева, д.м.

Официални рецензенти: Доц. д-р Екатерина Боянова Софтова, д.м

Проф. д-р Петър Иванов Генев, д.м.

Варна 2020 г.

Дисертационният труд съдържа 110 стр. и е онагледен с 13 таблици и 36 фигури.
Литературната справка включва 156 литературни източника, от които 4 на кирилица и 152 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на катедрен съвет на Катедрата по
Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при МУ ”Проф. Д-р Параскев
Стоянов” – Варна на 09.03.2020 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 26.06.2020 г. в Докторантското
училище в МУ-Варна на открито заседание на Научното жури.

Съдържание

I.	УВОД.....	4
II.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ:.....	6
III.	МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....	7
	4.1 Бази за реализация на дисертационния труд.....	7
	4.2 Пациенти и характеристика на проучваните групи.....	7
	4.3 Рутинни изследвания.....	7
	4.4 Критерии за категоризиране на всеки параметър.....	8
	4.5 Специфични методи на изследване.....	10
	4.6 Статистически методи.....	17
IV.	РЕЗУЛТАТИ.....	18
V.	ДИСКУСИЯ.....	49
VI.	ИЗВОДИ:.....	58
VII.	ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	59
VIII.	ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	60

I. УВОД

В света, сред жените, карциномът на гърдата (КГ) е най-разпространеното злокачествено заболяване и е първата причина за смърт от малигнени неоплазми. (Lakhani SR et al., 2012) Той е хетерогенно заболяване, включващо редица варианти, които се характеризират с различно биологично поведение, клинична картина и прогноза. Съществуват различни класификации на КГ, които стратифицират пациентите в отделни групи на базата на хистологичните и/или молекулярните им характеристики. Последната молекулярна класификация на КГ го подразделя на 5 отделни субтипа - луминал А, луминал В, тип, показващ свръхекспресия на HER2, тип, характеризиращ се с ниски нива на клаудин и базален тип, включващ и тройно негативния субтип. (Prat A. et al., 2015)

Тройно негативните карциноми (TNBC) на гърдата са около 15% от всички карциноми. Към тази група се отнасят карциномите, които не експресират рецептори за естроген, прогестерон и HER2. В сравнение с останалите субтипове, TNBC се характеризира с най-агресивното биологично поведение и се асоциира с най-лошата прогноза - висок риск от поява на близки и далечни метастази и рецидив в рамките на 3 до 5 години от поставянето на диагнозата. (Qiu J. et al., 2016)

Таргетните терапии, прилагани при ER, PR и HER2 позитивните КГ са неприложими при TNBC и единствената терапия е стандартната системна химиотерапия. TNBC са хетерогенна група карциноми и не винаги може да се предвиди резултата от проведеното лечение, което допълнително налага стратифициране на пациентите. ()

Има данни, че при TNBC, имунните клетки в туморната микросреда са по-многобройни в сравнение с останалите субтипове КГ. (Stovgaard ES. Et al., 2018) Тумор инфилтриращите лимфоцити (TILs) са хетерогенна популация от клетки, които играят различна роля в имунния отговор на организма. Те могат да стимулират имунния отговор срещу туморните клетки или да го инхибират и по този начин да осигурят подходяща среда за неопластичната пролиферация. (Stovgaard ES et al. 2018) През последното десетилетие TILs са обект на задълбочени изследвания с цел изясняване на ролята им като прогностичен и предиктивен биомаркер при карциноми с различна хистогенеза. Общата им полуколичествена оценка на хистологични препарати, оцветени с хемалаун-еозин не изяснява

достатъчно ролята им в туморния процес, което налага имунохистохимичното типизиране на TILs.

CD8+ цитотоксичните клетки и FOXP3+ регулаторните клетки се отнасят към T клетъчната субпопулация и тяхната количествена оценка би изяснила позитивния или негативния им ефект върху имунния отговор срещу мамарните неопластични клетки. Има данни, че CD8+ клетки играят положителна роля в имунната реакция на организма срещу туморните клетки. (Miyashita M. et al., 2015) Ролята на FOXP3+ клетки не е напълно изяснена. Данните са твърде противоречиви. Според някои автори, FOXP3+ T-клетки играят позитивна роля в борбата срещу туморните клетки, а според други те имат негативен ефект и спомагат за туморния растеж. (Miyashita M. et al., 2015 e Asano Y. et al., 2016)

По-детайлното изследване и типизиране на TILs при TNBC би допринесло не само до изясняване на ролята им в имунния надзор при КГ и до определяне на прогностичната им и предиктивна стойност, но и до разкриване на нови сигнални пътища и създаване на нови терапевтични подходи.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ:

ЦЕЛ:

Цел на настоящата работа е да се определи прогностичната роля на TILs и молекулярните биомаркери CD8 и FOXP3 във връзка с клинично-патологичните показатели и общата преживяемост при пациенти с тройно негативни карциноми на гърдата.

ЗАДАЧИ:

- Да се анализират клинично-морфологичните характеристики на пациентите с тройно негативни КГ и да се изследва влиянието им върху общата преживяемост;
- Да се анализира експресията на TILs в туморната микросреда и връзката ѝ с клинично-патологичните параметри и общата преживяемост при пациенти с тройно негативни КГ;
- Да се анализира експресията на CD8 в туморната микросреда и връзката ѝ с клинично-патологичните параметри и общата преживяемост при пациенти с тройно негативни КГ;
- Да се оцени експресията на FOXP3 в туморната микросреда и връзката ѝ с клинично-патологичните параметри и общата преживяемост при пациенти с тройно негативни КГ;
- Да се извърши сравнителен анализ между на експресията на TILs, CD8 и FOXP3 в туморна микросреда във връзка с клинично-патологични характеристики и смъртността при пациенти с тройно негативни КГ;
- Да се разработи интегриран клинично-морфологичен и имунохистохимичен профил за стратификация на риска на пациентите с тройно негативен КГ на базата на CD8 и FOXP3 позитивни стромални клетки.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

4.1 Бази за реализация на дисертационния труд

- Отделение по Патология, Падуа, Италия
- Онкологичен Институт Венето, Падуа, Италия

4.2 Пациенти и характеристика на проучваните групи

В настоящото проучване са включени общо 244 пациента с диагноза тройно негативен карцином на гърдата, диагностициран в периода 2000 – 2014 година в Онкологичен Институт Венето (IRCCS Istituto Oncologico Veneto - IOV), Падуа, Италия. Всички пациенти са провели системна химиотерапия (неoadювантна и/или адювантна) и хирургична интервенция в IOV, Падуа, Италия.

4.3 Рутинни изследвания

Хистологичният анализ е извършен върху биопсичен материал, при пациенти, подложени на НАХТ и хирургичен материал, получен след оперативна интервенция: квадрантектomia или мастектомия на гърда, при наличие на резидуални туморни клетки. За пациенти подложени на АДХТ е изследван хирургичен материал, получен след оперативна интервенция: квадрантектomia или мастектомия на гърда. Средно по 5-6 биопсични материала са изследвани от тумора на всяка гърда и по 2-3 материала от съседната на тумора тъкан. Проучени са всички изпратени ЛВ, като броят им е 12 или повече. Изследвани са материали от всички шест резекционни линии, за да се докаже хистологично радикалността на интервенцията.

Материалите са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин и след съответната обработка са включени в парафин. Изготвени са срезове с дебелина 5µm и са оцветени с хемалаун-еозин. Отчетени са следните параметри: хистологичен вариант, патологичен стадий на тумора, степен на диференциация, TILs, експресия на хормонални рецептори: ER и PR, HER2, пролиферативен индекс (Ki67) и състояние на лимфните възли.

4.4 Критерии за категоризиране на всеки параметър

Хистологичният вариант

Диагнозата на всички пациенти е поставена, базирайки се на класификацията на карцинома на гърдата, публикувана от СЗО през 2012 година (Lakhani SR et al, 2012).

Степен на диференциация (G)

Степента на диференциация на тумора е определена съгласно публикуваните критерии от Scarf, Bloom и Richardson и в последствие модифицирани от Elston и Ellis. Тези критерии оценяват три туморни характеристики: формиране на тубулни структури, ядрен плеоморфизъм и брой на митотичните фигури, всяка от които е оценена като е използвана три степенна скала от 1 до 3 точки.

Карциноми, при които се наблюдават повече от 75% добре оформени тубули, с ясно видими лумени, които наподобяват нормалната хистологична структура на гърдата се оценяват с 1 точка. С две точки се оценяват карциноми, при които тубулите са между 10% и 75% и с 3 точки карциноми, при които тубулите са <10%.

Броят на митотичните фигури се определя в периферията на тумора, в зоната на най-активен туморен растеж. Оценяват се 10 полета на 400 (10 x 40) увеличение. Карциноми, при които броят на митозите е от 0 до 5 на 10 полета се оценяват с 1 точка, тези при които броят им е съответно 6-9 се оценяват с 2 точки и карциноми с 10 и повече митози получават 3 точки.

Ядреният плеоморфизъм се оценява от 1 до 3 точки. Една точка получават туморите при които има само минимални отклонения в размерите и формата на ядрата и клетките са сравнително мономорфни. С две точки се оценяват карциномите при които има умерен ядрен плеоморфизъм. Най-голям брой точки – 3, получават неоплазмите, при които има подчертан нуклеарен плеоморфизъм, с големи разлики в размерите и формата на клетъчните ядра.

Максималният брой точки е 9, минималният - 3. Тумори с общ брой точки от 3 до 5 са определени като високо диференцирани, от 6 до 7 точки като умерено диференцирани и тумори с от 8 до 9 точки като ниско диференцирани. Тази класификация е приложена за инвазивния дуктален карцином.

Определянето на диференциацията на лобуларните инвазивни карциноми е на базата на оценка на ядрения плеоморфизъм, като се прилагат същите критерии описани по-горе. Това се налага поради липсата на тубулна формация и липсата на вариации в митотичния индекс при лобуларните карциноми.

Стадий на тумора

Стадият на всеки един от туморите е определен, базирайки се на публикуваните критерии на Италианската Асоциация по Медицинска Онкология (Associazione Italiana di Oncologia Medica), в съответствие с 18-то издание на системата за стадиране на КГ на Американския раков комитет. Клиничните стадии, в които са категоризирани пациентите са 5 – стадий 0, стадий I (включва стадий IA и IB), стадий II (включва стадий IIA и IIB), стадий III (включва стадий IIIA, IIIB и IIIC) и стадий IV.

TILs

При всеки пациент е извършена оценка на TILs върху препарат, оцветен с хематоксилин еозин, стриктно следвайки публикуваните през 2012 година препоръки от Salgado. Определен е процентът на стромата, заета от TILs. В хистологичната оценка не са включени неутрофилни левкоцити, зони на некроза и лимфоцитни инфилтрати около *in situ* карцином. Извършена е полуколичествена оценка на TILs. Отделните категории са оценени от 5% до 100% със стъпка 5%.

Експресия на хормонални рецептори (ER, PR)

За хормонално негативни карциноми са приети карциномите при които липсва експресия на ER и PR или тя е <1% от всички туморни клетки.

Експресия на HER2

Оценката на HER2 е извършена чрез имунохистохимичен анализ, следвайки международните критерии за оценка на този показател. Оценката на този показател е 4 степенна скала – (0), (1+), (2+), (3+).

Оценка (0) се поставя при липса на каквато и да е експресия на HER2 по мембраната на туморните клетки или при слабо, непълно мембранно оцветяване при <10% от туморните клетки.

Оценка (1+) се поставя при наличие на слабо изразено, непълно мембранно оцветяване на >10% от туморните клетки.

Оценка (2+) се поставя при слабо или умерено пълно мембранно оцветяване на >10% от туморните клетки.

Оценка (3+) се поставя при интензивно, пълно мембранно оцветяване на > 10% от туморните клетки.

Пациенти с резултат (0) или (1+) се считат за негативни, пациенти с резултат (3+) за позитивни и пациенти с резултат (2+) са тествани и с техника FISH за по-точно определяне на експресията на тествания ген. При резултат, след проведено изследване с техника FISH, който показва HER2>6.0 сигнала/клетка или при амплификация на гена, туморът се класифицира в групата на HER2 позитивни карциноми, при липса на амплификация или HER2<4.0 сигнала/клетка, се класифицират в групата на HER2 негативни карциноми. При оценката на този параметър не се включва *in situ* карцином.

Пролиферативен индекс (Ki67)

Оценена е само ядрената експресия на Ki67. Оценени са по 3 случайно избрани зони в периферията на всеки тумор, поради високата биологична активност на последната. Определи се процента на позитивни туморни клетки спрямо общия брой туморни клетки. При проведените статистически анализи разделихме изследваната популация в две групи – Ki67<30% и Ki67>30%. на базата на *cut off* стойността.

4.5 Специфични методи на изследване

Имунохистохимичен метод

Използван е индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ на MNF 116, CD8 и FOXP3. Антителата, реактивите за оцветяване и използваните работни концентрации са представени в таблица 1. Използвани са следните антитела: **MNF 116** - *Monoclonal Mouse Anti-Cytokeratin antibody, Clone MNF116*; **CD8** - *Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, Clone C8/144B* и **FOXP3** - *Monoclonal Mouse Anti-Human FOXP3, Clone 236A/E7*. Антителата са производство на Abcam. За позитивни контроли са използвани тъкан от човешка сливица за CD8 и FOXP3 и кожа за MNF116.

Табл. 1 Характеристики на използваните антитела.

Антитяло	Разреждане	Маркер за:	Фирма производител
MNF116	1:100	Епителни клетки	Abcam
CD8	1:100	Цитотоксични/супресорни Ткл	Abcam
FOXP3	1:200	Регулаторни Т-клетки	Abcam

Подготовка на материала от хирургична интервенция за имунохистохимия

От всеки пациент от включения в парафин материал, три последователни срези с дебелина 5µm бяха монтирани върху силанизирани стъкла. Срезите са депарафинирани в низходяща редица от алкохоли Ethanol 100% 3 мин., Ethanol 90% 3 мин., Ethanol 80% 3 мин., Ethanol 70% 3 мин., Xylol 3 x 10 мин. След това срезите се измиха с течаща вода и се поставиха в дестилирана вода. Антигенното разкриване за MNF-116 се осъществява чрез инкубация с Ензим 1, получен от смесването на 1 капка BOND протеолитичен ензимен концентрат (Bond Proteolytic Enzyme Concentrate) и 7 мл BOND ензимен разреждател (Bond Enzyme Diluent) на стайна температура. След приключване на процеса на антигенно разкриване, срезите се оставят да се охладят и след това се изплакват с TBS. Ендогенната пероксидаза се блокира с 3% разтвор на водороден пероксид на стайна температура. След това срезите се инкубират с мише моноклонално античовешко антитяло MNF-116. Срезите се изплакват с TBS и се инкубират за 8 минути с полимер, разтвор на заешко вторично антитяло - Poly-HRP-IgG (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom). Между всяка отделна инкубационна стъпка срезите щателно се измиват с почистващ разтвор на Bond (Bond Wash Solution (SK310, ДАКО) и дейонизирана вода. Инкубация на срезите с хромоген DAB пероксидазен разтвор за 2 x 5 мин., при непрекъснато микроскопиране.

Антигенното възстановяване за CD8 и FOXP3 се извършва чрез загряване на срезите в EDTA буфер (pH 9.0) за 20 минути на 100 °C. Срезите се оставят да се охладят и се изплакват с TBS. Ендогенната пероксидаза се инактивира с 3%-ен водороден пероксид на стайна температура. Срезите се инкубират съответно с първично мише моноклонално античовешко антитяло CD8 (Monoclonal Mouse Anti-Human

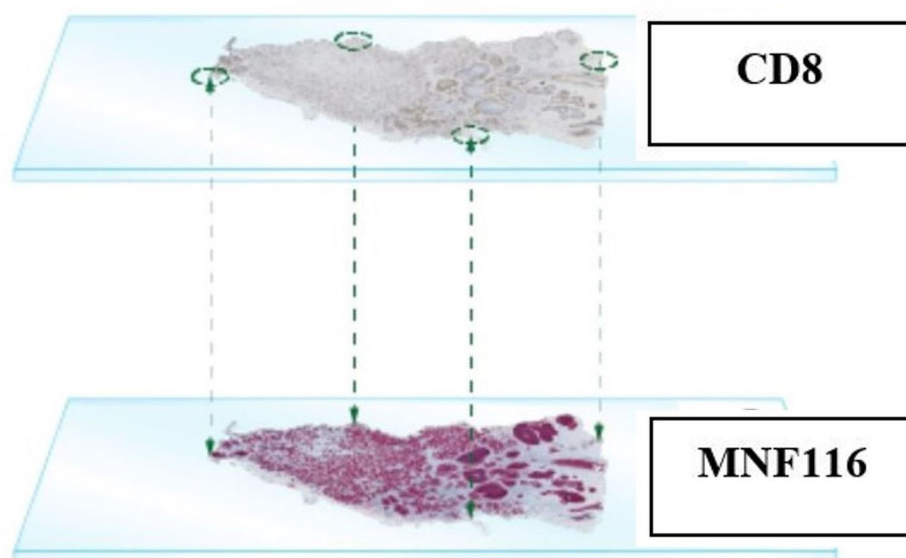
CD8, Clone C8/144B, dilution 1:100, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) и първично мише моноклонално античовешко антитяло FOXP3 (Monoclonal Mouse Anti-Human FOXP3, Clone 236A/E7, dilution 1:200, Abcam, Cambridge, MA, USA) за 15 минути. Следва изплакване с TBS и инкубация с вторично антитяло (Leica Biosystems) за 8 минути. След това срезите се изплакват отново в TBS и се инкубират за 8 минути с полимер (Leica Biosystems). Инкубация на срезите с хромоген DAB пероксидазен разтвор за 2 x 5 мин., при непрекъснато микроскопиране.

Хистологична оценка на експресията на MNF-116, CD8 и FOXP3

Всички ИХХ препарати са сканирани (HAMAMATSU C12740 – дигитален скенер) и съхранени в дигитален архив. Оцветените срези са анализирани с дигитален софтуер - Visiopharm®. Извършеният анализ включва три последователни стъпки.

През първия етап от дигиталния анализ се извършва тъканно подравняване на сканираните ИХХ срезове (CD8, FOXP3 и MNF 116) за всеки пациент (фиг.1). Този процес осигурява идеално дигитално подравняване на трите среза, калибрирайки множество идентични точки от съответните анализирани зони.

Фиг.1 Тъканно подравняване на срези за MNF116 и CD8 чрез софтуер Visiopharm.

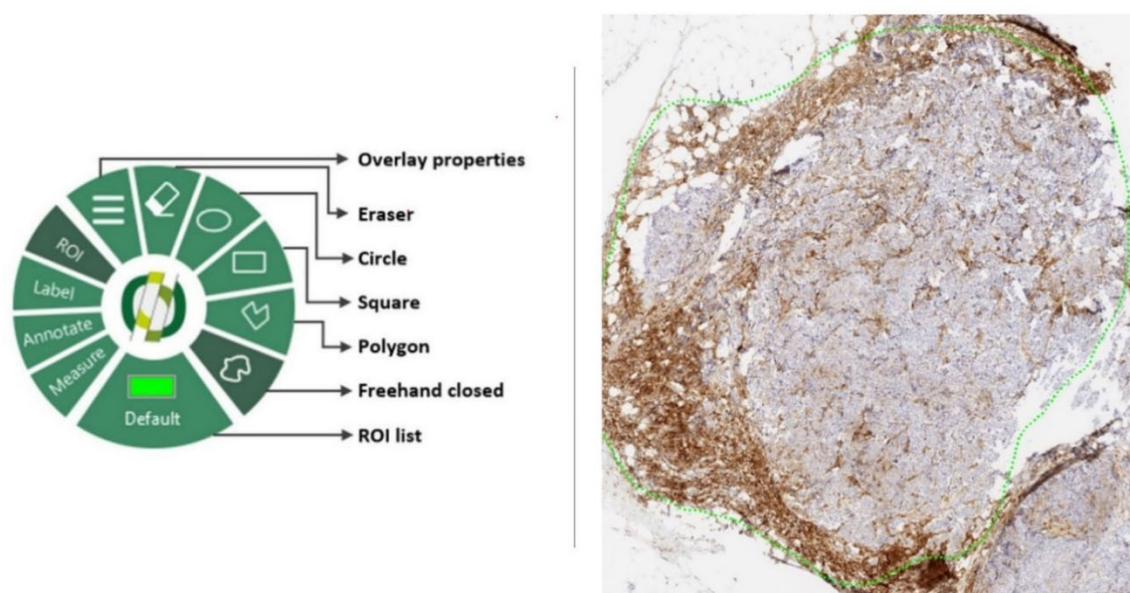


Tissuealign™ registration of
stained serial sections

VISIOPHARM®

След завършване на тъканното подравняване, изследователят, използвайки дигиталния софтуер Visiopharm®, ръчно обозначава зоната на интерес (region of interest ROI). ROI включва туморна тъкан и заобикалящата я строма, изключвайки зони с некроза и здрава тъкан (Фиг. 2). Така определената зона се прехвърля автоматично върху всички сканирани и подравнени срезове (CD8, FOXP3 и MNF116).

Фиг. 2 Определяне на ROI, Visiopharm®. Зелената линия очертава зоната, която е включена в изследването, съдържаща тумор и заобикаляща го

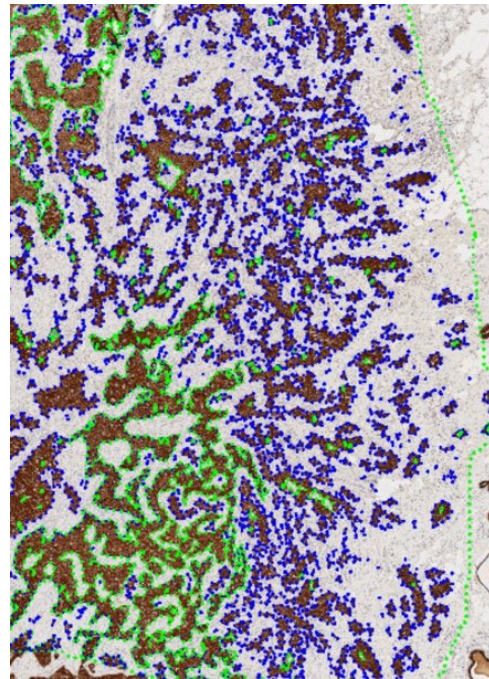
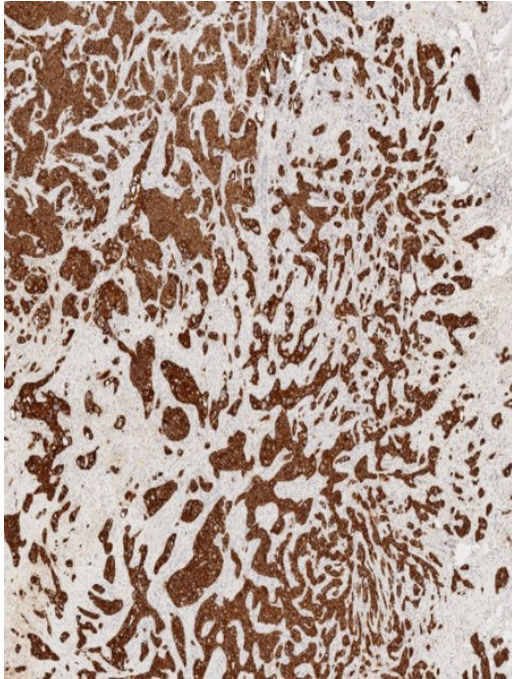


Третият етап на дигитална оценка започва с разграничаване на туморните и стромалните клетки, използвайки специално разработено приложение. Това приложение е базирано на положителното оцветяване на епителните клетки (неопластични и здрави) за MNF 116 и липсата на експресия на MNF 116 върху стромалните клетки. (фиг.3) След завършването на този анализ имаме две отделни зони – стромална зона и туморна зона. Това разделение е необходимо за по-нататъшната оценка на експресията на изследваните параметри.

Фиг. 3 Софтуерна оценка на експресията за MNF116

А) Туморни клетки, позитивни за MNF116

Б) Софтуерно разпознаване на туморни клетки, позитивни за MNF116

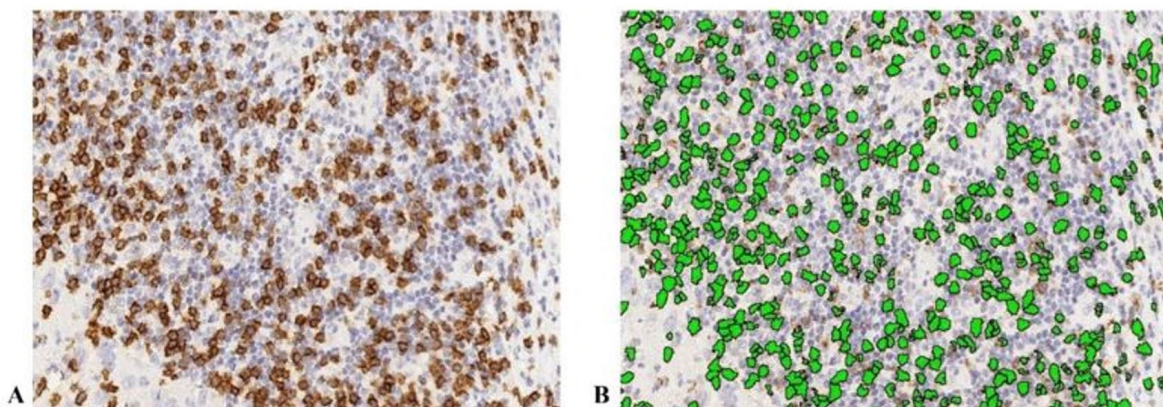


След приключване на този етап, второ приложение извършва оценката на експресията на CD8 и FOXP3 върху стромалните клетки. В различен цвят програмата означава позитивните клетки. (фиг.4)

Фиг. 4 Софтуерна оценка на експресията на CD8.

А) Имуни стромални клетки на ИХХ препарат, позитивни за CD8.

Б) Софтуерна оценка на Имуни стромални клетки на ИХХ препарат, позитивни за CD8.



Резултатите, получени от софтуера, изчисляват общия брой позитивни клетки за CD8 и FOXP3 в стромалната зона. Базирайки се на получените резултати е изчислена плътността на CD8 и FOXP3 ИХХ маркери по следните формули:

$$\text{Плътност CD8} = \frac{\text{CD8 позитивни стромални клетки/изследвана стромална зона}}{\text{mm}^2}$$

$$\text{Плътност FOXP3} = \frac{\text{FOXP3 позитивни стромални клетки/изследвана стромална зона}}{\text{mm}^2}$$

4.6 Статистически методи

- Дескриптивен анализ
- Chi – square тест
- Регресионен модел на Cox
- Kaplan Meier крива на преживяемостта
- *Log rank*

Критичното ниво на значимост за нашето проучване е $\alpha = 0.05$. При наличие на стойности на P-value по-малки от α , нулевата хипотеза се отхвърля.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1) КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ С ТРОЙНО НЕГАТИВНИ ТУМОРИ

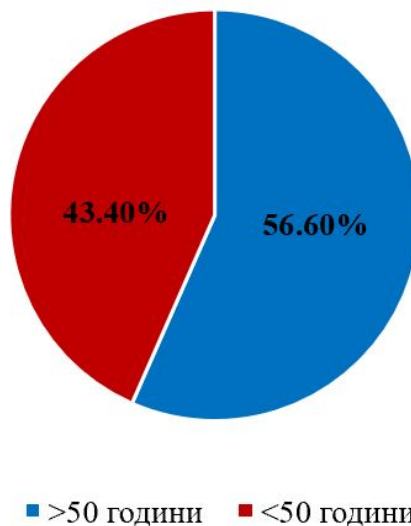
На табл.2 са представени клиничко-морфологичните характеристики на изследваните пациенти.

<i>Табл. 2 Клиничко морфологични характеристики на изследваните пациенти, стойности на TILs, CD8 и FOXP3.</i>			
		N общ брой	%
Възраст	Средна стойност	53 (25-84)	-
	≤ 50	106	43.4
	>50	138	56.6
Стадий	I	79	32.4
	II	120	49.2
	III	45	18.4
Хистологичен тип	Дуктален инвазивен карцином от неспециален тип	219	90.5
	Лобуларен карцином	8	3.3
	Апокринен карцином	8	3.3
	Метапластичен карцином	4	1.7
	Медуларен карцином	3	1.2
Степен на диференциация	G1-G2	28	12.3
	G3	199	87.7
Ki67	Средна стойност	55%	3-90
	< 30%	37	15.5
	≥ 30%	201	84.5
TILs	Средна стойност	10	-
	< 30%	184	75
	≥ 30%	60	25
CD8	Средна стойност	242	-
	<474	172	70
	>474	72	30
FOXP3	Средна стойност	57	-
	<57	123	50.4
	>57	121	49.6

От изследваните 244 пациента с КГ, 138 (56,60%) са на възраст над 50 години и 106 (43,40%) са под 50 години. На фиг. 5 графично е изобразено процентното съотношение на пациентите в двете възрастови групи.

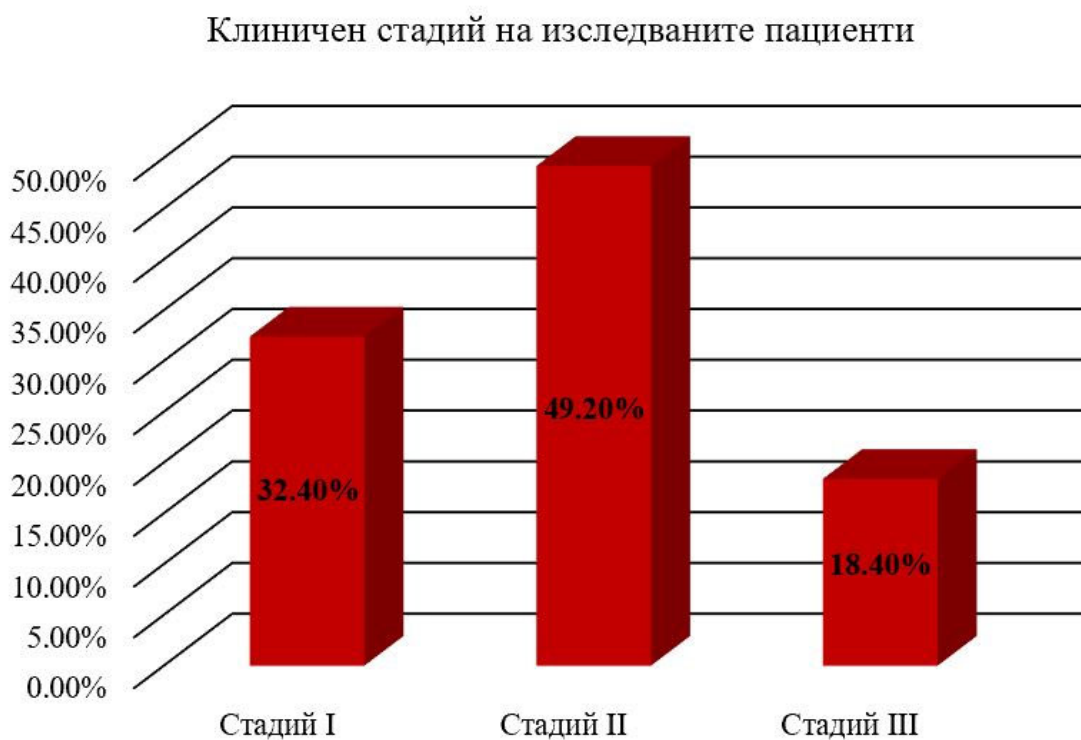
Фиг. 5 *Разпределение на пациентите в две възрастови групи – под и на 50 годишна възраст.*

Разпределение на пациентите във възрастови групи



Процентното разпределение на изследваните пациенти в зависимост от клиничния стадий в момента на поставяне на диагнозата е илюстрирано на фиг. 6. Най-много пациенти - 120 (49,2%) са диагностицирани в стадий II и най-малко - 45 (18,4%) са диагностицирани в по – напреднал стадий, стадий III. В първи стадий са диагностицирани 79 пациента (32,4%). (фиг. 6)

Фиг. 6 Разпределение на пациентите в зависимост от клиничния стадий при поставяне на диагнозата КГ.

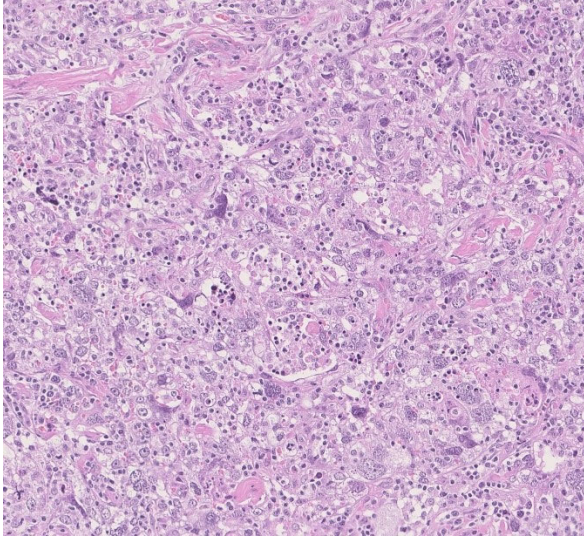


Преобладаващият хистологичен вариант на КГ в изследваната популация е дукталният инвазивен КГ от неспециален тип, който е установен в 219 (90,5%) от случаите. Останалите диагностицирани хистологични варианти са лобуларен КГ, диагностициран в 8 (3,3%) от случаите, апокринен КГ също диагностициран в 8 (3,3%) от случаите, метапластичен КГ – 4 (1,7%) и медуларен КГ, диагностициран в 3 (1,2%) от изследваните пациенти. (фиг. 7-10)

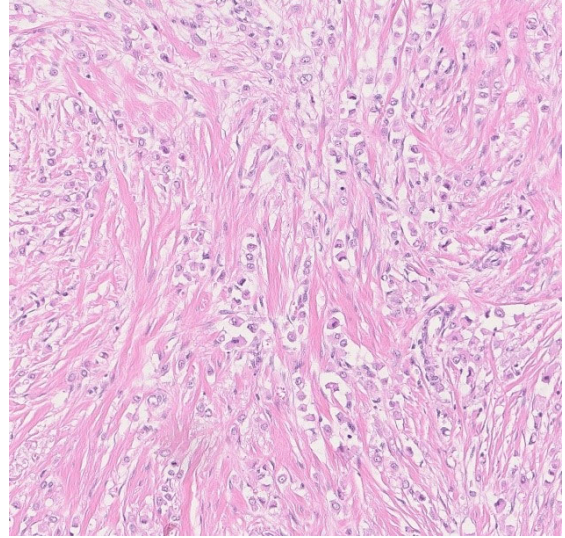
Фиг. 7 Разпределение на хистологичните КГ в изследваната популация.



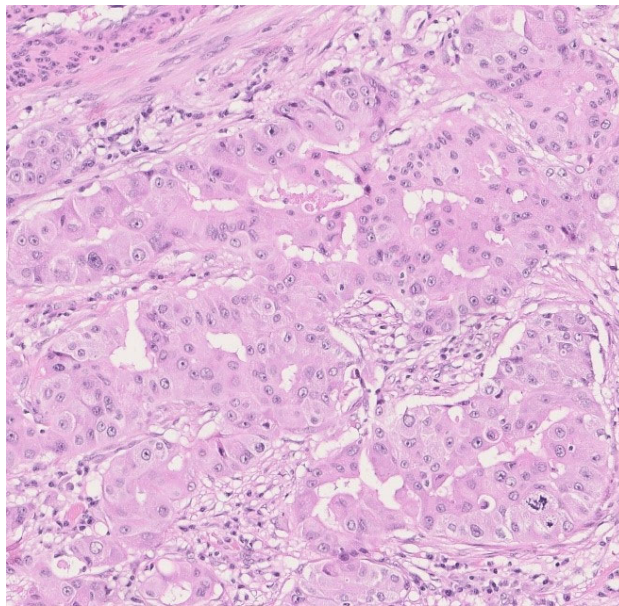
Фиг. 8 Дуктален инвазивен карцином от не специален тип. Оцветяване ХЕ, увеличение x 100.



Фиг. 9 Лобуларен инвазивен карцином. Оцветяване ХЕ, увеличение x 100.



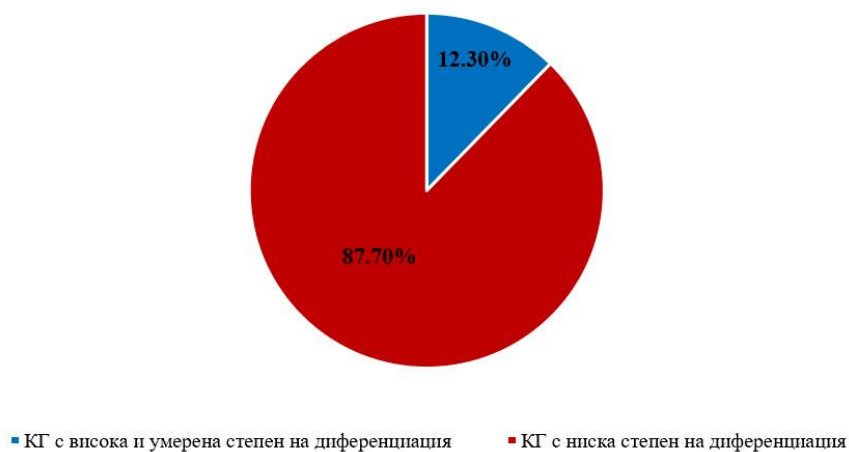
Фиг. 10 Апокринен инвазивен карцином. Оцветяване ХЕ, увеличение x 100.



Преобладаващата част от пациентите са с карциноми с ниска степен на диференциация – 199 (87,7%) от всички изследвани пациенти и с висок пролиферативен индекс >30% 201 (84,5%). (Фиг.11 - 12).

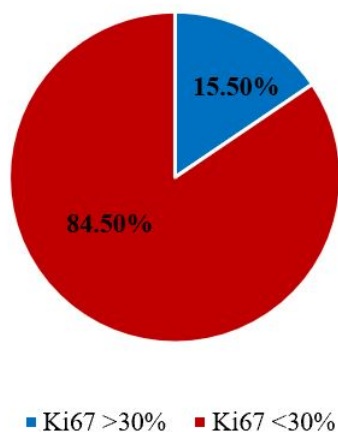
Фиг.11 Разпределение на пациентите на база на степента на диференциация на КГ.

Степен на диференциация на тройно негативните мамарни карциноми

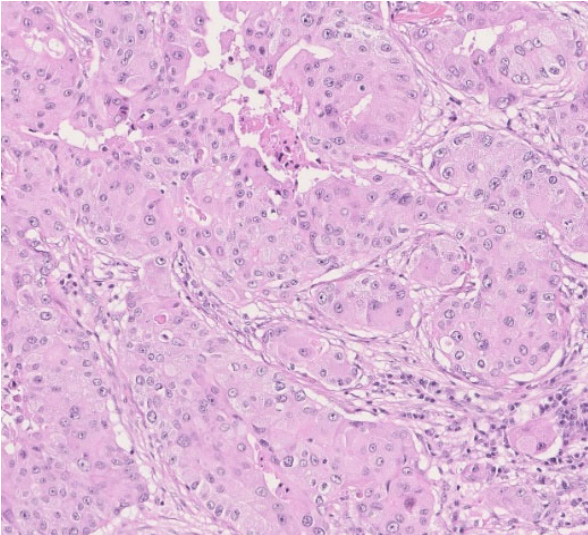


Фиг.12 Разпределение на пациентите на база на пролиферативната активност на КГ.

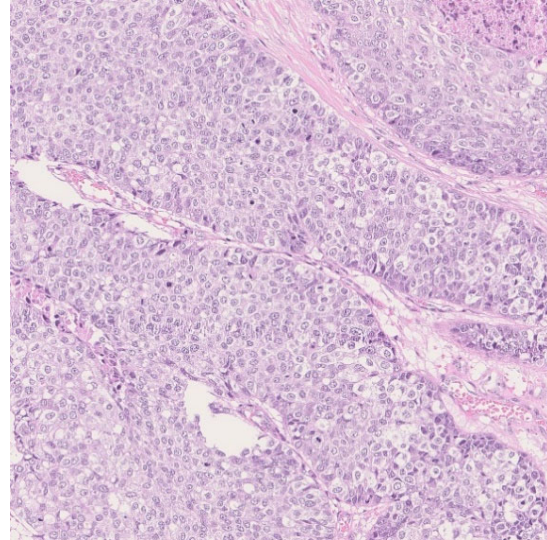
Пролиферативен индекс



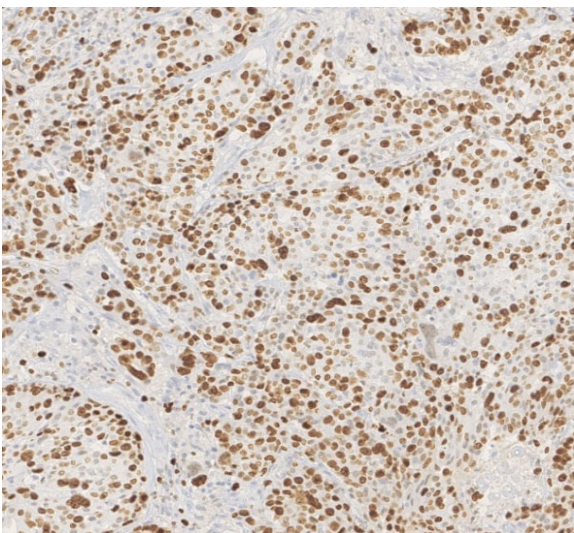
Фиг. 13А Карцином на гърдата с умерена степен на диференциация – G2, оцветяване с Н&Е, увеличение x 100.



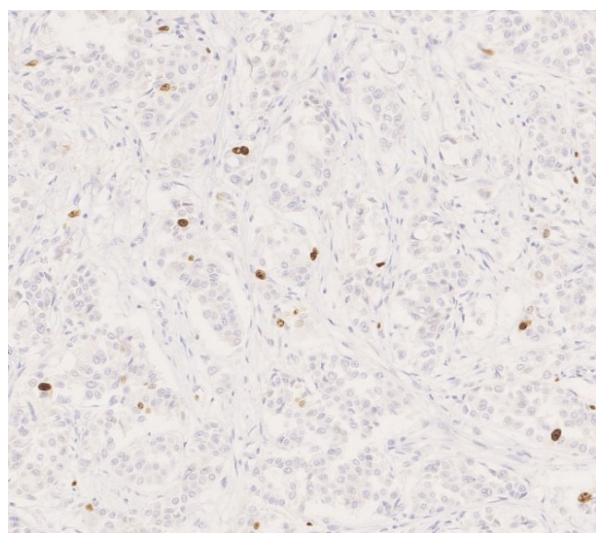
Фиг. 13В Карцином на гърдата с ниска степен на диференциация – G3, оцветяване с Н&Е, увеличение x 100.



Фиг. 14А Карцином на гърдата с висок пролиферативен индекс, имунохистохимично оцветяване с Ki67, увеличение x100.



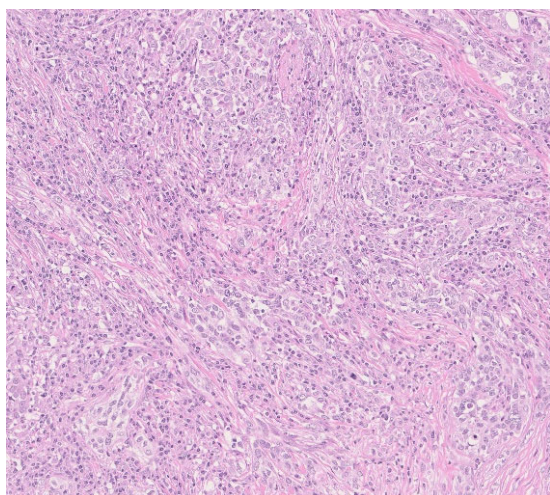
Фиг. 14В Карцином на гърдата с нисък пролиферативен индекс, имунохистохимично оцветяване с Ki67, увеличение x100.



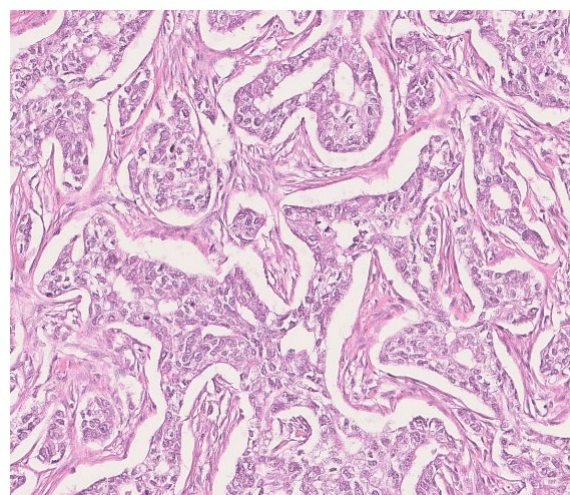
TILs

В нашето проучване *cut off* стойност на TILs беше определена 30 %. Установихме 60 пациента(25%) със TILs > 30% и 184 пациента (75%) със TILs < 30%. Зоната, в която се анализира всеки един от изследваните параметри (TILs, CD8, FOXP3) е една и съща, благодарение на дигиталното тъканно подравняване и софтуерна оценка На фиг. 15 и фиг. 16 са представени КГ с ниска експресия на TILs (< 30%) и с висока експресия на TILs (> 30%).

Фиг. 15 Карцином на гърдата с високи нива на TILs, оцветяване с H&E, увеличение x100.



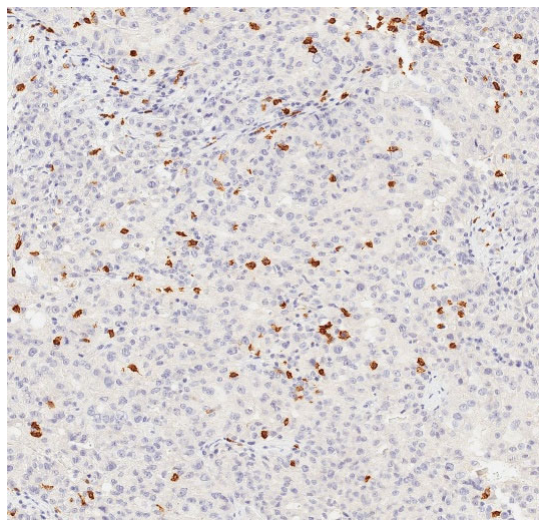
Фиг. 16 Карцином на гърдата с ниски нива на TILs, оцветяване с H&E, увеличение x100.



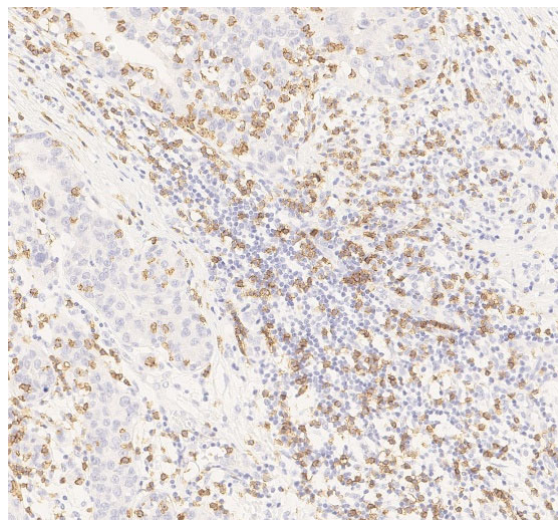
CD8

В нашето проучване *cut off* стойност за плътността на CD8 беше определена 474. Установихме 72 пациента (30%) със CD8 > 474 и 172 пациента (70%) със CD8 < 474. При всеки хистологичен материал е анализирана цяла площ на тумора и прилежащата му строма, На фиг. 17-18 са представени КГ с ниска плътност на CD8 (< 474) и с висока плътност на CD8 (>474.)

Фиг. 17 Карцином на гърдата с ниска плътност на CD8, увеличение x100.



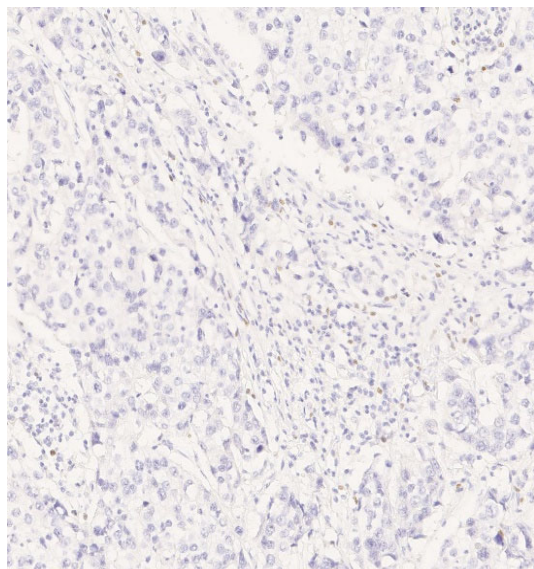
Фиг. 18 Карцином на гърдата с висока плътност на CD8, увеличение x100.



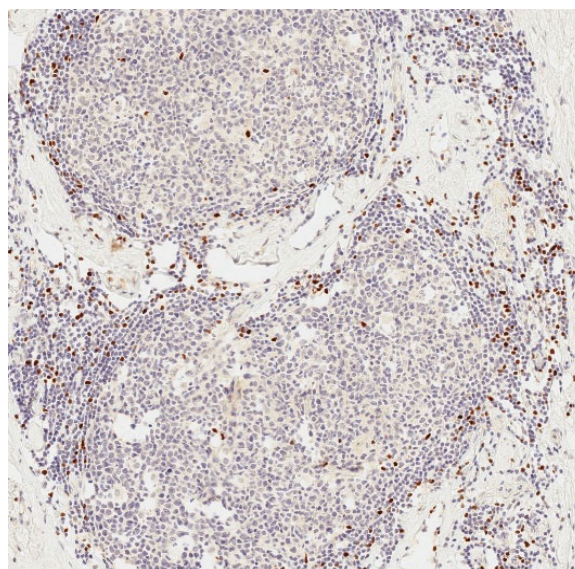
FOXP3

В нашето проучване *cut off* стойност за плътността на FOXP3 беше определена 57. Установихме 121 пациента (49.6%) със FOXP3 > 57 и 123 (50.4%) със FOXP3 < 57. При всеки хистологичен материал е анализирана цяла площ на тумора и прилежащата му строма. На фиг. 19-20 са представени КГ с ниска плътност на FOXP3 (< 57) и с висока плътност на FOXP3 (> 57).

Фиг. 19 Карцином на гърдата с ниска плътност на FOXP3, увеличение x100.

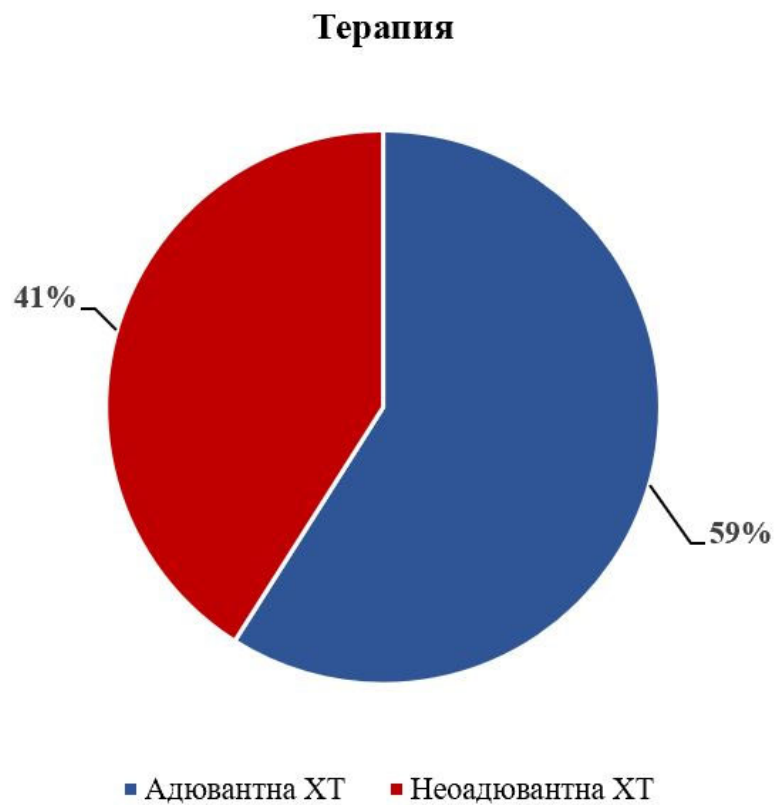


Фиг. 20 Карцином на гърдата с висока плътност на FOXP3, увеличение x100.



Повече от половината от изследваните пациенти, 145 (59%) пациента са преминали през хирургична интервенция последвана от АХТ и 99 (41%) пациента са получили НАХТ. (фиг.21)

Фиг. 21 Разпределение на пациентите в зависимост от приложената терапия – адювантна или неoadювантна.



При двете групи пациенти са използвани съответно различни медикаменти за химиотерапевтично лечение. При прилагане на АХТ, 82 пациента (57%) са подложени на лечение с комбинация от антрациклини и таксани, 31 пациента (21%) само с антрациклини и 32 пациента (22%) с други медикаменти. При прилагане на НАХТ, 93 пациента (94%) са подложени на лечение с комбинация от антрациклини и таксани, 1 пациент (1%) само с антрациклини и 5 пациента (5%) с други медикаменти. Използвана е комбинация от антрациклини и таксани при 175 (72%) от всички изследвани пациенти, самостоятелно са приложени антрациклини при 32 (13%) пациента и други химиотерапевтични медикаменти са приложени на 37 (15%) пациента. На фигура 22-23 е показано процентното разпределение на отделните терапевтични комбинации за двете изследвани групи. Най – често прилаганите медикаменти както за адювантна, така и за неoadювантна ХТ е комбинацията от антрациклини и таксани.

Фиг. 22 Видове АХТ, приложена на изследваните пациенти

Видове АХТ



Фиг. 23 Видове ХТ, приложена на изследваните пациенти

Видове ХТ, при пациенти с НАХТ



2) ЕКСПРЕСИЯ НА TILs ВЪВ ВРЪЗКА С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Получената средна стойност на TILs е 10% (Q1:Q3 3%:25%). При анализа на клинично-патологичните показатели и експресията на TILs се установи статистически зависимост между високите стойности на TILs и възрастта на пациентите. Високите стойности на TILs са асоциирани с по-млада възраст (<50 години) ($p=0.001$). Обратна корелация се откри между високите нива на експресия на TILs и ниската степен на диференциация на КГ ($p=0,001$). Установена е статистическа зависимост между високите нива на TILs и хистологичния вариант на КГ (дуктален, медуларен и метапластичен КГ) ($p=0.008$)(фиг.24). Не се установи статистическа зависимост между нивата на експресия на TILs и лобуларния и апокринния КГ. Най-ниски нива на TILs бяха установени при лобуларен КГ.(фиг.25)

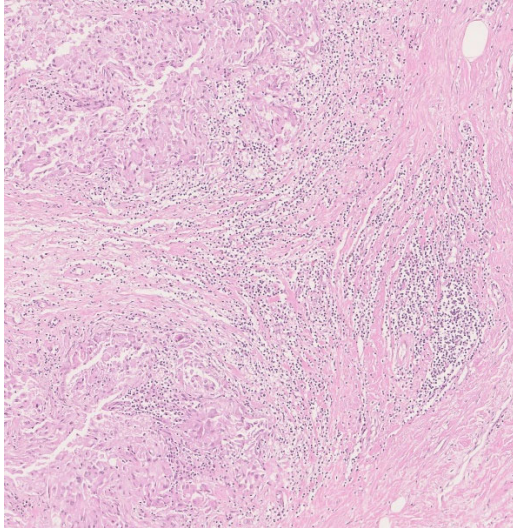
Високите нива на Ki67 (Ki67>30%) корелират с високи нива на експресия на TILs ($p=0.046$).

Не са открити статистически завиимости между експресията на TILs и клиничния стадий на пациента. На табл 3 е представен сравнителен анализ на връзката между експресията на TILs и клинично-морфологичните характеристики при пациенти с тройно негативни КГ.

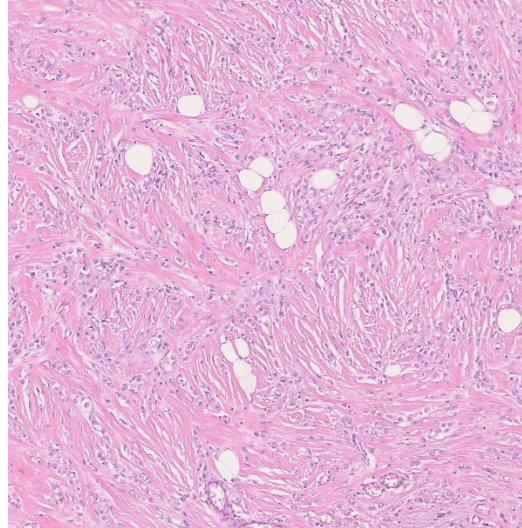
Табл. 3 Сравнителен анализ на връзката между експресията на и клинично-морфологичните характеристики при пациентите с тройно негативни карциноми на млечната жлеза.

		Н общ брой	%	TILs% Средна стойност (Q1:Q3)	P
Възраст	Средна стойност	53 (25-84)			
	≤ 50	106	43.4	12.5 (5.0:35.0)	0.001
	≥ 50	138	56.6	5.0 (2:20)	
Клиничен стадий	I	79	32.4	5.0 (2.0:20.0)	0.202
	II	120	49.2	10.0 (3.5:32.5)	
	III	45	18.4	10.0 (5.0:20.0)	
Хистологичен вариант	Дуктален инвазивен КГ от неспециален тип	219	90.5	10.0 (3.0:25.0)	0.008
	Лобуларен карцином	8	3.3	1.0 (1.0:4.0)	
	Апокринен карцином	8	3.3	3.5 (1.5:25.0)	
	Метапластичен карцином	4	1.7	32.5 (3.0:70.0)	
	Медуларен карцином	3	1.2	65.0 (10.0:85.0)	
Степен на диференциация	G1-G2	28	12.3	4.0 (1.0:5.0)	0.001
	G3	199	87.7	10.0 (4.0:30.0)	
Ki67	Средна стойност	55% (3%-90%)			
	< 30%	37	15.5	5.0 (1.0:20.0)	0.046
	≥ 30%	201	84.5	10.0 (5.0:20.0)	

Фиг. 24 *Метапластичен карцином на гърдата с високи нива на TILs, увеличение x100.*



Фиг. 25 *Лобуларен карцином на гърдата с ниски нива на TILs, увеличение x100.*



3) ЕКСПРЕСИЯ НА CD8 ВЪВ ВРЪЗКА С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Почената средна стойност за плътността на CD8 е 242 (Q1:Q3 108:566). При анализа на клинично-патологичните показатели и плътността на CD8 се установи статистически зависимост между високата плътност на CD8 и възрастта на пациентите. Високите стойности на CD8 са асоциирани с по-млада възраст (<50 години) ($p=0.003$). Обратна корелация се откри между високата плътност на CD8 и ниската степен на диференциация на КГ ($p=0,007$). Установена е статистическа зависимост между високата плътност на CD8 и хистологичния вариант на КГ (дуктален, медуларен и метапластичен КГ) ($p=0.002$) (фиг.26). Не се установи статистическа зависимост между нивата на експресия на CD8 и лобуларния и апокринния КГ. Най ниски нива на плътността на CD8 бяха установени при лобуларен КГ, най- високи при медуларен КГ.(фиг.27)

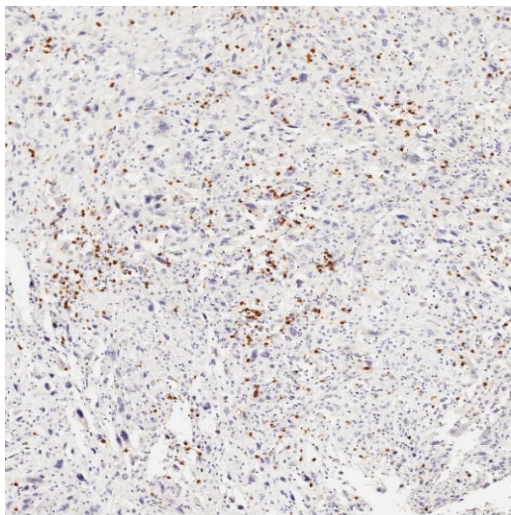
Високите нива на Ki67 (Ki67>30%) корелират с високи нива на експресия на CD8 ($p=0.027$).

Не са открити статистически зависимости между експресията на CD8 и клиничния стадий на пациента. На табл 4 е представен сравнителен анализ на връзката между експресията на CD8 и клинично-морфологичните характеристики при пациенти с тройно негативен КГ.

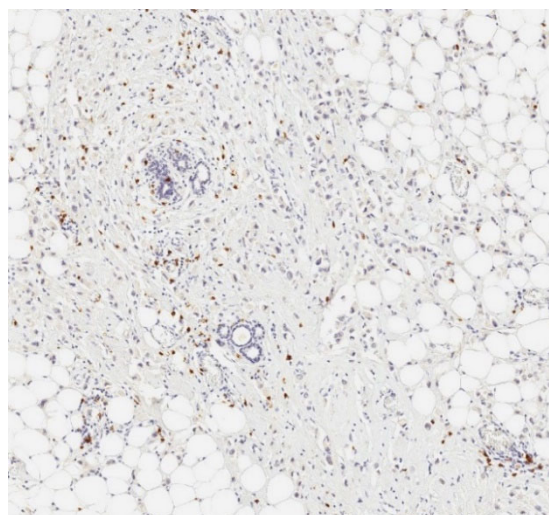
Табл. 4 Сравнителен анализ на връзката между експресията на CD8 и клинично-морфологичните характеристики при пациенти с тройно негативни карциноми на млечната жлеза.

		Н общ брой	%	CD8 гъстота Средна стойност (Q1:Q3)	P
Възраст	Средна стойност	53 (25-84)			0.003
	≤ 50	106	43.4	325 (137:661)	
	>50	138	56.6	191 (94:422)	
Стадий	I	79	32.4	201 (109:428)	0.573
	II	120	49.2	276 (104:644)	
	III	45	18.4	242 (123:443)	
Хисто- логичен вариант	Дуктален инвазивен карцином на гърдата от неспециален тип	219	90.5	250 (112:285)	0.002
	Лобуларен карцином	8	3.3	52 (14:88)	
	Апокринен карцином	8	3.3	99 (43:311)	
	Метапластичен карцином	4	1.7	320 (44:660)	0.002
	Медуларен карцином	3	1.2	569 (560:613)	0.002
Степен на диференци ация	G1-G2	28	12.3	123 (46:248)	0.007
	G3	199	87.7	270 (112:585)	
Ki67	Средна стойност	55% (3%- 90%)			0.027
	< 30%	37	15.5	152 (66:361)	
	≥ 30%	201	84.5	270 (114:585)	

Фиг. 26 *Експресия на CD8 при
метапластичен КГ, увеличение
x100.*



Фиг. 27 *Експресия на CD8 при
лобуларен КГ, увеличение x100.*



4) ЕКСПРЕСИЯ НА FOXP3 ВЪВ ВРЪЗКА С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Поучената средна стойност за плътността на FOXP3 е 57 (Q1:Q3 21:130). При анализа на клинично-патологичните показатели и плътността на FOXP3 се установи статистически зависимост между високата плътност на FOXP3 и възрастта на пациентите. Високите стойности на FOXP3 са асоциирани с по-млада възраст (<50 години) ($p=0.023$). Обратна корелация се откри между високата плътност на FOXP3 и ниската степен на диференциация на КГ ($p=0.002$). Установена е статистическа зависимост между високата плътност на FOXP3 и хистологичния вариант на КГ (дуктален, медуларен и метапластичен КГ) ($p=0.001$) (фиг. 28). Не се установи статистическа зависимост между нивата на експресия на FOXP3 и лобуларния и апокринния КГ. Най ниски нива на плътността на FOXP3 бяха установени при лобуларен и апокринен КГ, най- високи при метапластичен КГ (фиг. 29)

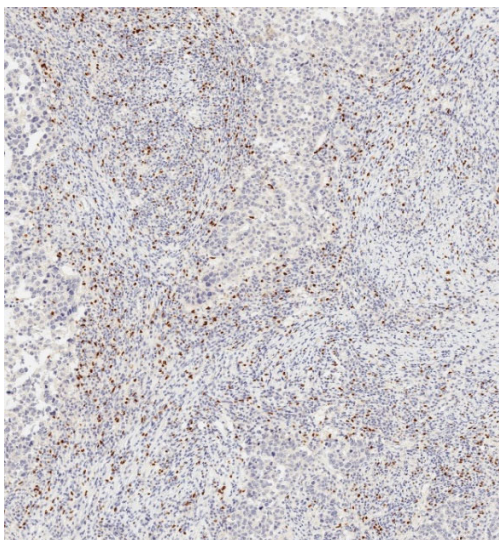
Високите нива на Ki67 (Ki67>30%) корелират с високи нива на експресия на FOXP3 ($p=0.003$).

Не са открити статистически зависимости между експресията на FOXP3 и клиничния стадий на пациента. На табл 5 е представен сравнителен анализ на връзката между експресията на FOXP3 и клинично-морфологичните характеристики при пациенти с тройно негативен КГ.

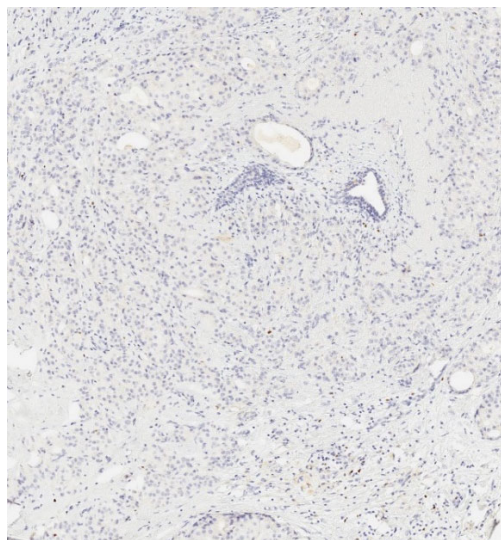
Табл. 5 Сравнителен анализ на връзката между експресията на FOXP3 и клинично-морфологичните характеристики при пациенти с тройно негативни карциноми на млечната жлеза.

		Н общ брой	%	FOXP3 гъстота Средна стойност (Q1:Q3)	P
Възраст	Средна стойност	53 (25-84)			
	≤ 50	106	43.4	70 (26:156)	0.023
	>50	138	56.6	49 (19:107)	
Стадий	I	79	32.4	45 (19:148)	0.330
	II	120	49.2	65 (21:148)	
	III	45	18.4	54 (24:110)	
Хистоло- гичен вариант	Дуктален инвазивен карцином на гърдата от неспециален тип	219	90.5	59 (23:134)	
	Лобуларен карцином	8	3.3	14 (11:16)	
	Апокринен карцином	8	3.3	13 (5:23)	
	Метапластичен карцином	4	1.7	136 (32:332)	
	Медуларен карцином	3	1.2	67 (7:111)	
Степен на диференц иация	G1-G2	28	12.3	29 (11:70)	0.002
	G3	199	87.7	59 (22:139)	
Ki67	Средна стойност	55% (3%- 90%)			0.003
	< 30%	37	15.5	23 (12:59)	
	≥ 30%	201	84.5	67 (25:139)	

Фиг. 28 *Експресия на FOXP3 при дуктален инвазивен КГ от неспециален тип, увеличение x100.*



Фиг. 29 *Експресия на FOXP3 при апокринен КГ, увеличение x100.*



Можем да обобщим, че високите нива на TILs, CD8 и FOXP3 се асоциират с по – млада възраст (<50 години) (TILs $p=0.001$, CD8 $p=0.003$, FOXP3 $p=0.023$), карциноми с ниска степен на диференциация (TILs $p=0.001$, CD8 $p=0.007$, FOXP3 $p=0.002$) и висок пролиферативен индекс (TILs $p=0.046$, CD8 $p=0.027$, FOXP3 $p=0.003$). Освен това високите нива на всички изследвани параметри показват статистически значима корелация и с някои специфични хистологични варианти на КГ – дуктален инвазивен карцином от не специален тип, метапластичен карцином и медуларен карцином. (TILs $p=0.008$, CD8 $p=0.002$, FOXP3 $p=0.001$). Никой от изследваните имунни маркери не показва статистическа зависимост с клиничния стадий на пациента (TILs $p=0.202$, CD8 $p=0.573$, FOXP3 $p=0.330$). Всички клинично-патологични характеристики и корелацията им с изследваните ИХХ параметри са представени на таблица 6.

Табл.6 Клиникопатологични характеристики на изследваната популация и корелацията им с TILs,CD8,FOXP3.

		N Общ брой	%	TILs% Средна стойност (Q1:Q2)	P	CD8 плътност Средна стойност (Q1:Q2)	P	FOXP3 плътност Средна стойност (Q1:Q2)	P
Въз- раст	Средна стойност	53 (25-84)							
	≤ 50	106	43.4	12.5 (5.0:35.0)	0.001	325 (137:661)	0.003	70 (26:156)	0.023
	>50	138	56.6	5.0 (2:20)		191 (94:422)		49 (19:107)	
Хисто- логиче н тип	Дуктален инвазивен КГ от неспециале н тип	219	90.5	10.0 (3.0:25.0)	0.008	250 (112:585)	0.002	59 (23:134)	0.001
	Лобуларен карцином	8	3.3	1.0 (1.0:4.0)		52 (14:88)		14 (11:16)	
	Апокринен карцином	8	3.3	3.5 (1.5:25.0)		99 (43:311)		13 (5:23)	
	Метапласт ичен карцином	4	1.7	32.5 (3.0:70.0)	0.008	320 (44:660)	0.002	136 (32:332)	0.001
	Медуларен карцином	3	1.2	65.0 (10.0:85.0)	0.008	569 (560:613)	0.002	67 (7:111)	0.001
Ста- дий	I	79	32.4	5.0 (2.0:20.0)	0.202	201 (109:428)	0.573	45 (19:123)	0.330
	II	120	49.2	10.0 (3.5:32.5)		276 (104:644)		65 (21:148)	
	III	45	18.4	10.0 (5.0:20.0)		242 (123:443)		54 (24:110)	
Степен на дифе- ренция	G1-G2	28	12.3	4.0 (1.0:5.0)		123 (46:248)		29 (11:70)	
	G3	199	87.7	10.0 (4.0:30.0)	0.001	270 (112:585)	0.007	59 (22:139)	0.002
Ki67	Средна стойност	55% (3%- 90%)							
	<30%	37	15.5	5.0 (1.0:20.0)		152 (66:361)		23 (12:59)	
	≥30%	201	84.5	10.0 (5.0: 25.0)	0.046	270 (114:585)	0.027	67 (25:139)	0.003

5) СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ МЕЖДУ ОТДЕЛНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИ ПОКАЗАТЕЛИ – TILs, CD8 и FOXP3

На таблица 7 е посочена връзката между степен на изразеност на TILs, CD8 и FOXP3 при пациенти с тройно негативен КГ. TILs демонстрират силна позитивна корелация с високата плътност на CD8 (коефициент на Spearman 0.759) и умерена такава с плътността на FOXP3 (коефициент на Spearman 0.540). Установен е корелация и между гъстотата на CD8 и FOXP3 (коефициент на Spearman 0.666). При високи стойности на TILs се наблюдават високи стойности и на CD8 и FOXP3.

Табл. 7 Зависимост между изследваните параметри – TILs, CD8, FOXP3 при пациенти с тройно негативен карцином на гърдата.

		TILs%	CD8 плътност	FOXP3 плътност
TILs%	Коефициент на Spearman	1.000	0.759	0.540
	P	.	<0.001	<0.001
CD8 плътност	Коефициент на Spearman	0.759	1.000	0.666
	P	<0.001	.	<0.001
FOXP3 плътност	Коефициент на Spearman	0.540	0.666	1.000
	P	<0.001	<0.001	.

6) СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ПРЕЖИВЯЕМОСТТА БЕЗ ЗАБОЛЯВАНЕ (DFS) НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ И КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ И TILs.

Сравнителният анализ между DFS и клиничко-морфологичните параметри, включително и TILs при регресионния модел на Cox с една или множество променливи показва статистическа значима зависимост между клиничния стадий на болестта и DFS ($p=0.001$). Получените резултати са представени на таблица 8. Позитивна корелация се установи между високите нива на TILs и DFS ($p=0.006$).

Табл. 8 Регресионен модел на Cox за оценка на статистическата зависимост между DFS и клиничко-морфологичните параметри.

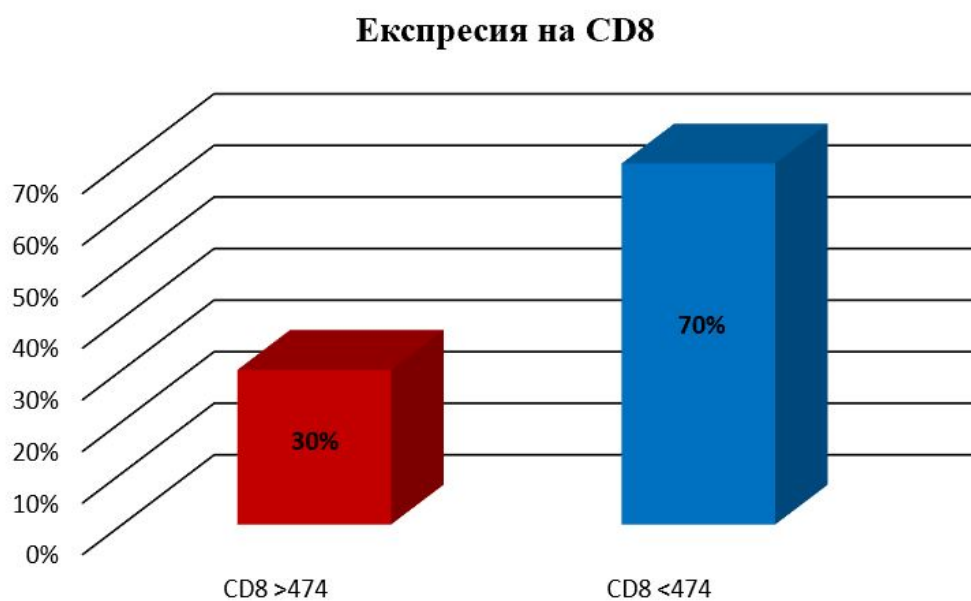
Клиничко-Морфологични фактори		Регресионен модел с една променлива		Регресионен модел с множество променливи	
		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Възраст		1.00 (0.98-1.02)	0.989		
Клиничен стадий на пациента	III	Ref		Ref	
	II	0.39 (0.23-0.67)	0.001	0.41 (0.24-0.71)	0.001
	I	0.19 (0.09-0.40)	<0.001	0.18 (0.08-0.37)	<0.001
Степен на диференциация	G3	Ref			
	G1-G2	0.61 (0.24-1.52)	0.288		
Ki67	≥ 30%	Ref			
	< 30%	0.98 (0.50-1.94)	0.957		
TILs		0.81 (0.70-0.94)	0.006	0.79 (0.67-0.92)	0.004

Легенда: HR (hazard ratio) – относителен риск; CI (confidence interval) – доверителен интервал; P (p value) – p стойност; TILs (tumor infiltrating lymphocytes) - тумор инфилтриращи лимфоцити.

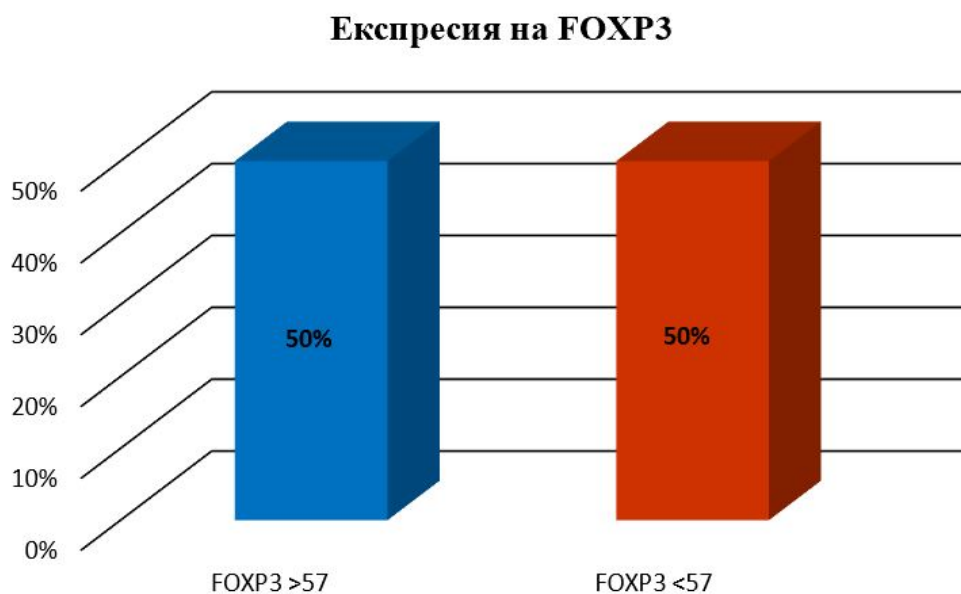
7) АНАЛИЗ НА ОБЩАТА ПРЕЖИВЯЕМОСТ И ПРЕЖИВЯЕМОСТТА БЕЗ ЗАБОЛЯВАНЕ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ И *CUT OFF* ЕКСПРЕСИЯТА НА CD8 И FOXP3

Първоначално изследвахме статистическата зависимост между CD8 и FOXP3 и изхода от заболяването. При този вид анализ беше установена статистическа зависимост между всички тествани параметри и DFS (HR=0.999, 95% CI 0.998-1.000, $p=0.004$ за CD8; HR=0.995, 95%CI 0.992-0.999, $p=0.010$ за FOXP3). Изчислявайки C-индексът на Harrell се определиха *cut-off* стойности за всяка отделна променлива. Стойностите на *cut-off* с най висок индекс на Harrell бяха определени за оптимални за по – нататъшните анализи за преживяемостта на пациентите. При гъстота на $CD8 \geq 474$ (с-индекс 0.585882), 30% от пациентите са с високи нива на CD8. (фиг. 30) При плътност на FOXP3 ≥ 57 (с-индекс 0.592259), 50% от пациентите имат високи нива на експресия на FOXP3. (фиг. 31)

Фиг.30 Разпределение на пациентите в зависимост от експресията на CD8.

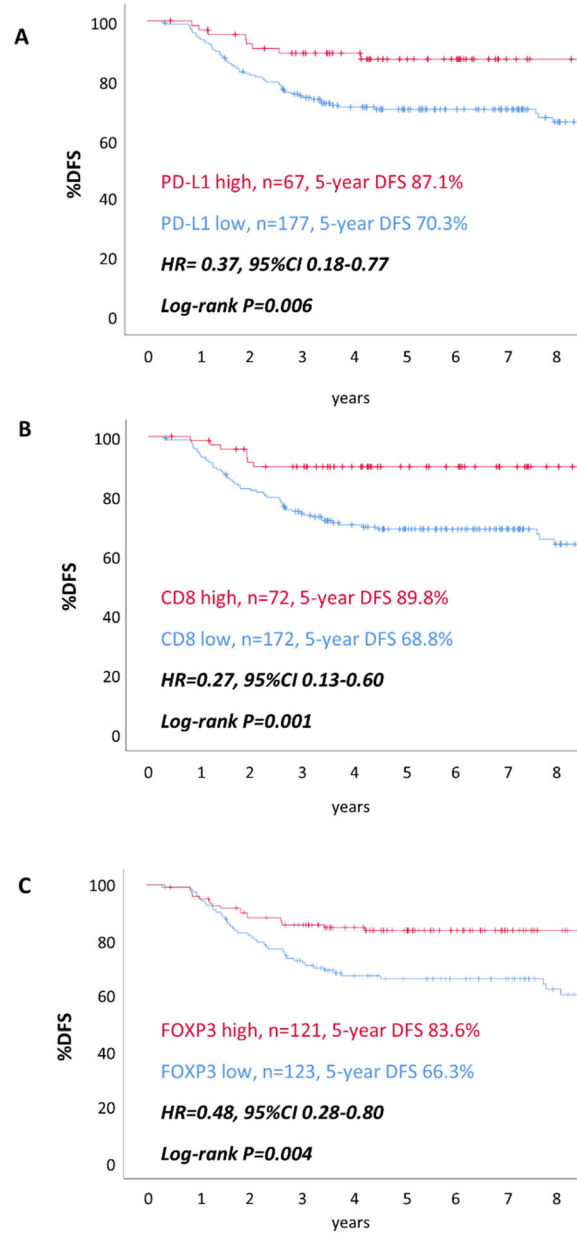


Фиг.31 Разпределение на пациентите в зависимост от нивото а експресия на FOXP3.



За изчисляване на DFS използвахме кривите на Kaplan Meier (фиг. 32). От проведените анализи се вижда, че пациентите, при които се наблюдават високи нива на експресия на CD8 (плътност на CD8 \geq 474) имат статистически значимо по-висока 5 годишна преживяемост (DFS 89,8%; p=0,001) в сравнение с преживяемостта на пациенти с ниска експресия на CD8 (DFS 68,8%; p=0,001). Пациенти с висока експресия на FOXP3 (плътност на FOXP3 \geq 57) имат статистически значимо по-висока 5 годишна преживяемост (DFS 83,6%; p=0,004) в сравнение с пациенти, при които наблюдаваме ниска експресия на FOXP3 (DFS66,3%; p=0,004).

Фиг. 32 Криви Kaplan Maier, показващи статистическата зависимост между DFS и експресията на CD8 и FOXP3.



8) ИНТЕГРИРАНИ ПРОГНОСТИЧНИ МОДЕЛИ

Бяха извършени анализи, оценяващи допълнителна прогностична информация, предоставена от стойностите на CD8 (висока vs ниска) и FOXP3 (висока vs ниска). Тази информация беше добавена към съществуващ прогностичен модел, включващ стадий на неоплазията и TILs. Всички получени резултати са представени на табл 9. От получените резултати се вижда, че FOXP3 и CD8 добавени поотделно към вече съществуващия прогностичен модел (стадий + TILs), добавят значима прогностична информация. ($p=0,023$ за CD8 и $p=0,024$ за FOXP3) Не открихме добавена прогностична стойност при едновременното добавяне на CD8 и FOXP3.

Табл. 9 Допълнителна прогностична (DFS) стойност на CD8 и FOXP3 към модели с повече променливи.

Прогностични модели	χ^2	P value
Стадий + TILs vs Стадий + TILs + CD8	5.14	0.023
Стадий + TILs vs Стадий + TILs + FOXP3	5.12	0.024
Стадий + TILs + CD8 vs Стадий + TILs + CD8 + FOXP3	3.56	0.059
Стадий + TILs + FOXP3 vs Стадий + TILs + FOXP3 + CD8	2.89	0.089

V. ДИСКУСИЯ

Получените от нас резултати показват, че тройно негативните КГ се срещат по-често при пациенти на възраст над 50 години. Ние установихме, че честотата им при пациенти над 50 годишна възраст е 56.6% срещу 43.4% при пациенти под 50 години. Средната възраст на жените в настоящото изследване е 53 години (варира между 25 години и 84 години). Подобни резултати са получени и от други автори (Dent R et al. 2007, Yeh J. et al. 2017). Данните от литературата показват, че за разлика от тройно негативните КГ, средната възраст на пациентите, позитивни за ER, PR и HER2 е значително по-висока (Dent R et al. 2007, Plasilova M. et al, 2016). Dent et al. (2007) анализирайки 1601 болни с инвазивен КГ, 180 от които са тройно негативни и 1421 от луминал А, луминал В и HER2+ установяват, че средната възраст на пациентите с тройно негативен карцином на гърдата е 53 години, а тази на пациентите от другите молекулярни субтипове е 57.7 години и разликата е статически значима ($p=0.0001$). Взети заедно, получените от нас резултати и данните от литературата показват, че тройно негативните КГ се срещат в по-млада възраст в сравнение с останалите субтипове КГ.

Преобладаващата част от пациентите с тройно негативни КГ, диагностицирани от нас, се намират във втори клиничен стадий – това са 49.9% от болните. Тези резултати не се различават от данните на други автори (42,113). Reddy et al. (2017) и Dogra et al. (2014) също установяват, че по-голяма част от техните пациенти с тройно негативни КГ се намират във втори клиничен стадий – съответно 67.6% и 70.1% от случаите.

В първи клиничен стадий са открити приблизително около една трета (32.4%) от заболяните, а 18.4% от пациентите са в трети клиничен стадий, резултати, различаващи се от тези в литературата (Dogra A. et al. 2014, Reddy GM. Et al., 2017). Според повечето автори (Dogra et al. 2014, Reddy et al. 2017), вторият по честота клиничен стадий при който се откриват болните с тройно негативните КГ е третият клиничен стадий. По литературни данни неговата честота е между 20.8% и 29.5%. Според нас, скрининговите програми, съвременните методи на диагностика и осъзнаването на пациентите от необходимостта от профилактични прегледи са в основата на ранното откриване на карцинома на гърдата.

Сравнителният анализ на тройно негативните КГ с другите молекулярни субтипове КГ показва, че луминал А и луминал В се откриват

в по-голямата част от случаите във II-ри клиничен стадий, докато HER2+ позитивните пациенти се диагностицират най-често в III-ти клиничен стадий (Reddy et al. 2017). От биологична гледна точка повишената активност на ген *HER2* и свръхекспресията на протеина (т.нар. HER2 позитивност) е свързана със засилена клетъчна пролиферация и мотилитет, увеличена ангиогенеза и туморна инвазивност, и намалена апоптоза (Ross JS et al.,2009). Според нас, HER2+ субтип се открива по-често в III клиничен стадий, защото той се диагностицира, когато присъства симптоматично, отколкото при скринингова мамография (Lin N et al. 2012).

Най-честият хистологичен вариант, установен от нас при пациентите с тройно негативен КГ е инвазивния дукталният карцином от неспециален тип. Той се установи в 90.5% от случаите. По данни на литературата този хистологичен тип варира между 63.35% и 94.8% при тройно негативните КГ (Ishikawa Y et al. 2011, Qiu J et al 2016).

Дукталният инвазивен карцином от неспециален тип е най-често срещаният хистологичен вариант не само при тройно негативните КГ, но и при останалите молекулярни субтипове (Reddy et al. 2017).

В 9.5% от случаите с тройно негативни КГ, ние установихме инвазивни карциноми от специален тип: лобуларен, апокринен, метапластичен и медуларен карцином, съответно с честота 3.3%, 3.3%, 1.7% и 1.2%. Тези резултати са в съответствие с публикуваните от други автори данни (Plasilova M et. Al 2016, Reddy GM et al 2017, Yeh J. et al. 2017).

Лобуларният карцином е между 10 и 15% от всички КГ и е вторият по честота хистологичен вариант на инвазивния КГ. Класическата форма на карцинома се характеризира с малки дискохезивни неопластични клетки, инвазиращи стромата в т.н. „индианска нишка“. Дискохезивният фенотип се дължи на нарушена кохезия между клетките поради липса на протеина Е-кадхерин (CDH1), който се наблюдава в около 90% от инвазивния лобуларен карцином. Ниската честота на инвазивния лобуларен карцином в настоящото изследване показва, че при тройно негативните КГ мутацията на *CDH1* е сравнително рядко явление.

Апокринният карцином на гърдата, както показва настоящото изследване е рядък карцином - 3.3% от тройно негативните инвазивни КГ са с апокриноклетъчна морфология. Туморните клетки имат обширна еозинофилна и грануларна цитоплазма с централно или ексцентрично ядро с проминентни нуклеоли и отчетливи клетъчни граници (Vranic S et al 2017). Присъствието на апокринни клетки, повече от 90% от инвазивната

туморна популация го определя като инвазивен апокринен карцином, но е необходимо да се определи имунохистохимичния профил на стероидните рецептори: ER-/PR-/AR+, за да се приеме за истински апокринноклетъчен карцином. Повечето, но не всички апокринноклетъчни карциноми не показват HER2 амплификация (Mills A. et al 2016). Апокринноклетъчните карциноми са между 0.4% и 5% и получените от нас резултати попадат в тези граници.

Класическият метапластичен карцином е хетерогенна група от малигнени епителни тумори на гърдата с два компонента: карциномен компонент и хетерогенен саркоматозен компонент (Schwartz TL et al, 2013). Все още не е известно дали саркоматозните компоненти имат общ предшественик и дали този предшественик е идентичен с тези на карциномния компонент. Ние установихме, че в групата на тройно негативните карциноми, 1,7% от карциномите са метапластичните карциноми. Zhuang al. (1997) предлага три теории за обяснение на едновременното присъствие на двата компонента. Според колизионната теория, метапластичните карциноми имат биклонален, синхронен растеж на двата компонента, епителен и саркоматозен, всеки от които води началото си от отделни прогениторни клетки и в даден момент двата компонента се смесват и се формира един тумор. Според втората теория, туморът има моноклонален произход и двата компонента произлизат от обща мултипотентна прогениторна клетка, която се диференцира в малигнена епителна и мезенхимна тъкан. Според метапластичната теория саркоматоидния компонент е трансформиран карциномен компонент на базата на метаплазия или преобразуване. Независимо от хистогенезата тези тумори показват ниска честота, която варира между 1% и 3% и само в отделни изследвания, честотата е по-висока – до 10.7% от случаите на тройно негативните КГ (Hashmi AA et al, 2014).

Ние установихме, че честотата на медуларния карцином е 1.2% от тройно негативните КГ. Тези карциноми се характеризират със синцитиален модел на растеж повече от 75% от площта на тумора, с примес на лимфоплазмоцитарен възпалителен инфилтрат, микроскопски имат ограничен растеж и нямат glandularна диференциация (Rosen PP et al, 2009). По данни на литературата, медуларният карцином при неселектирани пациенти е по-малко от 5% от всички инвазивни мамарни карциноми. По-високата честота на медуларния карцином при неселектирани пациенти се дължи на хетерогеността на този тип карцином на гърдата. Освен при тройно негативните КГ, медуларните карциноми са

откриват също и при ER, PR и/или HER-2 позитивни тумори (Dogra A et al, 2014).

Ретроспективният анализ на Hong-Ye Liao (2018) върху 19.900 пациенти с тройно негативен КГ показва, че пациенти с медуларен и апокринен КГ имат по-добра OS в сравнение с пациенти с дуктален инвазивен карцином от неспециален тип, лобуларен и метапластичен КГ (Liao HY et al, 2017). Тези резултати показват от една страна изразената хетерогенност на тройно негативните КГ, а от друга страна доказват, че хистологичният вариант е прогностичен фактор. Поради малкия брой пациенти с карциноми на гърдата от специален тип, подобна зависимост не е изследвана.

Ние установихме, че при тройно негативните КГ преобладава ниската степен на диференциация. В 87.7% от случаите, степента на диференциация е G3, докато G1-G2 е само в 12.3% от случаите. Освен ниската степен на диференциация, тройно негативните КГ показват висок пролиферативен индекс. В 84.5% от туморите се установи, че повече от 30% от клетките експресират Ki67. Ниската степен на диференциация и високия Ki67 индекс са находки, установени при редица ретроспективни проучвания (Dogra A et al 2014, Plasilova M et al 2016, Reddy GM et al 2017, Thike AA et al 2010). Според нас, по-агресивното поведение на тройно негативния КГ, може поне отчасти да се дължи на ниската степен на диференциация и високата клетъчна пролиферация. Независимо от различните *cut off* стойности, използвани за определяне на ниската и висока степен на пролиферация, всички те показват, че процентът на Ki67 позитивните клетки при тройно негативните КГ е по-висок в сравнение с останалите молекулярни субтипове на КГ (Dent R et al 2007, Plasilova M et al 2016, Yeh J et al 2017). Ние, подобно на други автори считаме, че пролиферативният маркер Ki67 е един от неблагоприятните прогностични маркери при тройно негативните КГ.

При пациентите с тройно негативни КГ, ние установихме статистическа зависимост между клиничния стадий и DFS. Пациенти, при които карциномите са I и II клиничен стадий имат по-добра DFS (съответно $p < 0.001$ и $p = 0.001$), което е в съответствие с данните от литературата (Hernandez-Aya LF et al 2011).

На базата на клинично-морфологичните характеристики можем да определим следния профил на тройно-негативния КГ: диагностицира се най-често във II клиничен стадий, в болшинството от случаите е инвазивен

дуктален карцином от неспециален тип, показва ниска степен на диференциация и висока пролиферативна активност.

През последните години се появиха редица публикации, които установяват, че малигнените и биологични черти на КГ зависят не само от генетичните нарушения, но и от взаимодействието между туморните клетки и микросредата (Hellwig B, 2019). Данните от литературата, относно ролята на TILs в тумора и свързаната с тях по-добра прогноза са доста ограничени (Cruz-Merino L et al 2013, Gajewski TF et al 2013). При карцином на гърдата, присъствието на TIL преди химиотерапията е предиктор за по-добър ефект при НАХТ (Denkert C et al 2010). Оценката на плътността на TILs при карцином на гърдата, видът и разположението на TILs в отделните проучвания се различават доста, което води до противоречиви резултати. За да се избегне субективната оценка и полуколичественото определяне на плътността на TILs, на CD8 и FOXP3 позитивните лимфоцити, ние използвахме дигитален софтуер с възможност за оценка на огромен брой клетки от всеки пациент, като средно са оценени повече от 200 000 клетки на хистологичен срез. Друго предимство на използвания от нас метод е бързината с която се извършва анализа. В зависимост от големината на изследваната зона, средно са необходими от 5 до 7 минути за морфометрична оценка на всеки препарат. На базата на предварително зададени параметри, програмата генерира редица резултати като общ брой на изследвани клетки, брой позитивни и негативни клетки, относителен дял на позитивни клетки, плътност на изследвана площ и други параметри. Основното предимство на използвания дигитален софтуер е анализ само на селектираните зони и прецизно разделяне на туморния паренхим от стромалната компонента.

Количествената оценка на TILs в настоящото проучване е определена на базата на *cut off* стойността, която е 30%. Ние установихме, че 25% от пациентите имат високи стойности на TILs и 75% от тях са с ниски стойности на TILs. Резултати от настоящото проучване показват, че при високи стойности на TILs преживяемостта без прогресия е увеличена в сравнение с ниските нива на TILs и разликата е статистически значима ($p=0.006$).

За първи път Loi et al. установяват статистическата зависимост между TILs и преживяемостта на пациенти с тройно негативен КГ (Loi S et al 2013). По-късно подобни резултати са получени и от други изследователи (Adams S et al 2014, Loi S et al 2014). Високите нива на TILs увеличават преживяемостта на пациенти и с HER2+ тумори (Denkert

C et al 2018). Големият брой TILs по време на диагнозата е свързан с намалена честота на рецидивите при ER- и HER2- КГ (Loi S et al 2014). Оценката на TIL като непрекъсната променлива показва, че 10%-ното

увеличение на инфилтратата води до намаляване на риска от далечни метастази между 13% и 18%. По-добрата прогноза на пациентите при високи нива на TILs след химиотерапия с антрациклин в сравнение с ниските им нива е в подкрепа на хипотезата, че предшестващият имунен отговор срещу тумора засилва ефекта от химиотерапия (Adams S et al 2014).

За разлика от останалите молекулярни субтипа на КГ: луминал А, луминал В и свръхекспресиращ HER2, тройно негативните ГК имат по-високи стойности на TILs, което би могло да се дължи на соматични мутации с последваща поява на неоантигени, които индуцират в организма имунен отговор срещу туморните клетки (Schreiber RD et al 2011, Stanton SE et al 2016). Ние, подобно на други автори (Gajewski TF et al 2013, Gierisch JM et al 2013), считаме, че TILs са силен прогностичен фактор при тройно негативните КГ.

Анализът на TILs във връзка с клинично-морфологичните показатели показва, че високите нива на TILs се срещат по-често във възрастта под 50 г. и разликата е статистически достоверна ($p=0,001$). Високите нива на TILs са асоциирани с ниска степен на диференциация на КГ ($p=0,001$), високи стойности на Ki67 ($p=0.046$) и с някои хистологични варианти на тройно негативните КГ: инвазивен дуктален карцином от неспециален тип и от специалните варианти: медуларен и метапластичен карцином ($p=0,008$). Статистически значима зависимост не се установи между TILs и клиничния стадий ($p=0.202$) и между TILs и специалните хистологични типа: лобуларен и апокринен карцином.

Определянето на клиничния стадий на КГ в настоящото изследване е на базата на оценка на туморния размер и статуса на ЛВ при морфологичното изследване на резекционния материал и информацията за липса или присъствие на далечни метастази, получена с образни методи. Клиничният стадий на болестта в настоящото изследване корелира с преживяемостта без заболяване ($p=0,001$). Освен клиничният стадий, други класически прогностични фактори са хистологичният вариант, степента на клетъчна диференциация (G) и митотичната активност на КГ. Установената от нас по-добра DFS при високите нива на TILs в сравнение с ниските стойности на TILs и липсата на позитивна корелация на TILs с

високата степен на диференциация на КГ, ниската митотична активност и клиничен стадий I-II означава, че TILs са самостоятелен прогностичен фактор.

Освен прогностичен фактор, данните от литературата показват, че TILs имат и предиктивна стойност и са асоциирани с ефекта от проведената химиотерапия (Adams S et al 2014, Dent R et al 2007, Loi S et al 2014, Loi S et al 2013, Plasilova M et al 2016, Schreiber RD et al 2011, Stanton SE et al 2016). Подобни резултати са получени и от няколко мета-анализа, които показват, че високите нива на TILs са свързани с подобряване на DFS и OS двете субгрупи: тройно негативни и HER2+ карциноми, но подобна зависимост липсва при ER+ и PR+ КГ (Ibrahim EM et al 2014, Mao Y et al 2016, Yu X et al 2016). На базата на друг мета-анализ, включващ шест големи клинични проучвания също се установява силна предиктивна стойност на високите нива на TILs за пълен отговор при проведена НАХТ при всички субтипове КГ: тройно негативни КГ, HER2+ карциноми и луминални КГ, но подобрене на OS не се наблюдава при луминалните КГ (Denkert C et al 2017).

TILs са хетерогенна популация от клетки, в състава на които влизат CD8 и FOXP3 позитивни клетки, верифицирани чрез имунохистохимично изследване. За cut off стойност за CD8 е определена плътност 474, а за FOXP3 плътността е 57. Пациентите с високи стойности на CD8 са 30%, а с ниски стойности са 70%, на FOXP3 са съответно 49.6% и 50,4%. Резултатите от настоящото проучване показват, че високата плътност на CD8 и FOXP3 клетки корелира с по-младата възраст на пациентите, ниската степен на диференциация, високия пролиферативен индекс на КГ и някои от хистологичните им варианти: дуктален инвазивен КГ от неспециален тип, метапластичен карцином и медуларен КГ. Не се откри зависимост между плътността на CD8 и FOXP3 позитивните клетки и клиничния стадий. При анализа на експресията на CD8 и FOXP3 и DFS се установи, че при висока плътност на двата показателя, DFS е по-добра в сравнение с ниската експресия на двете антитела. Това означава, че подобна на TILs, CD8 и FOXP3 позитивните клетки са самостоятелен прогностичен фактор. Допълнителна прогностична стойност при анализ едновременно на двата показателя не се установи.

Получените от нас резултати съответстват на данните публикувани от други автори (Mao Y 2014, McIntire PJ et al 2018). McIntire et al. (2018)

намират зависимост между общия брой на CD8+ позитивните клетки и преживяемостта без прогресия и общата преживяемост независимо от използвания метод за количествена оценка на плътността на клетките, обща плътността или определяне в т.н. горещи точки „hotspot“, т.е. зони с най-висока плътност на CD8+ позитивни клетки. Подобно на нас, авторите не намират зависимост между плътността на CD8+ клетки и клинично-патологичните параметри като: хистологичен тип, степен на диференциация, T категорията, статуса на лимфните възли и патологичния стадий. По-добрата преживяемост на пациентите с висока плътност на CD8+ лимфоцити в сравнение с ниската им плътност, според нас може да се обясни с цитотоксичната им роля в имунния отговор на организма срещу тумора. В литературата има данни, че високите нива на експресия на CD8 клетки в мамарна тъкан преди провеждане на ХТ корелира с висок процент на пълен патологичен отговор след НАХТ при пациенти с тройно негативен КГ и HER2+ КГ (Denkert C et al 2010, Denkert C et al 2015, Issa-Nummer Y et al 2013, Mao Y et al 2014, West NR et al 2011). Подобна зависимост не се открива при пациенти с луминал А и луминал В КГ. Взети заедно тези резултати показват прогностичната и предиктивна стойност на CD8 позитивните клетки в туморната тъкан на мамарен карцином.

В литературата все още няма еднозначно мнение относно ролята на FOXP3+ лимфоцити при тройно негативните КГ. Според някои автори, FOXP3+ лимфоцити имат негативен върху OS и DFS (Asano Y et al 2016, Mao Y et al 2016, Miyashita M et al 2015). Mao et al. (2016 година) на базата на мета анализ, включващ 22 964 пациенти от 25 проучвания с КГ, установяват, че високите нива на FOXP3+ лимфоцити корелират с по-ниска DFS. Тези резултати се в подкрепа на схващането, че CD8+ лимфоцити имат потенциален супресорен ефект върху имунния отговор на организма срещу тумора. Има данни, че нивата на експресия на FOXP3 при инвазивен карцином на гърдата са по-високи в сравнение с нормалната тъкан (Bates GJ et al 2006). Ние считаме, че несъответствието между получените от нас резултати, че високата плътност на CD8+ позитивните клетки има благоприятен ефект върху DFS и данните от литературата, че ефектът е негативен се дължат на различната методология на оценка на тези клетки. Loi et al. установяват висока концентрация на FOXP3+ лимфоцити в периферията на тумора и много ниска експресия в центъра на неоплазията (Liu F et al 2011). В подкрепа на позитивния ефект на високата експресия на FOXP3 клетки са резултатите от НАХТ при пациенти с КГ.

Високите стойности на експресия на FOXP3 в туморната тъкан при КГ преди провеждане на ХТ корелира с висок процент на пълен отговор след НАХТ при пациенти с тройно негативен КГ и HER2+КГ, аналогично на резултатите за CD8 (Denkert C et al 2010, Denkert C et al 2015, Issa-Nummer Y et al 2013, Mao Y et al 2014, West NR et al 2011).

В бъдеще са необходими повече проспективни проучвания насочени към изясняване на връзката между топографията на CD8+ и FOXP3+ лимфоцити и OS и DFS, и приемането на консенсус за полуколичествена оценка на TILs, която да е приложима в диагностичната практика и да има предиктивна стойност.

VI. ИЗВОДИ:

1. Тройно негативните карциноми на гърдата се срещат по-често след 50 годишна възраст, предимно във втори клиничен стадий, най-често са инвазивни дуктални карциноми от неспециален тип, показват ниска степен на диференциация и имат висока пролиферативна активност.

2. Високите стойности на TILs, CD8 и FOXP3 в туморната тъкан на тройно негативните карциноми на гърдата се срещат по-често при по-млада възраст (под 50 г.) в сравнение с по-напредналата възраст (над 50 г.).

3. Високите стойности на TILs, CD8 и FOXP3 в туморната тъкан на тройно негативния карцином на гърдата се срещат при ниска степен на диференциация, висок пролиферативен индекс и някои хистологични варианти: дуктален инвазивен карцином от неспециален тип, метапластичен и медуларен карцином.

4. Клиничният стадий на тройно негативния карцином на гърдата корелира с преживяемостта без прогресия. Пациентите, диагностицирани в I и II клиничен стадий имат по-добра преживяемостта без прогресия в сравнение с пациентите в III клиничен стадий.

5. При високи стойности на TILs, CD8 и FOXP3 в туморната тъкан на тройно негативните карциноми на гърдата, преживяемостта на пациентите без прогресия е по-висока в сравнение с ниските нива на TILs.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научни приноси с оригинален характер

- Осъществена е комплексна клиничко-морфологична и имунохистохимична характеристика на имунната реакция при тройно негативни карциноми на гърдата.
- Извършен е количествен софтуерен анализ на TILs, CD8 и FOXP3 с оглед изясняване на прогностичната им стойност.

Научни приноси с практическо-приложен характер:

- Определен е профилът на пациентите с тройно негативен карцином на гърдата.
- Едновременно е анализирана експресията на TILs, CD8 и FOXP3 във връзка клиничко-морфологичните параметри при тройно негативните карциноми на гърдата.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- Dieci MV, Tsvetkova V, Griguolo G, Miglietta F, Mantiero M, Tasca G, Cumerlato E, Giorgi CA, Giarratano T, Faggioni G, Falci C, Vernaci G, Menichetti A, Mioranza E, Di Liso E, Frezzini S, Saibene T, Orvieto E, Guarneri V. Androgen Receptor Expression and Association with Distant Disease-Free Survival in Triple Negative Breast Cancer: Analysis of 263 Patients Treated With Standard Therapy for Stage I-III Disease. *Front Oncol.* 2019 Jun 6;9:452.
- Василена Цветкова. Обзор на измененията в молекулярната класификация на карцинома на гърдата и в частност на тройно негативните карциноми на млечната жлеза. *Варненски медицински форум*, бр. 2, 2019, стр. 80-87
- Василена Цветкова Аденосквамозен карцином на гърдата със сириноматозна компонента – метастази в регионални лимфни възли. *Варненски медицински форум*, бр. 2, 2019, стр. 88-90