

Медицински Университет - Плевен

Факултет „Медицина“

Катедра „Патологоанатомия“

д-р Полина Дамянова Димитрова

**Морфологични и имунохистохимични аспекти от
антитуморния имунен отговор при различни
субтипове карцином на гърда**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

***за придобиване на образователна и научна степен
„Доктор“***

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.1. Медицина
Докторска програма: „Патологоанатомия и цитопатология“

Научен ръководител – проф. д-р Савелина Любенова Поповска д.м.н.

Официални рецензенти:

Доц. д-р Иван Недков Иванов, д.м.

Проф. д-р Николай Димитров Хаджиолов д.м.н.

Плевен 2022

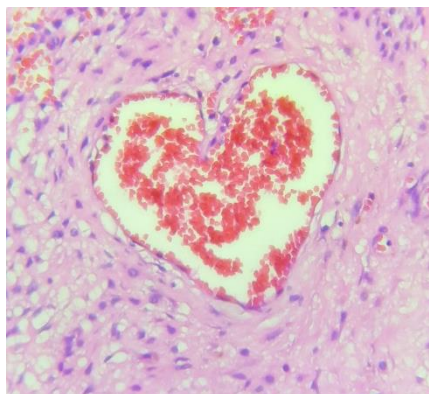
Дисертационният труд е написан на 206 стандартни печатни страници. Материалът е онагледен с 41 фигури, 27 таблици, 9 микрофотографии и 4 приложения.

Използваните литературни източници включват 295 заглавия – 3 на кирилица и 292 на латиница.

Авторът е редовен докторант към катедра „Патологоанатомия”, Факултет по Медицина, Медицински университет – Плевен.

Забележка: номерацията на фигурите и таблиците не отговаря на тази в дисертационния труд.

Дисертационният труд е обсъден и определен за публична защита на разширен Катедрен съвет на катедра „Патологоанатомия”, Факултет по Медицина, Медицински университет – Плевен, състоял се на 30.08.2022 г.



„Художник не е този, който се вдъхновява, а онзи, който вдъхновява другите“

Салвадор Дали

С огромна благодарност на моето семейство и на моят научен ръководител – за вдъхновението, подкрепата и търпението по време на научната ми работа!

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 11.11.2022 г. от 13:00 часа в зала „Амброаз Парс“ на МУ-Плевен.

Научно жури в състав:

Председател:

Доц. д-р Иван Недков Иванов, д.м.

Членове:

Проф. д-р Николай Димитров Хаджиолов д.м.н.

Доц. д-р Деян Людмилов Дженков, д.м.

Доц. д-р Юлиан Руменов Ананиев, д.м.

Доц. д-р Ангел Данчев Йорданов, д.м.

Резервни членове:

Проф. д-р Веселин Тодоров Беловежков, д.м.

Доц. д-р Страхил Асенов Страшилов, д.м.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ-Плевен (www.mu-pleven.bg) и са на разположение на интересуващите в Научен отдел на Факултет по Медицина, МУ Плевен.

	СТР.
СЪДЪРЖАНИЕ	
I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
1. Цел на изследването	6
2. Задачи	6
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
1. Качествен метод	8
2. Морфологичен метод	9
3. Статистически метод	16
IV. РЕЗУЛТАТИ	17
V. ОБСЪЖДАНЕ	68
VI. ИЗВОДИ	82
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	87
VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ	88
IX. ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, КУРСОВЕ И ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	92

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА:

ИО - имунен отговор
ИС – имунна система
ИТ – интратуморни лимфоцити
ИХХ – имунохистохимия/имунохистохимичен метод
КГ - карцином на гърда
ЛВ – лимфен възел
ЛВИ – лимфо-васкуларна инвазия
ЛПКГ - Лимфоцит-предоминиращ карцином на гърда
ПСТ - процентното съотношение на тумора
РМЖ - рак на млечна жлеза
СЗО – Световна здравна организация
СТ – стромални лимфоцити
ТИЛ - тумор-инфилтриращи лимфоцити
ТН - тройно негативен карцином на гърда
ФФПВ - формалин фиксирани парафин включени тъканни материали
ХЕ – хематоксилин - еозин
ЦТЛ - цитотоксични Т лимфоцити
CD - cluster of differentiation
СК - Cytokeratin /цитокератин
CTLA-4 - cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4
DAB - diaminobenzidine
ECIS - European Cancer Information System
ER - Estrogen receptor/ рецептор за естроген
Foxp3 - Forkhead Box Protein 3
G - grade/грейд/степен на диференциация
HER2 - Human epidermal growth factor receptor 2
HPF – high power field/голямо увеличение
HRP - Horseradish Peroxidase
ISH - In situ hybridization
LumA – Luminal A breast cancer
LumB – Luminal B breast cancer
MW - микровълнова фурна
NST - no special type/„неспециален тип“
PD-1 - Programmed cell death-1
PD-L1/PD-L2 - Programmed cell death ligand 1/2
PR – progesterone receptor/ рецептор за прогестерон
Th - T helper /Т хелпер
TNM - Tumour, node, metastasis
Treg - regulatory T /регулаторни Т лимфоцити

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Понастоящем съществуват противоречиви данни за ролята на тумор-инфилтриращите лимфоцити (ТИЛ) в локалния антитуморен имунитет и за значението им относно прогнозата при пациенти с карцином на гърда (КГ). Не е напълно изяснен и ефекта от взаимодействието на ТИЛ с туморните клетки, за значението на имунните "checkpoint" пътища в регулацията на имунния отговор (ИО).

Сложността на проблема се дължи на хетерогенността на първичния тумор при тази неоплазма, на нееднородния клетъчен състав на възпалителния инфилтрат, нееднаквото разпределение на имунните клетки в различните области на тумора и при отделните субтипове КГ. Различните групи КГ, вкл. дефинираните молекулярни типове – Luminal A и B (LumA и LumB), Базален/тройно негативен (ТН) и Human epidermal growth factor receptor 2 (HER 2) обогатен, се характеризират с различни молекулярни и генетични алтерации, имат различна прогноза и отговор към терапия. Базалният подвид, експресиращ базалноклетъчни цитокератини, се свързва с най-неблагоприятна прогноза и генетична нестабилност, поради множеството налични мутации при него. От друга страна мутационните продукти се възприемат от организма като неоантигени, индуциращи ИО и това превръща тези типове тумори в по-имуногенни неоплазми, характеризиращи се с по-изразен възпалителен инфилтрат в стромата, в тумора и в не-неопластичната тъкан. Но дали присъстващите имунни клетки са активни с ефективен антитуморен ИО или са потиснати в резултат на взаимодействие както по между си, така и с туморните клетки, или поради участие на имунни инхибиторни пътища (напр. свързани с Programmed cell death-1 (PD-1), Programmed cell death ligand 1/2 (PD-L1/PD-L2) и cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) молекулите) са факти, изясняването на които ще увеличи възможността за желана имунна модулация. Ролята на CTLA-4 и PD-1 / PD-L1, участващи в инхибиторните имунни клетъчни пътища и процеса на програмирана клетъчна смърт, не е добре проучена при различните подвидове КГ. През последните години инхибитори, насочени към тези молекули, са показали обещаващи резултати при различни видове неоплазми, като е установена корелация с тяхната туморна и/или имунна експресия и ефекта от терапия. Реактивиране на латентни ТИЛ чрез прилагане на имунотерапия, вкл. CTLA-4 и PD-L1/ PD-1 – инхибитори или специфична таргетна терапия, обещава нова стратегия в лечението и при рак на гърда.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел на изследването

Базирайки се на литературните данни за клиничко-епидемиологичната значимост на КГ, хетерогенността на тази неоплазма и противоречивата роля на ИС при него, си поставихме за цел да проучим някои морфологични и имунохистохимични аспекти от антитуморния имунен отговор при различни субтипове рак на млечна жлеза (РМЖ).

2. Задачи

За изпълнение на основната цел си поставихме следните задачи:

2.1. При селектираните случаи и при сурогатните молекулярни субтипове КГ:

- да се установи състава на ТИЛ, чрез определяне експресията на CD20, CD3, CD4, CD8 и FoxP3, маркиращи съответно В-, Т- и субтиповете Т-лимфоцити – хелперни, цитотоксични и регулаторни клетки;
- да се определи количеството на стромални (СТ) ТИЛ и на интратуморните (ИТ) и СТ ТИЛ подвидове;
- да се проучи експресията на PD-L1 и CTLA-4 при туморните и имунни (СТ и ИТ) клетки;
- да се установят базален субтип карциномите чрез проучване експресията на базалноклетъчни цитокератини - CK5/6 и CK17;
- да се апробира и валидира методика за определяне в рутинната дейност на ТИЛ подвидовете - В-, Т- и Т- хелпери, цитотоксични и регулаторни, имунните „checkpoint“ молекули PD-L1 и CTLA4 и базален фенотип при КГ.

2.2. При изследваните случаи с КГ и при отделните субтипове - LumA, LumB, HER2 и TN, да се определи честотата на:

- проучвани епидемиологични (пол, възраст, 5-годишна обща преживяемост) и клиничко-патологични характеристики [тип на хирургична интервенция, клиничен стадий, хистологична степен на диференциация (грейд - G), размер и хистологичен вариант на тумора, базален субтип, статус на аксиларни лимфни възли, лимфоваскуларна инвазия (ЛВИ)];
- проучвани имунни фактори (% ТИЛ; ИТ и СТ CD3, CD4, CD8, CD20 и FoxP3 лимфоцити; % туморни клетки позитивни за PD-L1 и CTLA4; % ИТ и СТ имунни клетки позитивни за PD-L1 и CTLA4).

2.3. Да се потърсят корелации между изследваните показатели (епидемиологични, клиничко-патологични и имунни) в цялата извадка и при отделните субтипове КГ.

- 2.4. Да се потърсят разлики между субтиповете КГ по отношение на изследваните показатели (епидемиологични, клинико-патологични и имунни).
- 2.5. Да се проучат допълнителни аспекти от антитуморния ИО (в цялата извадка и/или при различните подтипове КГ) като се определи:
- предпочитаната локализация (интратуморна и/или стромална) на подвидовете лимфоцити и PD-L1 и CTLA-4 позитивните имунни клетки
 - преобладаващ подвид лимфоцити – В или Т и субтип Т
 - имуногенност на субтиповете КГ
- 2.6. Да се проучи прогностичната стойност (при включените в изследването пациенти с КГ) на:
- ТИЛ и техните подвидове;
 - позитивността за имунните ”checkpoint” молекули PD-L1 и CTLA4 при туморните и имунни клетки;
 - базален фенотип на карциномите.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

- 1. Качествен метод** - Анализ на архивни информационни масиви с хистологични данни и преглед на архивни тъканни проби.

Пациенти

Ретроспективно са анализирани 100 пациенти с морфологично доказан първичен инвазивен КГ, групирани в четири молекулярни сурогатни субтипа (Luminal A и Luminal B- подобни, HER2-позитивен и тройно негативен - ТН), по 25 случая всеки.

Участниците в изследването са включени на произволен принцип, от архивни списъци на отделение по Обща и клинична патология към УМБАЛ "Г. Странски" -Плевен, на база селекция на тумори от архивни материали, при които е налично достатъчно количество тъканен материал и изследването не застрашава по никакъв начин неговото увреждане и изчерпване.

До събирането на предварително определения брой пациенти, са прегледани архивната документация и биопсичните проби на общо 290 случая с РМЖ, диагностицирани в периода 05.01.2011- 31.12.2014 г.

Всички селектирани за проучването пациенти са без данни за възпалителни заболявания или такива, асоциирани с възпалителна реакция в гърдата. Изключени са случаите с проведена предоперативна антитуморна терапия, с липсващ или застрашен от изчерпване архивен тъканен материал.

Демографските данни (пол, възраст, 5-годишна обща преживяемост) и проучваните клинично-патологични фактори (тип на хирургична интервенция, клиничен стадий, G, размер и хистологичен вариант на тумора, статус на аксиларни лимфни възли, ЛВИ) са систематизирани и регистрирани на анкетна карта, специално проектирана за изследването.

Пациентите са включени в:

1. Научно-изследователски проект № 19/2015 - „Проучване на разпространение, локализация и имунофенотип на тумор-инфилтриращите лимфоцити при различните молекулярни субтипове карцином на гърда“, МУ-Плевен;
2. Научно-изследователски проект № 11/2018 – „Проучване на експресията на имунните чекпойнт - инхибитори PD - L1 и CTLA – 4 при различните молекулярни субтипове карцином на гърда“, МУ-Плевен;
3. Научно-изследователски проект № D2/2020 - „Проучване експресията на BRCA1 и BRCA2 свързани протеини при различни молекулярни субтипове карцином на гърда, определени с имунохистохимичен метод“, МУ-Плевен;
4. European Regional Development Fund through the: Operational Programme "Science and Education for Smart Growth", with a leading organization MU-Pleven, grant no BG05M2OP001-1.002-0010-C01 (2018-

2023)/"Център за компетентност по персонализирана медицина, 3Д и телемедицина, роботизирана и минималноинвазивна хирургия" с рег. № BG05M2OP001-1.002-0010, финансиран от „Оперативна програма наука и образование за интелигентен растеж“

Проектите са одобрени от етичната комисия към МУ-Плевен. Всички данни за пациентите са обобщени и кодирани, а тъканните материали са изследвани без необходимост от идентификация на изследваните случаи.

Поради недостатъчен обем и застрашаване от изчерпване (парафиново блокче с дебелина на тъканния материал <1мм) на изследваните в проект №19/2015 архивни тъканни материали, за провеждане на проекти №11/2018, D2/2020 и BG05M2OP001-1.002-0010, при 26 от селектираните случаи са избрани нови тъканни проби.

2. Морфологичен метод – Рутинно изследване, позволяващо диагностициране, класифициране, градиране и стадиране на туморите на база определяне на тъканни и клетъчни структурни характеристики в проучваната проба.

2.1. Хистологично (тъканно) изследване (от хистос – тъкан) - провеждано главно с диагностична цел.

Тъканта, взета по време на хирургична интервенция, т. нар. биопсия, се обработва в последствие в патологична лаборатория, където след фиксиране (рутинно в 10% буфериран формалин) и допълнителни процедури, се включва в парафиново блокче. Обучен персонал прави тъканни срези от него, с дебелина от 2 до 5 микрона. Монтирани върху предметни стъкла и след последващо рутинно оцветяване (с ХЕ) се получават хистологични препарати за наблюдение под светлинен микроскоп от лекар – патолог. Той предоставя хистологичен резултат, включващ описание на наблюденията си и базирана на тях диагноза.

2.2. Имунохистохимично изследване

В случаите, когато първоначалната хистологична оценка не позволява поставянето на точна диагноза, вкл. причисляване на тумора към определена класификация и за определяне на туморна клетъчна активност, се препоръчва изследване на пробата с допълнителни методи, вкл. ИХХ-ият. Последният е високо ефективен и утвърден в рутинната патологична практика. Базиран е на специфична реакция антиген-антитяло, позволяваща идентифициране на специфични клетъчни структурни компоненти.

2.3. Хистологично и ИХХ изследване (съобразено с препоръките, актуални към периода на проучването), приложени при анализ на селектираните случаи.

На прегледаните пациенти с КГ са оценени архивните препарати с оцветяване за ХЕ. Случаите с КГ са субтипизирани съгласно хистологичната класификация на Световната здравна организация (СЗО) (4^{то} издание). За градиране на инвазивните карциноми е използвана системата за степенуване на Нотингам (модифицирана схема на Elston & Ellis, 1991). Туморите са стадираны съгласно 7-та ревизия на ТНМ-класификацията на Американския съвместен комитет по рак (American Joint Committee on Cancer - AJCC) и Международния съюз за контрол на рака (Union for International Cancer Control - UICC) от 2010г.

На прегледаните 290 случая са оценени архивните препарати с оцветяване за ER, PR, HER2 и Ki 67 след анализ на които, са определени клинично-патологичните сурогатни молекулярни субтипове КГ - Luminal A и Luminal B- подобни, HER2-позитивен и ТН, съгласно международния експертен консенсус за първично лечение на ранен КГ St Gallen 2013 – **Таблица 1.**

Микроскопската оценка на ER, PR и HER-2 /neu е направена по препоръките на American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidelines (ASCO/CAP guidelines). Интерпретацията на ИХХ - резултата за Ki67 е съгласно препоръките на Работната група за КГ.

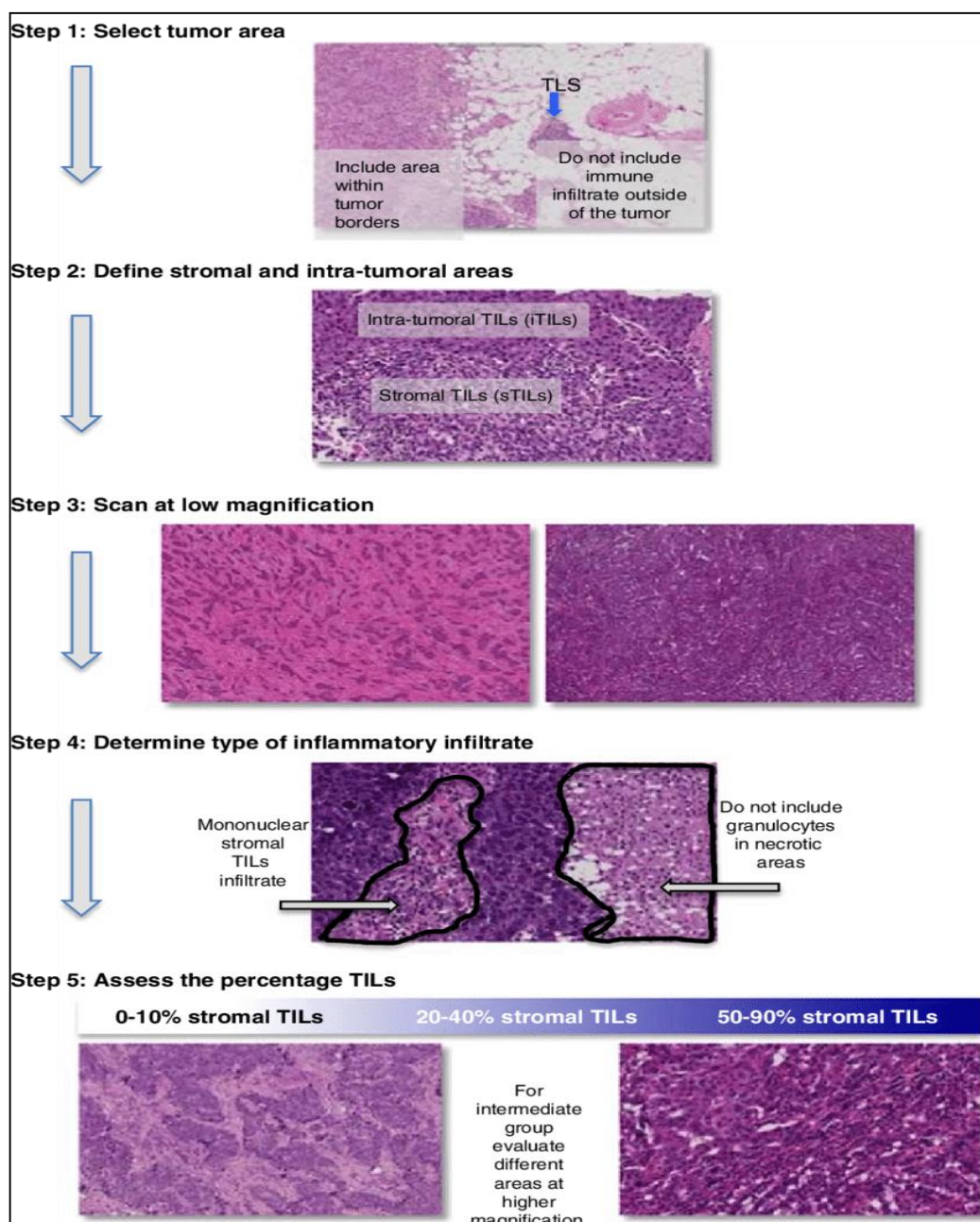
Таблица 1. Имунохистохимичен метод, приложен за дефиниране на сурогатни молекулярни субтипове КГ

Фенотип	Клинично-патологична дефиниция
Luminal A-подобен	ER+,PR+($\geq$ 20%), HER2-,Ki67<14%
Luminal B-подобен - HER2 негативен	ER+, HER2- и поне едното: PR-/<20%, Ki67 $\geq$ 14%
Luminal B-подобен- HER2 позитивен	ER+/PR+,ER+/PR-;ER-/PR+, HER2+ (ИХХ: HER2=3+; ISH+) и всяка стойност на Ki67
HER2-позитивен (нелуминален)	ER-, PR-, HER2+, всеки % Ki67
Тройнонегативен (ТНКГ)	ER-, PR-, HER2-, всеки % Ki67

След прилагане на включващите и изключващи критерии са селектирани 100 пациента, разпределени в посочените четири категории, по 25 случая във всяка група.

За всеки участващ в изследването пациент е избран по един хистологичен препарат за микроскопска и компютър-асистирана оценка (Uthscsa image tool v. 3.00) на процент стромални ТИЛ% при рутинно оцветени (с ХЕ) тъканни срези. Базирайки се на препоръките на международната работна група (International TILs Working Group 2014) – **Фигура 1**, включените в проучването тумори са субтипизирани като: КГ с ТИЛ >50% (лимфоцит-предоминиращи); КГ с налични ТИЛ, но $\leq$ 50 %;

„тумори - пустини“, при които не се установяват стромални ТИЛ.



Фигура 1. Стандартизиран подход за хистологична оценка на %ТИЛ при КГ, оцветяване с ХЕ

От съответното парафиново блокче на избрания хистологичен препарат при всеки пациент са изготвени препарати за ИХХ оценка на ТИЛ подвидове, за определяне експресията на имунни ”checkpoint” молекули – PD-L1 и CTLA4, както и за отчитане позитивността на базални цитокератини – CK5/6 и CK17 (използвани консумативи - Таблица 2).

Таблица 2. Използвани консумативи

Първично антитяло	Клон	Производител	Разреждане	Визуализираща система	Техника	Клетъчна/молекулна специфичност
CD3, Rb	Polyclonal	Dako, Agilent, Glostrup, Denmark	RTU	EnVision™ FLEX, High pH, (Link), DAKO	AutostainerLink 48, DAKO	Нормални и неопластични Т- лимфоцити
CD4, Mo	4B12, Isotype: IgG1, kappa	Dako, Agilent, Glostrup, Denmark	RTU	EnVision™ FLEX, High pH, (Link), DAKO	AutostainerLink 48, DAKO	Нормални Т-хелперни клетки
CD8, Mo	C8/144B, Isotype: IgG1, kappa	Dako, Agilent, Glostrup, Denmark	RTU	EnVision™ FLEX, High pH, (Link), DAKO	AutostainerLink 48, DAKO	Нормални цитотоксични Т- клетки
CD20, Mo	L26, Isotype: IgG2a, kappa	Dako, Agilent, Glostrup, Denmark	RTU	EnVision™ FLEX, High pH, (Link), DAKO	AutostainerLink 48, DAKO	Нормални и неопластични В- лимфоцити
FoxP3, Mo	236A/E7, Isotype: IgG1, kappa	Bioscience, San Diego, USA	1:100	EnVision™ FLEX, High pH, (Link), DAKO	AutostainerLink 48, DAKO	Подвид нормални регулаторни Т-лимфоцити
PD-L1, Mo	22C3, Isotype: IgG1, kappa	Dako, Agilent, Glostrup, Denmark	1:50	EnVision™ FLEX, High pH, (Link), DAKO + Реагент за сигнална амплификация - EnVision FLEX+ Mouse (LINKER)	AutostainerLink 48, DAKO	PD-L1 протеин, експресиран при някои туморни и имунни клетки
CTLA-4, Mo	F-8, Isotype: IgG1, kappa	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:100	EnVision™ FLEX, High pH, (Link), DAKO + Реагент за сигнална амплификация - EnVision FLEX+ Mouse (LINKER)	AutostainerLink 48, DAKO	CTLA-4 протеин, експресиран при някои туморни и имунни клетки
CK5/6, Mo	D5/16 B4, Isotype: IgG1, kappa	Dako, Agilent, Glostrup, Denmark	RTU	ultraVIEW Universal DAB Detection Kit	BenchMark, Ventana	Базалноклетъчни цитокератини 5 и 6
CK17, Mo	E3, Isotype: IgG2b, kappa	Dako, Agilent, Glostrup, Denmark	RTU	ultraVIEW Universal DAB Detection Kit	BenchMark, Ventana	Базалноклетъчен цитокератин 17

За детекция на повечето антитела е използвана визуализиращата система EnVision™ FLEX, High pH, (Link), DAKO. Тя е предназначена за ИХХ оцветителен метод. Има висока чувствителност за визуализация на свързалите се към съответните антигени първични антитела. Системи с двойна връзка (Link) открива първични миши и заешки антитела и реакцията се визуализира от 3,3'-diaminobenzidine (DAB) + хромоген. Комплектът включва реагент за блокиране на пероксидаза (EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent), EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen, субстратен буфер - EnVision™ FLEX Substrate Buffer, разтвор за таргетно антигенно разкриване с високо pH (50x Tris буфер, pH 9) EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) и буфер за промиване - EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x).

EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) е допълнителен реагент, използван в комбинация с другите компоненти на визуализиращата система (при детекция на PD-L1 и CTLA-4), позволяващ усилване на сигнала на първичните миши антитела и реакцията, визуализирана от DAB хромоген.

Визуализираща система UltraVIEW Universal DAB Detection Kit (използвана за детекция на базалноклетъчните цитокератини CK17 и CK5/6) също е предназначена за ИХХ оцветителен метод. Представява комплекс от реагенти, не съдържащи биотин, с висока чувствителност за визуализация на свързалите се към съответните антигени първични антитела. Системата открива първични IgG и IgM миши и заешки антитела чрез коктейл от вторични антитела, белязани с HRP (Horseradish Peroxidase) ензими. Този комплекс се визуализира с DAB хидрогенпероксид и хромоген. HRP- компонентата и протичане на реакцията без биотин подобряват чувствителността и специфичността на ИХХ изследването, като се подобрява кинетиката на реакцията и се намалява възможността за фоново оцветяване, възникващо при експозиция на биотин. Комплектът включва 5 реагента: DAB Inhibitor, HRP Multimer, DAB Chromogen, DAB H₂O₂, Copper.

От ФФПВ тъканни материали са изготвени тъканни срези с дебелина 2-4µm, поставени върху адхезивни стъкла. Всеки от изследваните 100 пациенти е тестван с всяко едно от деветте първични антитела и визуализираща система, при използване на съответна автоматизирана система AutostainerLink 48, DAKO или BenchMark, Ventana.

Всички работни процедури (вкл. депарафиниране и рехидратиране на тъканните срези; антигенно възстановяване, индуцирано от топлина; инкубация с първично антитяло и с детекционна система; визуализация на комплекса и т.н.) при провеждане на ИХХ анализа са изпълнени съгласно протоколите за съответните антитела на фирмата-производител.

При всеки оцветителен рън са използвани външни контролни тъкани за установяване на функционалност на оцветителните реагенти, оценка на качеството на оцветителната реакция, определяне на експресионния модел

при използваните антитела и с цел оптимизиране на ИХХ работните процедури, преди прилагането им при изследваните случаи – **Таблица 3.**

Таблица 3. Използвани контролни тъкани и установен ИХХ експресионен модел при съответните антитела

Първично антитяло	Контролна тъкан	Клетъчна локализация	Клетъчна позитивност
CD3	тонзила	мембранна и/или цитоплазмена	Умерена до силна експресия в Т – клетки от интерфоликуларните области и в герминативните центрове; липсва експресия в В- клетките
CD4	тонзила	мембранна	Умерена до силна експресия в Т-хелперни клетки на интерфоликуларните области и слаба до умерена в макрофаги от герминативните центрове;
CD8	тонзила	мембранна и цитоплазмена	Умерена до силна експресия в Т-клетки от интерфоликуларните области
CD20	тонзила	мембранна	Умерена до силна експресия в В-клетки от мантелна зона и герминативни центрове; липсва експресия в сквамозни епителни клетки
FoxP3	тонзила	ядрена	Умерена експресия в Т-регулаторни клетки от интерфоликуларните области и в герминативните центрове
PD-L1	тонзила	мембранно	Силна експресия в сквамозен епител от крипти; слаба до умерена експресия в макрофаги от герминативни центрове; липсва експресия в покривен сквамозен епител, ендотелни клетки и фибробласти
CTLA4	апендикс	цитоплазмено	Жлезен епител и лимфоидни клетки; лимфен възел - цитоплазмено и/или мембранно оцветяване в лимфоидни клетки от герминативен център
CK5/6	тонзила	цитоплазмена	Умерена и силна експресия в сквамозни епителни клетки
CK17	кожа	цитоплазмена и/или мембранна	Умерена до силна експресия в миепители клетки на потни жлези, липса на експресия в сквамозни и жлезни епителни клетки

Отчитането на позитивни ИХХ оцветени клетки се извърши независимо от двама патолози, които не са били осведомени за клинично-патологичните данни на изследваните случаи.

2.3.1. Микроскопска оценка на CD3, CD4, CD8, CD20 и FoxP3 експресия при имунни клетки

Имунофенотипизираните лимфоцити (отделно интартуморни и стромални) са преброени (компютър асистирано) и полуколичествено градиранни. За гранична се прие средната стойност на резултатите от изследваните случаи с КГ.

При микроскопската оценка на подвидовете ТИЛ-CD3, CD4, CD8 и CD20 позитивните лимфоцити, са отчетени в тумора и стромата на пет произволно избрани полета, при увеличение x40 (HPF). Резултати със среден брой до 25 ИХХ-позитивни клетки се приеха за ниска (low), а 25 и повече положителни клетки - за висока (high) стойност на съответния подвид ТИЛ. FoxP3-позитивните лимфоцити са определени полуколичествено в най-малко 10 полета от туморната площ, на голямо увеличение. Наличието на среден брой <15 и ≥ 15 FoxP3 ИХХ -

положителни клетки са отчетени съответно като ниска и висока FoxP3 експресия.

При липсата на ИХХ позитивни клетки се прие негативен резултат.

2.3.2. Микроскопска оценка на PD-L1 и CTLA-4 ИХХ - експресия при туморни и имунни клетки

Проучена е ИХХ експресията на туморните и имунни клетки в молекулярните субтипове КГ, като са определени: локализация на клетъчната експресия (цитоплазмена/мембранна/ ядрена); степен на интензивност - 1+ (слаба), 2+ (умерена), 3+ (силна) и процент на позитивни за PD-L1 и CTLA-4 туморни клетки; локализация (интратуморна и стромална) и степен на инфилтрация на първичния тумор от позитивни за PD-L1 и CTLA-4 имунни клетки.

Експресията при туморните клетки се оцени на целия тъканен срез чрез определяне на процент жизнеспособни туморни клетки ("процентното съотношение на тумора" - ПСТ), показващи различна интензивност, като при отчитането на позитивност са включени частичното или пълно мембранно оцветяване за PD-L1 и цитоплазменото за CTLA-4. Резултатите са интерпретирани като: негативен с липса на PD-L1 експресия (ПСТ <1%), позитивен с ниска (ПСТ 1-49%) или висока (ПСТ $\geq$ 50%) PD-L1 експресия; негативен с липса на CTLA4 експресия или при наличие само на туморни клетки с интензивност 1+; слабо позитивен със CTLA4 експресия с интензивност 2+ и/или 3+ в 1-49% туморни клетки; силно позитивен със CTLA4 експресия с интензивност 2+ и/или 3+ в >50 % туморни клетки.

Тумор-асоциираните имунни клетки, показващи частично или пълно мембранно PD-L1 оцветяване с интензивност 1+, 2+ и/или 3+, умерена и силна мембранна и/или цитоплазмена лимфоцитна ИХХ експресия за CTLA-4, са отчетени отделно в тумора и стромата на целия тъканен срез. Резултатите са причислени към категориите: 0 (негативен, с липса на позитивни имунни клетки); ниска (low) и висока (high) концентрация на PD-L1 и CTLA-4 позитивни имунни клетки, след определяне каква част (площ/процент) от цялата туморна област е заета с положителни интратуморни и стромални имунни клетки. За гранична се прие средната стойност на резултатите от изследваните случаи с КГ (1% за стромални и интратуморни PD-L1+ имунни клетки; 1% за интратуморни и 2% за стромални CTLA4+ имунни клетки).

2.3.3. Микроскопска оценка на CK5/6 и CK17 експресия при туморните клетки

Проучена е ИХХ-ната експресия при туморните клетки в молекулярните субтипове КГ, като са определени: локализация на клетъчната експресия (цитоплазмена / мембранна / ядрена); степен на

интензивност - 1+ (слаба), 2+ (умерена), 3+ (силна) и процент на позитивни за CK5/6 и CK17 туморни клетки.

Експресията при туморните клетки се оцени на целия тъканен срез чрез определяне на процента жизнеспособни туморни клетки, показващи различна интензивност. За базален субтип карциноми се приеха тези, при които се установи ИХХ експресия (цитоплазмена за CK5/6; цитоплазмена и/или мембранна за CK17) при туморните клетки и за двата базалноклетъчни цитокератини - CK5/6 и CK17 (при гранична стойност $\geq 60\%$) или само за единия, но при наличие на $\geq 80\%$ позитивни туморните клетки, с умерена или силна интензивност, при оценка на целия тъканен срез.

3. Статистически метод

Анализиране на събраните и обобщени данни, с приложение на подходящи за целта параметрични и непараметрични статистически тестове.

3.1. Статистически анализ, приложен в настоящото изследване

Получените резултати са въведени и обработени софтуерно със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 25.0 и MedCalc Version 14.8.1. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието $p < 0.05$.

Приложени са следните методи:

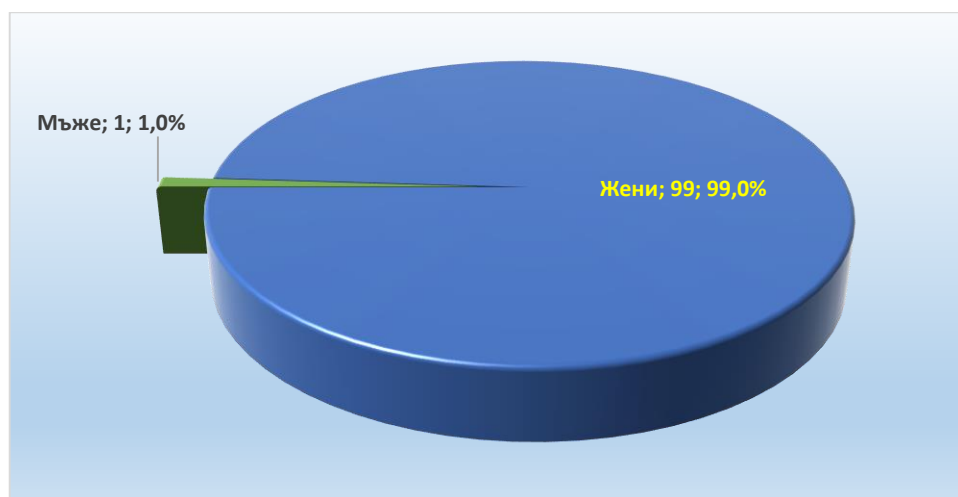
1. Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.
2. Вариационен анализ – за оценка на характеристиките на централната тенденция и статистическо разсейване.
3. Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.
4. Сравняване на относителни дялове.
5. Точен тест на Фишер и тест χ^2 – за проверка на хипотези за наличие на връзка между категоријни променливи.
6. Корелационен анализ (Kendall's tau b) – за проверка на хипотези за наличие на зависимост между категоријни променливи.
7. Метод на Каплан- Майер – за оценка времето до настъпване на изследвано събитие (Kaplan-Maier Product Limit Estimation of the Survival Function). Методът е подходящ за сравнително малки по обем проучвания. Проследява група от n субекти с различно време на включване в проучването и фиксира времето до настъпване на събитието.

IV. РЕЗУЛТАТИ

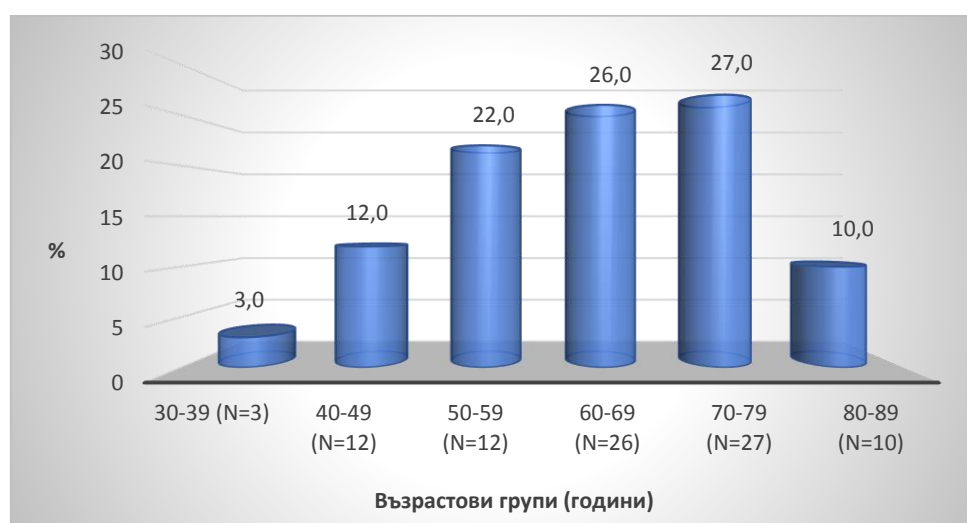
1. Процентно разпределение на проучваните показатели (епидемиологични, клинико-патологични и имунни) при изследваните случаи (n=100) и при разпределените по групи (отделни молекулярни подтипове КГ - LumA, LumB, HER2, TH, всеки с n=25).

1.1. Клинико-патологични и епидемиологични данни

В проучването са участвали 100 човека със средна възраст $63,90 \pm 12,17$ години в диапазона 35-87 год. От тях 99 (99%) са жени и 1 (1%) е мъж (**Фигура 2**). Възрастовата група с най-голяма численост (27%) е 70-79 години, следвана от 60-69 години с 26%, а с най-малка (3%) – 30-39 години (**Фигура 3**).



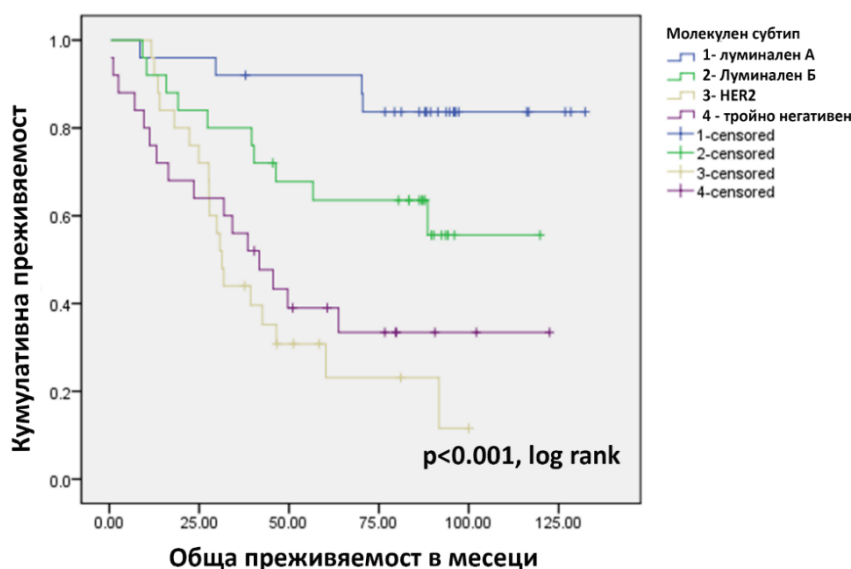
Фигура 2. Честотно разпределение на участниците в проучването по полова принадлежност



Фигура 3. Разпределение на участниците в проучването по възрастови групи

На **Таблица 4** се вижда, че:

- По-голямата част от изследваните пациенти (84%) са на възраст над 50 г. С най-висок относителен дял (96%) на тази възраст са имащите субтип ТН, следвани от субтип HER2 с 84%. При пациентите под 50 години най-често (24% от случаите) се установява субтип LumA, следван от субтип LumB (в 20%);
- Имащите 5-годишна преживяемост в цялата извадка са 55%, с най-висок относителен дял (92%) в групата със субтип LumA, следвани от тези със субтип LumB с 64% и ТН с 36%, а най-малко са от субтип HER2 (28%);
- На **Фигура 4** се вижда, че има съществено различие във функциите на кумулативната преживяемост на имащите различна степен на диференциация:
 - функцията на кумулативната преживяемост на пациентите с HER2 позитивни тумори свършва най-рано и на най-ниско ниво, в сравнение с тези с ТН, LumA и LumB карциноми;



Фигура 4. Функция на общата (вкл. 5 – годишната) преживяемост според показателя молекулярен субтип КГ

- По отношение на хистологичния грейд най-много са пациентите с ниска степен на диференциация, G3 – 48% за цялата извадка, като тя се установява предимно при субтипове HER2 и ТН (определена в 72% от случаите при тях). Следват G2 карциномите – 41% за цялата извадка, с максимален процент (68%) при субтип LumA, следван от субтип LumB с 44% и минимален процент (24%) при субтип HER2. Най-малко са пациентите имащи G1 неоплазми – 11% за цялата извадка, с максимален процент (32%) при субтип LumA, следван от субтип LumB с 8% и минимален процент (0%) при субтип ТН;
- Преобладаваща част от случаите са във II-ри клиничен стадий, 56% за цялата извадка, определен в максимален (64%) брой пациенти с ТН и в

минимален (48%) с LumA субтип. На второ място - 27% от цялата извадка, са във III - ти клиничен стадий –с максимален процент (по 32%) при субтипове LumB и HER2, а минимален при субтип LumA. В I – ви клиничен стадий са 16% от изследваните случаи с КГ, като преобладаващата част от тях са LumA субтип (36%). Само при един пациент (1%) от цялата извадка е определен IV – ти клиничен стадий, като той е с HER2 субтип;

- При болшинството от пациентите (53%) не са установени метастази в аксиларни лимфни възли, като при тези със субтип LumA процентът е най-висок (76%), следвани от субтип TH с 64,0%. Най-голяма част на случаите с метастатични лимфни възли са със субтипове LumB и HER2 (по 64%);

- По отношение на лимфоваскуларната инвазия – отново преобладават пациентите с нямащи такава – 76% за цялата извадка, като най-често те са от групата на субтип LumA – 96%, следван от субтип TH със 76%. Най-висок процент на имащи лимфоваскуларна инвазия се наблюдава при субтип HER2 – 40%, следван от субтип LumB с 28%;

- 79% от пациентите в цялата извадка имат тумори с размер над 3 см, като най-много (по 88%) са със субтипове LumB и HER2. С най-висок процент (36%) на тумори ≤ 3 см са от групата на субтип LumA;

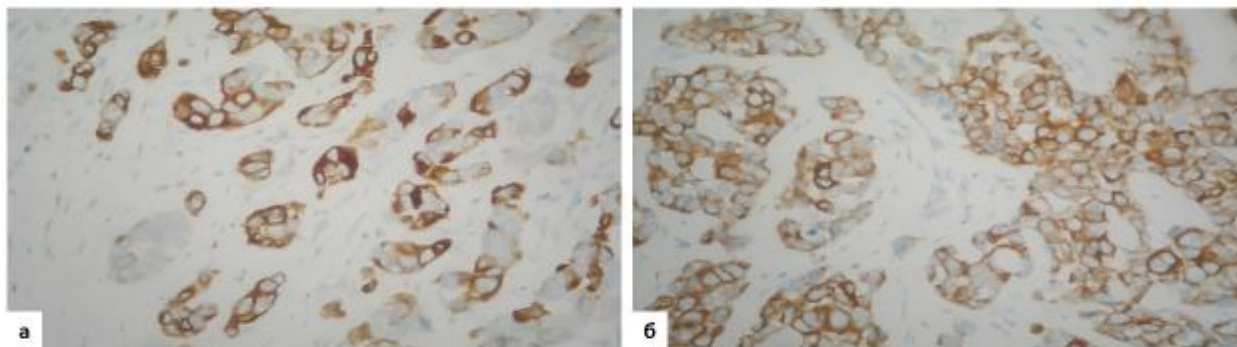
- От хистологичните типове с най-висок процент (80%) в цялата извадка е по special type/„неспециален тип“ (NST), следван от друг морфологичен тип с 11% [с включени карциноми: муцинозен (n=4); метапластичен (n=3); тубуларен (n=1), аденоидно-кистичен (n=1); с невроендокринни (n=1) и с медуларни (n=1) характеристики] и лобуларен карцином, с 9%. NST има най-голям относителен дял (92%) в групата на субтип HER2, лобуларен карцином - (20%) в групата на субтип LumB, а друг морфологичен тип (по 20%) - в субтипове LumA и TH.

- По отношение на разпределението на специалните морфологични типове сред молекулярните подвидове КГ, при TH се установяват 3 случая с метапластичен карцином, 1 пациент с аденоидно-кистичен карцином и 1 с медуларни характеристики; при HER2 позитивния субтип - 1 случай с муцинозен карцином, а останалите случаи са при LumA (3 броя муцинозни карциноми и по 1 брой тубуларен и с невроендокринни характеристики). В групата на LumB субтип не са включени специални хистологични варианти.

- Basal-like субтип – с пример визуализиран на **Микрофотография 1**, се определя в (18%) от изследваните случаи с КГ. Най-голямата част (48%) от тях се установява в групата на TH субтип, следван от HER2 с 12%, LumB с 8%, а най-малкият (4%) е при LumA субтип.

Таблица 4. Процентно разпределение на клинико-патологичните данни в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове КГ

Показател	Субтип LumA	Субтип LumB	Субтип HER2	Субтип TN	Цяла извадка
	%	%	%	%	%
Възраст (години)					
≤ 50	24,0	20,0	16,0	4,0	16,0
> 50	76,0	80,0	84,0	96,0	84,0
5 годишна преживяемост					
Не	8,0	36,0	72,0	64,0	45,0
Да	92,0	64,0	28,0	36,0	55,0
Grade					
G1	32,0	8,0	4,0	0,0	11,0
G2	68,0	44,0	24,0	28,0	41,0
G3	0,0	48,0	72,0	72,0	48,0
Клиничен стадий					
I	36,0	12,0	8,0	8,0	16,0
II	48,0	56,0	56,0	64,0	56,0
III	16,0	32,0	32,0	28,0	27,0
IV	0,0	0,0	4,0	0,0	1,0
Лимфни възли с метастази					
Не	76,0	36,0	36,0	64,0	53,0
Да	24,0	64,0	64,0	36,0	47,0
Лимфоваскуларна инвазия					
Не	96,0	72,0	60,0	76,0	76,0
Да	4,0	28,0	40,0	24,0	24,0
Туморен размер					
≤ 3 см	36,0	12,0	12,0	24,0	21,0
> 3 см	64,0	88,0	88,0	76,0	79,0
Оперативен материал					
Ексцизионна биопсия	28,0	12,0	24,0	24,0	22,0
Мастектомия	72,0	88,0	76,0	76,0	78,0
Хистологичен тип					
NST	68,0	80,0	92,0	80,0	80,0
Лобуларен карцином	12,0	20,0	4,0	0,0	9,0
Друг морфологичен подтип	20,0	0,0	4,0	20,0	11,0
Basal-like субтип					
Небазален	96,0	92,0	88,0	52,0	82,0
Базален	4,0	8,0	12,0	48,0	18,0



Микрофотография 1: ИХХ изследване с СК 17 (а) и СК 5/6 (б) при basal-like КГ, ув. x400

1.2. Данни за антитуморния имунен отговор

От Таблица 5, с резултати визуализирани на Микрофотографии 2-6 става ясно, че по отношение процентното разпределение на количеството и локализацията на ТИЛ подвидовете в цялата извадка и отделните молекулярни подтипове КГ:

- При ИТ CD3 Т-лимфоцити с най-висок процент (74%) в цялата извадка е ниската им концентрация, следвана от високата с 14%, а в 12% от случаите те не се установяват. Между имащите ниска концентрация с най-висок процент (по 80%) са субтипове LumA и HER2. При високата концентрация най-голям (28%) е относителният дял на пациентите със субтип ТН, следван от HER2 с 16%.

- При СТ CD3 Т-лимфоцити с най-висок процент (67%) в цялата извадка е високата концентрация, следвана от ниската с 31%. Между субтиповете КГ ниската концентрация се установява при най-висок процент (48%) от туморите с LumA субтип. При високата концентрация три от субтиповете - LumB, HER2 и ТН имат равен най-големия процент (по 72%);

- По отношение на ИТ CD4 Т-хелперни лимфоцити най-много (57%) в извадката са пациентите, при които те липсват, следвани от тези с ниска концентрация (35%). Между имащите ниска концентрация на първо място с 44% е субтип LumB, следван от субтип ТН с 40%. Висока концентрация се наблюдава в 8% от цялата извадка, само при субтип HER2 (32%);

- При СТ CD4 Т-хелперни лимфоцити с най-висок процент (82%) в цялата извадка е ниската концентрация, като тя се наблюдава в най-голяма част (по 84%) от случаите с LumA и LumB субтипове, следвани от останалите два субтипа с по 80%. При високата концентрация три от субтиповете LumB, HER2 и ТН имат по 8%, а LumA – 4%;

- ИТ CD8 Т - цитотоксични лимфоцити също в най-висок процент (70%) за цялата извадка имат ниска концентрация. Между имащите ниска концентрация с най-висок относителен дял (80%) е субтип HER2, следван от LumA със 72%. Високата концентрация се установява в 8% от цялата

извадка, най-често при субтип ТН (16%), следван от субтиповете LumB и HER2 с по 8%;

- Относно СТ CD8 цитотоксични лимфоцити – с най-висок процент (59%) в цялата извадка е ниската им концентрация, следвана от високата с 39%. Между имащите ниска концентрация с най-висок относителен дял (72%) е субтип LumA, следван от LumB с 60%. При високата концентрация най-големият процент (48%) е при субтип ТН, следван от субтип HER2 с 44%;

- В цялата изследвана извадка най-често (в 57%) се установява ниска концентрация на ИТ CD20 В-лимфоцити, като тя се определя в най-висок процент (76%) при случаите със субтип HER2, следван от субтип ТН (60%). Пациенти с висока концентрация на изследвания подвид лимфоцити няма;

- СТ CD20 В-лимфоцити също се установяват предимно с ниска и по-рядко с висока концентрация при проучваните случаи с КГ, съответно в 79% и 18%. Между имащите ниска концентрация най-висок процент (84%) се отчита при субтип LumB, следван от LumA и HER2 с по 80%. Най-висок относителен дял (24%) на високата концентрация има субтип ТН, следван от субтип HER2 с 20%;

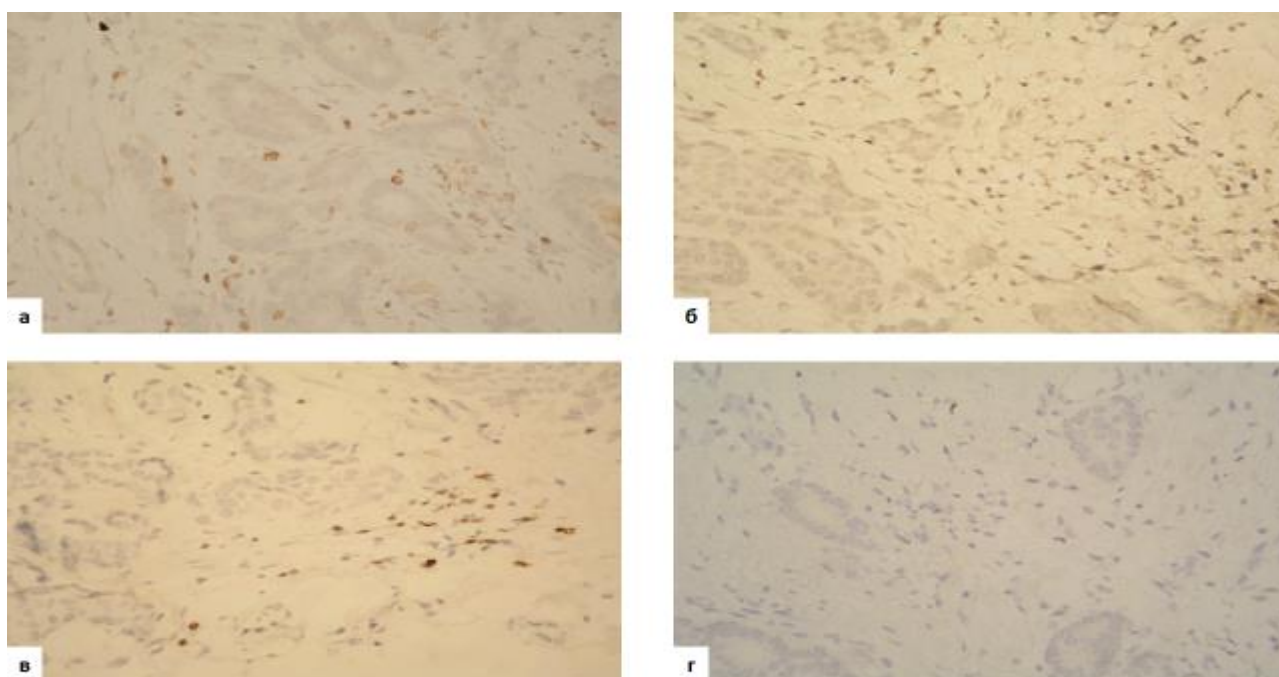
- При ИТ FP3 Т-регулаторни лимфоцити с най-висок процент (68%) в цялата извадка е ниската концентрация, установена с най-голям относителен дял (80%) при пациентите със субтип HER2, следван от LumB със 76%. Високата концентрация (7% от цялата извадка) се наблюдава най-често (по 12%) при субтиповете HER2 и ТН, следвани от субтип LumB с 4%;

- Отново с най-висок процент (66%) в цялата извадка е ниската концентрация на СТ FP3 Т-регулаторни лимфоцити, следвана от високата с 28%. Между имащите ниска концентрация субтип LumA е с най-висок относителен дял (76%), следван от LumB със 72%. При високата концентрация най-високият процент (40%) е при субтип HER2, следван от субтип ТН с 28%.

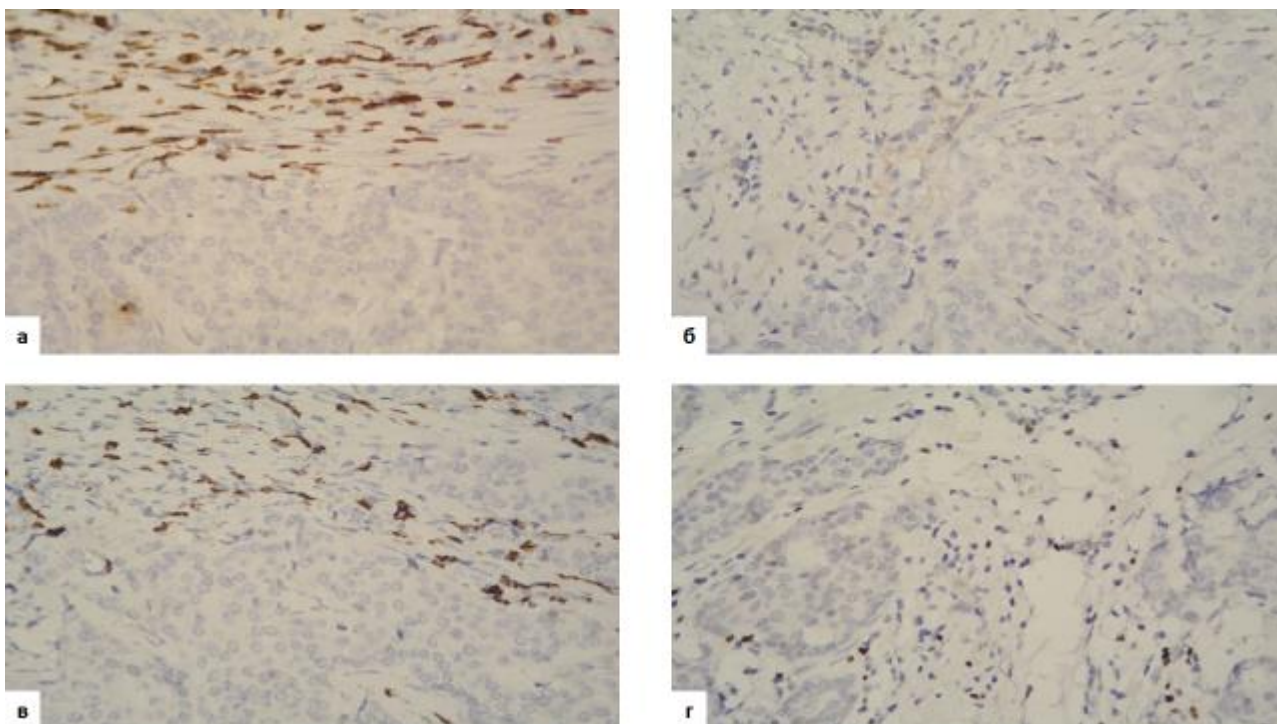
Таблица 5. Процентно разпределение на количеството и локализацията на ТИЛ подвидовете в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове КГ

Показател	Субтип LumA	Субтип LumB	Субтип HER2	Субтип ТН	Цяла извадка
	%	%	%	%	%
ИТ CD3					
Липсват	20,0	12,0	4,0	12,0	12,0
Ниска концентрация	80,0	76,0	80,0	60,0	74,0
Висока концентрация	0,0	12,0	16,0	28,0	14,0
СТ CD3					
Липсват	0,0	0,0	4,0	4,0	2,0
Ниска концентрация	48,0	28,0	24,0	24,0	31,0
Висока концентрация	52,0	72,0	72,0	72,0	67,0
ИТ CD4					
Липсват	72,0	56,0	40,0	60,0	57,0

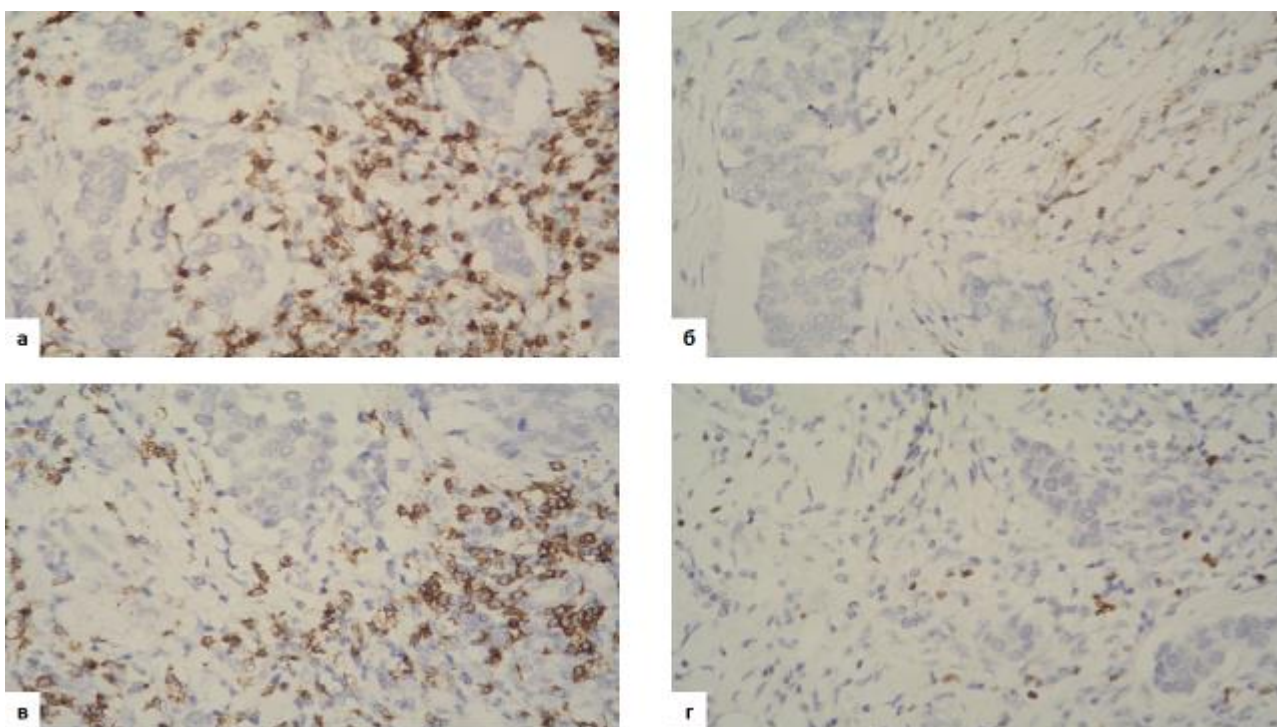
Ниска концентрация	28,0	44,0	28,0	40,0	35,0
Висока концентрация	0,0	0,0	32,0	0,0	8,0
CT CD4					
Липсват	12,0	8,0	12,0	12,0	11,0
Ниска концентрация	84,0	84,0	80,0	80,0	82,0
Висока концентрация	4,0	8,0	8,0	8,0	7,0
ИТ CD8					
Липсват	28,0	28,0	12,0	20,0	22,0
Ниска концентрация	72,0	64,0	80,0	64,0	70,0
Висока концентрация	0,0	8,0	8,0	16,0	8,0
CT CD8					
Липсват	0,0	4,0	0,0	4,0	2,0
Ниска концентрация	72,0	60,0	56,0	48,0	59,0
Висока концентрация	28,0	36,0	44,0	48,0	39,0
ИТ CD20					
Липсват	56,0	52,0	24,0	40,0	43,0
Ниска концентрация	44,0	48,0	76,0	60,0	57,0
Висока концентрация	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CT CD20					
Липсват	4,0	4,0	0,0	4,0	3,0
Ниска концентрация	80,0	84,0	80,0	72,0	79,0
Висока концентрация	16,0	12,0	20,0	24,0	18,0
ИТ FP3					
Липсват	44,0	20,0	8,0	28,0	25,0
Ниска концентрация	56,0	76,0	80,0	60,0	68,0
Висока концентрация	0,0	4,0	12,0	12,0	7,0
CT FP3					
Липсват	4,0	4,0	4,0	12,0	6,0
Ниска концентрация	76,0	72,0	56,0	60,0	66,0
Висока концентрация	20,0	24,0	40,0	28,0	28,0



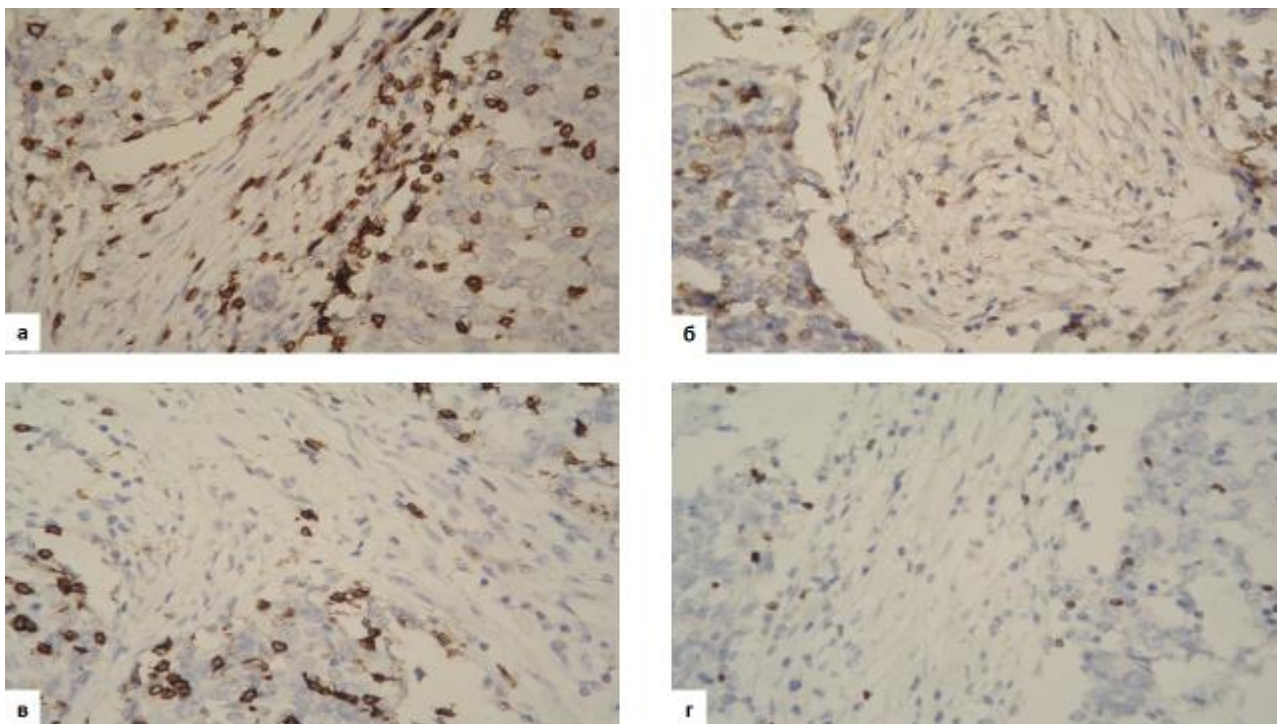
Микрофотография 2. Микроскопска оценка на ИХХ оцветените подвидове Т лимфоцити (а- CD3; б - CD4; в – CD8; г- FoxP3) при LumA КГ, ув. x400



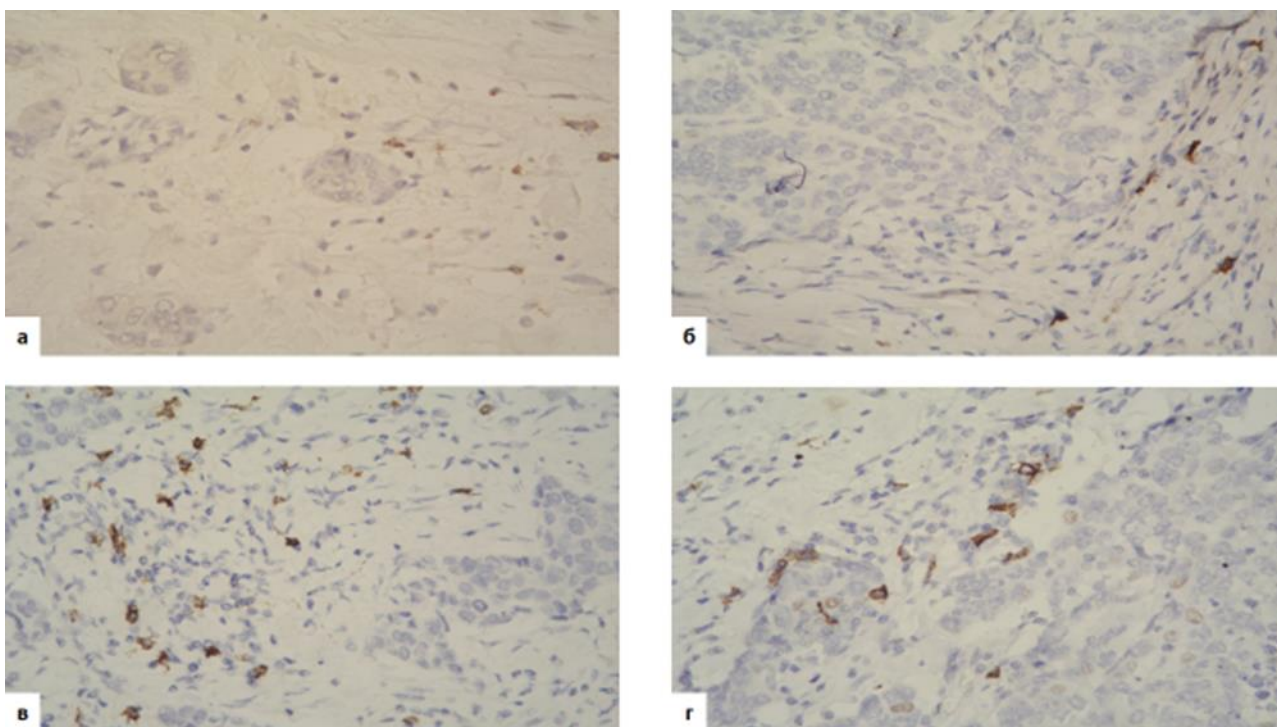
Микрофотография 3. Микроскопска оценка на IXX оцветените подвидове Т лимфоцити (а- CD3; б - CD4; в – CD8; г- FoxP3) при LumB КГ, ув. x400



Микрофотография 4. Микроскопска оценка на IXX оцветените подвидове Т лимфоцити (а- CD3; б - CD4; в – CD8; г- FoxP3) при HER2 позитивен КГ, ув. x400



Микрофотография 5. Микроскопска оценка на ИХХ оцветените подвидове Т лимфоцити (а- CD3; б - CD4; в – CD8; г- FoxP3) при ТНКТ, ув. х400



Микрофотография 6. Микроскопска оценка на ИХХ оцветените В - лимфоцити при отделните видове КГ(а- LumA; б - LumB; в – HER2 позитивен; г- TN), ув. х400

Резултатите от **Таблица 6**, визуализирани на **Микрофотографии 7-9**, показват, че:

- По-голямата част от изследваните тумори (89%) имат ТИЛ $\leq 50\%$. С най-висок относителен дял (100%) от тях са субтип LumA, следвани от субтип LumB с 96%. Най-висок процент (24%) на тумори с ТИЛ $> 50\%$ се наблюдава при субтип HER2, следвани от имащите субтип TH с 16%;

- По отношение на ИХХ позитивността за PD-L1 при туморните клетки (% PD-L1 т.кл.), при най-много (93%) случаи в цялата извадка се установи „липсваща експресия (негативен резултат)“, следват тези с позитивен резултат с ниска експресия (6%). Групата със субтип TH е с максимален относителен дял (20%) на позитивни случаи с ниска експресия и включва единствения позитивен случай с висока PD-L1 експресия при туморните клетки;

- При изследване на PD-L1 експресия при интратуморните имунни клетки (% PD-L1+ ИТ л.) се установи, че в преобладаващата част (97%) от туморите в цялата извадка липсват позитивни имунни клетки. Само 3% имат ниска концентрация, определена при 12% от групата със субтип TH. Висока концентрация на този показател не е установена;

- По отношение на PD-L1 експресията при стромалните имунни клетки (%PD-L1+ СТ л.) най-много (82%) за цялата извадка са случаите при които те липсват, следвани от имащите ниска (12%) и висока концентрация (6%). При ниската концентрация максимален относителен дял (24%) има LumB, следван от субтипове TH с 16% и HER2 с 8%. Високата концентрация на показателя се наблюдава само в групата със субтип TH (24%);

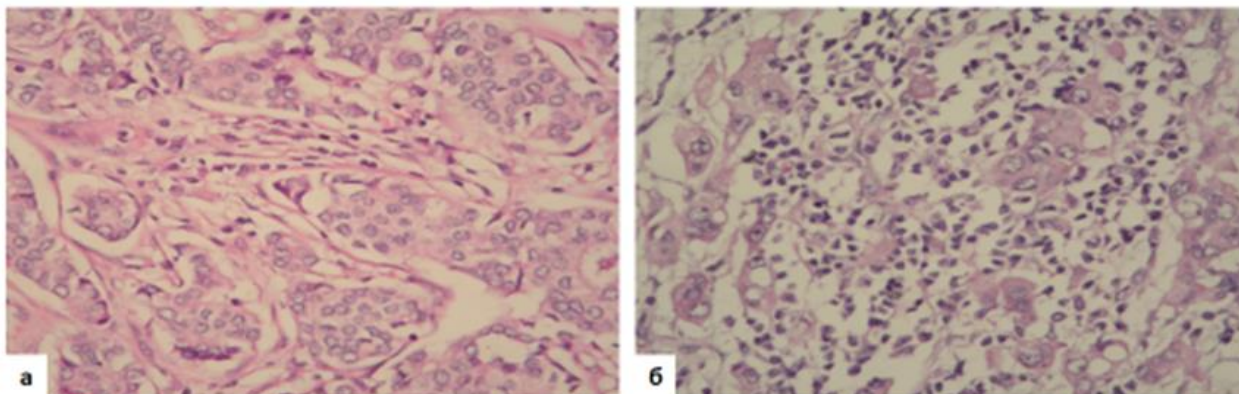
- При изследване на CTLA4 експресията при туморните клетки (% CTLA4 т. кл.) най-много (63%) в цялата извадка са случаите от категория „Негативен резултат с липсваща експресия“. Те са следвани от тези с „Позитивен резултат с ниска експресия“ (31%), установени при максимален относителен дял (48%) от туморите със субтип HER2, следван от LumA с 36%. Категорията „Позитивен с висока експресия“ на показателя се наблюдава само в групата със субтип LumA (24%);

- При определяне на CTLA4 позитивността при интратуморните имунни клетки (%CTLA4+ ИТ л.) най-много (98% от цялата извадка) са случаите, при които тя не се установява. Висока концентрация на този показател липсва, а с ниска концентрация са само два случая (8%) от групата със субтип TH;

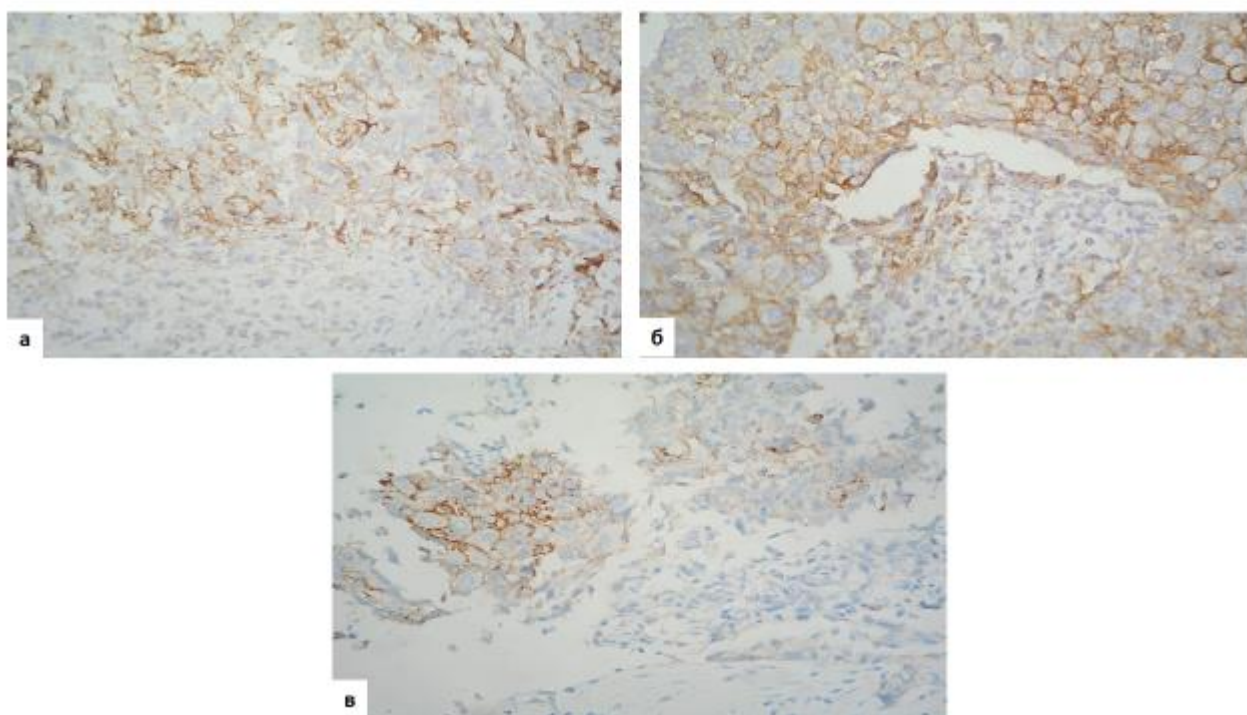
- По отношение на CTLA4 експресията при стромалните имунни клетки (%CTLA4+ СТ л.) най-много (50%) от цялата извадка са туморите, при които тя не се установява, следвани от имащите висока концентрация с 33% и ниска концентрация (17%). При ниската концентрация максимален относителен дял (24%) има субтип HER2, следван от субтип LumA с 20%. Високата концентрация на показателя е с максимален процент (52%) при субтип LumA, следван от субтип HER2 с 32%;

Таблица 6. Процентно разпределение на ТИЛ%, експресиите на PD-L1, CTLA-4 в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове КГ

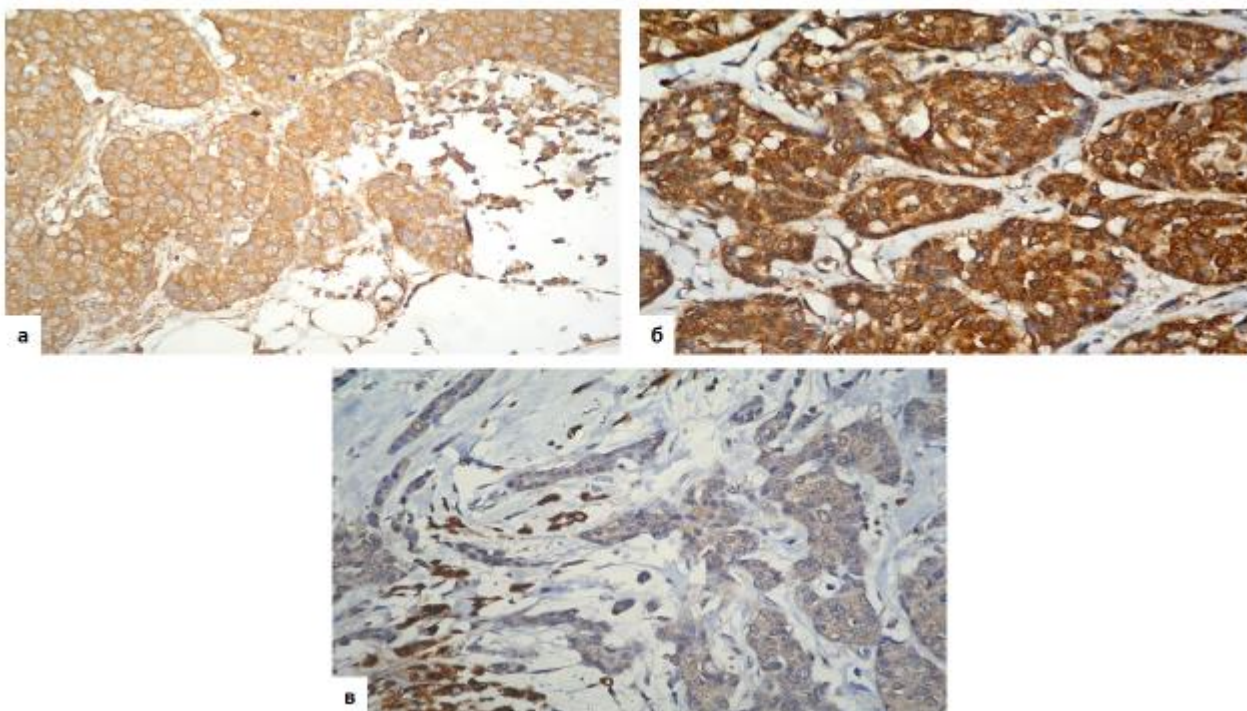
Показател	Субтип LumA	Субтип LumB	Субтип HER2	Субтип TN	Цяла извадка
	%	%	%	%	%
ТИЛ %					
≤ 50%	100,0	96,0	76,0	84,0	89,0
>50%	0,0	4,0	24,0	16,0	11,0
%PD-L1 т.кл.					
Негативен с липсваща експресия	96,0	100,0	100,0	76,0	93,0
Позитивен с ниска експресия	4,0	0,0	0,0	20,0	6,0
Позитивен с висока експресия	0,0	0,0	0,0	4,0	1,0
%PD-L1+ ИТ л.					
Липсват	100,0	100,0	100,0	88,0	97,0
Ниска концентрация	0,0	0,0	0,0	12,0	3,0
Висока концентрация	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
%PD-L1+ СТ л.					
Липсват	100,0	76,0	92,0	60,0	82,0
Ниска концентрация	0,0	24,0	8,0	16,0	12,0
Висока концентрация	0,0	0,0	0,0	24,0	6,0
%CTLA4 т. кл.					
Негативен с липсваща експресия	40,0	84,0	52,0	76,0	63,0
Позитивен с ниска експресия	36,0	16,0	48,0	24,0	31,0
Позитивен с висока експресия	24,0	0,0	0,0	0,0	6,0
%CTLA4+ ИТ л.					
Липсват	100,0	100,0	100,0	92,0	98,0
Ниска концентрация	0,0	0,0	0,0	8,0	2,0
Висока концентрация	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
%CTLA4+ СТ л.					
Липсват	28,0	64,0	44,0	64,0	50,0
Ниска концентрация	20,0	16,0	24,0	8,0	17,0
Висока концентрация	52,0	20,0	32,0	28,0	33,0



Микрофотография 7. Карцином на гърда с $ТИЛ \leq 50\%$ и $ТИЛ > 50\%$ (а, б), оцветяване Х.Е., ув. х400



Микрофотография 8. ИХХ изследване за PD-L1 при КГ, с позитивни туморни и стромални имунни клетки (а, б, в), ув. х400



***Микрофотография 9.** ИХХ изследване за СТЛА4 при КГ, с различна интензивност при туморни клетки 1+ (а), 2+ (б) и 3+ (в); позитивни стромални имунни клетки (а и в), ув. x400*

2. Сравнителен анализ на проучваните епидемиологични, клиничко-патологични и имунни показатели при субтиповете КГ - LumA, LumB, HER2, TH (всеки с n=25).

2.1. Сравнителен анализ на проучваните епидемиологични и клиничко-патологични показатели

Проведеният сравнителен анализ на проучваните клиничко-патологични данни при отделните молекулярни подтипове показва, че сигнификантни разлики се установяват при показателите 5 годишна преживяемост, grade, клиничен стадий, статус на лимфни възли и лимфоваскуларна инвазия (**Таблица 7**):

- 5-годишната обща преживяемост е със статистически значимо най-висок процент при пациентите със субтип LumA, следвана от имащите субтип LumB, а най-малките проценти са на останалите два субтипа;
- Отново двата субтипа - LumA и LumB, имат сигнификантно по-високи проценти на G1 и G2 спрямо останалите два субтипа, докато при G3 съотношението е обратно – по-високите проценти са при субтипове HER2 и TH;
- Статистически достоверна разлика между молекулярните субтипове се установява само при клиничен стадий I – статистически значимо по-висок процент установен при субтип LumA спрямо HER2 и TH (които не се различават статистически помежду си), но не и спрямо субтип

LumB, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на останалите субтипове;

- Сигнификантно по-нисък процент на метастатични лимфни възли се установява при субтип LumA спрямо молекулярните субтипове LumB и HER2 (чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си), но не и спрямо субтип TH, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на останалите субтипове;

- Сигнификантно по-нисък процент на лимфоваскуларна инвазия се установява при субтип LumA спрямо молекулярните субтипове LumB, HER2 и TH (чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си);

- Basal-like субтип статистически значимо се установява при по-висок относителен дял от пациентите с ТНКТ, спрямо останалите три субтипа, чиито проценти не се различават статистически помежду си.

Таблица 7. Сравнителен анализ на клинико-патологичните данни при отделните молекулярни подтипове КГ

Показател	Субтип LumA		Субтип LumB		Субтип HER2		Субтип TH	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Възраст (години)								
≤ 50	6	24,0 ^a	5	20,0 ^a	4	16,0 ^a	1	4,0 ^a
> 50	19	76,0 ^a	20	80,0 ^a	21	84,0 ^a	24	96,0 ^a
5-годишна преживяемост								<0,001
Не	2	8,0 ^a	9	36,0 ^b	18	72,0 ^{cd}	16	64,0 ^{bd}
Да	23	92,0 ^a	16	64,0 ^b	7	28,0 ^{cd}	9	36,0 ^{bd}
Grade								
G1	8	32,0 ^a	2	8,0 ^{ac}	1	4,0 ^{bc}	0	0,0 ^{bc}
G2	17	68,0 ^a	11	44,0 ^{ac}	6	24,0 ^{bc}	7	28,0 ^{bc}
G3	0	0,0 ^a	12	48,0 ^b	18	72,0 ^b	18	72,0 ^b
Клиничен стадий								
I	9	36,0 ^a	3	12,0 ^{ac}	2	8,0 ^{bc}	2	8,0 ^{bc}
II	12	48,0 ^a	14	56,0 ^a	14	56,0 ^a	16	64,0 ^a
III	4	16,0 ^a	8	32,0 ^a	8	32,0 ^a	7	28,0 ^a
IV	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	1	4,0 ^a	0	0,0 ^a
Лимфни възли с метастази								0,006
Не	19	76,0 ^a	9	36,0 ^{bc}	9	36,0 ^{bc}	16	64,0 ^{ac}
Да	6	24,0 ^a	16	64,0 ^{bc}	16	64,0 ^{bc}	9	36,0 ^{ac}
Лимфоваскуларна инвазия								0,027
Не	24	96,0 ^a	18	72,0 ^b	15	60,0 ^b	19	76,0 ^b
Да	1	4,0 ^a	7	28,0 ^b	10	40,0 ^b	6	24,0 ^b
Туморен размер								0,113
≤ 3 см	9	36,0	3	12,0	3	12,0	6	24,0
> 3 см	16	64,0	22	88,0	22	88,0	19	76,0
Оперативен материал								0,552

Ексцизионна биопсия	7	28,0	3	12,0	6	24,0	6	24,0
Мастектомия	18	72,0	22	88,0	19	76,0	19	76,0
Хистологичен тип								
NST	17	68,0 ^a	20	80,0 ^a	23	92,0 ^a	20	80,0 ^a
Лобуларен карцином	3	12,0 ^a	5	20,0 ^a	1	4,0 ^a	0	0,0 ^a
Друг морфологичен подтип	5	20,0 ^a	0	0,0 ^a	1	4,0 ^a	5	20,0 ^a
Basal-like								
Небазален	24	96,0 ^a	23	92,0 ^a	22	88,0 ^a	13	52,0 ^b
Базален	1	4,0 ^a	2	8,0 ^a	3	12,0 ^a	12	48,0 ^b

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

2.2. Сравнителен анализ на проучваните имунни показатели

Проведеният сравнителен анализ на количеството и локализацията на ТИЛ подвидовете при молекулярните подтипове КГ установи, че сигнификантни разлики има само при интратуморните лимфоцити – В, Т и някои субтипове Т клетки – хелперни и регулаторни, съответно с показатели ИТ CD20, ИТ CD3, ИТ CD4 и ИТ FP3 (**Таблица 8**):

- Статистически достоверно по-висок процент на липса на ИТ CD20 се установява при субтип LumA спрямо субтип HER2, но не и спрямо останалите два субтипа, чиито относителни дялове не се различават статистически, както помежду си, така и от този на субтип HER2; Ниската концентрация на ИТ CD20 е със статистически значимо по-висок процент при пациентите със субтип HER2 спрямо тези със субтип LumA, но не и спрямо останалите два субтипа, които не се различават статистически, както помежду си, така и от този на субтип HER2. Висока концентрация на ИТ CD20 не се установи при нито един случай;

- Високата концентрация на ИТ CD3 е със статистически значимо по-висок процент при пациентите със субтип ТН от тези със субтип LumA, но не и от тези на останалите два субтипа, които не се различават статистически помежду си;

- Сигнификантно по-висок процент на липсващи ИТ CD4 се установява при субтипове LumA и LumB спрямо субтип HER2, но не и спрямо субтип ТН, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на останалите субтипове. Процентът на високата концентрация на ИТ CD4 е със статистически значимо по-висок относителен дял при пациентите със субтип HER2 спрямо останалите три субтипа, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си;

- Липсата на ИТ FP3 е със сигнификантно по-висок процент при случаите със субтипове LumA и LumB спрямо тези с HER2, но не и спрямо имащите субтип ТН, чийто относителен дял не се различава статистически

от тези на останалите субтипове. Не се установиха статистически значими разлики за ниската и високата концентрация на ИТ FP3 при субтиповете КГ.

Таблица 8. Сравнителен анализ на количеството и локализацията на ТИЛ подвидовете според отделните молекулярни подтипове КГ

Показател	Субтип LumA		Субтип LumB		Субтип HER2		Субтип TN	
	п	%	п	%	п	%	п	%
ИТ CD3								
Липсват	5	20,0 ^a	3	12,0 ^a	1	4,0 ^a	3	12,0 ^a
Ниска концентрация	20	80,0 ^a	19	76,0 ^a	20	80,0 ^a	15	60,0 ^a
Висока концентрация	0	0,0 ^a	3	12,0 ^{ac}	4	16,0 ^{ac}	7	28,0 ^{bc}
СТ CD3								
Липсват	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	1	4,0 ^a	1	4,0 ^a
Ниска концентрация	12	48,0 ^a	7	28,0 ^a	6	24,0 ^a	6	24,0 ^a
Висока концентрация	13	52,0 ^a	18	72,0 ^a	18	72,0 ^a	18	72,0 ^a
ИТ CD4								
Липсват	18	72,0 ^a	14	56,0 ^a	10	40,0 ^{bc}	15	60,0 ^{ac}
Ниска концентрация	7	28,0 ^a	11	44,0 ^a	7	28,0 ^a	10	40,0 ^a
Висока концентрация	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	8	32,0 ^b	0	0,0 ^a
СТ CD4								
Липсват	3	12,0 ^a	2	8,0 ^a	3	12,0 ^a	3	12,0 ^a
Ниска концентрация	21	84,0 ^a	21	84,0 ^a	20	80,0 ^a	20	80,0 ^a
Висока концентрация	1	4,0 ^a	2	8,0 ^a	2	8,0 ^a	2	8,0 ^a
ИТ CD8								
Липсват	7	28,0 ^a	7	28,0 ^a	3	12,0 ^a	5	20,0 ^a
Ниска концентрация	18	72,0 ^a	16	64,0 ^a	20	80,0 ^a	16	64,0 ^a
Висока концентрация	0	0,0 ^a	2	8,0 ^a	2	8,0 ^a	4	16,0 ^a
СТ CD8								
Липсват	0	0,0 ^a	1	4,0 ^a	0	0,0 ^a	1	4,0 ^a
Ниска концентрация	18	72,0 ^a	15	60,0 ^a	14	56,0 ^a	12	48,0 ^a
Висока концентрация	7	28,0 ^a	9	36,0 ^a	11	44,0 ^a	12	48,0 ^a
ИТ CD20								
Липсват	14	56,0 ^a	13	52,0 ^{ac}	6	24,0 ^{bc}	10	40,0 ^{ac}
Ниска концентрация	11	44,0 ^a	12	48,0 ^{ac}	19	76,0 ^{bc}	15	60,0 ^{ac}
Висока концентрация	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
СТ CD20								
Липсват	1	4,0 ^a	1	4,0 ^a	0	0,0 ^a	1	4,0 ^a
Ниска концентрация	20	80,0 ^a	21	84,0 ^a	20	80,0 ^a	18	72,0 ^a
Висока концентрация	4	16,0 ^a	3	12,0 ^a	5	20,0 ^a	6	24,0 ^a
ИТ FP3								
Липсват	11	44,0 ^a	5	20,0 ^a	2	8,0 ^{bc}	7	28,0 ^{ac}
Ниска концентрация	14	56,0 ^a	19	76,0 ^a	20	80,0 ^a	15	60,0 ^a
Висока концентрация	0	0,0 ^a	1	4,0 ^a	3	12,0 ^a	3	12,0 ^a
СТ FP3								
Липсват	1	4,0 ^a	1	4,0 ^a	1	4,0 ^a	3	12,0 ^a

Ниска концентрация	19	76,0 ^a	18	72,0 ^a	14	56,0 ^a	15	60,0 ^a
Висока концентрация	5	20,0 ^a	6	24,0 ^a	10	40,0 ^a	7	28,0 ^a

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

Проведеният сравнителен анализ относно **показателите ТИЛ%, експресиите на PD-L1 и CTLA-4** при молекулярните подтипове КГ показва, че сигнификантни разлики се установяват при почти всички показатели без %PD-L1+ ИТ л. и %CTLA4+ ИТ л. (**Таблица 9**);

- Статистически достоверно по-висок относителен дял на ТИЛ > 50% се установява при субтип HER2 спрямо субтип LumA. Не се намери статистически значима разлика за останалите два субтипа LumB и TH;

- Сигнификантно по-висок процент на негативен резултат с липсваща експресия за PD-L1 при туморните клетки (%PD-L1 т.кл.) се установява при LumB и HER2 спрямо TH субтип, но не и спрямо LumA, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на останалите субтипове; Не се установиха статистически значими разлики между субтиповете КГ по отношение на позитивния резултат с ниска и висока експресия при туморните клетки;

- Ниската концентрация на PD-L1 позитивни стромални имунни клетки (%PD-L1+ СТ л.) е със сигнификантно по-висок процент при субтип LumB спрямо този на субтип LumA, но не и спрямо останалите два субтипа, чиито относителни дялове не се различават статистически, както помежду си, така и от този на субтип LumA. Високата концентрация на %PD-L1+ СТ л. е със статистически достоверно по-висок процент при субтип TH спрямо останалите три субтипа, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си;

- Сигнификантно по-висок процент на негативен резултат с липсваща експресия за CTLA4 при туморните клетки (%CTLA4 т. кл.) се установява при субтипове LumB и TH спрямо субтип LumA, но не и спрямо субтип HER2, относителният дял на който е значимо по-нисък от този на субтип LumB, но не се различава статистически от тези на субтип LumA и TH. Позитивен резултат с ниска експресия на същия показател е със сигнификантно по-висок процент при субтип HER2 спрямо този на субтип LumB, но не и спрямо останалите два субтипа, с чиито относителни дялове не се различават. Позитивен резултат с висока експресия на %CTLA4 т. кл. е със статистически достоверно по-висок процент при субтип LumA спрямо останалите три субтипа, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си;

- Статистически достоверно по-висок процент на липсващи CTLA4 позитивни стромални лимфоцити (%CTLA4+ СТ л.) се наблюдава при субтипове LumB и TH спрямо субтип LumA, но не и спрямо субтип HER2, относителният дял на който не се различава статистически от тези на всички

останали субтипове. Високата концентрация на същия показател е със сигнификантно по-висок процент при субтип LumA спрямо този на субтип LumB, но не и спрямо относителния дял на имащите субтип TH и HER2, които са значимо по-високи от този на групата със субтип LumB, но не и спрямо този на LumA, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си;

Таблица 9. Сравнителен анализ на ТИЛ%, експресиите на PD-L1 и CTLA-4 при отделните молекулярни подтипове КГ

Показател	Субтип LumA		Субтип LumB		Субтип HER2		Субтип TH	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ТИЛ %								
≤ 50%	25	100,0 ^a	24	96,0 ^{ac}	19	76,0 ^{bc}	21	84,0 ^{ac}
>50%	0	0,0 ^a	1	4,0 ^{ac}	6	24,0 ^{bc}	4	16,0 ^{ac}
%PD-L1 т.кл.								
Негативен с липсваща експресия	24	96,0 ^{ac}	25	100,0 ^a	25	100,0 ^a	19	76,0 ^{bc}
Позитивен с ниска експресия	1	4,0 ^a	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	5	20,0 ^a
Позитивен с висока експресия	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	1	4,0 ^a
%PD-L1+ ИТ л.								
Липсват	25	100,0 ^a	25	100,0 ^a	25	100,0 ^a	22	88,0 ^a
Ниска концентрация	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	3	12,0 ^a
Висока концентрация	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
%PD-L1+ СТ л.								
Липсват	25	100,0 ^a	19	76,0 ^{bc}	23	92,0 ^{ac}	15	60,0 ^b
Ниска концентрация	0	0,0 ^a	6	24,0 ^{bc}	2	8,0 ^{ac}	4	16,0 ^{ac}
Висока концентрация	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	6	24,0 ^b
%CTLA4 т. кл.								
Негативен с липсваща експресия	10	40,0 ^a	21	84,0 ^b	13	52,0 ^{ac}	19	76,0 ^{bc}
Позитивен с ниска експресия	9	36,0 ^{ac}	4	16,0 ^{bc}	12	48,0 ^a	6	24,0 ^{ac}
Позитивен с висока експресия	6	24,0 ^a	0	0,0 ^b	0	0,0 ^b	0	0,0 ^b
%CTLA4+ ИТ л.								
Липсват	25	100,0 ^a	25	100,0 ^a	25	100,0 ^a	23	92,0 ^a
Ниска концентрация	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	2	8,0 ^a
Висока концентрация	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
%CTLA4+ СТ л.								
Липсват	7	28,0 ^a	16	64,0 ^{bc}	11	44,0 ^{ac}	16	64,0 ^{bc}
Ниска концентрация	5	20,0 ^a	4	16,0 ^a	6	24,0 ^a	2	8,0 ^a
Висока концентрация	13	52,0 ^a	5	20,0 ^b	8	32,0 ^{ac}	7	28,0 ^{ac}

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава (p<0,05)

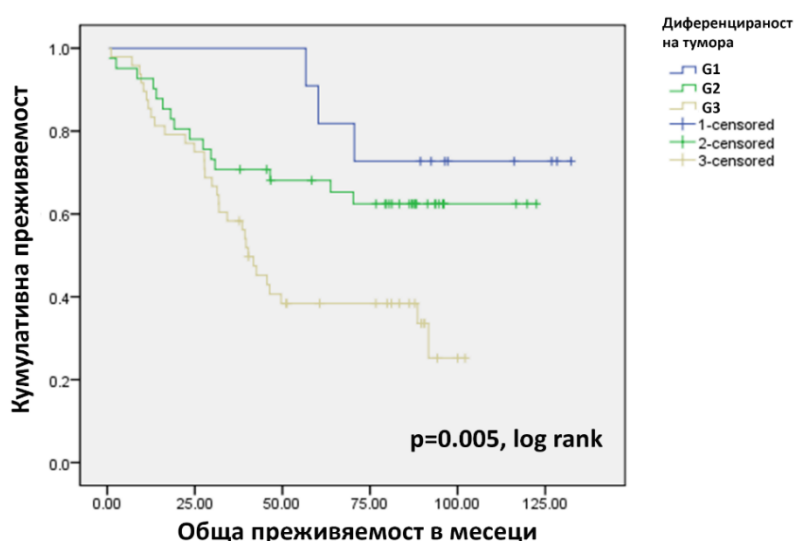
3. Корелационен анализ на проучваните показатели (епидемиологични, клинико-патологични и имунни) при изследваните случаи (n=100) и при разпределените по групи (отделни молекулярни подтипове КГ - LumA, LumB, HER2, TH, всеки с n=25).

3.1. Корелации между епидемиологични и клинико-патологични данни (Пол, Възр. ≤ 50 / >50 г., 5 год. пр., G, St, ЛВ, ЛВИ, Т. p-p, Операт. м-л, Хистол. тип).

3.1.1. Проведеният корелационен анализ на **епидемиологичните и клинико-патологичните данни** показва статистически достоверна зависимост в цялата извадка между показателите G и 5-годишна обща преживяемост:

- На **Фигура 5** се вижда, че има съществено различие във функциите на кумулативната преживяемост на имащите различна степен на диференциация:

- функцията на кумулативната преживяемост на пациентите с G3 тумори свършва най-рано и на най-ниско ниво, в сравнение с тези с G2 и G1 карциноми;



Фигура 5. Функция на общата (вкл. 5 – годишна) преживяемост според показателя диференцираност на тумора (G)

3.1.2. Проведеният сравнителен анализ на **клинико-патологичните данни** според показателя **basal-like** субтип КГ показва, че сигнификантни зависимости се установяват в цялата извадка (**Фигура 6**) и при пациентите със субтип TH (**Фигура 7**);

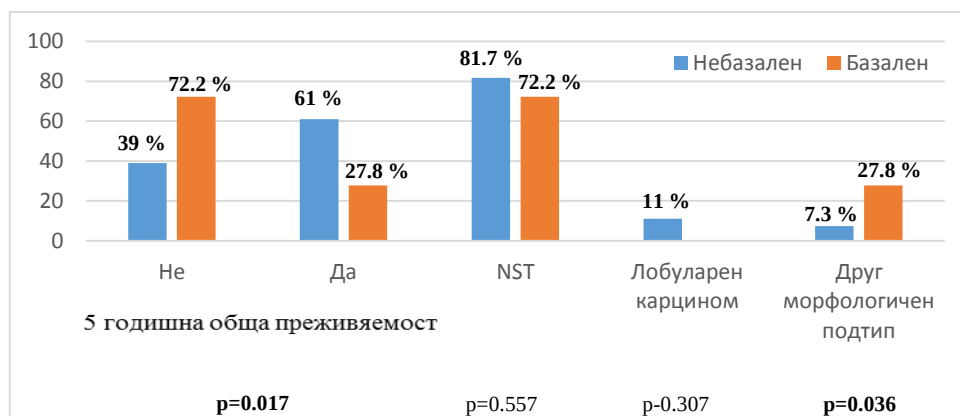
- В цялата извадка показателите, които корелират с basal-like субтип карцином на гърда са два - 5 годишна преживяемост и хистологичен тип;
- При пациентите с 5 годишна преживяемост статистически значимо по-голям е относителният дял на небазалния субтип КГ, докато при нямащите тази преживяемост е по-висок процентът на базалния субтип;

- В допълнение, на **Фигура 8** се вижда, че има съществено различие във функциите на кумулативната преживяемост на имащите базален и небазален субтип КГ:

- функцията на кумулативната преживяемост на пациентите с базален тип тумори свършва по-рано и на по-ниско ниво, в сравнение с тази на небазални карциноми;

- При категорията друг морфологичен подтип на показателя хистологичен тип, сигнификантно по-голям е относителният дял на имащите базален субтип КГ;

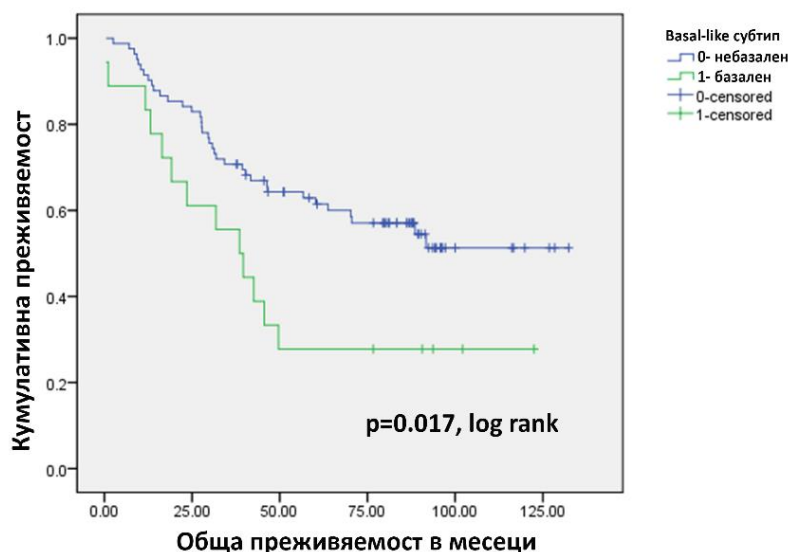
- Пациентите от подгрупата с подтип ТН имат статистически достоверно по-висок процент на небазален субтип КГ при наличие на NST хистологичен тип, докато при друг морфологичен подтип сигнификантно по-голям е относителният дял на тези с базален субтип.



Фигура 6. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според базален субтип карцином на гърда (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с 5 годишна обща преживяемост и хистологичен тип



Фигура 7. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според базален субтип карцином на гърда (Субтип ТН) - сигнификантна зависимост с хистологичен тип

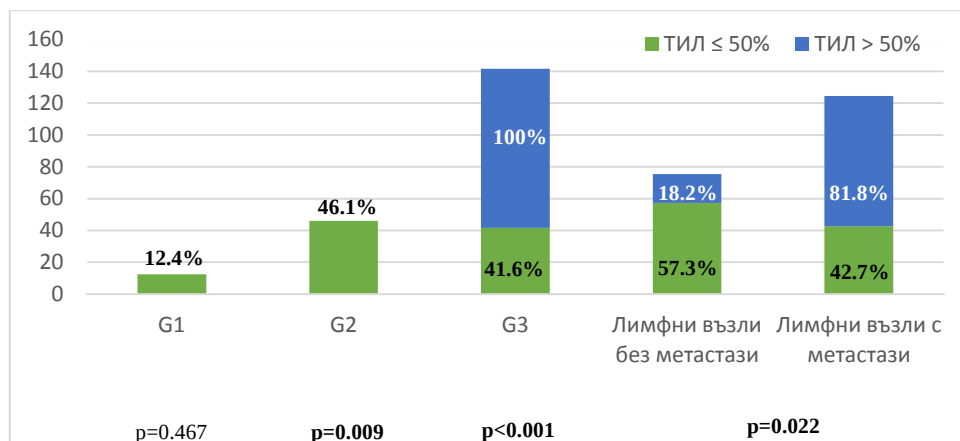


Фигура 8. Функция на общата (вкл. 5 – годишна) преживяемост според показателя *basal – like* субтип КГ

3.2. Корелации между клинико-патологични данни (Пол, Възр. ≤ 50 / > 50 , 5 год. пр., G, St, ЛВ, ЛВИ, Т. р-р, Оперативен м-л, Хистологичен тип, basal-like субтип) **и проучваните имунни показатели** (ТИЛ %, ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD 4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3, %PD-L1 т.кл., %PD-L1+ ИТ л., %PD-L1+ СТ л., % CTLA4 т.кл., %CTLA4+ ИТ л., %CTLA4+ СТ л.)

3.2.1. Проведеният корелационен анализ на **клинико-патологичните данни** според стойностите на **ТИЛ** в цялата извадка и при молекулярни подтипове показва, че сигнификантни зависимости се установяват единствено в цялата извадка (**Фигура 9**). При Субтип LumA стойности на ТИЛ $> 50\%$ липсват, а при субтип LumB тази стойност е само една, което не дава възможност за направата на статистически достоверни изводи при субтиповете КГ;

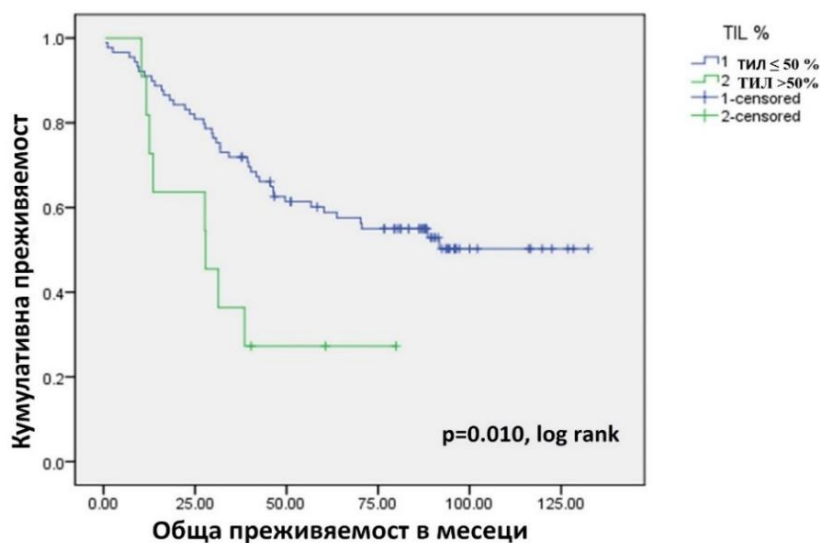
- В цялата извадка показателите, които корелират с ТИЛ са два - Grade и статус на лимфни възли.
- При G3 КГ се установява статистически значимо по-висок относителен дял на имащите ТИЛ $> 50\%$, докато при G2 статистически достоверно се установяват ТИЛ $\leq 50\%$. Разликата между относителните дялове на ТИЛ при G1 е статистически нищожна;
- Относителният дял на пациентите с ТИЛ $> 50\%$ е сигнификантно по-висок при имащите метастази в лимфни възли, докато този на пациентите с ТИЛ $\leq 50\%$ е по-голям при нямащите такива.



Фигура 9. Сравнителен анализ на клинико-патологичните данни според стойностите на ТИЛ (цяла извадка) – сигнификантна зависимост с G и ЛВ статус

- В допълнение, на **Фигура 10** се вижда, че има съществено различие във функциите на кумулативната преживяемост на имащите ТИЛ ≤50% и ТИЛ >50%:

- функцията на кумулативната преживяемост на пациентите с ТИЛ >50% в техните тумори свършва по-рано и на по-ниско ниво, в сравнение с тези с ТИЛ ≤50%;



Фигура 10. Функция на общата (вкл. 5 – годишна) преживяемост според показателя %ТИЛ

3.2.2. Сравнителният анализ на **клинико-патологичните** данни според стойностите на **ИТ CD3** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове показва, че сигнификантни зависимости се установяват в цялата извадка и при пациентите със субтип ТН (**Фигури 11 и 12**);

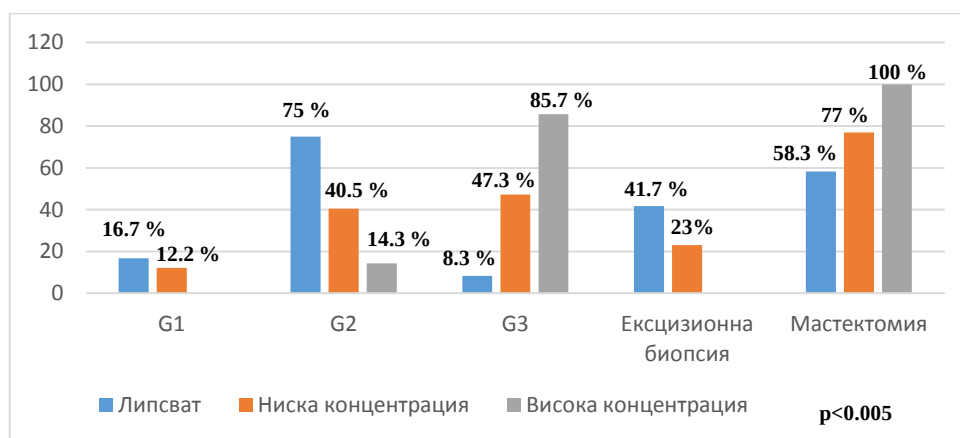
- В цялата извадка показателите, които корелират с ИТ CD3 са хистологична степен на диференциация (Grade) и тип на оперативен материал;

- При пациентите с G3 КГ статистически значимо по-голям е относителният дял

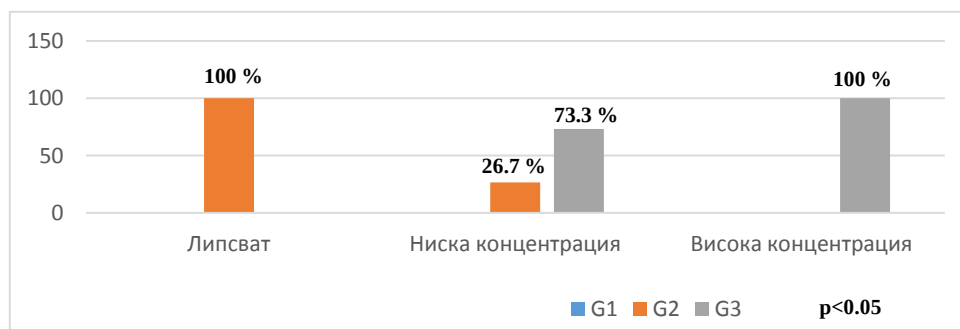
на имащите висока концентрация ИТ CD3.

- При пациентите с ексцизионна биопсия статистически значимо по-често не се установяват позитивни ИТ CD3 и по-рядко са имащите висока концентрация на разглеждания показател, докато при мастектомия е точно обратното;

- Туморите от ТН субтип имат статистически достоверно по-висок процент на висока концентрация на ИТ CD3 при G3.



Фигура 11. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на ИТ CD3 (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с G и тип хирургична интервенция



Фигура 12. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на ИТ CD3 (Субтип ТН) - сигнификантна зависимост с G

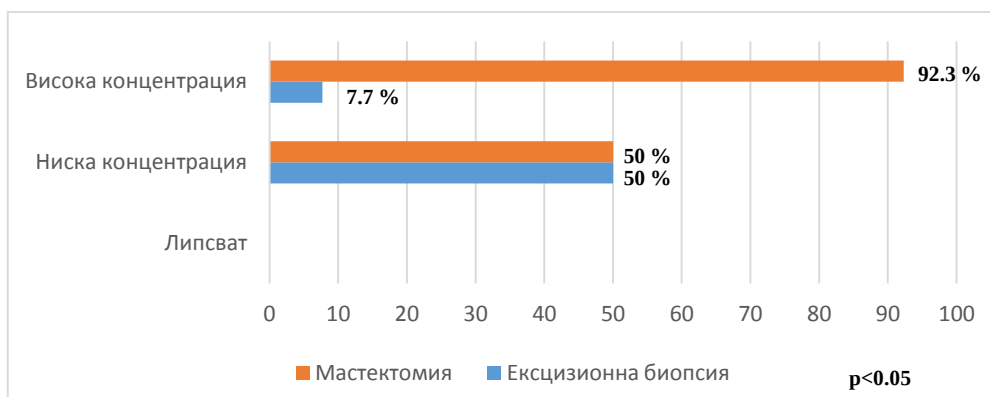
3.2.3. Проведеният корелационен анализ на **клинично-патологичните данни** според стойностите на **СТ CD3** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове показва, че сигнификантна зависимост се установява единствено при пациентите със Субтип LumA (**Фигура 13**);

- Единственият показател, който корелира с показателя СТ CD3 е тип на оперативен материал;

- При пациентите с ексцизионна биопсия статистически значимо по-голям е относителният дял на имащите ниска концентрация на СТ CD3, а по-малък

- на имащите висока концентрация на разглеждания показател, докато при

мастектомия е точно обратното. Пациенти с липса на СТ CD3 при този молекулярен субтип няма.

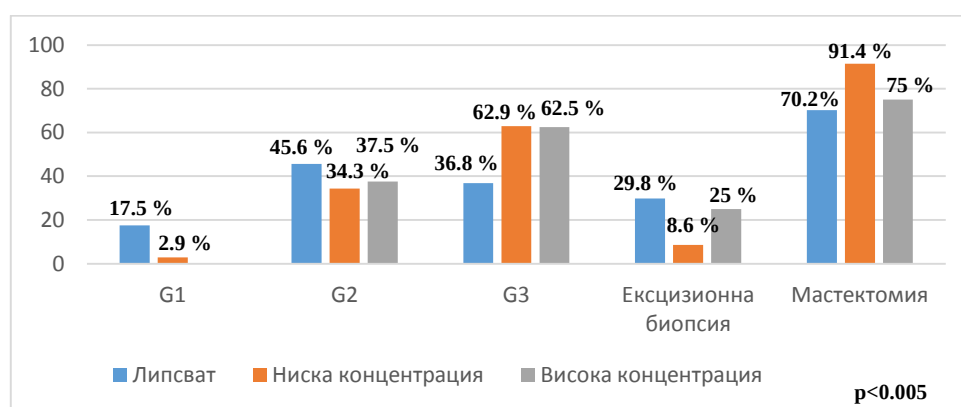


Фигура 13. Сравнителен анализ на клинико-патологичните данни според стойностите на СТ CD3 (Субтип LitA) - сигнификантна зависимост с тип хирургична интервенция

3.2.4. Корелационният анализ на **клинико-патологичните данни** според стойностите на **ИТ CD4** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Фигура 14**) показва, че сигнификантни зависимости се установяват в цялата извадка, като показателите, които корелират са Grade и Оперативен материал;

- При пациентите с G3 статистически значимо по-голям е относителният дял на имащите ниска концентрация на ИТ CD4, а най-малък – на пациентите при които този показател липсва. Относителният дял на високата концентрация заема междинна позиция. При G1 и G2 разликата в честотното разпределение на концентрациите на ИТ CD4 е статистически нищожна;

- При пациентите с ексцизионна биопсия статистически значимо по-голям е относителният дял на нямащите ИТ CD4, а най-малко – на имащите ниска концентрация на разглеждания показател, като при тези с мастектомия се установява противоположна корелация; относителният дял на високата концентрация заема междинна позиция.



Фигура 14. Сравнителен анализ на клинико-патологичните данни според стойностите на ИТ CD4 (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с G и тип хирургична интервенция

3.2.5. Проведеният корелационен анализ на клинико-патологичните данни според стойностите на СТ CD4 в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове показва, че не се установяват сигнификантни зависимости.

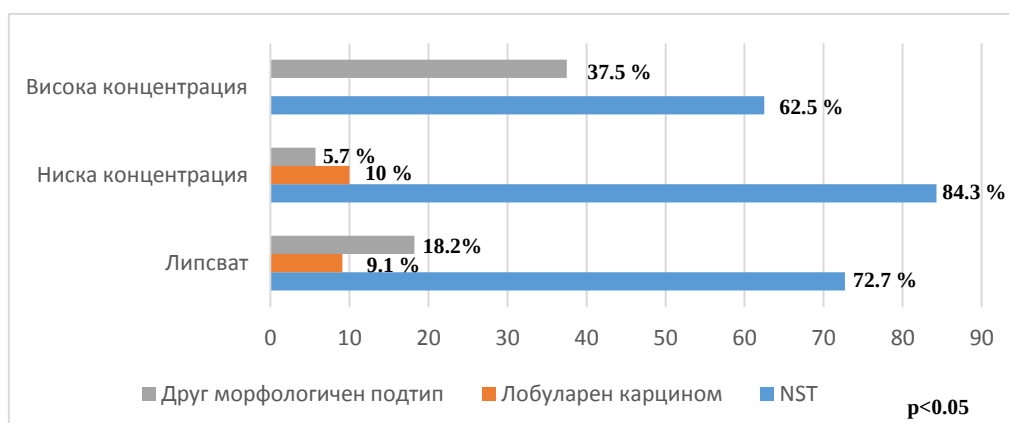
Корелационният анализ на клинико-патологичните данни според стойностите на ИТ CD8 в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Фигури 15-17**) показва, че сигнификантни зависимости се установяват в цялата извадка и при пациентите със субтипове LumA и TH;

- В цялата извадка и имащите субтип TH показателят, който корелира с ИТ CD8 е хистологичен тип;

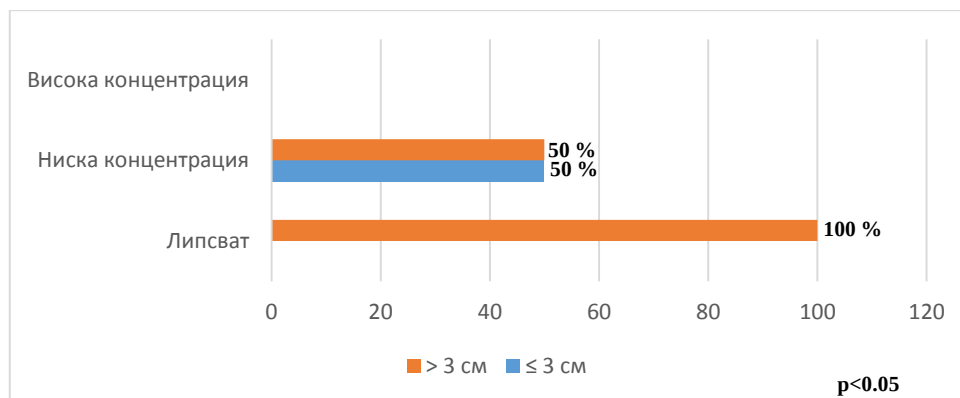
- При пациентите с друг морфологичен подтип сигнификантно най-високият процент е на високата ИТ CD8 концентрация, а най-малкия на ниската. Относителният дял на нямащите ИТ CD8 заема междинна позиция без да се различава статистически от тези на останалите две категории;

- В групата на субтип LumA имащите туморен размер ≤ 3 см са със статистически значимо по-висок относителен дял на ниска концентрация на ИТ CD8, докато при тези с по-голям размер – процентът на нямащите ИТ CD8. Пациенти с висока концентрация на изследвания показател при този субтип няма;

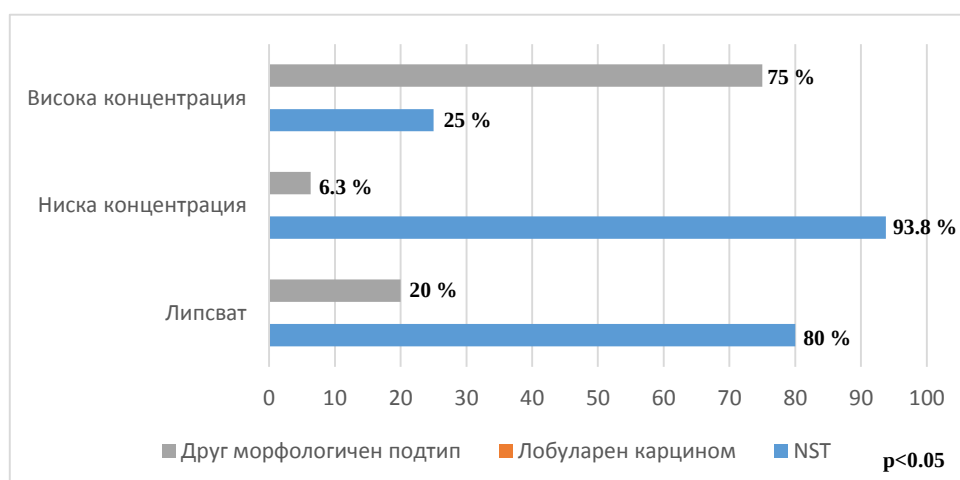
- При пациентите с TH субтип имащите хистологичен тип NST са със статистически достоверно по-висок процент на ниска концентрация на ИТ CD8 отколкото с висока, докато относителният дял на нямащите този показател заема междинна позиция без да се различава статистически от тези на останалите две категории.



Фигура 15. Сравнителен анализ на клинико-патологичните данни според стойностите на ИТ CD8 (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с хистологичен тип



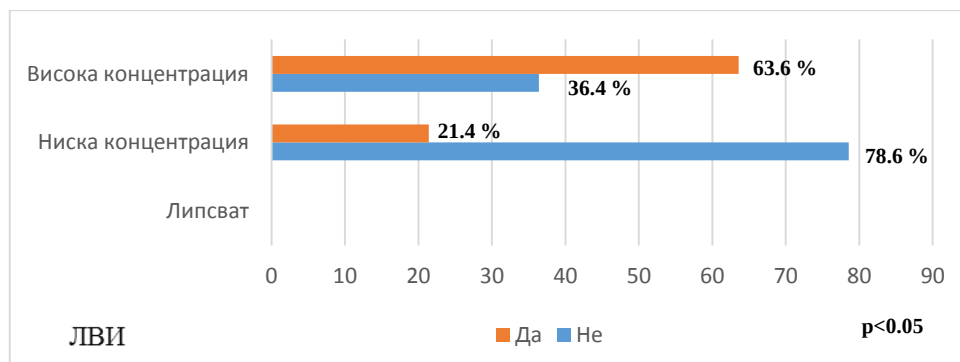
Фигура 16. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на ИТ CD8 (Субтип LumA) - сигнификантна зависимост с туморен размер



Фигура 17. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на ИТ CD8 (Субтип TH) - сигнификантна зависимост с хистологичен тип

3.2.6. Проведеният корелационен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на **СТ CD8** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Фигура 18**) показва, че сигнификантна зависимост се установява единствено при пациентите от субтип HER2;

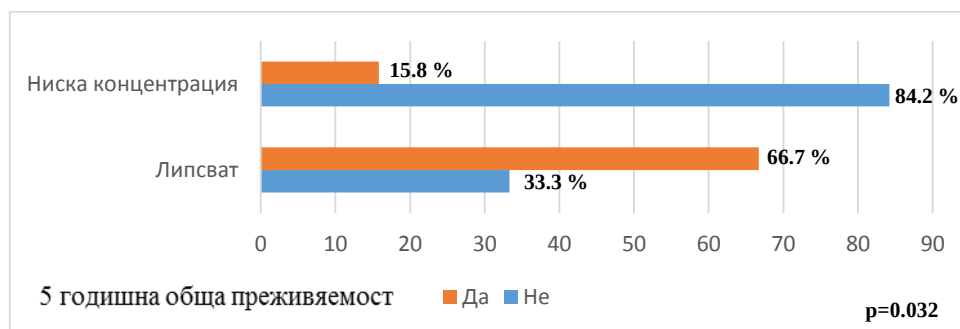
- Единственият показател, който корелира с СТ CD8 е Лимфоваскуларна инвазия;
- При пациентите с такава инвазия значимо по-висок относителен дял има високата концентрация на СТ CD8, докато при тези без – ниската концентрация.



Фигура 18. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на CT CD8 (Субтип HER2) - сигнификантна зависимост с ЛВИ

3.2.7. Корелационният анализ на **клинично-патологичните данни** според стойностите на **ИТ CD20** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Фигура 19**) показва, че сигнификантни зависимости се установяват при пациентите със субтип HER2:

- В групата на субтип HER2 нямащите 5 годишна преживяемост са със статистически достоверно по-висок относителен дял на ниска концентрация на ИТ CD20, докато при имащите такава преживяемост – процентът на нямащите ИТ CD20. Пациенти с висока концентрация на ИТ CD20 не са установени.

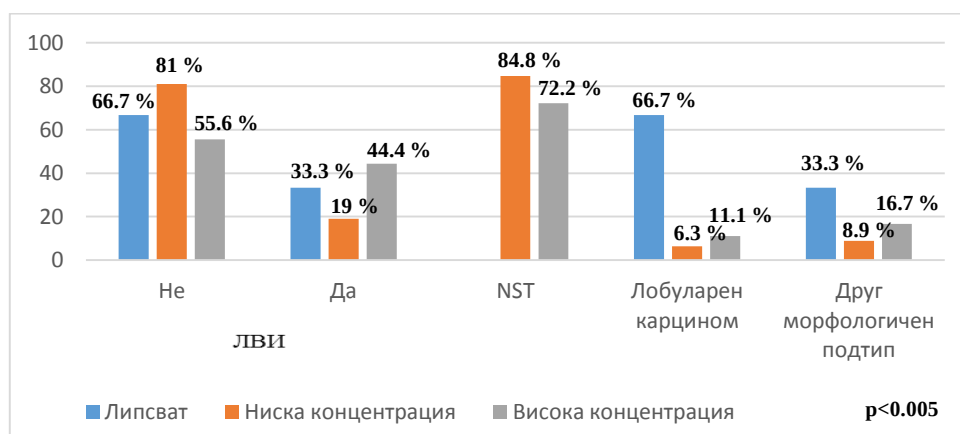


Фигура 19. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на ИТ CD20 (Субтип HER2) - сигнификантна зависимост с 5 годишна обща преживяемост

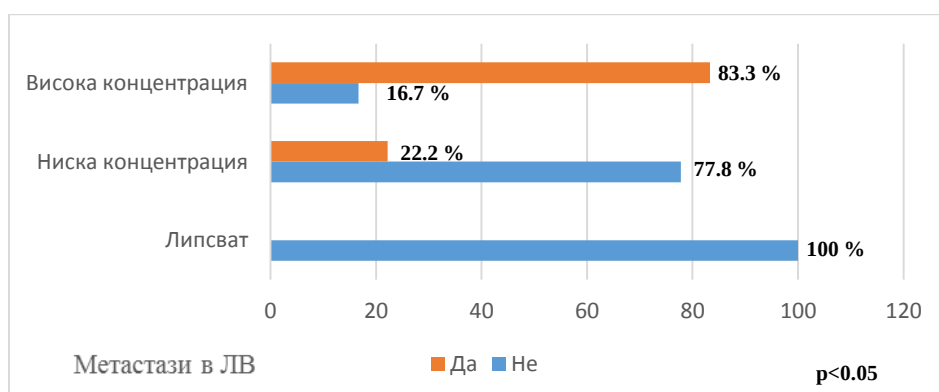
3.2.8. Проведеният корелационен анализ на **клинично-патологичните данни** според стойностите на **СТ CD20** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Фигури 20 и 21**) показва, че сигнификантна зависимост се установява при пациентите от цялата извадка и имащите субтип ТН;

- В цялата извадка показателят, който корелира със СТ CD20 е лимфоваскуларната инвазия;
- При имащите лимфоваскуларна инвазия статистически значимо по-висок процент има високата концентрация спрямо ниската, докато при нямащите ЛВИ е точно обратното.

- При пациентите от субтип ТН имащите метастатични лимфни възли са със сигнификантно по-висок процент на висока концентрация на ИТ CD20, а нямащите - на ниска.



Фигура 20. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на СТ CD20 (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с ЛВИ и хистологичен тип

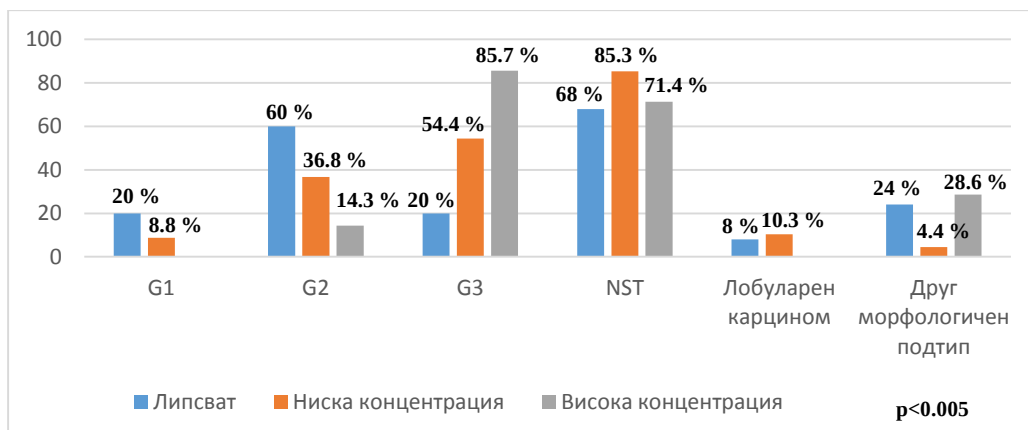


Фигура 21. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на СТ CD20 (Субтип ТН) - сигнификантна зависимост с ЛВ статус

3.2.9. Корелационният анализ на **клинично-патологичните данни** според стойностите на **ИТ FP3** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Фигура 22**) показва, че сигнификантна зависимост се установява при пациентите от цялата извадка.

В цялата извадка показателите, които корелират с ИТ FP3 са Grade и хистологичен тип;

- При G3 карциномите процентът на имащите ниска и висока концентрация ИТ FP3 (които не се различават статистически помежду си) е статистически достоверно по-голям от нямащите този подвид лимфоцити;
- По отношение на хистологичния тип, в категория друг морфологичен подтип - със статистически достоверно по-висок процент са нямащите ИТ FP3 спрямо имащите ниска концентрация, но не и спрямо имащите висока, чийто процент не се различава статистически от този на останалите две категории. При NST и Лобуларен карцином не се установи сигнификантна разлика в честотното разпределение на ИТ FP3;

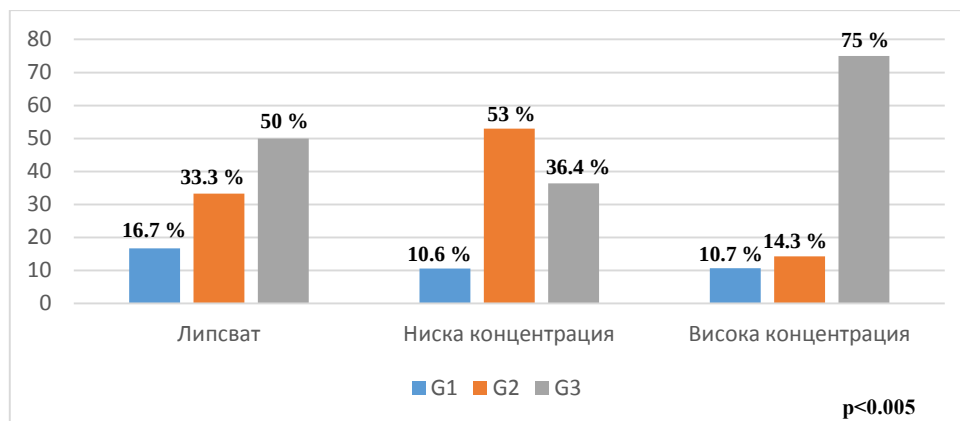


Фигура 22. Сравнителен анализ на клинико-патологичните данни според стойностите на ИТ FP3 (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с G и хистологичен тип

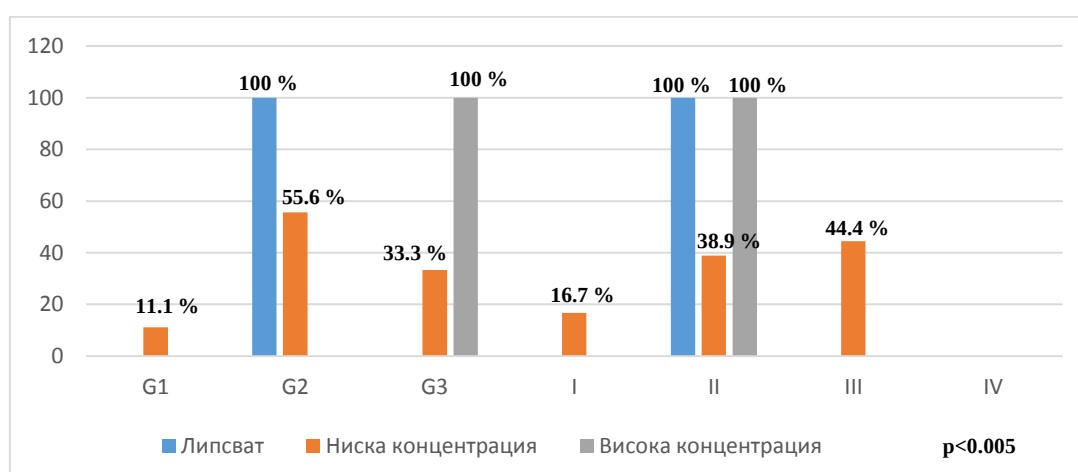
3.2.10. Корелационният анализ на **клинико-патологичните данни** според стойностите на **СТ FP3** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Фигури 23 и 24**) показва, че сигнификантна зависимост се установява при пациентите от цялата извадка и имащите субтип LumB;

- В цялата извадка показателят, който корелира със СТ FP3 е Grade;
- В категорията G3 тумори високата концентрация на СТ FP3 е със сигнификантно по-висок относителен дял спрямо тази с ниска концентрация, докато процентът на нямащите СТ FP3 не се различава статистически от тези на останалите две категории. При G2, пациентите с ниска концентрация на СТ FP3 са със статистически значимо по-висок относителен дял спрямо тези с висока концентрация, докато процентът на нямащите СТ FP3 не се различава статистически от този на останалите две категории.

- В групата на субтип LumB СТ FP3 корелира с показателите Grade и клиничен стадий;
- При имащите G3 карциноми сигнификантно по-голям е процентът на имащите висока концентрация спрямо тези с ниска, като при този субтип КГ не се установяват случаи с G3 неоплазми без FP3 клетки;
- При пациентите с клиничен стадий II статистически значимо по-висок е относителният дял на имащите висока концентрация спрямо този на имащите ниска. Липсата на СТ FP3 при този молекулярен подтип се наблюдава само при един пациент, поради което не участва в статистическия анализ.



Фигура 23. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на CT FP3 (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с G



Фигура 24. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според стойностите на CT FP3 (Субтип LumB) - сигнификантна зависимост с G и стадий

3.2.11. Корелационният анализ на клинично-патологичните данни според резултата, базиран на процент PD-L1 позитивни туморни клетки в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове показва, установи единствено в цялата извадка наличие на статистически значими различия по отношение на basal-like субтип карциномите (Таблица 10):

- При негативен резултат с липсваща експресия за PD-L1 при т. кл. относителният дял на небазалния субтип КГ е сигнификантно по-висок от този на базалния; при базален субтип се отчете единствения случай с висока експресия на PD-L1 при туморните клетки;

Таблица 10: Сравнителен анализ на експресията на PD-L1 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация; ниска и висока концентрация) според базален субтип карцином на гърда (цяла извадка)

Показател	Небазален		Базален		P
	n	%	n	%	
% PD-L1 т.кл.					
Негативен с липсваща експресия	79	96,3	14	77,8	0,023

Позитивен с ниска експресия	3	3,7	3	16,7	0,121
Позитивен с висока експресия	0	0,0	1	5,6	0,395
%PD-L1+ ИТ л.					0,083
Липсват	81	98,8	16	88,9	
Ниска концентрация	1	1,2	2	11,1	
%PD-L1+ СТ л.					
Липсват	72	87,8	10	55,6	0,004
Ниска концентрация	8	9,8	4	22,2	0,287
Висока концентрация	2	2,4	4	22,2	0,008

3.2.12. Корелационният анализ на **клинико-патологичните данни** според резултата, базиран на процент **PD-L1** позитивни интратуморни лимфоцити в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове показва, че няма сигнификантни зависимости. Със значимо по-висок процент са пациентите, при които изследваният показател липсва. Липсата на зависимости се обяснява до голяма степен с пълното отсъствие на категорията „Висока концентрация“ и наличието само на 3 случая с „Ниска концентрация“ в цялата извадка, които са при субтип ТН.

3.2.13. Корелационният анализ на **клинико-патологичните данни** според резултата, базиран на процент **PD-L1** позитивни стромални лимфоцити в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Таблица 10 и Фигура 25**) показва, че единствената сигнификантна зависимост е с Grade, хистологичен и basal-like тип в цялата извадка:

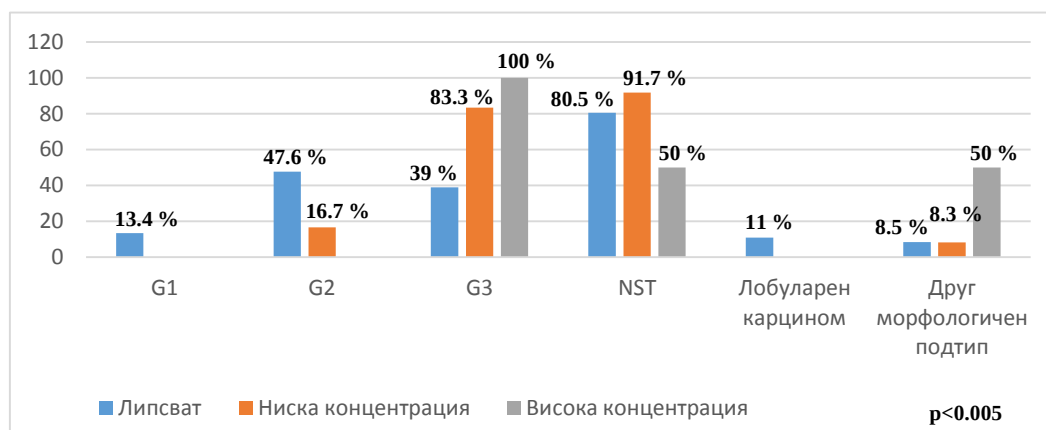
- При G3 със значимо по-висок процент са пациентите, при които изследваният

показател е с висока концентрация спрямо тези при които той липсва, а относителният дял на имащите ниска концентрация не се различава статистически от тези на останалите две категории. При G1 и G2 разликата в честотното разпределение на PD-L1 позитивни стромални лимфоцити е статистически нищожна;

- При категорията „друг морфологичен подтип“ на показателя хистологичен тип сигнификантно по-висок относителният дял имат пациентите с висока концентрация на PD-L1 позитивни стромални лимфоцити спрямо тези, при които те липсват, а относителният дял на имащите ниска концентрация не се различава статистически от тези на останалите две категории. При останалите два типа (NST и лобуларен) не се установява статистически достоверна разлика в честотното разпределение на изследвания показател;

- Небазалният субтип карцином на гърда е със статистически значимо по-висок процент от този на базалния при липсата на позитивни стромални имунни клетки (%PD-L1+ СТ л.), докато при високата им концентрация статистически достоверна е противоположната корелация.

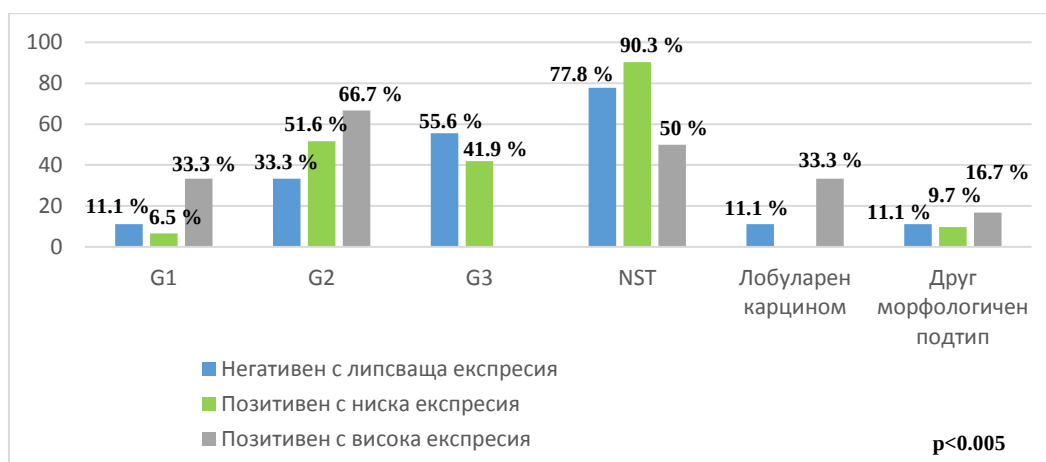
- Липсата на зависимости при отделните молекулярни подтипове КГ се обяснява до голяма степен с пълното отсъствие на категорията „Висока концентрация“ при повечето от тях, а при субтип LumA и на категорията „Ниска концентрация“.



Фигура 25. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според резултат, базиран на процент PD-L1 позитивни стромални лимфоцити (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с G и хистологичен тип

3.2.14. Корелационният анализ на **клинично-патологичните данни** според резултата, базиран на процент **CTLA4** позитивни туморни клетки в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Фигура 26**) показва, че съществува сигнификантна зависимост с Grade и хистологичен тип единствено в цялата извадка:

- При G3 със значимо по-висок процент са пациентите, при които изследваният показател е негативен с липсваща експресия спрямо тези при които той е позитивен с висока експресия, а относителният дял на имащите ниска експресия не се различава статистически от тези на останалите две категории. При G1 и G2 разликата в честотното разпределение на CTLA4 позитивни туморни клетки е статистически нищожна;
- При категорията „Лобуларен карцином“ на показателя хистологичен тип сигнификантно по-висок процент има относителният дял на пациентите с висока експресия на изследвания показател спрямо тези с ниска, а относителният дял на тези при които експресията липсва не се различава статистически от тези на останалите две категории. При останалите два типа не се установява статистически достоверна разлика в честотното разпределение на процент CTLA4 позитивни туморни клетки.



Фигура 26. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според резултат, базиран на процент **CTLA4** позитивни туморни клетки (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с *G* и хистологичен тип

3.2.15. При корелационният анализ на **клинично-патологичните данни** според резултат, базиран на процент **CTLA4** позитивни **интратуморни лимфоцити** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове не се установи сигнификантна зависимост. Липсата на зависимости се обяснява до голяма степен с пълното отсъствие на категориите „Висока концентрация“ и „Ниска концентрация“ при почти всички молекулярни подтипове.

3.2.16. Корелационният анализ на **клинично-патологичните данни** според резултата, базиран на процент **CTLA4** позитивни **стромални лимфоцити** в цялата извадка и при отделните молекулярни подтипове (**Фигури 27 и 28**) показва, че сигнификантна зависимост се установява при пациентите от цялата извадка и имащите субтип ТН;

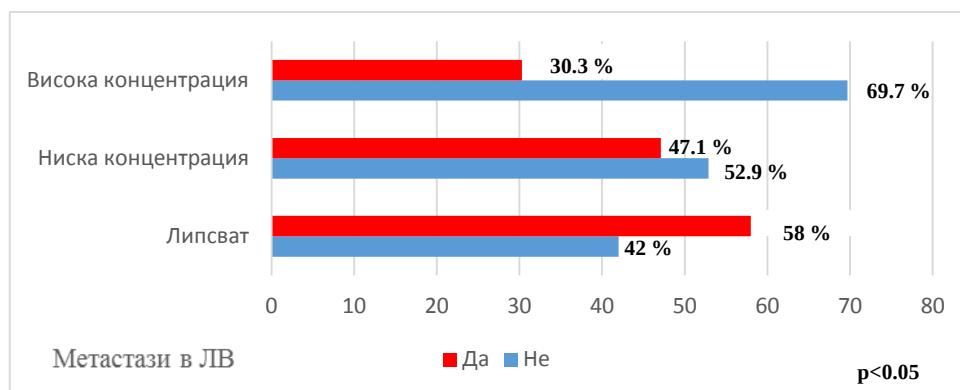
- В цялата извадка показателят, който корелира със **CTLA4** позитивни стромални лимфоцити е статуса на лимфните възли;

- При неметастатични ЛВ със статистически значимо по-висок относителен дял са пациентите с висока концентрация на изследвания показател спрямо тези, при които той липсва, докато процентът на имащите ниска концентрация не се различава статистически от тези на останалите две категории. При наличие на метастатични лимфни възли се наблюдава обратната зависимост относно високата концентрация и липсата на **CTLA-4** позитивни имунни клетки;

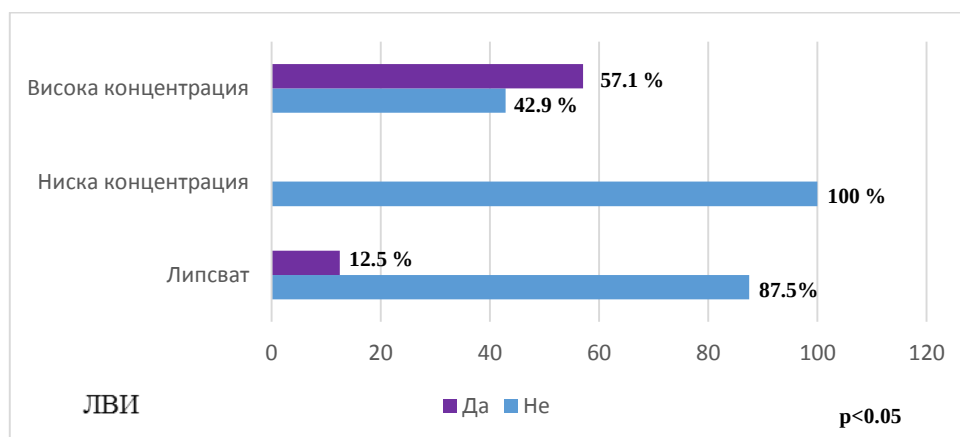
- В групата на субтип ТН, **CTLA4** позитивни стромални лимфоцити корелират с показателя лимфоваскуларна инвазия;

- При пациентите с лимфоваскуларна инвазия сигнификантно по-висока стойност има процентът на имащите висока концентрация на изследвания показател спрямо този на имащите ниска, а относителният дял на нямащите **CTLA4** позитивни стромални лимфоцити не се различават статистически от тези на останалите две категории. При пациентите без такава инвазия се

наблюдава обратна зависимост относно ниската и високата концентрация на изследвания показател.



Фигура 27. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според резултат, базиран на процент CTLA4 позитивни стромални лимфоцити (цяла извадка) - сигнификантна зависимост с ЛВ статус



Фигура 28. Сравнителен анализ на клинично-патологичните данни според резултат, базиран на процент CTLA4 позитивни стромални лимфоцити (Субтип ТН) - сигнификантна зависимост с ЛВИ

4. Корелации между количеството (концентрацията) и локализацията (интратуморна - ИТ и стромална - СТ) на ТИЛ подвидовете (ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3) при изследваните случаи (n=100) и при разпределените по групи (отделни молекулярни подтипове КГ - LumA, LumB, HER2, ТН, всеки с n=25)

- Тъй като разглежданите показатели са измерени по ординатната скала, при корелационния анализ е използван коефициента Kendall's tau-b. На **Таблица 11** се вижда, че в цялата извадка:

- ИТ CD3 корелира слабо и правопрпорционално със СТ CD3, умерено и еднопосочно с ИТ CD4, ИТ CD20 и ИТ FP3, а изразено и правопрпорционално с ИТ CD8;

- СТ CD3 корелира умерено и еднопосочно с СТ CD8, а слабо и правопрпорционално с ИТ CD20, ИТ FP3 и СТ FP3;

- ИТ CD4 корелират слабо и правопрпорционално с ИТ CD8, а умерено и еднопосочно с ИТ CD20 и ИТ FP3;
- СТ CD4 корелира слабо и правопрпорционално с ИТ FP3, а умерено и еднопосочно с СТ FP3;
- ИТ CD8 корелира умерено и еднопосочно с ИТ CD20 и ИТ FP3, а слабо и правопрпорционално с СТ FP3;
- СТ CD8 корелира умерено и еднопосочно с СТ FP3;
- ИТ CD20 корелира умерено и еднопосочно с ИТ FP3 и СТ FP3;
- СТ CD20 корелира слабо и правопрпорционално с СТ FP3;
- ИТ FP3 корелира умерено и еднопосочно с СТ FP3.

Таблица 11. Корелация между количеството (концентрацията) и локализацията (интратуморна и стромална) на ТИЛ подвидовете - ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3 (цяла извадка)

Показатели	СТ CD3	ИТ CD4	СТ CD4	ИТ CD8	СТ CD8	ИТ CD20	СТ CD20	ИТ FP3	СТ FP3
ИТ CD3	0,221*	0,332***	0,047	0,575***	-0,029	0,456***	0,030	0,430***	0,119
СТ CD3		0,051	0,096	0,135	0,372***	0,202*	0,049	0,196*	0,297**
ИТ CD4			0,138	0,245**	-0,083	0,326**	0,140	0,437***	0,049
СТ CD4				0,105	0,004	0,154	0,132	0,233*	0,339***
ИТ CD8					0,173	0,446***	0,054	0,454***	0,280**
СТ CD8						0,113	0,077	0,002	0,346***
ИТ CD20							0,118	0,414***	0,314**
СТ CD20								0,035	0,272**
ИТ FP3									0,339***

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

От **Таблица 12** става ясно, че при пациентите със субтип LumA:

- ИТ CD3 корелира изразено и правопрпорционално с ИТ CD8;
- СТ CD3 корелира умерено и еднопосочно с СТ CD8;
- ИТ CD4 корелира изразено и правопрпорционално с ИТ CD20, а умерено и еднопосочно с СТ CD20;
- СТ CD4 не корелира с разглежданите на реда показатели;
- ИТ CD8 корелира изразено и еднопосочно с ИТ CD20 и ИТ FP3;
- СТ CD8 не корелира с разглежданите на реда показатели;
- ИТ CD20 корелира умерено и еднопосочно с ИТ FP3;
- СТ CD20 не корелира с разглежданите на реда показатели;
- ИТ FP3 не корелира с разглеждания на реда показател.

Таблица 12. Корелация между количеството (концентрацията) и локализацията (интратуморна и стромална) на ТИЛ подвидовете - ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3 (субтип LumA)

Показатели	СТ CD3	ИТ CD4	СТ CD4	ИТ CD8	СТ CD8	ИТ CD20	СТ CD20	ИТ FP3	СТ FP3
ИТ CD3	0,320	0,312	0,150	0,579**	-0,134	0,242	0,147	0,363	0,147
СТ CD3		0,064	0,017	0,292	0,421*	0,206	0,071	0,277	0,323
ИТ CD4			0,344	0,389	-0,190	0,524*	0,446*	0,373	-0,033
СТ CD4				0,325	-0,096	0,380	0,284	0,225	0,285
ИТ CD8					0,190	0,553**	0,183	0,524*	0,392
СТ CD8						0,165	0,236	-0,165	0,359
ИТ CD20							0,142	0,461*	0,384
СТ CD20								-0,119	0,306
ИТ FP3									0,295

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

Резултатите от **Таблица 13** показват, че в групата на имащите субтип LumB:

- ИТ CD3 корелира изразено и правопрпорционално с ИТ CD8 и ИТ FP3, а умерено и еднопосочно с ИТ CD20;
- СТ CD3 корелира умерено и еднопосочно с ИТ CD8 и СТ FP3, а изразено и правопрпорционално с СТ CD8;
- ИТ CD4 не корелира с разглежданите в таблицата показатели;
- СТ CD4 корелира умерено и еднопосочно с СТ FP3;
- ИТ CD8 корелира умерено и еднопосочно с СТ CD8, ИТ CD20 и ИТ FP3;
- СТ CD8 корелира умерено и еднопосочно с ИТ CD20, а изразено и правопрпорционално с СТ FP3;
- ИТ CD20 корелира умерено и еднопосочно с ИТ FP3 и СТ FP3;
- СТ CD20 не корелира с разглежданите в таблицата показатели;
- ИТ FP3 не корелира с разглеждания на реда показател.

Таблица 13: Корелация между количеството (концентрацията) и локализацията (интратуморна и стромална) на ТИЛ подвидовете - ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3 (субтип LumB)

Показатели	СТ CD3	ИТ CD4	СТ CD4	ИТ CD8	СТ CD8	ИТ CD20	СТ CD20	ИТ FP3	СТ FP3
ИТ CD3	0,353	0,320	-0,192	0,689**	0,250	0,476*	0,184	0,686**	0,126
СТ CD3		0,014	0,000	0,404*	0,509*	0,243	0,344	0,359	0,419*
ИТ CD4			0,198	0,173	0,051	0,116	0,225	0,295	0,119
СТ CD4				-0,136	0,000	0,000	0,000	0,215	0,408*
ИТ CD8					0,454*	0,465*	-0,119	0,452*	0,291
СТ CD8						0,457*	0,060	0,174	0,621**

ИТ CD20	0,206	0,499*	0,418*
СТ CD20		0,285	0,121
ИТ FP3			0,303

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

От **таблица 14** се вижда, че при пациентите със субтип HER2:

- ИТ CD3 корелира умерено и правопрпорционално с ИТ CD8;
- СТ CD3 не корелира с разглежданите в таблицата показатели;
- ИТ CD4 корелира изразено и правопрпорционално с ИТ FP3;
- СТ CD4 корелира умерено и еднопосочно със СТ FP3;
- СТ CD8 не корелира с разглежданите в таблицата показатели;
- ИТ CD20 не корелира с разглежданите в таблицата показатели;
- СТ CD20 корелира умерено и еднопосочно със СТ FP3;
- ИТ FP3 не корелира с разглеждания на реда показател.

Таблица 14: Корелация между количеството (концентрацията) и локализацията (интратуморна и стромална) на ТИЛ подвидовете - ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3 (субтип HER2)

Показатели	СТ CD3	ИТ CD4	СТ CD4	ИТ CD8	СТ CD8	ИТ CD20	СТ CD20	ИТ FP3	СТ FP3
ИТ CD3	0,205	-0,089	0,229	0,419*	0,119	0,358	0,088	0,143	0,245
СТ CD3		0,152	-0,051	0,000	0,372	0,302	-0,322	0,296	0,245
ИТ CD4			0,000	-0,196	-0,112	0,059	0,174	0,508**	-0,136
СТ CD4				0,170	-0,102	0,155	0,253	0,198	0,387*
ИТ CD8					0,086	0,364	0,262	0,000	0,334
СТ CD8						0,121	-0,242	-0,078	-0,170
ИТ CD20							0,047	0,255	0,329
СТ CD20								0,175	0,398*
ИТ FP3									0,372

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

От **Таблица 15** става ясно, че при имащите субтип ТН:

- ИТ CD3 корелира изразено и правопрпорционално с ИТ CD4, ИТ CD8 и ИТ CD20, а умерено и разнопосочно със СТ CD8;
- СТ CD3 не корелира с разглежданите в таблицата показатели;
- ИТ CD4 корелира изразено и правопрпорционално с ИТ CD8 и ИТ CD20, а умерено и еднопосочно с ИТ FP3;
- СТ CD4 не корелира с разглежданите в таблицата показатели;
- ИТ CD8 корелира изразено и еднопосочно с ИТ FP3;
- СТ CD8 корелира изразено и еднопосочно с СТ FP3;
- ИТ CD20 не корелира с разглежданите на реда показатели;
- СТ CD20 не корелира с разглежданите в таблицата показатели;

- ИТ FP3 не корелира с разглеждания на реда показател.

Таблица 15: Корелация между количеството (концентрацията) и локализацията (интратуморна и стромална) на ТИЛ подвидовете - ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3 (субтип ТН)

Показатели	СТ CD3	ИТ CD4	СТ CD4	ИТ CD8	СТ CD8	ИТ CD20	СТ CD20	ИТ FP3	СТ FP3
ИТ CD3	-0,020	0,712***	0,030	0,537**	-0,389*	0,587**	-0,220	0,351	-0,047
СТ CD3		-0,064	0,372	-0,211	0,161	0,014	0,091	-0,166	0,200
ИТ CD4			0,071	0,574**	-0,170	0,500*	-0,320	0,450*	0,075
СТ CD4				0,137	0,165	0,111	0,000	0,275	0,297
ИТ CD8					-0,120	0,338	-0,075	0,585**	0,137
СТ CD8						-0,365	0,161	-0,065	0,555**
ИТ CD20							0,014	0,300	0,087
СТ CD20								-0,126	0,240
ИТ FP3									0,304

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

5. Корелация между експресията на PD-L1 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация; ниска и висока концентрация) - %PD-L1 т.кл., %PD-L1+ ИТ л., %PD-L1+ СТ л.) при изследваните случаи (n=100) и при разпределените по групи (отделни молекулярни подтипове КГ - LumA, LumB, HER2, ТН, всеки с n=25)

Проведеният корелационен анализ между експресията на PD-L1 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация) показва, че (**Таблица 16**) в цялата извадка съществува статистически достоверна правопрпорционална корелация между трите изследвани показателя - %PD-L1 т.кл., %PD-L1+ ИТ л. и %PD-L1+ СТ л., като между %PD-L1 т.кл. и %PD-L1+ ИТ л. тя е изразена по сила, а между останалите две двойки – умерена;

- Единственият субтип при който също има корелация е ТН, като тя е еднопосочна и изразена по сила между трите показателя на PD-L1.

6. Корелация между експресията на PD-L1 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация; ниска и висока концентрация - %PD-L1 т.кл., %PD-L1+ ИТ л., %PD-L1+ СТ л.) и **другите проучвани имунни показатели** (ТИЛ%, ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3; CTLA4 т. кл., %CTLA4+ ИТ л., %CTLA4+ СТ л.;) при изследваните случаи (n=100) и при разпределените по групи (отделни молекулярни подтипове КГ - LumA, LumB, HER2, ТН, всеки с n=25)

6.1. Проведеният корелационен анализ на експресията на **PD-L1** при **туморните и имунни клетки** според **ТИЛ** подвидовете показва, че статистически значими корелации в цялата извадка и при субтипите LumB и TH (**Таблица 17**):

- **В цялата извадка:**

- %PD-L1 т.кл. корелира слабо и еднопосочно с ИТ CD3, ИТ CD20 и ИТ FP3, умерено и правопрпорционално с ИТ CD8, изразено и еднопосочно с %CTLA4+ ИТ л.;

- %PD-L1+ ИТ л. корелира слабо и еднопосочно с ИТ CD3 и ИТ CD8, а силно и правопрпорционално с %CTLA4+ ИТ л.;

- %PD-L1+ СТ л. корелира умерено и правопрпорционално с ИТ CD3, ИТ FP3 и %CTLA4+ ИТ л., слабо и еднопосочно с ИТ CD4, ИТ CD8, ИТ CD20 и СТ FP3, а слабо и разнопосочно с % CTLA4 т. кл. и %CTLA4+ СТ л.;

- В групата на субтип **LumB** единствено %PD-L1+ СТ л. корелира правопрпорционално и умерено по сила с СТ CD4, правопрпорционално и изразено със СТ FP3, а обратнопрпорционално и умерено с %CTLA4+ СТ л.;

- В групата на **субтип TH** :

- %PD-L1 т.кл. корелира умерено и еднопосочно с ИТ CD3, ИТ CD20, ИТ FP3 и %CTLA4+ ИТ л., а изразено и правопрпорционално с ИТ CD8;

- %PD-L1+ ИТл. корелира умерено и еднопосочно с ИТ CD8, а силно и правопрпорционално с %CTLA4+ ИТ л.;

- %PD-L1+ СТл. корелира умерено и правопрпорционално с ИТ CD3, ИТ CD20 и %CTLA4+ ИТ л., умерено и разнопосочно с СТ CD3, а изразено и правопрпорционално с ИТ CD4, ИТ CD8 и ИТ FP3.

6.2. Корелационният анализ на експресията на **PD-L1** при **туморните и имунни клетки** (с интратуморна и стромална локализация; ниска и висока концентрация) според стойностите на %**ТИЛ**, както в цялата извадка, така и в четирите молекулярни субтипа установи, че няма сигнификантни различия.

Таблица 16: Корелация между експресията на PD-L1 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация) - %PD-L1 т.кл., %PD-L1+ ИТ л., %PD-L1+ СТ л.

Показатели	Цяла извадка		Субтип LumA		Субтип LumB		Субтип HER2		Субтип TN	
	%PD-L1+ ИТ л.	%PD-L1+ СТ л.	%PD-L1+ ИТ л.	%PD-L1+ СТ л.	%PD-L1+ ИТ л.	%PD-L1+ СТ л.	%PD-L1+ ИТ л.	%PD-L1+ СТ л.	%PD-L1+ ИТ л.	%PD-L1+ СТ л.
%PD-L1 т.кл.	0,631***	0,432***	.	.	.	.	.	.	0,609**	0,598**
%PD-L1+ ИТ л.		0,420***		.		.		.		0,532**

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

♦ - празните полета се получават когато едната променлива е константа или с липсващи стойности

Таблица 17: Корелация между експресията на PD-L1 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация) - %PD-L1 т.кл., %PD-L1+ ИТ л., %PD-L1+ СТ л. и количеството (концентрацията) и локализацията (интратуморна и стромална) на ТИЛ подвидовете - ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3, експресията на CTLA-4 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация) - % CTLA4 т. кл., %CTLA4+ ИТ л., %CTLA4+ СТ л.

Показатели	Цяла извадка			Субтип LumA			Субтип LumB			Субтип HER2			Субтип TH		
	%PD-L1 т.кл.	%PD-L1+ ИТ л.	%PD-L1+ СТ л.	%PD- L1 т.кл.	%PD- L1+ ИТ л.	%PD- L1+ СТ л.	%PD- L1 т.кл.	%PD- L1+ ИТ л.	%PD- L1+ СТ л.	%PD- L1 т.кл.	%PD- L1+ ИТ л.	%PD- L1+ СТ л.	%PD- L1 т.кл.	%PD- L1+ ИТ л.	%PD- L1+ СТ л.
ИТ CD3	0,291**	0,218*	0,339***	0,102	.	.	.	.	0,186	.	.	0,260	0,463*	0,301	0,464*
СТ CD3	-0,002	0,122	0,024	0,196	.	.	.	.	0,350	.	.	0,180	-0,128	0,225	-0,389*
ИТ CD4	0,120	0,062	0,188*	0,327	.	.	.	.	0,257	.	.	0,021	0,314	0,201	0,514**
СТ CD4	0,024	0,150	0,152	0,044	.	.	.	.	0,459*	.	.	0,029	0,045	0,299	0,066
ИТ CD8	0,338**	0,243*	0,269**	0,127	.	.	.	.	0,186	.	.	-0,301	0,630**	0,413*	0,627**
СТ CD8	-0,098	0,100	0,028	-0,127	.	.	.	.	0,178	.	.	0,036	-0,226	0,142	-0,140
ИТ CD20	0,237*	0,153	0,204*	0,230	.	.	.	.	0,210	.	.	0,166	0,449*	0,302	0,384*
СТ CD20	0,011	0,074	-0,033	-0,060	.	.	.	.	0,120	.	.	-0,147	0,024	0,096	-0,112
ИТ FP3	0,211*	0,156	0,332**	0,181	.	.	.	.	0,378	.	.	0,301	0,414*	0,282	0,504**
СТ FP3	-0,031	0,146	0,239*	-0,075	.	.	.	.	0,538**	.	.	0,345	0,007	0,301	0,191
% CTLA4 т. кл.	-0,129	-0,130	-0,248**	0,057	.	.	.	.	-0,245	.	.	0,012	-0,309	-0,208	-0,291
%CTLA4+ ИТ л.	0,513***	0,812***	0,341**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0,487*	0,799***	0,425*
%CTLA4+ СТ л.	-0,118	-0,088	-0,226*	0,177	.	.	.	.	-0,395*	.	.	0,031	-0,270	-0,088	-0,169

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

♦ - празните полета се получават когато едната променлива е константа или с липсващи стойности

7. Проведеният корелационен анализ между експресията на CTLA-4 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация; ниска и висока концентрация) - % CTLA4 т. кл., %CTLA4+ ИТ л., %CTLA4+ СТ л. показва, че в цялата извадка и при четирите молекулярни субтипа съществува статистически достоверна, правопрпорционална корелация единствено между % CTLA4 т. кл. и %CTLA4+ СТ л., като при субтип LumA тя е най-силна, а в цялата извадка и останалите три субтипа – по-слабо изразена по сила (Таблица 18).

8. Корелация между експресията на CTLA-4 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация; ниска и висока концентрация) - % CTLA4 т. кл., %CTLA4+ ИТ л., %CTLA4+ СТ л., и другите проучвани имунни показатели (ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3; ТИЛ%) при изследваните случаи (n=100) и при разпределенияте по групи (отделни молекулярни подтипове КГ – LumA, LumB, HER2, TH, всеки с n=25);

8.1. Проведеният корелационен анализ между експресията на CTLA-4 при туморните и имунни клетки и ТИЛ подвидовете - ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3 показва, статистически значими корелации в цялата извадка и при субтиповете LumA, HER2 и TH (Таблица 19):

- В цялата извадка % CTLA4 т. кл. корелира слабо и разнопосочно с ИТ CD4; % CTLA4 + ИТ л. корелира слабо и еднопосочно с СТ FP3; % CTLA4 + СТ л. корелира слабо и обратнопропорционално с ИТ CD4;
- В групата на субтип LumA %CTLA4 т. кл. и % CTLA4 + СТ л. корелират обратнопропорционално и изразено по сила със СТ CD20;
- В групата на субтип HER2 %CTLA4 т. кл. корелира изразено и обратнопропорционално с ИТ CD4, а еднопосочно и умерено със СТ CD8; %CTLA4 + СТ л. корелира обратнопропорционално и умерено по сила с ИТ CD4;
- В групата на субтип TH единствено %CTLA4 + ИТ л. корелира умерено и еднопосочно със СТ FP3.

Таблица 18: Корелация между експресията на CTLA-4 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация) - % CTLA4 т. кл., %CTLA4+ ИТ л., %CTLA4+ СТ л.

Показатели	Цяла извадка		Субтип LumA		Субтип LumB		Субтип HER2		Субтип TH	
	%CTLA4+ ИТ л.	%CTLA4+ СТ л.	%CTLA4+ ИТ л.	%CTLA4+ СТ л.	%CTLA4+ ИТ л.	%CTLA4+ СТ л.	%CTLA4+ ИТ л.	%CTLA4+ СТ л.	%CTLA4+ ИТ л.	%CTLA4+ СТ л.
% CTLA4 т. кл.	-0,105	0,662***	.	0,790***	.	0,605**	.	0,563**	-0,166	0,536**
%CTLA4+ ИТ л.		-0,043		.		.		.		0,000

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001 ♦ - празните полета се получават когато едната променлива е константа или с липсващи стойности

Таблица 19: Корелация между CTLA-4 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация; ниска и висока концентрация) - % CTLA4 т. кл., %CTLA4+ ИТ л., %CTLA4+ СТ л. и количеството (концентрацията) и локализацията (интратуморна и стромална) на ТИЛ подвидовете - ИТ CD3, СТ CD3, ИТ CD4, СТ CD4, ИТ CD8, СТ CD8, ИТ CD20, СТ CD20, ИТ FP3, СТ FP3

Показатели	Цяла извадка			Субтип LumA			Субтип LumB			Субтип HER2			Субтип TH		
	% CTLA4 т. кл.	% CTLA4 + ИТ л.	% CTLA4 + СТ л.	% CTLA4 т. кл.	% CTLA4 + ИТ л.	% CTLA4 + СТ л.	% CTLA4 т. кл.	% CTLA4 + ИТ л.	% CTLA4 + СТ л.	% CTLA4 т. кл.	% CTLA4 + ИТ л.	% CTLA4 + СТ л.	% CTLA4 т. кл.	% CTLA4 + ИТ л.	% CTLA4 + СТ л.
ИТ CD3	-0,042	0,131	-0,023	-0,112	.	-0,087	0,216	.	0,056	0,094	.	0,221	0,014	0,158	-0,049
СТ CD3	-0,067	0,099	-0,029	-0,370	.	-0,278	0,029	.	0,097	0,084	.	0,184	0,342	0,180	0,076
ИТ CD4	-0,197*	0,008	-0,259**	-0,299	.	-0,271	0,053	.	-0,189	-0,541**	.	-0,436*	0,115	0,060	-0,117
СТ CD4	-0,053	0,176	-0,090	-0,270	.	-0,256	-0,268	.	-0,375	0,086	.	0,000	0,255	0,344	0,255
ИТ CD8	-0,040	0,159	-0,067	-0,125	.	-0,039	-0,069	.	0,012	0,264	.	0,068	-0,110	0,253	-0,230
СТ CD8	0,107	0,174	-0,026	0,006	.	-0,039	0,138	.	-0,012	0,439*	.	0,119	0,043	0,296	-0,080
ИТ CD20	-0,039	0,124	-0,021	-0,096	.	-0,035	-0,201	.	-0,131	0,165	.	0,013	-0,115	0,241	0,117
СТ CD20	-0,100	0,116	-0,158	-0,515**	.	-0,568**	0,187	.	0,008	-0,080	.	-0,035	0,147	0,180	-0,014
ИТ FP3	-0,150	0,164	-0,125	-0,265	.	-0,140	0,160	.	-0,014	-0,086	.	-0,164	-0,143	0,293	-0,073
СТ FP3	0,009	0,209*	-0,032	-0,244	.	-0,153	-0,190	.	-0,217	0,225	.	0,082	0,172	0,406*	0,146

* - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0, 001

8.2. Сравнителният анализ на експресията на CTLA-4 при туморните и имунни клетки (с интратуморна и стромална локализация) според стойностите на %ТИЛ, както в цялата извадка, така и в четирите молекулярни субтипа установи, че няма сигнификантни различия.

9. Определяне на преобладаващ подвид лимфоцити при изследваните случаи с КГ (n=100) и при разпределените по групи (отделни молекулярни подтипове КГ - LumA, LumB, HER2, TH, всеки с n=25)

Сравнителният анализ на подвидове лимфоцити CD3 и CD20 установи, че (Таблица 20):

В категория „Наличие“ (определена на база брой случаи с налични CD3 и CD20 лимфоцити, независимо от концентрацията им)

- В цялата извадка и субтипове LumA и LumB относителният дял на туморите с наличие на ИТ CD3 е сигнификантно по-голям от този на ИТ CD20. При останалите субтипове няма статистически значима разлика между наличието на разглежданите подвидове лимфоцити с интратуморна локализация;

- При стромалната локализация, в цялата извадка и четирите молекулярни субтипове няма статистически достоверна разлика между наличието на разглежданите подвидове лимфоцити;

В категория „Висока“ (определена на база брой случаи с висока ИТ и СТ концентрация за CD3 и CD20 лимфоцити)

- Относителният дял на туморите с ИТ CD3 с висока концентрация в цялата извадка и при имащите субтип TH е сигнификантно по-голям от този на ИТ CD20. При останалите субтипове КГ статистически значима разлика между разглежданите подвидове лимфоцити с висока интаруморна концентрация не се установява;

- В цялата извадка и при четирите молекулярни субтипа относителният дял на туморите с висока концентрация на СТ CD3 е статистически значимо по-голям от този на СТ CD20.

Таблица 20: Сравнителен анализ на подвидове лимфоцити CD3 и CD20

Концентрация	Група	Локализация	CD3		CD20		P
			n	%	n	%	
Наличие	Цяла извадка	ИТ	88	88,0	57	57,0	<0,001
		СТ	98	98,0	97	97,0	1,000
	Субтип LumA	ИТ	20	80,0	11	44,0	0,020
		СТ	25	100,0	24	96,0	1,000
	Субтип LumB	ИТ	22	88,0	12	48,0	0,006
		СТ	25	100,0	24	96,0	1,000
	Субтип HER2	ИТ	24	96,0	19	76,0	0,103
		СТ	25	100,0	24	96,0	1,000

Висока	Субтип ТН	СТ	24	96,0	25	100,0	1,000
		ИТ	22	88,0	15	60,0	0,053
		СТ	24	96,0	24	96,0	0,470
	Цяла извадка	ИТ	14	14,0	0	0,0	<0,001
		СТ	67	67,0	18	18,0	<0,001
	Субтип LumA	ИТ	0	0,0	0	0,0	-
		СТ	13	52,0	4	16,0	0,017
	Субтип LumB	ИТ	3	12,0	0	0,0	0,234
		СТ	18	72,0	3	12,0	<0,001
	Субтип HER2	ИТ	4	16,0	0	0,0	0,118
		СТ	18	72,0	5	20,0	<0,001
	Субтип ТН	ИТ	7	28,0	0	0,0	0,014
		СТ	18	72,0	6	24,0	0,002

Сравнителният анализ на подвидове лимфоцити CD4, CD8 и FP3 (Таблица 21) показва, че:

При категория „Наличие“ (определена на база брой случаи с налични CD4, CD8 и FoxP3 лимфоцити, независимо от концентрацията им)

- В цялата извадка и субтип ТН относителният дял на туморите имащи ИТ CD4 е сигнификантно по-малък от тези на ИТ CD8 и ИТ FP3, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си. При субтипове LumB и HER2 статистически значимо по-често се установяват ИТ FP3 спрямо ИТ CD4, но не и спрямо ИТ CD8, чиито относителен дял не се различава статистически от останалите два. При субтип LumA в значимо по-висок процент от туморите се установява ИТ CD8 спрямо ИТ CD4, но не и спрямо ИТ FP3, чийто процент не се различава статистически от този на останалите два;

- При стромалните лимфоцити единствено в цялата извадка статистически достоверно в по-висок процент се установява СТ CD8 спрямо СТ CD4, но не и спрямо СТ FP3, чийто относителен дял не се различава статистически от този на останалите два. При четирите молекулярни субтипа няма статистически достоверна разлика между наличието на разглежданите подвидове лимфоцити със стромална локализация;

При категория „Висока“ (определена на база брой случаи с висока ИТ или СТ концентрация за CD4, CD8 и FoxP3 лимфоцити)

- Статистически значими разлики относно високата концентрация на CD4, CD8 и FoxP3 лимфоцити се установяват само при стромалните лимфоцити в цялата извадка и разглежданите молекулярни субтипове без LumA;

- В цялата извадка и субтип HER2 относителният дял на високата концентрация на СТ CD4 е сигнификантно по-малък от тези на СТ CD8 и

СТ FP3, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си;

- В групите на субтипове LumB и TH сигнификантно по-висок процент на високата концентрация се установява при СТ CD8 спрямо СТ CD4, но не и спрямо СТ FP3, чийто процент не се различава статистически от останалите два.

Таблица 21. Сравнителен анализ на подвидове лимфоцити CD4, CD8 и FP3

Концен- трация	Група	Локали- зация	CD4		CD8		FP3	
			n	%	n	%	n	%
Наличие	Цяла извадка	ИТ	43	43,0 ^a	78	78,0 ^b	75	75,0 ^b
		СТ	89	89,0 ^a	98	98,0 ^{bc}	94	94,0 ^{ac}
	Субтип LumA	ИТ	7	28,0 ^a	18	72,0 ^{bc}	14	56,0 ^{ac}
		СТ	22	88,0 ^a	25	100,0 ^a	24	96,0 ^a
	Субтип LumB	ИТ	11	44,0 ^a	18	72,0 ^{ac}	20	80,0 ^{bc}
		СТ	23	92,0 ^a	24	96,0 ^a	24	96,0 ^a
	Субтип HER2	ИТ	15	60,0 ^a	22	88,0 ^{ac}	23	92,0 ^{bc}
		СТ	22	88,0 ^a	25	100,0 ^a	24	96,0 ^a
	Субтип TH	ИТ	10	40,0 ^a	20	80,0 ^b	18	72,0 ^b
		СТ	22	88,0 ^a	24	96,0 ^a	22	88,0 ^a
Висока	Цяла извадка	ИТ	8	8,0 ^a	8	8,0 ^a	7	7,0 ^a
		СТ	7	7,0 ^a	39	39,0 ^b	28	28,0 ^b
	Субтип LumA	ИТ	0	0,0	0	0,0	0	0,0
		СТ	1	4,0 ^a	7	28,0 ^a	5	20,0 ^a
	Субтип LumB	ИТ	0	0,0 ^a	2	8,0 ^a	1	4,0 ^a
		СТ	2	8,0 ^a	9	36,0 ^{bc}	6	24,0 ^{ac}
	Субтип HER2	ИТ	8	32,0 ^a	2	8,0 ^a	3	12,0 ^a
		СТ	2	8,0 ^a	11	44,0 ^b	10	40,0 ^b
	Субтип TH	ИТ	0	0,0 ^a	4	16,0 ^a	3	12,0 ^a
		СТ	2	8,0 ^a	12	48,0 ^{bc}	7	28,0 ^{ac}

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

10. Определяне на предпочитана локализация на лимфоцитите при изследваните случаи с КГ (n=100) и при разпределените по групи (отделни молекулярни подтипове КГ - LumA, LumB, HER2, TH, всеки с n=25)

Предпочитаната локализация – интратуморна (ИТ) или стромална (СТ), от подвидовете лимфоцити (CD20, CD3, CD4, CD8, FoxP3, PD-L1 и CTLA4), е определена на база брой случаи със стромална/интратуморна локализация на лимфоцитния инфилтрат независимо от концентрацията на

клетките (категория „наличие“) и при високата им концентрация (категория „висока концентрация“).

От **Таблицы 22-26** става ясно, че:

- В цялата извадка има най-голям брой показатели (почти всички), при които изследваната разлика е статистически достоверна, като стромалната локализация е по-често срещано място за разпространение на имунния клетъчен инфилтрат. Единствено при CD3 и CD4 с висока концентрация разликата е статистически нищожна;

Субтип LumA, Категория „наличие“

- Стромалната локализация е сигнификантно предпочитана при CD4, CD8, CD20, FoxP3 и CTLA4 позитивни лимфоцити, независимо от концентрацията им;

Субтип LumA, Категория „висока концентрация“

- Стромалната локализация е статистически значимо по-честа при CD3, CD8 и CTLA4. Интратуморна локализация с висока концентрация липсва при всички разглеждани показатели;

Субтип LumB, Категория „наличие“

- Стромалната локализация е статистически достоверно предпочитана при CD3, CD4, CD20, PD-L1 и CTLA4;

Субтип LumB, Категория „висока концентрация“

- Стромалната локализация е сигнификантно по-висока при CD3 и CD8;

Субтип HER2, Категория „наличие“

- Стромалната локализация е статистически достоверно по-честа за високата концентрация на CD8, CD20 и CTLA4 лимфоцити;

Субтип HER2, Категория „висока концентрация“

- Стромалната локализация е статистически значимо по-честа при CD3, CD8 и CTLA4;

Субтип TH, Категория „наличие“

- Стромалната локализация е сигнификантно по-висока при CD4, CD20 и CTLA4;

Субтип TH, Категория „висока концентрация“

- Стромалната локализация е сигнификантно по-висока при CD3, CD8, CD20, PD-L1 и CTLA4.

Таблица 22. Сравнителен анализ на предпочитаната локализация от подвидовете лимфоцити (CD20, CD3, CD4, CD8 и FoxP3, PD-L1 и CTLA4 (цяла извадка)

Концентрация	Локализация	Интратуморна		Стромална		P
		п	%	п	%	
Наличие	CD3	88	88,0	98	98,0	0,013
	CD4	43	43,0	89	89,0	<0,001
	CD8	78	78,0	98	98,0	<0,001
	CD20	57	57,0	97	97,0	<0,001

	FoxP3	75	75,0	94	94,0	<0,001
	PD-L1	3	3,0	18	18,0	0,001
	CTLA4	2	2,0	50	50,0	<0,001
Висока	CD3	18	72,0	67	67,0	0,539
	CD4	14	14,0	7	7,0	0,160
	CD8	8	8,0	39	39,0	<0,001
	CD20	0	0,0	18	18,0	<0,001
	FoxP3	7	7,0	28	28,0	<0,001
	PD-L1	0	0,0	6	6,0	0,038
	CTLA4	0	0,0	33	33,0	<0,001

Таблица 23. Сравнителен анализ на предпочитаната локализация от подвидовете лимфоцити (CD20, CD3, CD4, CD8 и FoxP3, PD-L1 и CTLA4 (подтип LumA))

Концен-трация	Локализация Показател	Интрагуморна		Стромална		P
		n	%	n	%	
Наличие	CD3	20	80,0	25	100,0	0,059
	CD4	7	28,0	22	88,0	<0,001
	CD8	18	72,0	25	100,0	0,014
	CD20	11	44,0	24	96,0	<0,001
	FoxP3	14	56,0	24	96,0	0,003
	PD-L1	0	0,0	0	0,0	-
	CTLA4	0	0,0	18	72,0	<0,001
Висока	CD3	0	0,0	13	52,0	<0,001
	CD4	0	0,0	1	4,0	1,000
	CD8	0	0,0	7	28,0	0,014
	CD20	0	0,0	4	16,0	0,118
	FoxP3	0	0,0	5	20,0	0,059
	PD-L1	0	0,0	0	0,0	-
	CTLA4	0	0,0	13	52,0	<0,001

Таблица 24: Сравнителен анализ на предпочитаната локализация от подвидовете лимфоцити (CD20, CD3, CD4, CD8 и FoxP3, PD-L1 и CTLA4 (подтип LumB))

Концен-трация	Локализация Показател	Интрагуморна		Стромална		P
		n	%	n	%	
Наличие	CD3	22	88,0	25	100,0	0,013
	CD4	11	44,0	23	92,0	<0,001
	CD8	18	72,0	24	96,0	0,054
	CD20	12	48,0	24	96,0	<0,001
	FoxP3	20	80,0	24	96,0	0,192
	PD-L1	0	0,0	6	24,0	0,030
	CTLA4	0	0,0	9	36,0	0,003
Висока	CD3	3	12,0	18	72,0	<0,001
	CD4	0	0,0	2	8,0	0,470
	CD8	2	8,0	9	36,0	0,040
	CD20	0	0,0	3	12,0	0,234

FoxP3	1	4,0	6	24,0	0,103
PD-L1	0	0,0	0	0,0	-
CTLA4	0	0,0	5	20,0	0,059

Таблица 25. Сравнителен анализ на предпочитаната локализация от подвидовете лимфоцити (CD20, CD3, CD4, CD8 и FoxP3, PD-L1 и CTLA4 (подтип HER2))

Концен- трация	Локализация	Интрагуморна		Стромална		P
		п	%	п	%	
Наличие	CD3	24	96,0	24	96,0	0,470
	CD4	15	60,0	22	88,0	0,053
	CD8	22	88,0	25	100,0	0,013
	CD20	19	76,0	25	100,0	0,030
	FoxP3	23	92,0	24	96,0	1,000
	PD-L1	0	0,0	2	8,0	0,470
	CTLA4	0	0,0	14	56,0	<0,001
Висока	CD3	4	16,0	18	72,0	<0,001
	CD4	8	32,0	2	8,0	0,077
	CD8	2	8,0	11	44,0	0,010
	CD20	0	0,0	5	20,0	0,059
	FoxP3	3	12,0	10	40,0	0,053
	PD-L1	0	0,0	0	0,0	-
	CTLA4	0	0,0	8	32,0	0,007

Таблица 26. Сравнителен анализ на предпочитаната локализация от подвидовете лимфоцити (CD20, CD3, CD4, CD8 и FoxP3, PD-L1 и CTLA4 (подтип TH))

Концен- трация	Локализация	Интрагуморна		Стромална		P
		п	%	п	%	
Наличие	CD3	22	88,0	24	96,0	0,602
	CD4	10	40,0	22	88,0	0,001
	CD8	20	80,0	24	96,0	0,192
	CD20	15	60,0	24	96,0	0,006
	FoxP3	18	72,0	22	88,0	0,289
	PD-L1	3	12,0	10	40,0	0,053
	CTLA4	2	8,0	9	36,0	0,040
Висока	CD3	7	28,0	18	72,0	0,005
	CD4	25	100,0	2	8,0	0,470
	CD8	4	16,0	12	48,0	0,034
	CD20	0	0,0	6	24,0	0,030
	FoxP3	3	12,0	7	28,0	0,289
	PD-L1	0	0,0	6	24,0	0,030
	CTLA4	0	0,0	7	28,0	0,014

11. Анализ на PD-L1 и CTLA-4 туморната и имунна експресия при отделните субтипове КГ - LumA, LumB, HER2 и TH.

Проведеният анализ за експресията на PD-L1 и CTLA-4 при туморните (% PD-L1 т.кл, % CTLA4 т. кл.) и стромални/интратуморни имунни клетки (%PD-L1+ СТ л., %CTLA4+ СТ л., %PD-L1+ ИТ л., %CTLA4+ ИТ л.), е базиран на общия брой случаи с позитивност (независимо от концентрацията им - категория „наличие“) и при високата им концентрация (категория „висока концентрация“).

Установи се, че (**Таблица 27**):

При категория „**Наличие**“

- Сигнификантни разлики има при показателите %PD-L1 т.кл., %PD-L1+ СТ л., %CTLA4 т. кл. и %CTLA4+ СТ л.;
- Относно позитивността за %PD-L1 при т. кл. статистически значимо по-висок процент имат пациентите от субтип TH спрямо субтипове LumB и HER2, но не и спрямо имащите субтип LumA, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на останалите субтипове;
- Отново при субтип TH наблюдаваме статистически достоверно най-висок процент на %PD-L1+ СТ л. този път спрямо субтипове LumA и HER2, но не и спрямо относителният дял на субтип LumB;
- При %CTLA4 т. кл. статистически значимо по-висок процент имат пациентите от субтип LumA спрямо субтипове LumB и TH, но не и спрямо имащите субтип HER2, чийто относителен дял е сигнификантно по-висок единствено от този на имащите субтип LumB;
- Относно %CTLA4 + СТ л. статистически значимо по-висок процент имат пациентите от субтип LumA спрямо субтипове LumB и TH, но не и спрямо имащите субтип HER2, чийто относителен дял не се различават статистически от тези на останалите субтипове;

При категория „**Висока концентрация**“

- Сигнификантни разлики има при показателите %PD-L1+ СТ л., %CTLA4 т. кл. и %CTLA4+ СТ л.;
- Относно %PD-L1 + СТ л. статистически значимо по-висок процент има при субтип TH спрямо всички останали субтипове, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си;
- При %CTLA4 т. кл. статистически достоверно по-висок процент имат пациентите от субтип LumA спрямо всички останали субтипове, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си;
- Относно %CTLA4 + СТ л. – сигнификантно по-висок процент имат пациентите от субтип LumA спрямо субтип LumB, но не и спрямо имащите субтип HER2 и TH, чиито относителни дялове не се различават статистически, както помежду си, така и от тези на останалите субтипове.

Таблица 27. Сравнителен анализ на експресиите на PD-L1 и CTLA-4 (наличие и висока) при отделните молекулярни подтипове

Концен- трация	Показател	Субтип LumA		Субтип LumB		Субтип HER2		Субтип TN	
		п	%	п	%	п	%	п	%
Наличие	%PD-L1 т.кл.	1	4,0 ^{ac}	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	6	24,0 ^{bc}
	%PD-L1+ ИТ л.	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	3	12,0 ^a
	%PD-L1+ СТ л.	0	0,0 ^a	6	24,0 ^{bc}	2	8,0 ^{ac}	10	40,0 ^b
	%CTLA4 т. кл.	15	60,0 ^a	4	16,0 ^b	12	48,0 ^{ac}	6	24,0 ^{bc}
	%CTLA4+ ИТ л.	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	2	8,0 ^a
	%CTLA4+ СТ л.	18	72,0 ^a	9	36,0 ^{bc}	14	56,0 ^{ac}	9	36,0 ^{bc}
Висока	%PD-L1 т.кл.	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	1	4,0 ^a
	%PD-L1+ ИТ л.	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	%PD-L1+ СТ л.	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	6	24,0 ^b
	% CTLA4 т. кл.	6	24,0 ^a	0	0,0 ^b	0	0,0 ^b	0	0,0 ^b
	%CTLA4+ ИТ л.	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	%CTLA4+ СТ л.	13	52,0 ^a	5	20,0 ^{bc}	8	32,0 ^{ac}	7	28,0 ^{ac}

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

V. ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от нашето проучване са сходни с данните на ECIS от 2020г., относно възрастово специфичната заболяемост от КГ в България. В проучваната от нас популация, честотата на това заболяване се увеличава рязко след 30 год. възраст, като достига своя пик при възрастовата група на 70-79 годишните жени, след което намалява.

Относно възрастовото разпределение при субтипове КГ установихме, че при по-млади пациенти по-често се среща субтип LumA, в сравнение с другите варианти на тази неоплазма, които са диагностицирани предимно след 50 годишна възраст. Нашите резултати се различават от тези, получени при повечето други изследвания. Според тях младата възраст (за която няма ясна дефиниция и е определена различно в отделните проучвания, вкл. като ≤ 35 / ≤ 40 год. възраст) е независим прогностичен фактор за по-честа поява на биологично и клинично агресивни тумори. Съгласно данните от някои изследвания в по-ранна възраст преобладават HER2 позитивен и ТН, вкл. базално-подобен субтип и с BRCA мутации, а според други - луминалния В субтип е по-често срещан при млади пациенти. Установено е също, че дори луминален А вариант диагностициран при случаи в по-ранна възраст протича клинично по-агресивно в сравнение с този, доказан при по-възрастни пациенти. От друга страна има данни, че луминалните варианти притежават възрастово независима прогностична стойност, като Luminal A субтипа се свързва с най-благоприятен клиничен резултат в сравнение с другите молекулярни субтипове КГ. Необходими са допълнителни проучвания за по-прецизно определяне на значението на възрастта за появата на отделните подтипове карциноми, връзката ѝ с допълнителни характеристики на карциномите и влиянието ѝ върху прогнозата на пациента.

Имайки предвид разпределението на субтиповете КГ по отношение на 5-годишната обща преживяемост, нашите данни потвърждават установените при други изследвания, че LumA субтип се характеризира с най-добра прогноза, а субтиповете - ТН и HER2 позитивен нелуминален, са с най-неблагоприятна, като LumB заема междинно положение. Трябва да се отбележи, че проучваните от нас пациенти с HER2 позитивен субтип са диагностицирани в период, когато неoadювантната терапия не е била предпочитан терапевтичен подход. Към днешна дата, този тип лечение е с доказано благоприятно влияние при пациентите с HER2 позитивен КГ, с постигане на пълен патологичен отговор в голям процент от случаите, подобрявайки тяхната прогноза. Също така КГ е с доказана биологична хетерогенност, като отделните сурогатни ИХХ-но установени варианти не отразяват напълно молекулярната класификация и включват различни нейни субтипове. Това повлиява клинично-патологичните характеристики при КГ. Поражда се необходимостта от намиране на нови прогностични и

предиктивни маркери, допълващи сурогатната класификация. Откриването им може да позволи по-точна стратификация на пациентите, свързана с тяхното по-прецизно и дългосрочно прогнозиране, което ще даде възможност за приложение и на персонализиран терапевтичен подход.

В нашето проучване допълнителни благоприятни прогностични фактори отново се установяват предимно при LumA туморите, в сравнение с другите субтипове КГ. При LumA варианта по-често се диагностицират пациенти в I-ви клиничен стадий, с размер на тумора ≤ 3 см, който е високо диференциран - G1, предимно без ЛВИ и без метастатично разпространение в аксиларни ЛВ. Неблагоприятни клиничко-патологични фактори като напреднал клиничен стадий (III-ти и IV-ти), по-голям размер на тумора (> 3 см), наличие на ЛВИ и лимфогенно разпространение в ЛВ, се установяват най-вече при субтиповете LumB и HER2 позитивен нелуминален КГ, а високият хистологичен грейд – G3, предимно при HER2 позитивния и ТН подтип. Междинната позиция на ТН вариант по отношение на някои от посочените показатели потвърждава описаните в литературата негови особености, напр. рядкото метастазиране по лимфогенен път. Въпреки, че част от пациентите с този субтип се диагностицират в по-начален клиничен стадий (предимно във II-ри) с лезии с по-малки размери, ниската степен на диференциация на туморите, в допълнение към по-кратката преживяемост на пациентите предполагат агресивните биологични особености на част от ТН карциноми. Възможна причина за тях са базално-подобните молекулярни характеристики при тези неоплазми. В съответствие с други изследвания, в нашето проучване установихме най-висока честота на basal-like подвид именно при ТНКГ, предимно със специален морфологичен тип. В по-малък процент този вариант се определи и при другите субтипове РМЖ, което вероятно допринася и за тяхното по-неблагоприятно клинично поведение. В нашето проучване базалният подвид се свързва с лоша прогноза, като пациентите с този субтип по-често имат < 5 годишна обща преживяемост. Установяване на basal-like фенотипните прояви при КГ може да позволи селекция на такива пациенти, с различен сурогатен молекулярен субтип, при които да се приложи персонализиран „по-агресивен“ и комбиниран терапевтичен подход.

Друг проучван патологичен фактор е хистологичният вариант на карцинома, който също може да има прогностична стойност. В нашето изследване преобладават NST карциномите, най-голяма част от които са включени в категорията на HER2 субтип, а лобуларните карциноми имат най-малък относителен дял, като те са предимно LumB подвид. Някои от субтиповете на хистологичния тип, в допълнение към степента им на диференциация, могат да окажат както позитивен, така и негативен ефект за клиничния изход на пациентите. Установихме също, че по-голяма част от включените при нас специални типове КГ са в категориите LumA и ТН. В съответствие с предишни изследвания, при нашето проучване в групата на

LumA КГ са специални типове с благоприятна прогноза – вкл. муцинозен и тубуларен тип. От другата страна се намира ТН-ят подтип, включващ хетерогенната група на метапластичен тип, с неблагоприятна прогноза за повечето негови варианти. Освен него, в изследваната категория ТНКГ е и медуларен тип, обичайно с позитивен клиничен резултат, въпреки характерната за него ниска степен на диференциация.

Установените данни показват, че прогнозата при субтипозите КГ е комплексен и сложен показател, като класическите прогностични фактори не са достатъчно еднозначни и категорични. За по-точното определяне на клиничния резултат при пациентите с РМЖ е необходимо отчитане на повече от един клинично-патологичен фактор. Потвърждава се и необходимостта от намиране на нови прогностични биомаркери.

През последните години като такива се проучват особености на туморната микросреда, вкл. различни фактори на антитуморния ИО. Сред тях ТИЛ са един от най-атрактивните показатели и са включени в повечето изследвания.

Все още има противоречиви данни за тяхната прогностична и предиктивна стойност при пациентите с КГ. Според някои изследвания клинично значима е само високата концентрация на ТИЛ, а като такава се приема ТИЛ >50%. Преобладаваща част от резултатите показват правопрпорционална връзка между степента на инфилтрация с ТИЛ и отговора към приложена терапия. По-често се съобщава и за тяхното позитивно влияние върху прогнозата при пациентите с КГ. В допълнение е установено, че съществува разлика в имунната активност при субтипозите КГ, като HER2 позитивния и ТН вариант най-често се определят като най-силно имуногенни, с по-изразен имунен клетъчен инфилтрат.

В нашето проучване преобладаващ процент от случаите имат ТИЛ $\leq 50\%$, с най-висок относителен дял за LumA субтип, при който не се намира нито един тумор с ТИЛ >50%. ЛПКГ - с ТИЛ >50%, се установи в по-малка част от изследваните пациенти, главно с HER2 субтип, следван от ТНКГ, което е в съответствие с повечето изследвания.

Съпоставяне на количествените стойности за ТИЛ с доказани прогностично значими клинично-патологични фактори може да допринесе за постигне на по-добра представа относно клиничната значимост на имунния инфилтрат.

Според данните от нашето изследване, високата концентрация на стромални лимфоцити се свързва с неблагоприятни клинично-патологични фактори. ТИЛ >50% се установиха само при карциноми с ниска степен на диференциация - G3 и предимно при пациенти с метастатични ЛВ. В допълнение високата концентрация на ТИЛ се свързва с < 5 годишна обща преживяемост при проучваните пациенти.

Нашите резултати са в противоречие с тези от повечето други изследвания. Това налага по-задълбочено проучване на имунния отговор

при КГ, не само отчитане на концентрацията от лимфоцити, но и субтипизиране на лимфоцитния инфилтрат.

Установено е, че отделните видове имунни клетки изпълняват различни и специфични функции, взаимодействайки както помежду си, така и с нелимфоидни клетки. Предполага се също, че подвидовете лимфоцити имат различно участие в ИО при отделните субтипове КГ. С цел да се определи специфичната роля на имунния инфилтрат при КГ все по-активно се проучва неговия състав, предпочитана локализация и степен на инфилтрация в туморната зона.

В нашето проучване се установи, че преобладават случаите с налична Т-клетъчна CD3-експресия, в сравнение с тези, позитивни за CD20 В-лимфоцити (независимо от полуколичествено определените стойности на посочените субтипове клетки). Тази зависимост важи за интратуморна локализация на клетките, като за стромалната не се установи статистически значима разлика за субтипизирания лимфоцитен инфилтрат. Високата концентрация на CD3+ Т-лимфоцитите обаче е по-често срещана от високата степен на инфилтрация със CD20+ В-лимфоцити не само интратуморно, но и стромално.

От субтиповете Т лимфоцити в цялата извадка се установиха по-голям брой случаи с налични интратуморни и стромални цитотоксични CD8+ и регулаторни FoxP3+ клетки, със слабо изразено преобладаване на CD8+ лимфоцитите и при двете локализации. Относно високата концентрация на подвидовете Т – клетки, се установи значима разлика единствено при стромалната им инфилтрация. В стромата по-рядко се отчита висок брой на CD4+ Т – хелпери, спрямо останалите два типа Т – клетки. Не се намери преобладаващ подвид Т-лимфоцити с висока концентрация при интратуморна локализация.

При изследваните от нас случаи с КГ и при четирите молекулярни подтипа повечето видове проучвани лимфоцити, участващи в хуморалния и клетъчния ИО (CD20+ В-, CD3+ Т- и подвидовете Т-лимфоцити - цитотоксични CD8+ и регулаторни FoxP3+), инфилтрират предимно стромата (както в ниска, така и във висока степен). Установена е статистически достоверна зависимост в преобладаваща част от категориите на сравнителния анализ. Единствено за високата концентрация на хелперни CD4+ Т-клетки се забелязва само тенденция за предпочитано интратуморно разпространение, главно при субтиповете HER2 и ТНKG.

В нашето проучване, интратуморно преобладават ниските концентрации на изследваните подтипове лимфоцити (CD20+В, CD3+ Т, CD8+ Т-цитотоксични, FoxP3+ Т-регулаторни и CD4+ Т-хелперни), спрямо високите им стойности. CD4 и CD20 клетките са тези, които най-рядко инфилтрират туморните зони при КГ, т.к. в най-голям процент от случаите не се наблюдават такъв тип позитивни клетки при тази локализация, в сравнение с другите подвидове лимфоцити. В допълнение, високата

интратуморна концентрация се установява предимно при CD3 Т-лимфоцитите и субтиповете Т-клетки – CD4, CD8 и FoxP3, като тя не е характерна за CD20 В-лимфоцитите.

В цялата извадка по отношение на стромалната локализация, с изключение на CD3+ Т - клетките, отново преобладава ниската спрямо високата концентрация на проучваните подвидове имунни клетки. От субтиповете лимфоцити, CD4 Т-хелперите са тези, които най-често не инфилтрат стромата при изследваните случаи с КГ. От друга страна, високото количество при стромално разположение е характерно най-вече за CD3 Т- лимфоцитите и се установява по-често при някои от техните подвидове – CD8+ цитотоксични и FoxP3 регулаторни клетки.

От проучваните субтипове КГ, високите концентрации на лимфоцити се наблюдават предимно при ТН и HER2 позитивен нелуминален вариант. По отношение на интратуморната локализация, ТН субтип е предпочитан за високата концентрация на CD3 и CD8, HER2 за CD4, а FoxP3 се установява в еднаква степен при тези варианти КГ, в сравнение с луминалните. Въпреки че при нито един случай не се отчете висока интратуморна концентрация на CD20, ниският им брой е най-характерен за HER2 субтипа.

Отново ТН и HER2 позитивният КГ са субтиповете, при които най-често се отчита висока стромална концентрация на лимфоцити, но за някои подвидове клетки тя се установява в еднаква степен и при LumВ варианта. ТНKG е предпочитан субтип за висока концентрация на стромални CD8 и CD20, HER2 за FoxP3, а високият брой стромални CD3 и CD4 се разпределят еднакво при субтиповете LumВ, HER2 позитивен и ТНKG.

Посочените по-горе резултати са в съответствие с тези, получени при други изследвания. Потвърждаваме данните, че ТН и HER2 позитивен КГ са по-имуногенни подтипове в сравнение с луминалните. Според нашето проучване обаче вероятно има субпопулация при LumВ варианта, която също стимулира изразен антитуморен ИО.

В съответствие с данните от други изследвания установихме, че стромата е предпочитано място за инфилтрация от повечето видове лимфоцитите. Предполага се обаче, че имунните клетки с различна локализация имат различно биологично и клинично значение. Въпреки, че се установяват по-рядко, интратуморните лимфоцити вероятно по-точно отразяват имунната активност в туморната зона поради директното им взаимодействие с туморните клетки. Съгласно резултати от някои проучвания, концентрацията на тези лимфоцити е без значение за крайния ефект от тяхното действие. Важни са механизмите, които се активират при междуклетъчните контакти – инхибиторни или активиращи.

Подобно на други проучвания, нашите резултати показват, че Т-клетъчно медирианият имунитет е водещ в антитуморния отговор при КГ, а хуморалният В-клетъчен има второстепенна роля. Също така

цитотоксичните CD8⁺ Т- лимфоцити са преобладаващ подвид Т – клетки. Тяхното активиране е възможно при достатъчна имуногенна стимулация, което би позволило създаване на ефективен антитуморен ИО. Наблюдаваната тенденция за преобладаваща интратуморна локализация от CD4⁺ Т - клетките именно при по-имуногенните варианти КГ - HER2 позитивния и ТН, вероятно показва опит за подпомагане активацията на ефекторната популация от Т - лимфоцити. От друга страна обаче може да отразява инхибиторна имунна активност, т.к. главните представители на Т – клетъчните имunosупресори - FoxP3 Т-регулаторните клетки, също са позитивни за CD4⁺ молекулата и се установяват по-често при тези субтипове КГ.

Нашите резултати за преобладаващ ТИЛ подвид се разминават с получените от някои други изследвания. Възможни причини за несъответствията на литературните данни са различия в дизайна на съответните проучвания (хетерогенна селекция на подвидове тумори, изследване на нееднакъв брой и различни маркери за лимфоцитния инфилтрат, употреба на различни техники за установяване на ТИЛ и методи за оценка на имунофенотипизираните клетки).

Различното количество, състав и предпочитана локализация от подвидовете лимфоцити вероятно отразяват нееднаква клетъчна биология при карциномите, с хетерогенни възможности за ефективен контрол върху туморната прогресия и включване на различни механизми за генериране на имунологична памет. Установяване на значими корелации между имунните клетки и техни специфични особеност е важен функционален аспект от антитуморния имунитет. Намирането им може да допринесе за по-добро прогнозиране при КГ и да даде насоки за създаване на нови имунотерапевтични таргети.

Установиха се статистически значими корелации между отделните подвидове на лимфоцитния инфилтрат както в проучваната популация пациенти с РМЖ, така и при отделните сурогатни подвидове на тази неоплазма.

При изследваните случаи с КГ и от субтиповете - при ТН и луминалните варианти, CD20⁺ В лимфоцити корелират с всички подвидове Т-лимфоцити при интратуморна локализация и само с FoxP3 Treg клетки при стромална инфилтрация. Предполага се, че установената зависимост отразява допълваща/спомагателна роля на В-клетките при изпълнение на Т-клетъчния ИО, главно в интратуморната зона на КГ.

Според нашето проучване, CD8-Тс клетките са преобладаващ подвид на CD3⁺ Т-лимфоцити, с установени корелации между тях и при четирите молекулярни подтипа КГ. Доказа се, че интратуморните CD8-Тс и FoxP3-Treg подвидове ТИЛ се срещат по-често заедно при изследваните случаи, главно при ТН субтип и в по-малка степен при луминалните подвидове.

Стромалните лимфоцити са по-хетерогенна популация, като CD8 Тс клетките отново показват тенденция за преобладаващ Т-клетъчен субтип, с установени корелации между CD3+ и CD8+ стромални клетки при изследваните тумори и от подвидовете КГ - при луминалните варианти. Отново се наблюдава зависимост между същите субтипове Т лимфоцити - CD8-Тс и FoxP3-Treg в стромата на цялата проучвана популация и в тази на ТН и LumB субтип.

Възможно е, голямото количество цитотоксични CD8-Тс клетки да е сигнал за активен опит на ИС за отхвърляне на тумора, който обаче е неуспешен поради потискането им от супресорните FoxP3+ Treg клетки. Допуска се и супресорен ефект от страна на туморните клетки, който е специфичен за отделните молекулярни подвидове КГ. Според данни от някои проучвания, преобладаващи и взаимосвързани са други ТИЛ подвидове. Една от възможните причини отново е разлика в дизайна на изследванията.

Доказано е, че Foxp3-положителните клетки представляват субтип на Treg CD4+ Т - лимфоцитите. В съответствие с тези данни, намерихме връзка между стромалните и интратуморните CD4+ Т и FoxP3+ Treg в проучваната група пациенти с КГ. Такава корелация се намери само при някои от субтиповете РМЖ – при HER2 и LumB за стромално разположените клетки и при HER2 и ТН за интратуморно отчетените лимфоцити. Вероятно FoxP3 регулаторните клетки имат различно участие в туморогенезата при отделните типове КГ и оказват влияние в ИО само при някои от тях.

Установи се още слаба корелация между интратуморните CD4 и CD8 в общата проучвана популация и силна връзка само при ТН субтип. CD4 + ТИЛ са показали, че са достатъчни за отстраняване на туморни клетки в отсъствието на CD8+ Т клетки при някои тумори. По-често обаче и двете клетъчни линии (CD4+ и CD8+) са необходими за ефективно отстраняване на тумор. Ролята на някои подвидове CD4 + ТИЛ в антитуморния отговор често е активиране на CD8 + ТИЛ, което води до унищожаване на тумора от CD8 + цитотоксични Т-лимфоцити. Възможно е едновременното присъствие (в отсъствие на FoxP3 субтип) на интратуморни CD4 и CD8 Т-лимфоцити да отразява по-благоприятна прогноза за тези неоплазми.

Намиране на корелации между конкретни характеристики на лимфоцитния инфилтрат с доказани прогностично значими клиничко-патологични показатели може да даде по-ясна представа за ролята на наблюдаваната от нас имунна клетъчна реакция при КГ. Също така установяването на тези връзки е част от сложния процес на включване на даден биомаркер в рутинната практика.

В цялата извадка и при ТН субтип G3 карциномите имат висока концентрация на ИТ CD3. Установи се още, че при изследваните случаи с G3 по-често се отчита ниска концентрация на ИТ CD4. В допълнение на тези данни, при ниската степен на диференциация по-често присъстват ИТ

FoxP3, независимо от концентрацията им (ниска или висока). Установи се също, че при G3 туморите преобладава високата концентрация на СТ FoxP3 клетки, като тази корелация е характерна най-вече за LumB карциномите.

От посочените данни може да се обобщи, че при КГ интратуморните FoxP3 Т-регулаторни клетки независимо от тяхното количество са неблагоприятен прогностичен фактор при съчетание с ниска концентрация на интратуморни CD4 хелперни Т – лимфоцити. Високата степен на инфилтрация с регулаторни Т – клетки в стромата обаче се отразява негативно на прогнозата само при Lum B варианта. Потвърждаваме резултатите от други изследвания, които определят FoxP3 като потенциален маркер за прогресия на рак.

В цялата проучвана популация и при пациентите с ТН субтип при хистологично доказан друг морфологичен (специален) тип по-често се отчита висока концентрация на ИТ CD8+. При тази група на хистологични варианти преобладават случаите без ИТ FoxP3. При ТН карциноми с NST хистологичен тип се установи предимно ниска концентрация на ИТ CD8+ подвид лимфоцити, без сигнификантни разлики по отношение на ИТ FoxP3. При лобуларния карцином не се отчете значима връзка с подвидовете ТИЛ.

При пациенти с HER2 позитивни карциноми с налична ЛВИ по-често се установява висока концентрация на СТ CD8, а при тези без такава инвазия – преобладава ниската им концентрация.

Високата концентрация на СТ CD20 се свързва с наличие на ЛВИ при проучваните случаи с КГ и с метастатични ЛВ при ТНKG.

При пациенти с >5 годишна обща преживяемост при HER2 субтип се установи, че ИТ CD20 по-често липсват, а при по-кратката преживяемост се установява ниската им концентрация (като се има в предвид, че висока концентрация на този вид клетки не се отчете при нито един от проучваните случаи).

Туморите с размери ≤ 3 см при LumA субтип имат предимно ниска концентрация на ИТ CD8, а при по-големите тумори такива клетки липсват, като високата им концентрация не се наблюдава изобщо при този субтип КГ.

Според данни от някои проучвания, прогностичната стойност на цитотоксичните Т-клетки е противоречива при субтиповете КГ и зависи от локализацията на клетките. Като обобщение на нашите резултати може да каже, че CD8+ Т – лимфоцитите с интратуморна локализация се свързват с позитивен ефект при LumA тумори с малък размер. Високата концентрация на този подвид ТИЛ в стромата на HER2 карциномите обаче вероятно действа като неблагоприятен прогностичен фактор. Интратуморните CD8+ позитивни Т – клетки може би ефективно изпълняват цитотоксичната си функция при повечето хистологични типове карциноми, но най-вече с друг морфологичен тип и при съчетание с липсата на регулаторни клетки в същата зона на неоплазмата. В допълнение, цитотоксичните Т – лимфоцити

не са определящи за прогнозата при субтиповете NST и лобуларен карцином. Възможно е тя да зависи от други фактори при тези хистологични варианти.

В съответствие с повечето по-стари проучвания, В - лимфоцитите се свързват с неблагоприятна прогноза, като при HER2 позитивен КГ негативно влияние оказват ИТ CD20, а при ТН субтип - високата концентрация на СТ CD20. В противоречие сме обаче с данните от метаанализ на по-нови изследвания, според който В-клетките имат предимно защитно, отколкото вредно действие при КГ.

Като допълнение към посочените резултати, се установи разлика в отчетеното количество на някои видове имунни клетки при изследване на биопсични проби от различни хирургични интервенции (мастектомия или ексцизия). При мастектомия по-често се установява по-висока концентрация на СТ CD3, ИТ CD3 и ИТ CD4 в сравнение с ексцизионен тип биопсия, при която преобладават по-ниската им стойности. Вероятно отчитането на лимфоцитния инфилтрат в по-голям оперативен материал, ще позволи по-прецизно отчитане на ИО при КГ. Основните трудности при определяне на ТИЛ се пораждат от частично представената туморна тъкан в по-малки биопсични материали, като се има в предвид хетерогенността на тази неоплазма по отношение на туморния целуларитет, количеството туморна строма и различния модел на разпространение и състав на ТИЛ при отделните хистологични и молекулярни варианти, с различна степен на диференциация.

Получените резултати за корелациите на фенотипизирания лимфоцитен инфилтрат при КГ не са достатъчни, за да се разбере тяхната роля и прогностична стойност. Проучване на молекулярните механизми, позволяващи на туморните клетки да „избягат“ от ИО ще даде допълнителна информация за клиничното значение на ТИЛ. Основни сред тях са тези с участие на PD-L1 и CTLA-4 молекулите, които могат да се експресират както при имунни, така и при туморни клетки.

Нашите резултати по отношение на PD-L1 и CTLA-4 позитивността показват, че рядко се установява тяхната експресия при неопластични клетки в изследваната популация с КГ. Въпреки това, от субтиповете РМЖ ТН е този, при който най-често се отчита налична туморна експресия за PD-L1, а при LumA най-често се наблюдава туморна позитивност за CTLA-4. И за двата маркера високата степен на експресия при туморните клетки (PD-L1 и CTLA-4 $\geq 50\%$) се определя при същите субтипове КГ, съответно.

Съгласно получените резултати, PD-L1 позитивността при имунните клетки се отчита в нисък процент от проучените случаи. При интратуморното им разположение при нито един случай не се установи висока концентрация на позитивни клетки, а ниската се среща само при ТНКГ. При този субтип, в сравнение с другите варианти РМЖ, най-често се

установяват и стромално разположените PD-L1 позитивни имунни клетки, вкл. с високата им концентрация, което е статистически достоверно.

При малък брой от проучените неоплазми се отчитат интратуморни имунни клетки експресиращи CTLA-4. Те се установяват само при ТН субтип, като концентрация им е ниска и липсват случаи с високата степен на интратуморна инфилтрация от тази клетъчна популация. При стромалната локализация, CTLA – 4 позитивни имунни клетки, вкл. с висока концентрация се отчитат най-често при LumA субтип.

В допълнение към посочените данни, установихме разлики относно PD-L1 експресията при категориите базални и небазални случаи с КГ. При небазалните субтипове по-често липсват PD-L1 позитивни стромални имунни клетки, докато при базалните се установява предимно високата им концентрация. В сравнение с небазалните неоплазми, позитивността при туморните клетки също е по-характерна за базалния вариант КГ.

Тези резултати показват, че инхибиторните механизми имат различно участие при отделните субтипове РМЖ. ТНKG, при който най-често се установяват и базално-подобен субтип неоплазми, е предпочитан за включване на checkpoint супресорните пътища. При него главна роля изпълняват тези с участие на PD-L1, а второстепенна – с ангажирана CTLA-4 молекула. Нашите резултати са в съответствие с тези, получени при други изследвания, според които checkpoint молекулите имат основна роля при ТНKG. За разлика от тях, в нашето проучване LumA варианта също се откроява като един от субтиповете КГ, при които по-често участват механизми, потискащи ИО. При него обаче се установява ангажиран само един от проучваните, този свързан със CTLA-4 молекулата. Възможно е отделните механизми да имат различното клинично значение при субтиповете КГ. Допуска се също вероятността за кръстосани връзки между тях, със синергичен или взаимноизключващ се ефект при антитуморния ИО. С цел да се изясни ролята им при проучваните случаи с КГ, потърсихме корелации между експресията на PD-L1 и CTLA-4 молекулите от туморните и имунни клетки, както помежду им, така и с други имунни и клинично-патологични фактори.

При изследваните случаи с КГ и главно при тези с ТН субтип се установи правопрпорционална корелация между експресията на PD-L1 при туморните и имунни клетки, като връзката е по-силно изразена при интаратуморно локализираните. Като подвид свързан с неблагоприятни клинично-патологични фактори, при него се предполага синергичен механизъм на действие с инхибиторен ефект при участието на PD-L1 молекулата в туморната микросреда.

Резултатите от проведения корелационен анализ при CTLA-4 показват, че има едноросочна връзка между позитивността за тази молекула само при туморните и стромално разположени имунни клетки, главно при LumA субтип КГ. Предвид доказаните благоприятни прогностични фактори

при този вариант, допускаме възможността, че при него участието на CTLA-4 молекулата има „стопиращ“ ефект за инфилтрация от ТИЛ подвидове с потискаща имунна активност. Възможна е също липсата на активност на този инхибиторен механизъм поради влияние на допълнителни имунни и туморни фактори.

При проучваната популация пациенти и главно при тези с ТНКТ се установи еднопосочна и правопрпорционална връзка между експресията на PD-L1 от туморните клетки и CTLA-4 позитивните интратуморни лимфоцити, както и с концентрацията на почти всички подвидове лимфоцити (без CD4+ Т-хелпери) с интратуморна локализация. Според допълнителни резултати съществува еднопосочна корелация между експресията на PD-L1 и CTLA-4 при интратуморните имунни клетки. Също така има еднозначна връзка между PD-L1 позитивността при имунни клетки и концентрацията на CD3+Т- лимфоцитите, предимно CD8+ цитотоксичен подвид с интратуморно разположение. При ТНКТ ИТ CTLA-4+ позитивни лимфоцити са свързани еднопосочно със СТ FoxP3.

Допълнително се потвърждава предположението, че водещ инхибиторен механизъм в интратуморния ИО при КГ, главно при ТН субтип, е този с участие на PD-L1 молекулата, с възможен допълващ ефект от страна CTLA-4. Също така е възможно намерената корелация на PD-L1 експресията при туморни и имунни клетки с повишената концентрация на CD8+ Т лимфоцити да показва активен опит на организма за отстраняване на неопластичната пролиферация. Установеното правопрпорционално увеличаване в броя на FoxP3 Т-регулаторните клетки (споменато по-горе) вероятно отразява потиснатата активност на ефекторните клетки. Повишеният брой на интратуморните CD20+ В-лимфоцитите при PD-L1 позитивните тумори може би също допринася за прогресията на ТН неоплазми. Освен това може да се предположи, че количеството на подвидовете лимфоцити не е самостоятелен определящ фактор за изпълнение на ефективен антитуморен ИО. Дори при наличие на висока концентрация на цитотоксични Т-лимфоцити, активността на инхибиторните пътища може да не позволява изпълнение на тяхната функция. Допуска се също, че именно пациентите с висока PD-L1 експресия при туморните и имунни клетки, в комбинация имащи висока концентрация на CD8+, FoxP3 и CD20+, са най-подходящи за имунна терапевтична модулация. При тях се очаква ефективно възстановяване на антитуморния ИО като краен ефект.

При изследваните случаи с КГ и при тези с HER2 субтип се установи обратна корелация между позитивността за CTLA-4 при туморните клетки и концентрацията на интратуморните CD4+Т – хелпери и еднопосочна връзка между експресията при туморните клетки и концентрацията на СТ CD8+. Също така има разнопосочна връзка между СТ CTLA-4+ и ИТ CD4+ имунни клетки. Съгласно тези резултати може да се изкаже предположение,

че инфилтрацията в туморната зона от CD4+ Т – хелперите и активността на цитотоксичните Т-лимфоцити се потиска главно с участие на CTLA-4 checkpoint молекулата при HER2 субтип КГ. Модулацията на този checkpoint механизъм може да е нов обещаващ път за лечение на HER2+ РМЖ. Налични данни от някои проучвания насърчават приложението на имунотерапия свързана със CTLA-4 блокадата, именно при пациенти с HER2 позитивни тумори.

При луминалните субтипове КГ се установиха допълнителни корелации. Позитивността за CTLA-4 при туморните клетки на LumA и стромалните лимфоцити на този подтип корелира обратнопропорционално с концентрацията на СТ CD20+ В- лимфоцити. Възможно е полученият резултат да отразява позитивно влияние на CTLA – 4 при този вариант на карцинома, предвид благоприятната прогноза при изследваната група пациенти и установения от нас и в други проучвания отрицателен ефект на В-клетките при КГ.

В изследваните от нас пациенти и главно при LumB субтип, се доказва обратна връзка между степента на експресия на PD-L1 и CTLA-4 от стромалните лимфоцити. Намери се още правопрпорционална корелация на експресиращите PD-L1 СТ имунни клетки със СТ CD4+ и FoxP3 лимфоцити. Може да се предположи водещата роля на PD-L1 като инхибиторен механизъм на действие в стромата при тези тумори, а FoxP3 Т-регулаторните клетки (като подвид на CD4+ Т – лимфоцити) са изпълнители на супресорната функция.

Експресионните нива на PD-L1 и CTLA-4 при туморните и имунни клетки нямат достатъчна прогностична стойност на самостоятелни биомаркери при проучваните от нас случаи с КГ. Въпреки липсата на значима връзка с преживяемостта, намирането на корелации с някои от класическите прогностични фактори ще позволи да се изясни ролята на тези checkpoint молекули в нашето изследване.

Установи се, че PD-L1 позитивните стромални имунни клетки „предпочитат“ предимно G3 карциноми и само при тях се отчита висока им концентрация, като всички силно инфилтрирани неоплазми са с ТН субтип. Също така при туморните клетки на ниско диференцираните карциноми по-често липсва позитивност за CTLA-4, в сравнение с G1 и G2 неоплазмите.

При базалния субтип КГ по-често се намира висока концентрация на СТ PD-L1+ имунни клетки и експресия (вкл. висока) на PD-L1 при туморните клетки, в сравнение с небазалния.

При проучените хистологични варианти също се установиха някои корелации. В категорията с друг (специален) морфологичен тип на неоплазмите по-често се отчита силна степен на инфилтрация с PD-L1 позитивни стромални имунни клетки, отколкото по-ниските им стойности. При лобуларните карциноми пък не се установиха никакви стромални PD-L1 позитивни клетки, но по-често има висока експресия за CTLA-4 при

туморните клетки. При NST субтип не се намери статистически значима разлика за проучваните checkpoint показатели.

Посочените резултати са в съответствие с някои от споменатите по-горе, според които ТНKG е един от преобладаващите субтипове в категориите G3 неоплазми, с базален фенотип и специален морфологичен тип, единствен в нашето проучване с висока концентрация на стромални PD-L1+ клетки и с висока туморна експресия за тази молекула. Освен него, HER2 позитивните карциноми (с еднакъв относителен дял) и по-рядко LumB туморите, показват ниска степен на диференциация. Също така, базалният фенотип може да се установи при всички сурогатни молекулярни субтипове KG. Освен това туморите с друг морфологичен тип често се включват и в групата на LumA варианта, но при него не се установи нито един случай със стромални PD-L1 позитивни имунни клетки. От тук може да се предположи, че PD-L1 позитивните имунни клетки в стромата участват в ИО най-вече при ниско диференцираните тумори, базалноподобен подвид и специален хистологичен тип на всеки сурогатен молекулярен субтип, различен от LumA варианта. Установяват се с висока концентрация обаче само, когато KG има ТН фенотип. В допълнение може да се каже, че в тези случаи инхибиторната активност на PD-L1 зависимия механизъм е достатъчна за потискане на ИО. Вероятно по тази причина не се установиха значими корелации за CTLA-4 молекулата, показващи нейното участие в имунната активност при неоплазмите със специален (нелобуларен) морфологичен тип, базален подвид и при ниска степен на диференциация.

По отношение на лобуларните карциноми се забелязва обратната корелация при проучваните инхибиторни молекули, с по-изразено участие на CTLA-4 позитивните туморни клетки. В нашето изследване по-голямата част от този тип неоплазми са луминални подвидове (с малко по-голям относителен дял на LumB варианта). Резултатите от корелационния анализ на имунните checkpoint молекули и клинично-патологичните данни потвърждават по-горе описаните, че CTLA-4 инхибиторния механизъм има участие предимно при LumA варианта. Показват също, че неговата активност може да се очаква и при LumB подвид, когато карциномът е лобуларен тип.

В преобладаващата част от изследваните случаи с метастатични ЛВ по-често се установява липса на стромални CTLA-4 позитивни имунни клетки, а при неметастатични ЛВ – високата им концентрация. Също така, при ТНKG с ЛВИ преобладават случаите с висока концентрация на стромални CTLA-4 позитивни имунни клетки, като те по-често не се наблюдават при липсата на такава инвазия.

Тези корелации могат да се обяснят отчасти с установените резултати, че лимфогенното разпространение на карциномите е по-малко вероятно за LumA и ТН субтипове. Именно при LumA варианта най-често се отчита високата концентрация на стромални CTLA-4 позитивни имунни

клетки. От друга страна ролята на CTLA-4 при ТНКТ е второстепенна. Допускаме, че самостоятелната стромална активност на CTLA-4 оказва благоприятно влияние в туморната микросреда при LumA, подобрявайки нодалния статус на пациентите. Също така е възможно допълнителни туморни и/или други доминиращи имунни фактори да не позволяват проява на инхибиторния ефект на тази checkpoint молекула. При ТН субтип обаче CTLA-4 механизма вероятно допринася за макар и по-рядкото му разпространение по лимфен път. Възможно е той да повлиява активността на имунните клетки, които биха възпрепятствали контакта между туморните и ендотелните клетки.

Заклучение:

В обобщение на данните от литературния обзор и резултатите от нашето проучване може да се каже, че ИО при КТ е комплексен и не е напълно проучен. Отделните компоненти на ИС показват хетерогенно разпространение в туморната зона (стромална и паренхимна) и имат различно участие при субтиповете КТ (хистологични и молекулярни). Предлага се прилагане на комплексен подход с отчитане на няколко имунни фактори - %ТИЛ, подвидове имунни клетки - вкл. В-, Т- и Т - субтипове лимфоцити, както и checkpoint молекули – вкл. PD-L1 и CTLA4. Определяне на базален фенотип при КТ би допълнил значимостта на резултатите от проучваните имунологични компоненти. Клиничното валидиране и стандартизиране на подхода може да позволи по-прецизно прогнозиране и персонализирано лечение при пациентите с РМЖ.

VI. ИЗВОДИ

Изводи свързани с честотата и прогностичната стойност на епидемиологични и клиничко-патологични характеристики на изследваните случаи с КГ и разликите им при сурогатните молекулярни субтипове - LumA, LumB, HER2 и ТН:

1. Честотата на КГ се увеличава след 30 годишна възраст и достига своя пик при 70-79 годишни пациенти, главно от женски пол. При по-млади пациенти (<50 годишна възраст) се диагностицира предимно Luminal A субтип КГ, а в по-късна възраст се установяват главно другите варианти (Luminal B, HER2 позитивен нелуминален и ТН).
2. Преобладаващ хистологичен тип е NST, като той се диагностицира най-често при пациентите с HER2 субтип. Лобуларен карцином се установява в най-малък процент от изследваните случаи и е предимно Luminal B подвид. Специални типове КГ са главно в категориите Luminal A и ТН.
3. Специални типове с благоприятна прогноза могат да се установят както при Luminal A, така и при ТНКГ. ТН подвид включва тези с неблагоприятна прогностична стойност.
4. От сурогатните молекулярни субтипове, Luminal A се свързва с най-благоприятни клиничко-патологични фактори.
 - Пациентите с този вариант се диагностицират предимно в I-ви клиничен стадий, по-често имат малък размер на тумора (<3см), който е високо диференциран - G1, в повечето случаи без лимфоваскуларна инвазия (ЛВИ) и без метастатично разпространение в аксиларни лимфни възли. Най-висок относителен дял на 5 – годишна обща преживяемост също се установява при пациентите с този вариант.
5. ТН, HER2 и Luminal B субтипове се свързват с неблагоприятни клиничко-патологични фактори, хетерогенно представени при отделните варианти КГ.
 - Напреднал клиничен стадий (III-ти и IV-ти), по-голям размер на тумора, наличие на ЛВИ и лимфогенно разпространение в ЛВ, се установяват най-вече при субтиповете LumB и HER2 позитивен нелуминален КГ. Високият хистологичен грейд – G3, се среща предимно при HER2 позитивния и ТН подтип. Най-кратка обща преживяемост е характерна за пациенти с HER2 и ТН варианти КГ.
6. Базално-подобен фенотип е най-характерен за ТН неоплазми, предимно със специален вариант и се установява по-рядко при останалите субтипове КГ.
 - Базално-подобен фенотип най-често се установява при ТНКГ, главно при друг морфологичен тип неоплазми.
7. Базално-подобните характеристики се свързват с неблагоприятна прогноза за пациентите.

- Пациентите с този тип тумори по-често имат <5 годишна обща преживяемост.

Изводи, базирани на определяне на честотата на имунните фактори при изследваните случаи с КГ, на взаимната им корелация и разликите им при отделните субтипове КГ- LumA, LumB, HER2 и ТН:

1. ЛПКГ - с ТИЛ >50%, се установява в малка част от пациентите с тази неоплазма, главно с HER2 и ТНКГ субтип.
 2. CD3+ Т-клетъчно медирианият имунитет е водещ в антитуморния отговор при КГ, а хуморалният CD20+В-клетъчен е по-слабо разпространен.
 3. Цитотоксичните CD8+ Т- лимфоцити са преобладаващ подвид Т – клетки, както стромално, така и интратуморно.
 4. CD8-Тс и FoxP3-Treg подвидове ТИЛ се срещат по-често заедно интратуморно и стромално, предимно при ТН субтип.
 5. Стромата е предпочитано място за инфилтрация от повечето видове лимфоцити (CD20+ В, CD3+ Т, CD8+ цитотоксични и FoxP3+ регулаторни), независимо от тяхната концентрация и субтип КГ, в който се установяват.
- Изключение правят CD4+ Т-хелперите с висока концентрация, по-често срещани интратуморно при HER2 и ТН варианти на РМЖ.
6. Интратуморно и стромално по-често се установяват ниски концентрации на подвидовете лимфоцити. Високата степен на инфилтрация е по-рядка, като е характерна предимно за CD3 Т-лимфоцитите, главно CD8+ цитотоксичен и FoxP3+ регулаторен субтип.
 7. ТН и HER2 позитивен КГ са по-имуногенни подтипове в сравнение с луминалните, но се установява субпопулация и при LumB варианта, с изразен антитуморен ИО.
- Високата степен на инфилтрация на интратуморно разположените подвидове лимфоцити е най-характерна за ТН и HER2 субтип. Тази зависимост се установява и за стромална локализация на CD20, CD8 и FoxP3 клетките.
- Високата стромална концентрация на CD3 и CD4 освен за ТН и HER2, е характерна и за Luminal B варианта.
8. Инхибиторните механизми имат различно участие при молекулярните субтипове КГ, като ТНКГ (при който най-често се установяват и базално-подобнен субтип неоплазми) е предпочитан субтип за включване на checkpoint супресорните пътища – с участие в главна роля на PD-L1, а второстепенна – на CTLA-4 молекулата.
- При ТН най-често се установяват интратуморно и стромално разположените PD-L1 позитивни имунни клетки;

- ТН е субтип КГ, при който най-често се отчита туморна експресия за PD-L1;

- CTLA-4 позитивни интратумори имунни клетки се установяват само при ТНKG.

9. Luminal A е предпочитан подвид КГ за участие на CTLA-4 checkpoint механизма.

- При LumA най-често се отчитат позитивност за CTLA-4 при туморните и стромалните имунни клетки, вкл. с високите им стойности, в сравнение с другите субтипове КГ.

Изводи свързани с корелации между епидемиологични и клиничко-патологични данни с фактори на имунния отговор, вкл. с прогностична стойност

1. Високата концентрация на ТИЛ се свързва с неблагоприятни епидемиологични и клиничко-патологични прогностични фактори.

- ТИЛ >50% се установява при карциноми с ниска степен на диференциация

- G3 и предимно при пациенти с метастатични ЛВ.

- Високата концентрация на ТИЛ се свързва с <5 годишна обща преживяемост при пациентите.

2. При КГ интратуморните FoxP3 T-регулаторни клетки независимо от тяхното количество са неблагоприятен прогностичен фактор при съчетание с ниска концентрация на интратуморни CD4 хелперни Т – лимфоцити.

- При G3 карциномите се установява CD3 T-клетъчен ИО свързан с участие предимно на интратуморни FoxP3 регулаторни Т-лимфоцити (независимо от концентрация им) и слабо присъствие на интратуморни CD4 хелперни Т-клетки.

3. Високата степен на инфилтрация с регулаторни FoxP3+ Т - клетки в стромата се свързва с негативна прогноза.

- При G3 карциномите по-често се установява висока концентрация на СТ FoxP3 клетки, в сравнение с по-високо диференцираните карциноми.

4. Предполага се по-ефективна цитотоксична активност при специалните типове КГ.

- При категорията друг морфологичен (специален) тип КГ по-често се отчита висока концентрация на интратуморни CD8+ и липса на ИТ FoxP3, в сравнение с NST и лобуларен хистологичен вариант.

5. Наличието на интратуморни CD20 и високата концентрация на CD8 в стромата на HER2, както и високата концентрация на стромални CD20 при ТН субтип карциномите действат като неблагоприятен прогностичен фактор при съответните подвидове неоплазми.

- ЛВИ се свързва с висока концентрация на СТ CD8 при HER2 позитивни карциноми и с високата концентрация на СТ CD20 при ТН субтип.

- Метастатичното разпространение в ЛВ при ТНКТ също се свързва с висока концентрация на СТ CD20.
- По-дългата преживяемост (>5 годишна обща) при пациенти с HER2 субтип се асоциира с липса на ИТ CD20, а при по-кратката се установява ниската им концентрация (като се има в предвид, че висока концентрация на този вид клетки не се отчете при нито един от проучваните случаи).
- 6. Наличието на CD8+ Т – лимфоцити с интратуморна локализация се свързва с благоприятна прогноза при LumA тумори.
- Туморите с размери ≤ 3 см при LumA субтип имат предимно ниска концентрация на ИТ CD8, а при по-големите тумори такива клетки липсват (като високата им концентрация не се наблюдава изобщо при този субтип КГ).
- 7. Отчитането на лимфоцитния инфилтрат в по-голям оперативен материал, ще позволи по-прецизно определяне на ИО при КГ.
- При мастектомия по-често се отчита по-висока концентрация на СТ CD3, ИТ CD3 и ИТ CD4 в сравнение с ексцизионния тип биопсия, при която преобладават по-ниската им стойности.
- 8. Checkpoint молекулите показват различно участие при отделните хистологични варианти КГ.
- CTLA-4 се установява предимно при лобуларен КГ, а PD-L1 при други специални типове.
- 9. PD-L1 е водещ инхибиторен механизъм в стромата при Luminal B субтип КГ, а FoxP3 Т-регулаторните клетки (като подвид на CD4+ Т – лимфоцити) са изпълнители на супресорната функция.
- Съществува правопрпорционална корелация за PD-L1, CD4 и FoxP3 позитивните стромални клетки при LumB КГ.
- 10. Участието на PD-L1 свързан инхибиторен механизъм е по-характерен за базален субтип неоплазми, в сравнение с небазалния.
- При базално-подобен фенотип по-често се установява експресия (вкл. висока) за PD-L1 при туморните клетки и висока концентрация на СТ PD-L1+ имунни клетки, в сравнение с небазалния тип.
- 11. От луминалните субтипове КГ, CTLA-4 инхибиторния механизъм има главно участие при LumA варианта, а неговата активност може да се очаква при LumB подвид, най-вече когато карциномът е лобуларен тип.
- При лобуларния субтип КГ по-често се установява CTLA-4 експресия при туморните клетки.
- По-голяма част от лобуларните карциноми са луминални варианти, с по-голям относителен дял за LumB .
- 12. CTLA-4 checkpoint молекулата вероятно оказва потискащ ефект при HER2 субтип КГ за инфилтрацията от CD4+ Т – хелпери и активността на цитотоксични Т-лимфоцити в туморната зона.

- Експресията на CTLA-4 при туморните и стромалните имунни клетки корелира обратнопропорционално с интратуморната концентрация на хелперни CD4+ Т-клетки при този субтип КГ.
 - Има еднопосочна корелация между туморната позитивност за CTLA-4 и стромалната концентрация на цитотоксични CD8+ Т-клетки.
13. Високата концентрация на PD-L1+ стромални имунни клетки се установява само при G3 карциноми, когато неоплазмите са ТН подвид и е по-честа при тези от тях със специален тип и КГ с базален фенотип (с молекулярен субтип различен от LumA).
- PD-L1 позитивните клетки в стромата са част от имунния отговор най-вече при G3 карциномите, в сравнение с G1 и G2 неоплазмите, като високата им концентрация се установява само при ниско диференцираните тумори, всички от които са ТН субтип;
 - PD-L1 стромалните клетки не са част от ИО при LumA субтип.
 - При специален хистологичен тип и при базалноподобни карциноми е по-честа високата концентрация на PD-L1 стромални клетки в сравнение с ниската.
14. Липсата на позитивност за CTLA-4 в туморните клетки и високата концентрация на стромални PD-L1+ имунни клетки се свързват с един от класическите неблагоприятни прогностични фактори – ниска степен на диференциация на неоплазмите (G3).
15. Допуска се, че пациентите (предимно с ТНKG) с висока PD-L1 експресия при туморните и имунни клетки, в комбинация имащи висока интратуморна концентрация на CD8+, FoxP3 и CD20+, са най-подходящи за имунна терапевтична модулация.
16. Прогнозата при субтиповете КГ е комплексен показател.
- Класическите прогностични фактори не са достатъчно еднозначни и категорични.
 - Необходимо е отчитане на повече от един клинично-патологичен фактор, вкл. намиране на нови прогностични биомаркери.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с научно-практичен и/или оригинален характер

1. За първи път в България са проучени фактори на ИО при всички сурогатни молекулярни субтипове КГ.
2. За първи път в страната са извършени компютърно асистиран морфометричен анализ на субтиповете лимфоцити - В-, Т- и подвидове Т – хелперни, цитотоксични и регулаторни.
3. За първи път в България и чужбина при отделните сурогатни молекулярни субтипове КГ е направена комплексна оценка на имунните фактори: ТИЛ, основни субтипове лимфоцити и главни инхибиторни имунни ”checkpoint” молекули, в допълнение с определяне на агресивен базален фенотип при неоплазмите.
4. Приложена е методика за определяне на ТИЛ подвидове, базален фенотип и някои checkpoint молекули при КГ в патологичната дейност – **Приложение 1, 2 и 3.**

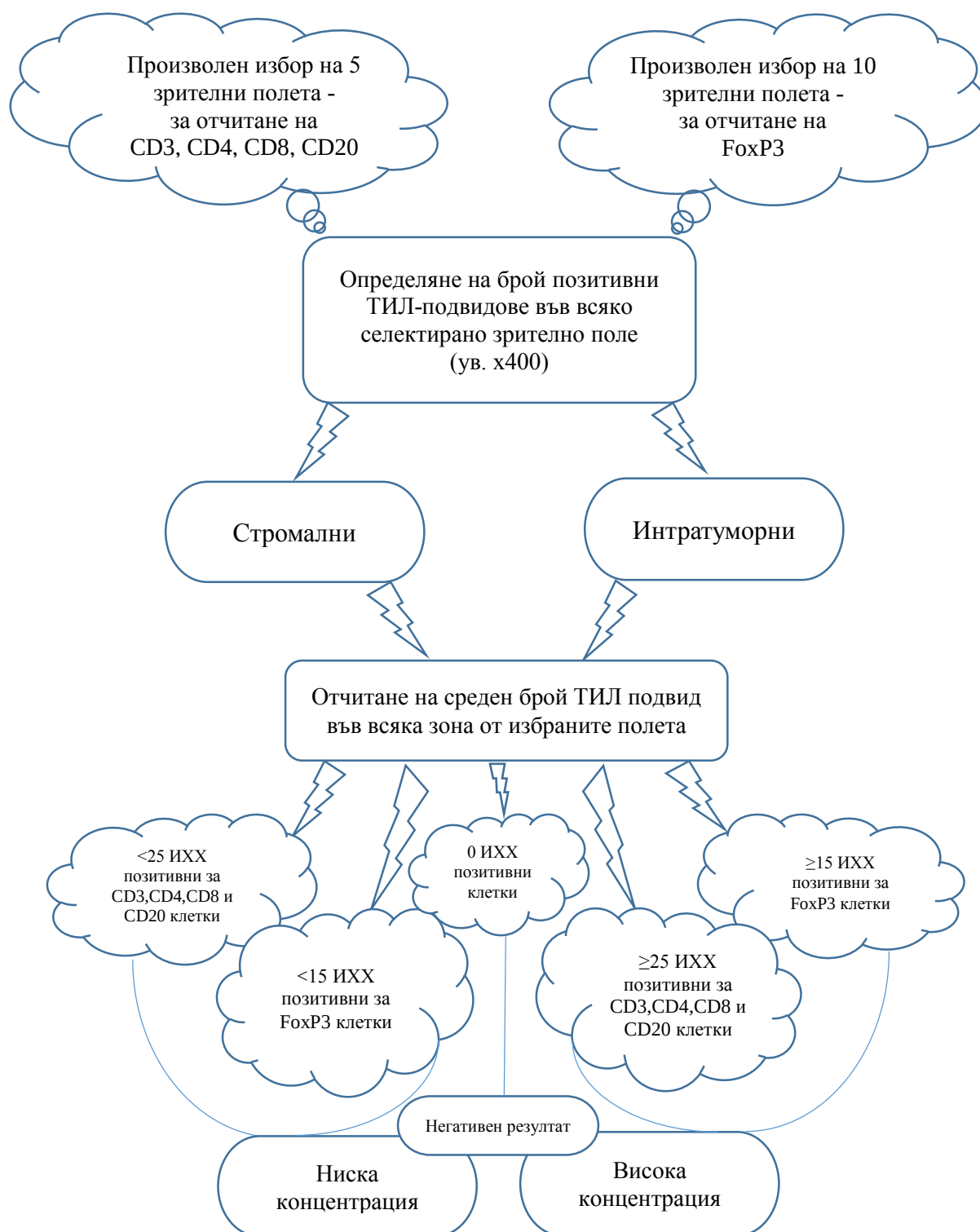
Приноси с научно-теоритичен характер

1. Имунофенотипизирането на Т-клетъчните субпопулации и имунните ”checkpoint” молекули PD-L1 и CTLA4, както и определянето на базален субтип може да се обсъждат в контекста на използването им като прогностичен маркер при пациенти с КГ.
2. Предлага се комплексен подход за имунохистохимично определяне на прогностично значими фактори при отделните сурогатни молекулярни субтипове КГ – **Приложение 4.**
3. Получените резултати могат да се използват за последваща клинична валидация на прогностичната стойност на имунните фактори при по-голям брой пациенти.
4. Установените зависимости може да послужат като база данни за допълнителни изследвания, с цел инкорпорирането им в прогностичен алгоритъм и предиктивен морфологичен скрининг, позволяващ по-добра селекция на пациенти за последваща, химио-, имуно-, таргетна или друг вид терапия при пациенти с КГ.

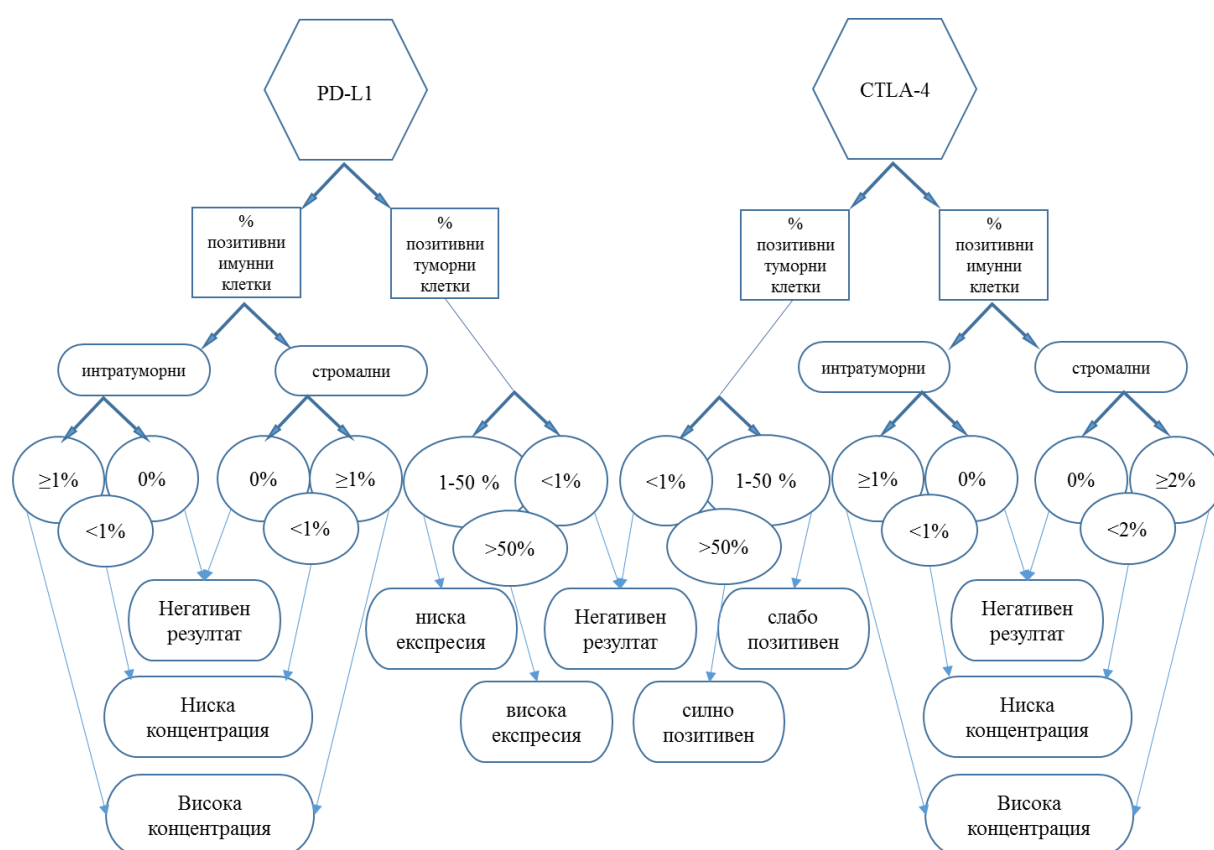
VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

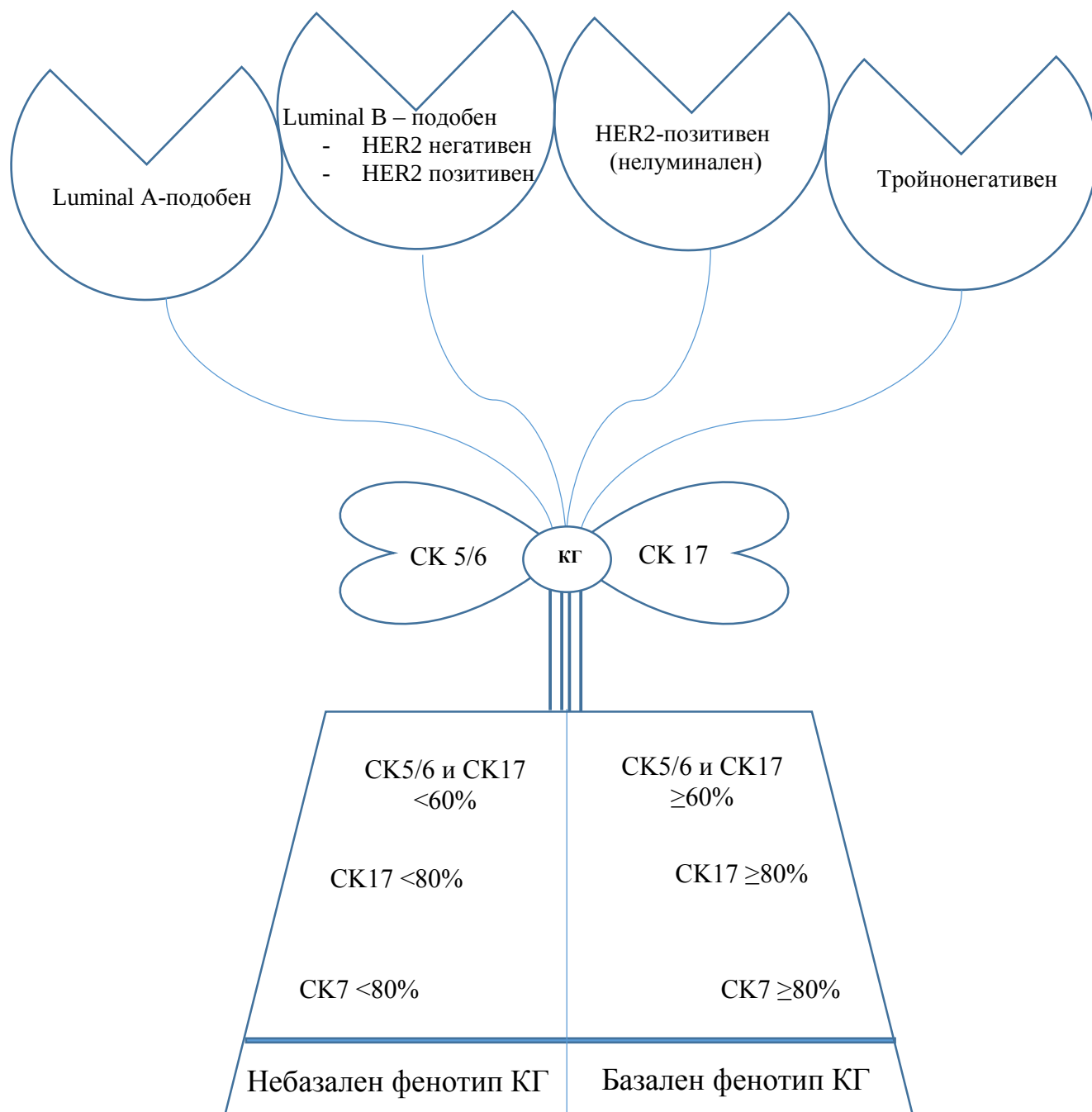
Методика за микроскопска оценка на подвидовете ТИЛ - CD3, CD4, CD8, CD20 и FoxP3 лимфоцити при КГ



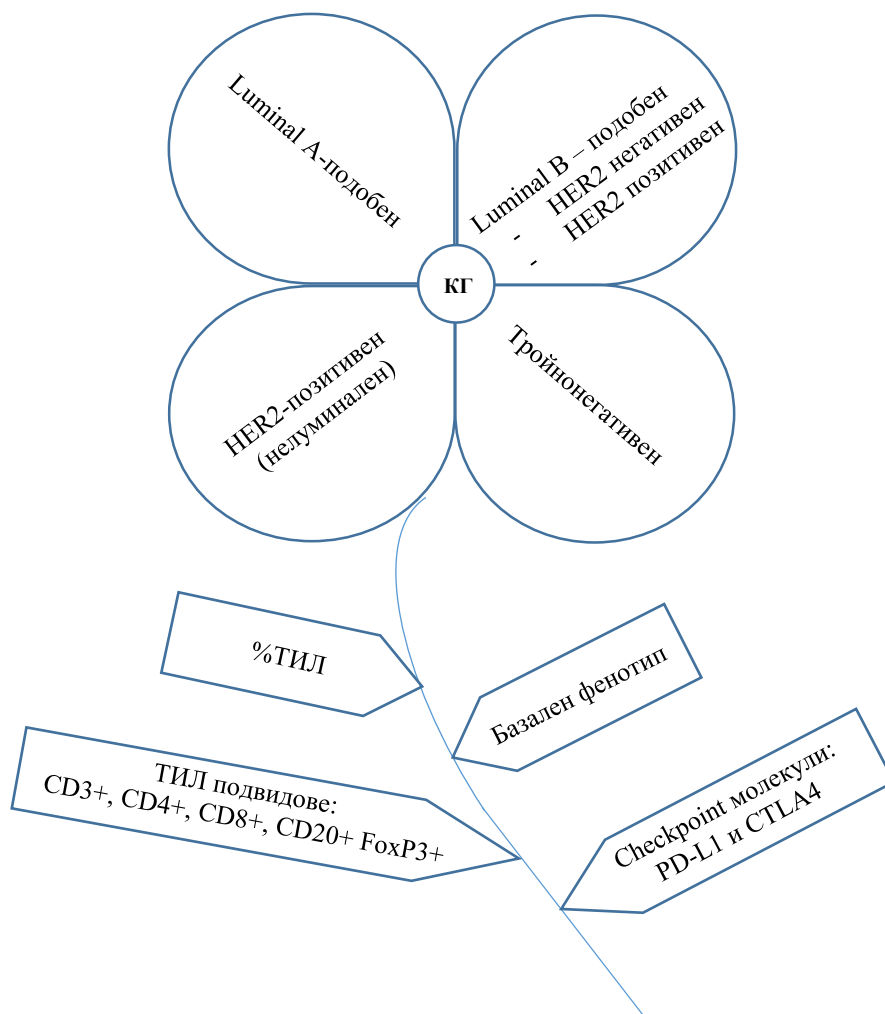
Методика за микроскопска оценка на PD-L1 и CTLA4 при туморни и имунни клетки на КГ



Методика за имунохистохимично определяне на базален фенотип при КГ



Комплексен подход за имунохистохимично определяне на прогностично значими фактори при отделните сурогатни молекулярни субтипове КГ



IX. ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, КУРСОВЕ И ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1) Публикации на научни резултати в пълнотекстови статии и/или доклади свързани с дисертационния труд:

1. Polina D. Dimitrova, Savelina L. Popovska, Ivanov N. Ivanov. „A study on tumor-infiltrating lymphocytes in different subtypes breast cancer“, J Biomed Clin Res, Vol.14, No1, 2021, p.70-81 (ISSN 1313-6917), Online (ISSN 1313-9053)
2. Dimitrova PD, Popovska SL, Ivanov IN, Dineva TB. Expression of Immune Checkpoint Molecules - PD-L1 and CTLA-4 in Different Subtypes of Breast Cancer. Akusherstvo i Ginekologiya 2019, 58(3): 23-29, (SJР= 0,12); ISSN 0324-0959
3. Popovska S., Damianova P., Tomov S., Dineva T., Ivanov I. Case of encapsulated solid papillary carcinoma with triple-negative and basal-like phenotype occurred in pregnant woman with review of the literature. Akusherstvo i Ginekologiya 2015, 54 (2): 50 – 56. ISSN 0324-0959 (IF =0.14)

2) Участия в научни форуми, свързани с дисертационния труд: - в страната

1. 17-18.06.2022 - Национална конференция по патология, Луковит, България
- С. Поповска, П. Дамянова, А. Йорданов, М. Василева – Славева. Роля на CD47 при карцином на маточна шийка. Сборник резюмета, стр.17.; Национална конференция по патология; 17-18.06.2022; КНД
2. 03-04.06.2022 - Академия по молекулярна патология – дигитална патология на гърда, Плевен, България
- П. Дамянова. Макроскопска обработка на материали от гърда според препоръките. Презентация.
3. 28-30.01.2022 – II научно-практическа конференция Кардионкология – екипна грижа за по-добри резултати, интердисциплинарен подход при различни нозологии.
- П. Дамянова. Диагноза на карцинома на гърда – гледната точка на патолога. Презентация.
4. 10-12.09.2021 – XIII национален конгрес по патология – Бургас, България
- П. Дамянова, С. Поповска. Имунохистохимична експресия на BRCA1 свързан протеин при базалноподобен субтип карцином на гърда. Сборник резюмета XIII Национален конгрес по патология - 10-12.09.2021г., Бургас; ЕП-8, 52-53 с

- П. Дамянова. Тройно негативен карцином на гърда – роля на прецизната патология – морфология и ИХХ-ни субтипове. Молекулярно субтипизиране. Предиктивни биомаркери с фокус върху PD-L1.

5. 31.10-02.11.2019г - Участие в Юбилейна Научна Конференция, МУ – Плевен; Плевен, България

- Polina D. Dimitrova, Savelina L. Popovska, Ivan I. Ivanov, Tereza B. Dineva. Study on the tumor immune microenvironment in different subtypes of breast cancer. Постер - PSO15.

6. 11.04. – 14.04.2019 - Национална Конференция по патология, Велинград, България

- П. Дамянова, С. Поповска, И. Иванов, Т. Динева., Проучване експресията на PD - L1 и CTLA - 4 при различните молекулярни субтипове карцином на гърда, Национална конференция по патология, 11-14.04.2019г., Велинград – постер, Сборник Резюмета, 83-84 с.

7. 11-13.05.2017 – XII Национален конгрес по патология, Велико Търново, България

- С. Поповска, П. Дамянова, И. Иванов, К. Петров, Р. Иванова, Т. Динева. Имунитет и карцином на гърда. XII национален конгрес по патология - В. Търново, презентация; 35-36 с.

8. 17-19.06.2016 – Четвърта годишна научна конференция с международно участие; БАМО, София, България

- С. Поповска, П. Дамянова, И. Иванов, Т. Динева. Проучване на разпространението, локализацията и имунофенотипа на тумор инфилтриращите лимфоцити при различните молекулярни субтипове карцином на гърда, презентация

- в чужбина

1. 29-31.08.2021 – 33-ти Европейски конгрес по патология - Belgium (Virtual Congress)

- P. Dimitrova, S. Popovska, I. Ivanov. A study on tumour-infiltrating lymphocytes, PD-L1 and BRCA1 immunohistochemical expression in basal-like subtype of breast cancer. Virchows Archiv (2021) 479 (Suppl 1):S1–S320; PS-02-009, S68; <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03157-8>, ISSN 0945-6317, ISSN (print), 1432-2307 (web), (IF=3.31, 2020).

2. 05-09.12.2017 – San Antonio breast cancer symposium, San Antonio, Texas, USA

- Popovska S., Dimitrova P., Dineva T. A study on amount, localization and immune phenotype of tumor-infiltrating lymphocytes in different subtypes of breast cancer. CANCER RESEARCH, Vol: 78, Iss: 4 , Suppl: S , Meeting Abstract: P3-05-20, FEB 2018, (IF 2018 – 8.37) DOI: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS17-P3-05-20>

3) Участие в специализирани курсове в областта на темата на дисертационния труд:

1. 02-04.05.2019 - EScoP Varna: Update in Breast Pathology, Varna, Bulgaria
2. 10.12.2020; 04.03.2021 - PD-L1 (SP142) TNBC Training, Roche, България
3. 01-05.07.2019 - Реализирана преподавателска мобилност с цел обучение по програма „Еразъм+“, Section of Anatomic Pathology, Bellaria Hospital, Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, Болония, Италия.
4. 19-20.09.2018 – Breast pathology masterclass, Рим, Италия
5. 18-20.10.2017 – 4 th annual the course – Diagnostic Immunohistochemistry for Pathologists, Краков, Полша
6. 25-26.09.2017 – HER2 interpretation training in breast and gastric carcinoma, София, България

4) Участие в научни проекти

- свързани пряко с дисертационния труд:

1. Проучване експресията на BRCA1 и BRCA2 свързани протеини при различни молекулярни субтипове карцином на гърда, определени с имунохистохимичен метод. (НАУЧНОИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ № D2, година на финансиране 2020, МУ - Плевен)
2. Проучване на експресията на имунните чекпойнт – инхибитори PD - L1 и CTLA - 4 при различните молекулярни субтипове карцином на гърда (НАУЧНОИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ № 11, година на финансиране 2018, МУ- Плевен)
3. Проучване на разпространение, локализация и имунофенотип на тумор инфилтриращите лимфоцити при различните молекулярни субтипове карцином на гърда. (НАУЧНОИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ № 19, година на финансиране 2015, МУ - Плевен)
4. European Regional Development Fund through the: Operational Programme "Science and Education for Smart Growth", with a leading organization MU-Pleven, grant no BG05M2OP001-1.002-0010-C01 (2018-2023)/"Център за компетентност по персонализирана медицина, 3Д и телемедицина, роботизирана и минималноинвазивна хирургия“ с рег. № BG05M2OP001-1.002-0010, финансиран от „Оперативна програма наука и образование за интелигентен растеж“