

Медицински Университет – Плевен
Катедра „Патологоанатомия ”

Д-р Иван Недков Иванов

Клинико-морфологични аспекти на тумор-асоциираните лимфатици
при рака на гърдата

АВТОРЕФЕРАТ

на

Дисертационен труд за присъждане на
образователна научна степен „Доктор”

Научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология”

Шифър 03.01.03

Научен ръководител:

доц. д-р Савелина Любенова Поповска, д.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Иван Михайлов, д.м.н

Доц. д-р Анна Михова-Панчева д.м.

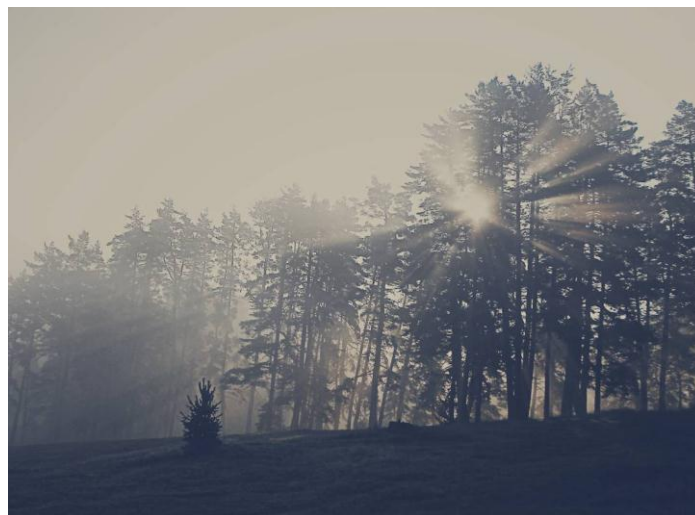
Плевен, 2012

Дисертационният труд съдържа 203 страници и е онагледен с 28 таблици и 34 фигури. Литературната справка съдържа 254 литературни източника, от които 12 на кирилица и 242 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширен катедрен съвет на Катедра „Патологоанатомия” Медицински Университет - Плевен

Всички изследвания, представени в дисертационния труд, са извършени в биопсихната и имунохистохимична лаборатория на Отделението по Клинична Патология при УМБАЛ – „Д-р Г. Странски” ЕАД – Плевен.

Издавам благодарност към моите близки, приятели, учители и колеги които ме поощряваха и критикуваха при написването на този труд.



Фотография: Posledenzalez

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 2012 г. от : ч. в зала „Амброаз Паре” на ТЕЛЕЦ при МУ – Плевен. Материалите по защитата на дисертационния труд са публикувани на страницата на МУ – Плевен - www.mu-pleven.bg .

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА

РГ – рак на гърдата

ER- естрогенов(и) рецептор(и)

PgR- прогестеронов(и) рецептор(и)

HER2- човешки епидермален растежен фактор рецептор - тип 2

ДИН – дуктална интраепителна неоплазия

ЛИН – лобуларна интраепителна неоплазия

ЛСИ – лимфно-съдова инвазия

ЛСПл - лимфно-съдова плътност

СЛСПщ- средна –лимфно-съдова площ

ОЛСПщ – относителна лимфно-съдова площ

a. (a.a.) – артерия(и)

v. (v.v.) – вена (и)

ЛС – лимфен(и) съд(ове)

TIFF- (tagged image file format) некомпесиран формат на цифровото изображение

ТНТ- тройно-негативен тумор

ИХХ – имунохистохимия

НС – несигнификантна разлика

ПТ - пери-туморни

ИТ- интра-туморни

ППС- позитивна предсказваща стойност

НПС – негативна предсказваща стойност

Глава I

ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът на гърдата (РГ) е хетерогенно заболяване, като отделните морфологични и биологични типове се характеризират с различна прогноза и изискват съответно различно терапевтично поведение [Tavassoli FA и Eusebi V, 2009].

Предимно лимфогенното разпространение на РГ се дължи на богатството на лимфни съдове и техните морфологични и функционални особености. Попаднали в лимфните капиляри, туморните клетки се пренасят в дрениращите регионални лимфни възли, където попадат най-напред в маргиналия синус, от където започва туморния растеж [Гърдевски, М., Запрянов, З., 1999] и последващо разпространение в кръвоносните съдове и дисеминация в далечни органи.

Въпреки голямото значение, което имат за дисеминирането на първичния тумор, дрениращите лимфа структури в гърдата не са напълно проучени в контекста на карциномен растеж. Данните за пре-лимфатичната система при РГ са оскъдни [Damiani S и сътр., 2002.]. В достъпната съвременна литература съществуват сериозни противоречия, касаещи наличието на тумор индуцирана лимфангиогенеза при РГ, както и за значението на повишената лимфо-вакуларизация за лимфогенното метастазиране [Van der Auwera I и сътр., 2005; van der Schaft D и сътр., 2007; Vleugel M и сътр., 2004; Williams C и сътр., 2003].

По своята същност, първият международен консенсус за методологията на оценяване на лимфангиогенезата при солидните тумори при човека е твърде общ и с неясна приложимост при РГ [van der Auwera I и сътр., 2006]. Настоящото проучване е мотивирано от нуждата от изясняване на морфологичните особености на лимфа-дрениращите структури (лимфатици), свързани с РГ.

Глава II

Цели и задачи

Изхождайки от литературните данни за произхода, устройството и физиологичните особености на лимфната система и ролята на лимфните съдове за туморното метастазиране при РГ, ние си поставихме следната основна цел:

Да се проучи свързания с карциномите на гърдата лимфа дрениращ апарат и да се изследват морфологичните особености на неговите компоненти, тяхното значение за клиничната практика, както и да се установят възможностите за оптимизиране на хистологичната му оценка.

За реализиране на набелязаните цели си поставихме следните задачи:

Задачи:

1. Да се тества препоръчания протокол за оценка на лимфангиогенезата при солидните тумори и да се адаптира и оптимизира за работа при РГ.

1.1 Да се оцени приложимостта на D2-40 като ЛЕ маркер в контекста на нормалната и засегнатата от туморен растеж гърда, както и да се определи степента на пространствено ориентиране при лимфните съдове на гърдата.

1.2. Да се провери приложимостта на препоръчвания Chalkley шаблон за оценка на лимфно-съдовата васкуларизация при РГ, като резултатите от този метод се сравнят с резултатите от лимфно-съдовата васкуларизация отчетена посредством компютърен образен анализ.

1.3. Да се проучи феноменът съд в съда, като потенциален източник на грешка при морфометричния анализ (оценката на съдовата плътност, обема и площта) на лимфните съдове на гърдата.

2. Да се проучи пре-лимфатичната система на гърдата в норма и в контекста на карциномен растеж.
3. Да се проучи наличието на тумор-асоциирана лимфангиогенеза при РГ и вероятните механизми, по които тя се реализира.
4. Да се проучат морфометричните показатели (ЛСПл; СЛСПщ и ОЛСПщ) за ЛС васкуларизация при карциномите на гърдата и тяхната връзка с ЛСИ и статуса на аксиларните лимфни възли.
5. Да се изследват и оптимизират нивата на точност при използването на ЛСИ като предиктор на аксиларния статус. Да се изследва влиянието на ЛСИ и аксиларния статус, върху 5 годишната преживяемостт при индивидуализирано стандартно лекувани пациенти с инвазивен РГ.

Глава III

Пациенти материали и методи

Пациенти и тъканни материали

Обект на ретроспективно проучване са общо 187 произволно подбрани случаи с диагностициран инвазивен карцином на гърдата, тъканните материали на които се съхраняват в архива на Отделението по Клинична Патология към УМБАЛ „Д-р Г. Странски” гр. Плевен. За целите на проучването са избран по един парафин-включен, формалин – фиксиран тъканен материал. По задача 1.1; 1.3; 2; 4 и 5 са проучени 130, по задача 1.2 са проучени 37 случаи и по задача 3 са проучени 20 случаи. Изследваните тумори са типизирани и стадирани съобразно критериите на СЗО [Tavassoli FA и Devillee P, 2003] и градирани съобразно критериите на Elston и Ellis [Elston CW и Ellis IO, 2002].

Проучени са и бенигнените материали от гърда които се съхраняват в архива на Отделението по Клинична Патология към УМБАЛ „Д-р Г. Странски” гр. Плевен (проучвани по задача 1.1 и задача 3), включващи случаи с фиброкистична болест на гърдата, без данни за дуктална и лобуларна атипична хиперплазия или ин-ситу карцином. Оценявани са по възможност зони незасегнати или слабо засегнати от фиброкистичните промени. При подбора на случаите са приложени редица включващи и изключващи критерии, касаещи пациентите и тъканните материали.

Използвани методи

Имунохистохимичен метод:

Имунохистохимично изследване се извърши върху тъканни срези с дебелина 4µm. След стандартно депарафиниране на тъканните срези се извърши температурно антигенно възстановяване (тенжера под налягане P= 16 Pa при температура 124°C за 1 мин.) или ензимно протеолитично

антигенно възстановяване (за 3 мин. с протеиназа к при температура - 24°C). Имунооцветяването се извърши мануално. Използва се FLEX EnVISION (DAKO) метода. Имунохистохимичната реакция е визуализирана с 3-3` диаминобензидин. Материалите са контраоцветени с хематоксилин Mayer.

Детайли за използваните първични антители са представени на табл. 1.

Таб. 1 използваните първични антители– работни концентрации, производител, метод на антигенно възстановяване

маркер	първично антияло	разреждане	производител	антигенно възстановяване
HER2	c-erbB-2 oncoprotein	1:250	DAKO	топлинно индуцирано
ER	SP1 α	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
PgR	PgR 636	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
CK AE1/3	AE1/3	готово за употреба	DAKO	протеинолиза протеиназа к
p63	4A4	1:25	DAKO	топлинно индуцирано
D2-40	D2-40	1:100	DAKO	топлинно индуцирано
α-SMA	QBEnd10	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
CD34	1A4	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
CK5/6	D5/16B4	1:100	DAKO	топлинно индуцирано
Caveolin- 1	Поликлонално	1:100	BD Transduction Lab.	топлинно индуцирано
Ki-67	MIB-1	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
<u>Vimentin</u>	Vim 3B4	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
<u>S100</u>	Поликлонално	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
E-cadherin	NCH-38	1:70	DAKO	топлинно индуцирано
EGFR	2-18C9	готово за употреба	DAKO	протеинолиза протеиназа к
CD3	Поликлонално	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
CD20	L26	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
CD68	PG-M1	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано
Collagen IV	Поликлонално	готово за употреба	DAKO	топлинно индуцирано

Имунохистохимично маркиране с коктейл D2-40 / p63 и D2-40 / Ki-67 и интерпетацията на съответните резултати се извърши съгласно модифицирани от нас протокол

Отчитането на имунохистохимичната реакция се извърши ръчно. Реакцията за HER2 се отчете съгласно препоръките на American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline [Wolff AC и сътр., 2007; Onitilo AA и сътр., 2009], а тази за ER и PgR полуколичествено, съгласно Allred сбор. [Onitilo AA и сътр., 2009].

Реакцията за CK AE1/3 , α -SMA, D2-40, p63, CD34, CK5/6, Caveolin- 1, Ki-67, CD3, CD20, CD68, Vimentin, S100, E-cadherin, EGFR, Collagen IV са отчетени като позитивни и негативни, съгласно инструкции предоставени от фирмата производител на съответните антители.

Реакцията за p63 и D2-40 се отчете полуколичествено като силно позитивна- ясно видима на обзорно увеличение (40x), умерено позитивна- видима на увеличение 100x, слабо позитивна- видима при увеличение 400x и негативна- липса на реакция.

Молекулна класификация на РГ базирана на експресията на имунохистохимични маркери:

Според имунохистохимичната експресия на ER, PgR и HER2 рецепори карциномите на гърдата са разделени на: луминален А тип (ER+ и/или PgR+, HER2-), луминален Б тип (ER+ и /или PR+ и HER2+), HER2 свръхекспресиращи тумори (HER2+, ER- и PgR-), тройно-негативни карциноми (ER-, PgR- и HER2-) [Onitilo AA и сътр., 2009].

Определяне на степента на пространствено ориентиране

Необходимостта от определяне на степента на пространствено ориентиране, както и степента на пространственото ориентиране на

микрообектите се изследва върху 15 препарата от нормален мамарен паренхим имунооцветени с D2-40, като се използваха методи, предложени от Автандилов ГГ [Автандилов ГГ, 1990].

Оценка на ЛСИ :

Оценката на ЛСИ върху оцветени с ХЕ тъканни срези се извърши съобразно критериите, предложени от Schnit и Collins: [Schnitt SJ и Collins LC., 2008]

- Наличие на туморни клетки сред тапицирани от ендотел пространства
- Туморните клетки и клетъчни струпвания не преповтарят контура на лимфатичните пространства
- Клетъчните струпвания сред постлани от ендотел лумени се откриват в части от мамарния паренхим, за които е характерно наличието на лимфни съдове (перидуктално и в интерлобуларната строма, както и в близост до други съдови структури).

Като позитивна лимфносъдова инвазия върху оцветените с D2-40/p63 препарати се прие наличието на групи туморни клетки, разположени в съдови лумени, постлани от ендотел с непрекъсната цитоплазмена имунопозитивност (D2-40 позитивен) и липса на ядрена имунопозитивност (p63 -).

Разделянето на лимфните съдове на пери- и интра-туморни се извърши съобразно наша модификация на предложените от Yamauchi C и сътр. критерии [Yamauchi C и сътр., 2007]. Модификацията се състои в приемането на лимфните съдове от вътрешността на тумора и лимфните съдове от инвазивния фронт на тумора (зоната от около +/- 500µm от най-външните туморни гнезда и повлекла) като интра-туморни. За пери-

туморни се приеха лимфните съдове извън зоната от около 500µм от най-външните туморни гнезда и повлекла.

За установяване на негативния аксиларен статус се използва оцветяване с СК АЕ1-АЕ3, като се изследваха лимфните възли с негативна находка на рутинно оцветяване с ХЕ

Хистоморфометрични изследвания.

Изработване Chalkley шаблон и работа снего:

Върху площ от 1см² са изготвени два шаблона съставени от нанесени 25 произволни точки [Dykes JRW, 1969] в Microsoft Paint 5.1. Графичният файл е принтиран върху прозрачна плака и адаптиран към оптичната система на микроскопа, посредством шайба от твърд картон.

В 6 непрепокриващи се полета в зоните с най-висока васкуларизация се определи Chalkley броенето. За всяко поле се определи възможно най-високият брой съвпадения между точките от шаблона и съдовете от хистологичния срез. За целта шаблона се завърта до момента, в който най-голям брой точки от шаблона съвпадат със съдовете от хистологичният срез. Като резултат от измерването се прие най- високата от 6-те измерени стойности.

Компютърен образен анализ:

Количествената оценка на лимфно-съдовата васкуларизация се извърши с помощта на морфометричния софтуерен продукт –Image Tool 3.0[®] [<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html> (актуален линк към 01.06.2012)]. За целта всеки един от хистологичните материали се прегледа на малко увеличение и се селектираха зоните с най-висока васкуларизация. На сборно увеличение x100, се засне зоната на интерес посредством микроскоп Olympus BX 40, снабден с дигитална камера Olympus C 5050 ZOOM или Leika модел DM100030W снабден с 1.31MP. Получените

дигитални изображения се съхраниха като некомпресирани файлове (TIFF-формат) върху електронен носител. След незначителна обработка на изображенията и подходящо филтриране се пристъпи към измерването на съответните параметри. Софтуерът Image Tool е предварително калибриран към метричния размер на заснетото зрително поле.

Наслагване на хистологичните срези:

За целта, на сборно увеличение $\times 40$ се селектираха зони от туморна периферия и зони на мамарен паренхим с нормална морфология и неинфилтриран от тумор. На сборно увеличение $\times 100$, се заснеха селектираните зони на интерес, посредством микроскоп Olympus BX 40, снабден с дигитална камера Olympus C 5050 ZOOM. Така се получиха цифрови изображения с резолюция $0.5102 \mu\text{m}/\text{pixel}$. Получените дигитални изображения се съхраниха като компресирани файлове (JPEG-формат) върху електронен носител. На следващ етап, дигиталните изображения от всеки случай са включени в съответна серия от изображения чрез софтуерния продукт Reconstruct [Fiala JC, 2005]. За целта: се създаде нова серия от изображения, в тази серия се отвори дигиталните изображения, направи се метрично калибриране на софтуера, съобразно системата микроскоп-камера. Изображенията се подравниха, като за целта се определиха съответни точки от дукто-лобуларните комплекси върху срежите, имунооцветени за лимфни и кръвоносни съдове. Извърши се ръчно маркиране на имуно-позитивните структури с различни цветове за лимфни, кръвоносни съдове и пре-лимфни съдове. Маркираха се и дукто-лобуларните единици. Изображенията се насложиха и сборното, двуизмерно изображение, представляващо проекциите на изследваните структури се запази като графичен файл (JPEG-формат). Описаха се и се анализираха особеностите на наблюдаваните кръвоносни и лимфни съдове и пре-лимфатични структури.

Изследване на преживяемостта :

От онкологичните досиета на пациентите се извлече информация, касаеща преживяемостта.

Проследяването на преживяемостта при пациентите е извършено на база на преглед на онкологичните досиета на пациентите. Като отправна точка за проследяване на преживяемостта се счита датата на оперативната намеса. За крайна точка се прие навършването на 5 календарни години от датата на операцията за пациентите оперирани през 2005 и 2006 година, а за оперираните през 2007- 31.07.2011.

Резултатите от проучването са описани чрез таблици, графики и цифрови величини (относителни дялове, честоти, медианни стойности, средни аритметични със съответните им стандартни отклонения).

За установяване на разлики в проучваните групи, закономерности, връзки и зависимости са използвани следните параметрични и непараметрични тестове. В повечето случаи за изчисляването е използван софтуерния статистически продукт STATGRAPHICS Plus[®].

На първи етап се тества нормалността на разпределение на изследваните променливи. В зависимост от наличието или липсата на нормално разпределение се подбраха съответни статистически тестове: Choen's Kappa ; Student's – t test (т-критерий на Стюдънт); Spearman's rank correlation test – (теста на Спийрман); Kruskal – Wallis (K-W) (Крускал-Уолис тест); знаков рангов тест на Wilcoxon; еднофакторелен дисперсионен анализ (One-way ANOVA); Mann–Whitney U test; Chi-square test – (хи-квадрат теста χ^2); Logrank test - (знаково-рангов тест);

За допустимо ниво на значимост бе прието $p < 0.05$, което осигурява най-малко 95% достоверност на получените резултати (отхвърлящи H_0).

ГЛАВА IV

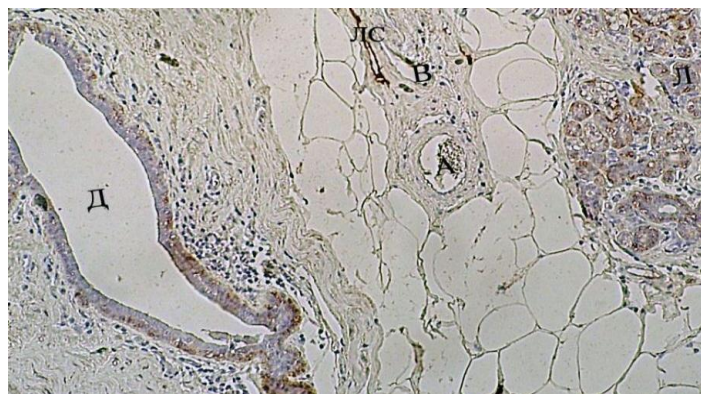
Собствени проучвания и резултати

4.1 Тестване на препоръчания протокол за оценка на лимфангиогенезата при солидните тумори и адаптация и оптимизация за работа при РГ.

4.1.1 Оценка на приложимостта на D2-40 като ЛЕ маркер в контекста на нормалната и засегнатата от туморен растеж гърда. Определяне на степента на пространствено ориентиране при лимфните съдове на гърдата.

4.1.1.1 Експресия на D2-40 от тъканите на нормалната гърда

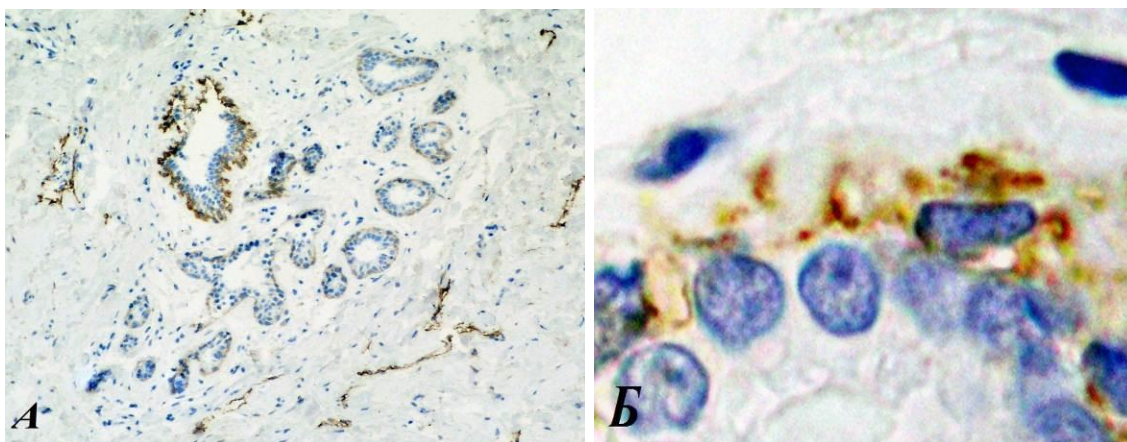
При изследването на 15 материала от нетуморни заболявания и патологично непроменен мамаран паренхим на гърдата се установи наличието на позитивност за D2-40 сред mioepителните клетки на дуктусите и лобулите и лимфно-съдовите ендотелни клетки (Фиг. 1).



Фиг 1. Артериален съд (А); венозен съд (В); лимфен съд (ЛС); дуктус (Д) и лобул (Л) – имунопозитивни са mioepителните клетки на дуктуса и лобулите, както и ендотелните клетки на лимфния съд. D2-40, оригинално ув. 40x

Позитивността за D2-40 в mioepителните клетки на лобулите и дуктусите е слаба, цитоплазмена и разпокъсана, като интензивността на

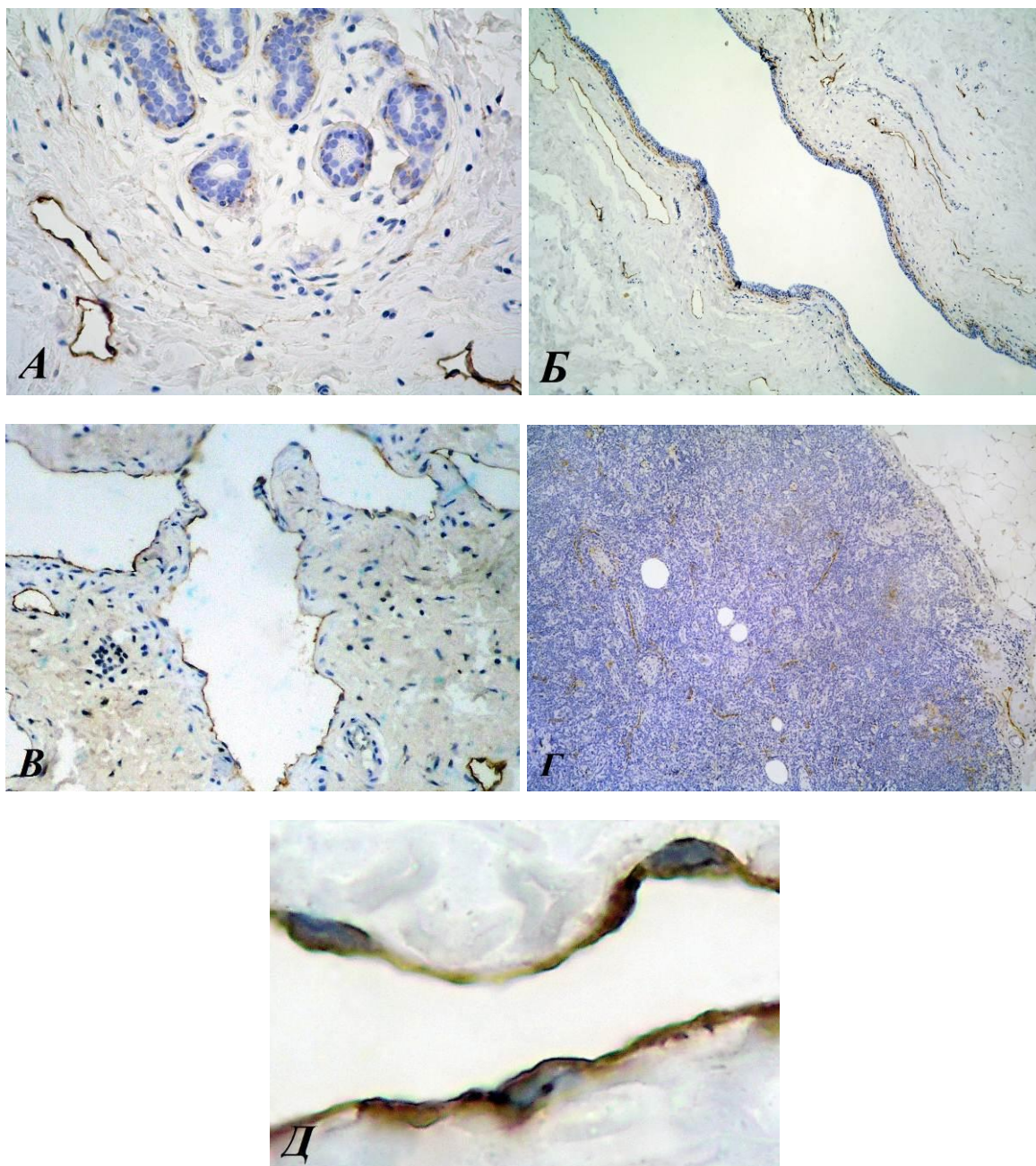
оцветяването на миоепителните клетки на лобулите е по-слаба, спрямо тази на дуктусите (Фиг. 2).



Фиг.2 А) Терминална дукто-лобуларна единица с прилежащ дуктус – отчетливо се забелязва по-силното оцветяване на миоепителните клетки на дуктуса спрямо това на лобулите. D2-40, оригинално ув. 400x; Б) слаба, разпокъсана, цитоплазмена позитивност в миоепителни клетки, D2-40, оригинално ув. 1000x с имерсия.

При изследваните случаи, ендотелът на кръвоносните съдове, както и стромалните клетъчни компоненти, са негативни за D2-40.

Позитивността на лимфно-съдовия ендотел за D2-40 е силна, цитоплазмена и се наблюдава в лимфните съдове от различен калибър: лимфни капилляри, пре-колекторни и колекторни лимфни съдове (достигащи аксиларните ЛВ) както и в ендотела, тапициращ синусоидите на лимфните възли (Фиг.3).



Фиг.3 А) Лобул, около който в интерлобуларната строма на гърдата се откриват лимфни капиляри. D2-40, оригинално ув. 400x; Б) Дуктус, около който се откриват различни по калибър пре-колекторни и колекторни лимфни съдове. D2-40, оригинално ув. 100x; В) Колекторен лимфен съд, притежаващ гладкомускулна стена. Личат две деформирани клапи. D2-40, оригинално ув. 400x; Г) Лимфен възел– синусоиди и прилежащ лимфен съд. Забелязва се слаба позитивност в дендритните фоликуларни клетки. D2-40, оригинално ув. 100x; Д) Лимфен ендотел (лимфен капиляр)– силна

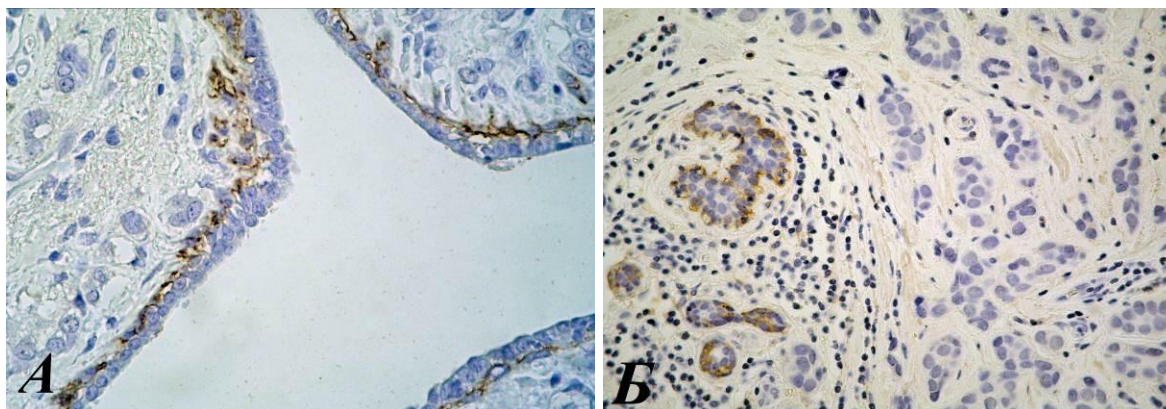
цитоплазмена позитивност за D2-40. D2-40, оригинално ув. 1000x с имерсия.

Експресията на D2-40 свързана с инвазивните тумори на гърдата е уместно да бъде разгледа в два аспекта: експресия в съдови и дуктални/лобуларни структури, свързани с тумора, разположени вътре-туморно и около тумора и експресия на D2-40 от туморните клетки.

4.1.1.2 Оценка на експресията на D2-40 в мамарни структури засегнати от туморния растеж

При 19/130 (14.62%) от изследваните случаи не се установи наличието на D2-40 позитивни структури (не се откриха нито лимфни съдове, нито миоепителни клетки)– целият хистологичен препарат е представен от туморни клетки, кръвоносни съдове и фибозна строма.

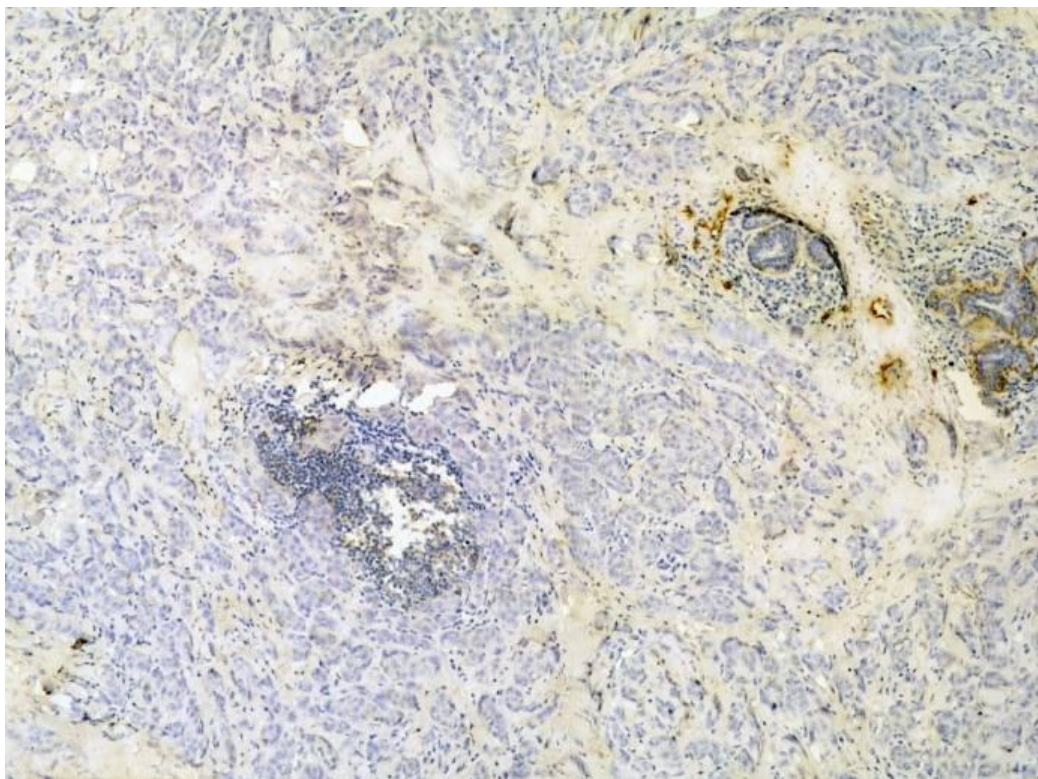
Позитивността за D2-40 в миоепителните клетки на мамарните лобули и каналчета, прорастнати от тумор се установи при 88 (67.69%) от изследваните 130 случаи с инвазивни РГ. Подобно на нормалната мамарна тъкан, позитивността е слаба, цитоплазмена и разпокъсана, като интензивността на оцветяването в миоепителните клетки на лобулитите е по-слаба, спрямо тази в каналите (Фиг.4).



Фиг.4А) Позитивност за D2-40 в mioeпителните клетки на мамарните канали прорастнати от тумор. D2-40, оригинално ув. 100x; Б)

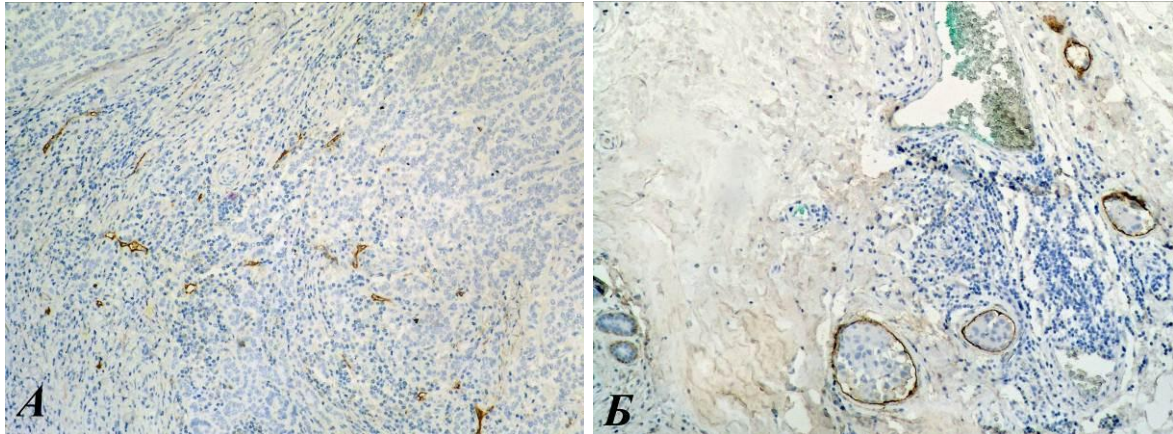
Позитивност за D2-40 в mioeпителните клетки на мамарните лобули, прорастнати от тумор. D2-40, оригинално ув. 100x.

При 108 (83.08%) от изследваните инвазивни тумори в зоните на инвазивния туморен фронт или непосредствено пери-туморно се наблюдава своеобразна слаба, „разпрашена“ дифузна позитивност на фона на кръглоклетъчни инфилтрати (съставени основно от лимфоцити и макрофаги) и сенки от дукто-лобуларни единици (Фиг.5).



Фиг.5 Дукто-лобуларни единици, около които е прорастнал тумора. Терминалните дукто-лобуларни единици са инфилтрирани от кръглоклетъчни инфилтрати, като част от жлезните елементи и интралобуларната строма са напълно разрушени. Наблюдава се разпрашеност за D2-40 оцветяването. D2-40; 40x

Свързаните с тумора лимфни съдове, както пери-туморни, така и интра-туморни демонстрират силна цитоплазмена позитивност за D2-40. При случаите, при които се наблюдава лимфно-съдовата инвазия характеристиките на експресията на D2-40 от страна на лимфно-съдовите ендотелни клетки остава непроменен- хомогенно, силно цитоплазмено имунооцветяване (Фиг.6).



Фиг.6 А) Интра-туморните лимфни съдове са колабирани, приплетнати, част от тях фрагментирани D2-40, 100x; Б) Пери-туморните лимфни съдове които са дилатирани, изпълнени с туморни емболи. D2-40, 100x

4.1.1.3 Интерпретация на D2-40 позитивността при тумори с интрадуктален/интраканаликуларен растеж

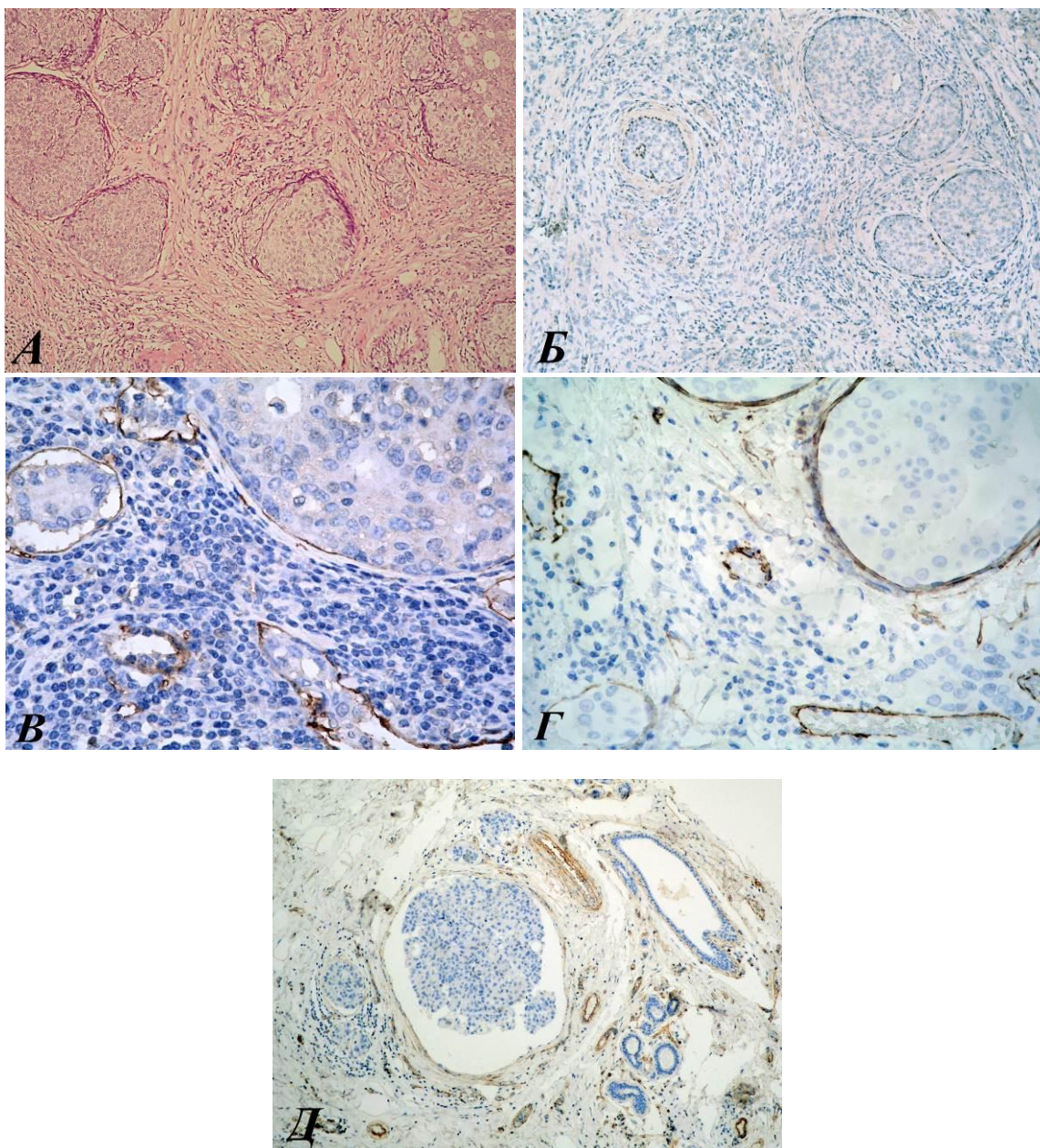
При 42 (32, 31%) от изследваните случаи, тъканните материали, селектирани за оценка на съдовата инвазия съдържат ин-ситу тумори (дуктална интраепителна неоплазия – ДИН 1,2 или 3 или лобуларна интраепителна неоплазия ЛИН 1, 2) или туморна инвазия и разпространение в канали и/или лобуларни единици (Табл. 2).

Табл. 2. Честота на наличие на ин-ситу тумори или туморна инвазия и разпространение в канали и/или лобуларни единици при материалите оценявани за ЛСИ

	Дуктален карцином ин-ситу/ ДИН	Лобуларен карцином ин-ситу / ЛИН	Туморно разпространение в канал	Туморно разпространение в лобул
ЛСИ липсва	28	3	1	4
ЛСИ се открива	5	0	0	1

Интерпретацията на хистологичната картина в тези случаи е извършена върху 5 последователни 4µм дебели срези оцветени с D2-40, α-SMA, p63, collagen IV, като интерпретацията на базата на D2-40 и трите допълнителни маркера демонстрира идентични резултати с интерпретацията, осъществена върху 5-тия препарат, оцветен с коктейл от D2-40 / p63 антитела и една визуализираща система. Колаген тип IV се оказва полезен маркер за отличаване на артефициалното свиване около туморните гнезда, уподобяващо туморни емболи в лимфни съдове. Установиха се случаи, при които интерпретацията на оцветяването с колаген тип IV е затруднена главно поради факта, че лимфните капиляри са лишени от базална мембрана или разполагат с непълна такава.

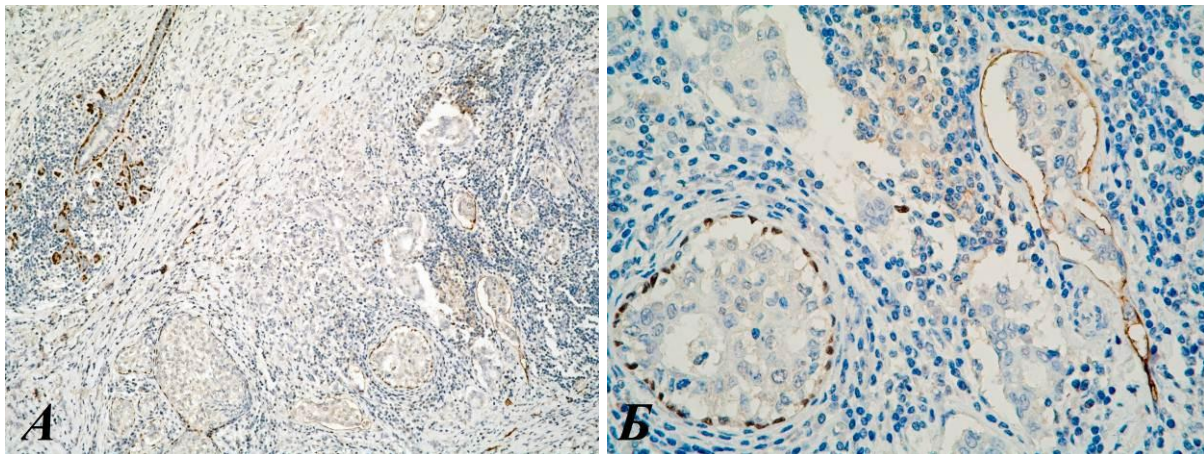
В някои случаи, ЛСИ е неотличима от ин-ситу тумори или туморна инвазия и разпространение в канали и лобуларни единици на рутинно оцветени с ХЕ препарати, както и имунооцветени препарати с D2-40 и α-SMA (Фиг.7).



Фиг.7 А) Туморно разпространение в канал и лобуларни единици и лимфно-съдова инвазия. Огнищата на лимфно-съдова инвазия са трудно отличими ХЕ, 100x; Б) Структури, оградени от p63 позитивни миоепителни клетки (силна ядрена позитивност). При това оцветяване личат добре жлезните структури, но лимфните съдове са неотличими от артефакти, породени от тъканно свиване- p63, 100x; В) Наличието на дилатирани жлезни структури с приплеснат миоепителен слой, затруднява интерпретацията на оцветените с D2-40 препарати и създава трудности при отличаването им от лимфно-съдова инвазия - D2-40, 400x;

Г) Оцветяването с α -SMA не допринася много към разграничаването на дилатирани жлезни структури с приплеснат миепителен слой от събирателни лимфни съдове изпълнени с туморни маси. Събирателните лимфни съдове притежават гладкомускулни клетки в своята стена- α -SMA, 400x; Д) Колаген тип IV- силно дилатиран лимфен капиляр или начален събирателен лимфен съд, при който базалната мембрана се открива фокално. Колаген тип IV, 100x.

В случаите на ин-ситу тумори или туморна инвазия и разпространение в канали и или лобуларни единици използването на D2-40 оцветени препарати и последователно срязани оцветени с p63 препарати, както и оцветяването с D2-40 / p63 коктейл позволява точно отграничаване на последните от ЛСИ (Фиг.8).



Фиг. 8 А) Материали, оцветени с коктейл D2-40/ p63 по модифициран протокол. Лимфните съдове демонстрират непрекъснато, умерено до силно позитивно цитоплазмено оцветяване (D2-40 позитивност в лимфно-ендотелните клетки), което е добре отлчиимо от имунопозитивността тип “броеница” характерна за каналите и лобулите на мамарния паренхим (слабо до липсващо оцветяване за D2-40, силно ядрено оцветяване с p63 характерно за миепителните клетки). D2-40/ p63, 100x; Б) достоверна интерпретация на оцветяването с D2-

40/ p63 коктейла се извършва при увеличение 400x- умерено до силно позитивно цитоплазмено оцветяване (лимфен съд), имунопозитивност тип “броеница”- канали и лобули на мамарния паренхим. D2-40/ p63, 400x.

Степента на съгласуваност между двата метода (отчитане на ЛСИ само върху оцветени с D2-40 хистологични препарати и върху препарати оцветени с D2-40 / p63 коктейл) за отграничаване на ЛСИ от интрадуктален/ лобуларен карциномен растеж е много добра ($\kappa=0.90$) (Табл. 3).

Табл. 3 Съгласуваност между интерпретацията на интрадуктален и/или лобуларен карциномен растеж и ЛСИ на базата на D2-40 и D2-40/p63

n= 111 (19 случая са неинтерпретируеми*)		D2-40/p63	
		ЛСИ липсва	открива се ЛСИ
D2-40	ЛСИ липсва	83	0
	открива се ЛСИ	4	24

*Не се откриват структури позитивни за D2-40

Погрешно като ЛСИ са интерпретирани 2 случая на туморна инвазия и разпространение в лобуларни единици и 2 случая на високодиференциран солиден дуктален карцином ин- ситу.

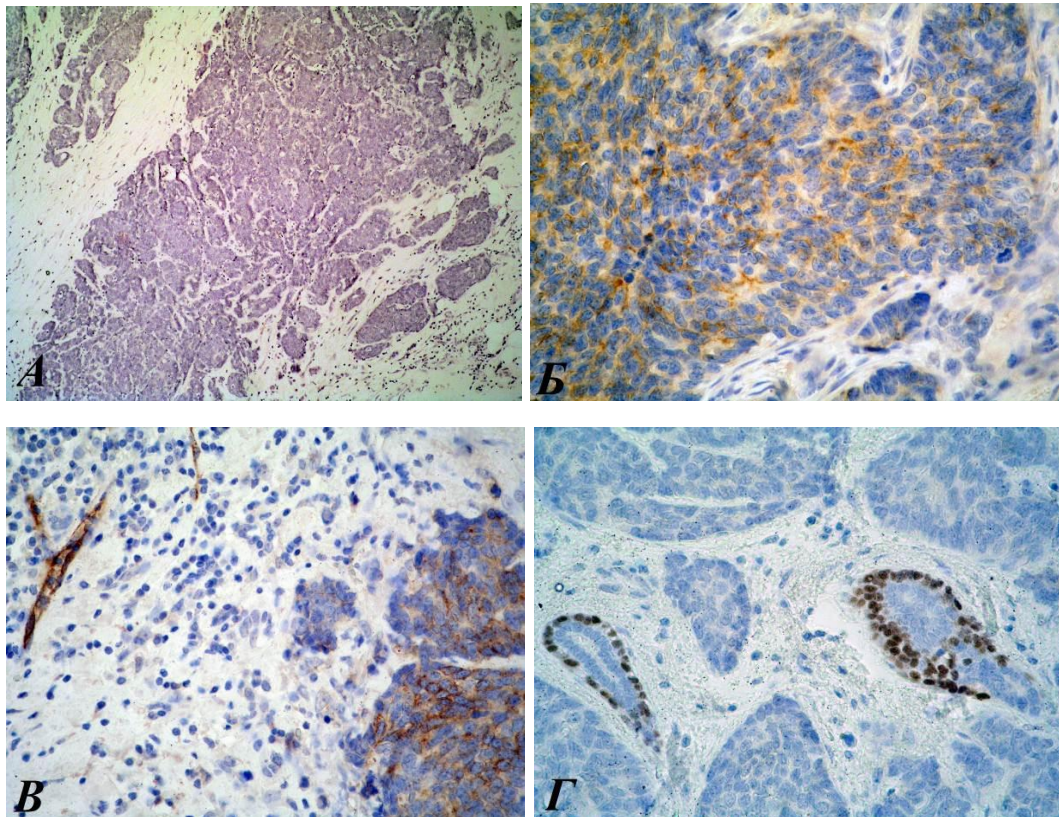
Чувствителността и специфичността от интерпретацията на D2- 40 имунохистохимичната реакция (единствено D2- 40) оцветяването, спрямо интерпретацията на базата на D2-40 и p63, е съответно 100% и 95.40%.

За един от четирите погрешно интерпретирани случаи позитивната ЛСИ (в действителност солиден дуктален карцином ин-ситу)

интерпретирана на базата само на D2-40 би създавала предпоставки за прилагането на различна терапевтична стратегия - (65 годишна пациентка, инвазивен дуктален карцином NOS с обширна ин-ситу компонента pT1c, Nx 0/6; Mx; G2 позитивна лимфно-съдова инвазия (реално негативен); ER умеренопозитивен в 60%; HER2 – 1+)

4.1.1.4 Оценка на експресията на D2-40 от карциномите на гърдата

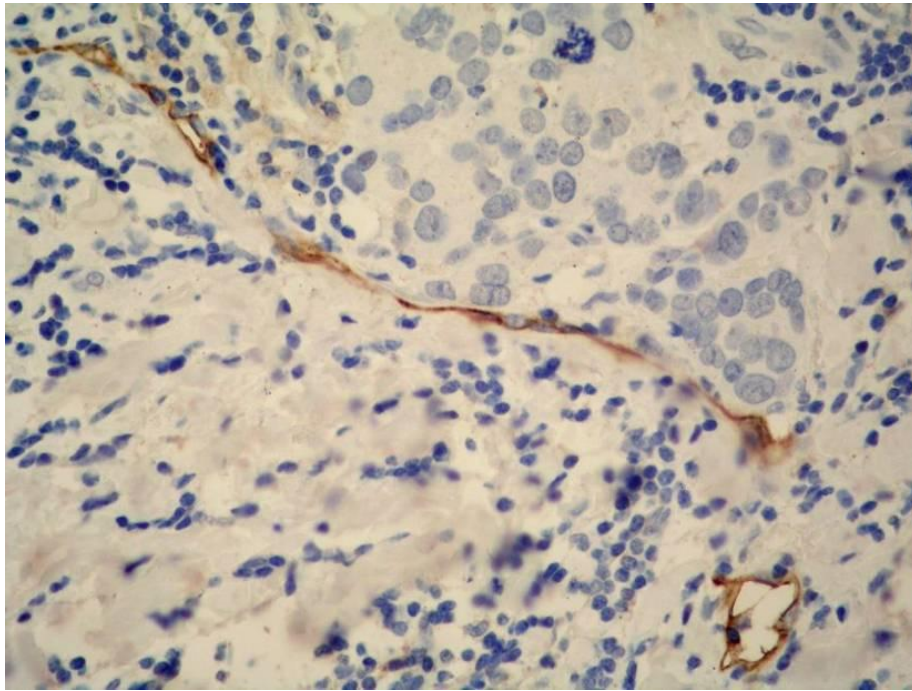
Позитивност за D2-40 се установи при един от изследваните 130 инвазивни карцинома на гърдата. При него експресията се изразява като фокална в над 60% от туморните клетки с умерена цитоплазмена позитивност. По своите морфологични характеристики този тумор е класифициран като умерено-диферинциран, инвазивен дуктален карцином. Туморът към момента на оперативната интервенция е с размери 25 мм в диаметър, плътен, сивкаво-белезникав на срез. Интерес представлява наличието на инвазивен дуктален карцином в другата гърда на пациентката. Статуса на ипси- и контралатералната аксила е негативен, липсват данни за наличие на метастатични огнища във вътрешни органи и кости. Подопланин позитивния тумор е класифициран като Луминален А тип (ER+, PgR+, Her2-, E-catherin +; EGFR - , CK5/6 -; Vim – ; α – SMA -; p63 -; Cav-1 -). Интерес, в този случай, представлява експресията на кавеолин. Въпреки позитивността на туморните клетки, лимфните съдове в тумораната периферия са сравнително добре отличими (Фиг. 9).



Фиг. 9 А) Хистологично, туморът е с предимно солиден растеж, умерен клетъчен атипизъм, слабо изразена стромна реакция и дезмоплазия на стромата. ХЕ, 40x; Б) Умерена цитоплазмена позитивност за D2-40 в туморните клетки D2-40, 400x; В) Умерена цитоплазмена позитивност за D2-40 в туморните клетки. Позитивността в лимфните съдове е добре отличима в пери-туморните лимфни съдове. D2-40, 400x; Г) Нормални мамарни жлезии с позитивен за p63 миоепител, разположени сред негативни за p63 туморни гнезда. p63, 400x.

При описания подопланин позитивен тумор инвазията е по типа на груповата клетъчна инвазия, експресията на E-cadherin при тумора е съхранена.

В някои случаи, прорастването на туморите в частично или изцяло запазени лимфни съдове или дуктални и лобуларни структури е в състояние да симулира позитивност за подопланин на върха на туморната инвазия, и то само по „въшната страна на инвазиращите клетки” (Фиг.10).



Фиг.10 Псевдопозитивност за подопланин на върха на туморната инвазия. Виждат се единични запазени ендотелни клетки. Прави впечатление, че „позитивния туморен фронт” продължава и в тъканите в съседство. D2-40, 400x

При проучването на ролята на подопланиновата експресия от страна на туморите на гърдата за типа на туморния растеж се установиха следните резултати:

Установиха два типа на туморна инвазия при карциномите на гърдата. При 7 (5.38%) от случаите туморна ивазия се осъществява посредством миграция на единични клетки. Характерна за този тип е наличието на E-cadherin негативни, дискохезивни клетки (отговарящи морфологично и имунохистохимично на категорията инвазивен лобуларен карцином на гърдата). При нито един от тези тумори не се установи експресия на подопланин.

При 7 (5.38%) типа на туморната инвазия е смесен (колективна миграция и миграция на единични клетки) а при 116 (89.24%) от случаите

туморна ивазия се осъществява посредством колективна туморно-клетъчна миграция. При последните е запазена експресията на E-cadherin, но само при един случай този тип на растеж е свързан с експресия на D2-40 от страна на туморните клетки.

4.1.1.5 Определяне на степента на пространствено ориентиране при лимфните съдове

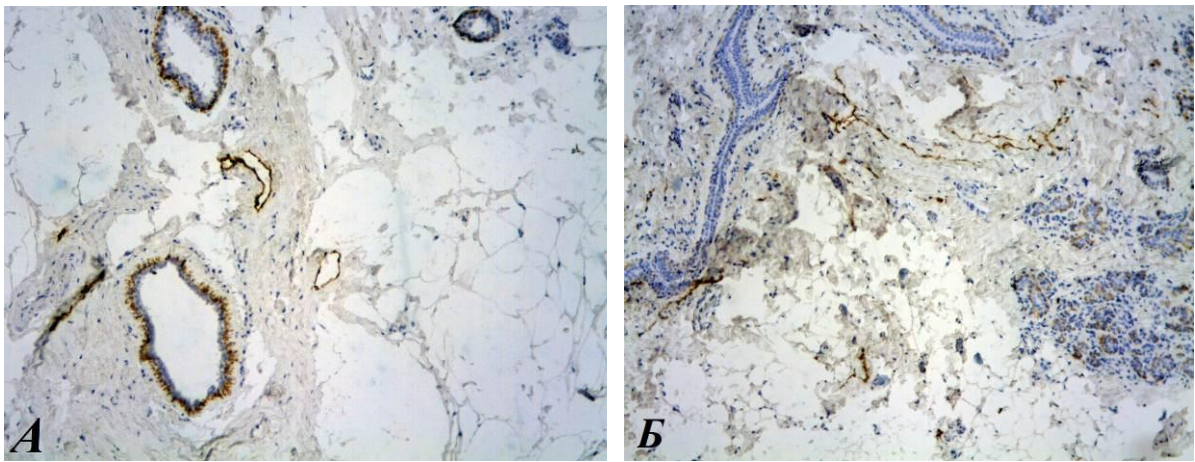
Установи се необходимостта от определяне на степента на пространствено ориентиране при лимфните съдове на нормалната гърда (Табл. 4).

Табл. 4 Съпоставяне на дългите и късите диаметри на лимфните съдове върху хистологични препарати от нормална гърда.

Съдов диаметър	N	дължина в μm +/- CO	Student's - t test
Най-голям съдов диаметър	15	39.65 +/- 22.57	t=5.3882; p=0.0001
Най-малък съдов диаметър	15	10.33 +/- 7.05	

От направения последващ анализ на степента на пространственото ориентиране на микрообектите се установи, че лимфните съдове в гърдата са микрообекти с предимно закономерна ориентация (среден ъгъл заключен между продължиението на дългата ос на лимфните съдове с надлъжната ос ориентирана по хода на мамарен канал е 53.056° (CO= 16.0682; дисперсия 258.1870; n=15).

Относително закономерното подреждане на лимфните съдове се изразява наличието на събирателни лимфни съдове, съпровождащи събирателните канали (Фиг 11). Лимфните капилляри и началните събирателни лимфни съдове и комуникациите между тях са относително произволно разпръснати (спрямо мамарните дуктуси) и придават на мамарния паренхим отчасти произволно разпределение в направлението на лимфните съдове.

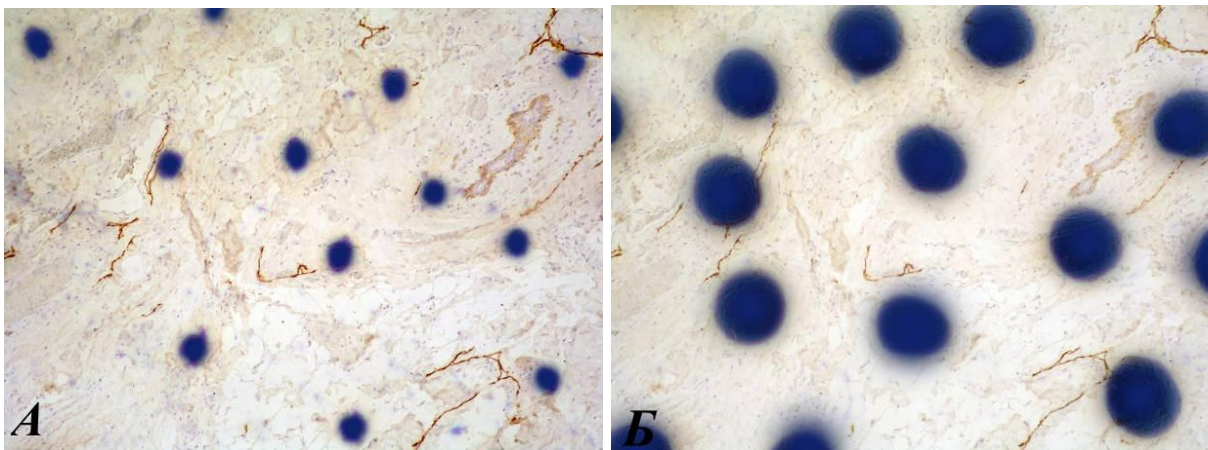


Фиг11 А) Срез перпендикулярен на надлъжната ос на каналите на гърдата. Лимфните съдове изглеждат с окръглен лумен. Отделните лимфни съдове са добре обособени. D2-40, 100x; Б) Срез успореден на надлъжната ос на същите канали на гърдата. Лимфните съдове изглеждат с елипсовиден и издължен лумен. На места прекъсват и отделни фрагменти от стената изглеждат като отделни съдове. D2-40, 40x

4.1.2. Проверка на приложимостта на препоръчвания Chalkley шаблон за оценка на лимфно-съдовата васкуларизация при РГ и сравняването и с лимфно-съдовата васкуларизация, отчетена посредством компютърен образен анализ.

Медианната стойност на относителната лимфно-съдова площ при изследваните случаи, определена посредством компютърен образен анализ е 0.0049195 (варираща от 0.000100711 до 0.10219).

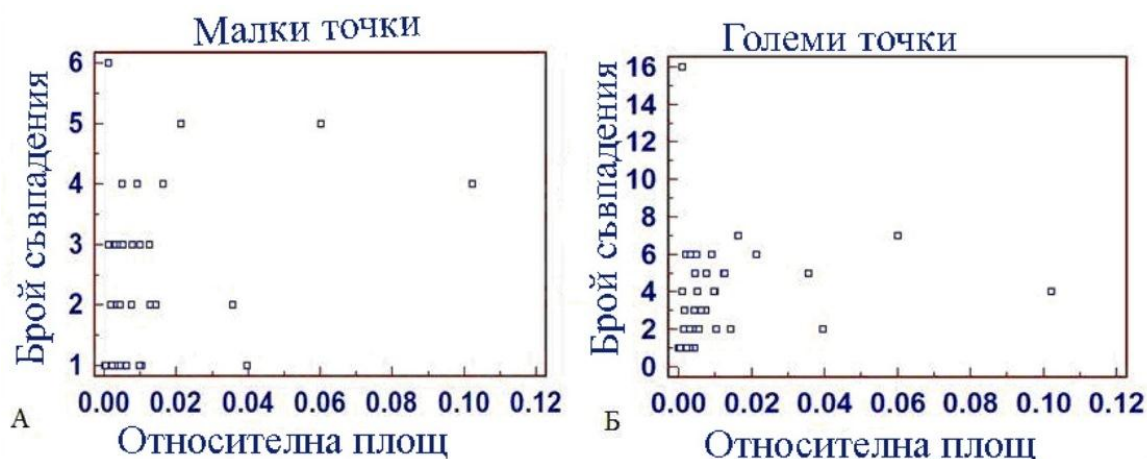
Изработените и монтирани към микроскоп шаблони предоставиха възможност за ефективно отчитане на Chalkley броя, като проецираните върху хистологичните срези точки бяха добре отграничени (Фиг.12)



Фиг. 12 А) Фрагмент от зрително поле от хистологичен срез и насложения образ на Chalkley шаблона с точки с площ 0.05% от площта на шаблона D2-40, сборно ув. 100x; Б) фрагмент от зрително поле от хистологичен срез, и насложения образ на Chalkley шаблона с точки с площ 1.29% от площта на шаблона; D2-40, сборно ув. 100x

Резултатите, отчетени посредством шаблона с „едри“ точки показаха медианна стойност 3 съвпадения (вариращи от 1 до 16), докато резултатите получени върху същите участъци от тъканта, на базата на шаблона с „малките точки“ показаха медианна стойност 2 съвпадения (вариращи от 1 до 6). Установи се значима разлика в разпределенията на резултатите от малките и големите точки $p < 0.001$; $n = 37$. Установи се, че резултатите от Chalkley, както от шаблона с “малките”, така и от шаблона с “големите” точки са сигнификантно свързани с реалната относителна лимфно-съдова площ, съответно $\rho = 0.345$; $\rho = 0.039$; $n = 37$ за шаблона с малките точки и $\rho =$

0.404; $p=0.015$; $n=37$ за шаблона с големите точки. В не малко случаи Chalkey сборът, при материали с различна относителна лимфно-съдова площ е еднакъв, което е изразено по-добре при измерванията, извършени с малките точки. Например, Chalkey сбор (резултат) 1 съответства на стойности от приблизителна относителна съдова площ от 0.0001 до близо 0.04. Подробностите са представени на (Фиг.13).

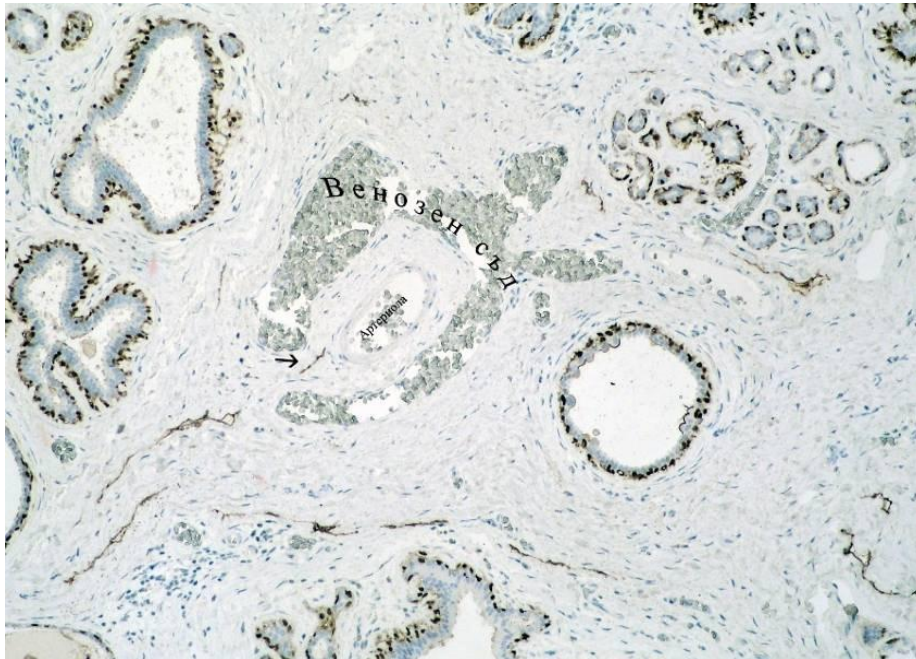


Фиг.13 Диаграма А отразява зависимостта на относителната лимфно-съдова площ, установена посредством Chalkley шаблон с точки с площ 0.05% от площта на шаблона от реалната относителна лимфно-съдова площ. Диаграма Б отразява зависимостта на относителната лимфно-съдова площ установена посредством Chalkley шаблон с точки с площ 1.29% от площта на шаблона от реалната относителна лимфно-съдова площ.

4. 1.3. Феноменът съд в съда, като потенциален източник на грешка при морфометричния анализ (оценката на съдовата плътност, обема и площта) на лимфните съдове на гърдата

След серийно проучване и имунохистохимично оцветяване, морфологичната картина „съд в съда” се наблюдава в 16 (12. 31%) от изследваните хистологични материали от мамарен паренхим.

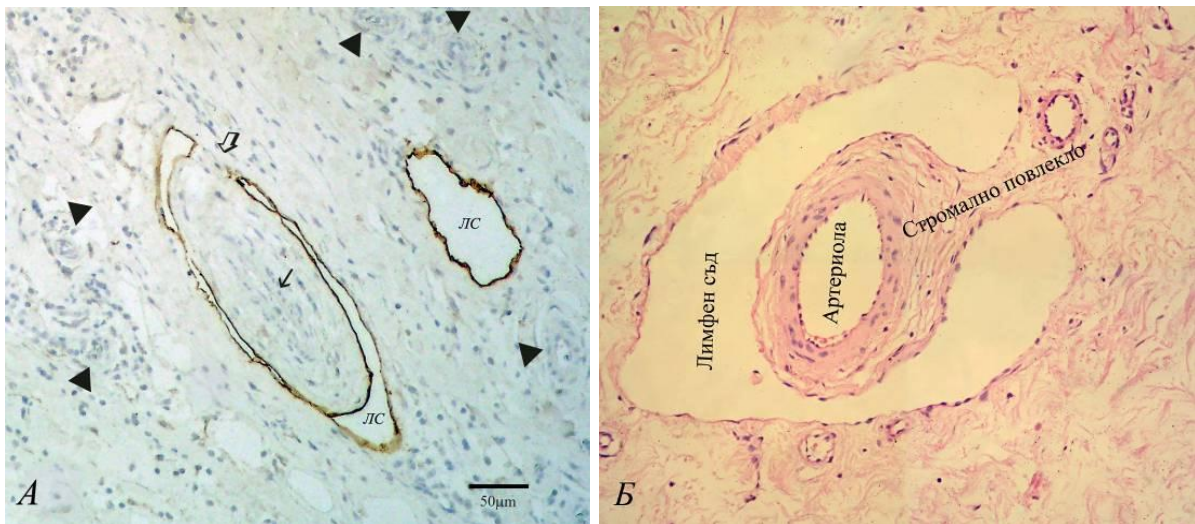
След имунохистохимичното типизиране на съдово-съдовите комплекси на нелактираща, функционално необременена гърда се установи, че последните са съставени от лимфни и кръвоносни съдове с изключение на един случай, при който наред с лимфо-кървоносните съдови комплекси се откри и съдово-съдова структура изградена от кръвоносни съдове – венозен и артериален съд (Фиг.14).



Фиг.14 Съдово-съдова структура изградена от кръвоносни съдове – венозен и артериален. Лимфните съдове и миоепителните клетки са имунооцветени. D2-40/p63, 100x

Установи се също така, че при всички случаи, при които се откриха съдово-съдови комплекси, съставени от лимфен и кръвоносен съд, голямокалибрните, цепковидни съдове, представляващи „външния, обвиващ” съд са лимфни съдове с характеристики на колекторни лимфни съдове (едрокалибрени съдове с D2-40 позитивен, CD 34 негативен ендотел, мускулен слой и в някои случаи съдържащи клапи). Съдовете, „вложени” в лумена на колекторните лимфни съдове, са кръвоносни съдове- артериоли (D2-40 негативни, CD 34 позитивни, съдържащи

еритроцити), обвити от оскъдно количество мамарна строма (единични миофибробласти и колаген). При всички случаи на съдово-съдови комплекси се откри нежно стромално повлекло, свързващо мамарния паренхим с кръвоносния съд, който е „вложен” (вдаден) в лумена на лимфния съд. (Фиг.15 А, Б).



Фиг.15 А) Феномен съд в съда, с участието на лимфни съдове разположен в интерлобуларната строма на гърдата. С плътни върхове на стрелки са означени кръвоносни съдове в мамарната строма, с контурирана стрелка– стромалното стебло на вложената артериола, със стрелка лумена на вложения артериален съд, съдържащ единични еритроцити. ЛС- лимфен съд. D2-40, 100x; Б) Феноменът съд в съда ХЕ, 100x

От друга страна, съдово-съдовия комплекс, съставен изцяло от кръвоносни съдове, по своята същност е венозен съд в лумена, на който се открива артериален.

По наши наблюдения, откриването на описаната връзка на артериолата с мамарния паренхим и при двата вида съдово-съдови структури е въпрос на избор на срезна повърхност на хистологичния материал и посока на ориентиране на тъканния срез.

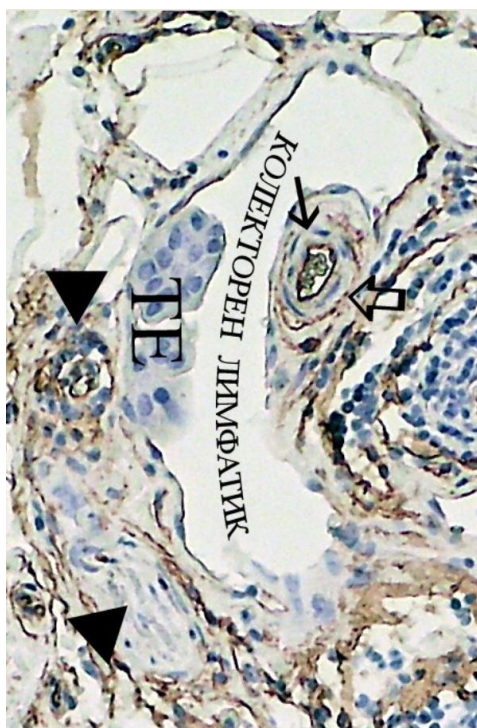
Измерването на обиколката и площта, заградена от лумените на лимфните съдове от фигура 20, са представени таблично (Табл. 5).

Табл. 5 Площта и обема на съседните лимфни съдове от фиг. 15 А - единият – колекторен лимфен съд, участващ в (съдово-съдов комплекс), вторият- начален пре-колекторен лимфен съд

Вид на съда	Обиколка на съда μm	Площ на съда μm^2
Колекторен лимфен съд (съдово-съдов комплекс)	1429.7	7439
Пре-колекторен лимфен съд	385.4	7403

От данните изложени в последната, прави впечатление, че площите на колекторния лимфен съд, при който се наблюдава феноменът „съд в съда” и разположения в съседство пре-колекторен лимфен съд са приблизително идентични. Обиколка на колекторния лимфен съд е 3.7 пъти по-голяма, спрямо тази на пре-колекторния лимфен съд.

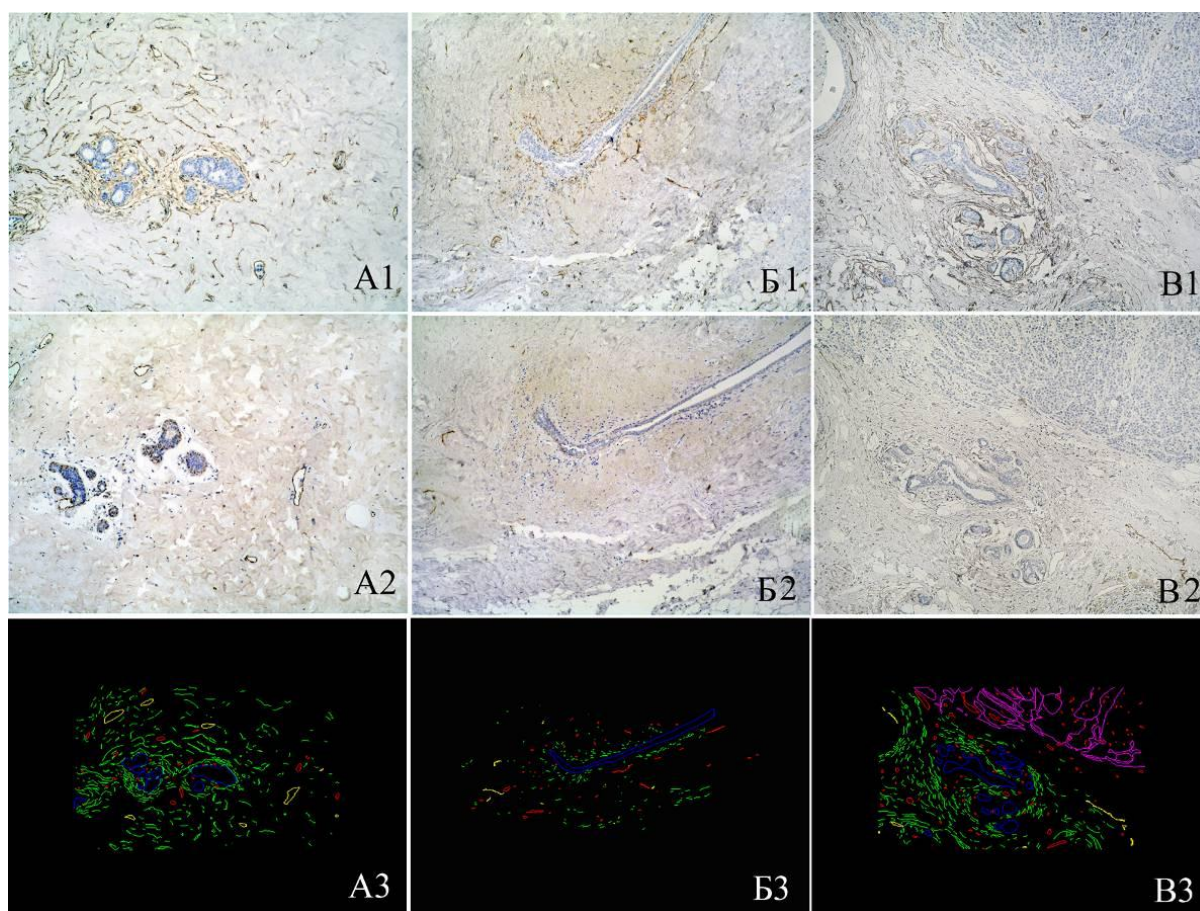
При 3 от изследваните случаи колекторните лимфни съдове са ангажирани от туморни емболи и вероятно тензионно обременяване от локална лимфостаза. При тези случаи кръвоносните съдове са избутани от лимфно-съдовия лумен, като само частично се вдават в него. Контурът на лимфните съдове е от елипсовиден до окръглен (Фиг.16).



Фиг. 16 Феномен съд в съда, при който в лимфния съд се откриват туморни емболи. Съдът е „дилатиран”, а артериолата (имунооцветена) е избутана извън лумена. TE- туморен ембол. CD34, 400x.

4. 2. Проучване на пре-лимфатичната система на гърдата в норма и в контекста на карциномен растеж

В патологично непроменения (неангажиран от туморен растеж) мамарен паренхим на менструиращите жени, се наблюдава отчетливо обособяване на интра– и интерлобуларна строма. Интралобуларната строма изглежда рехавя и слабо колагенизирана, което при микроскопско изследване на малки увеличения и придава вид на рехаво, стромално просветляване около терминалните дукто-лобуларни единици и каналите в мамарния паренхим. Интерлобуларната строма изглежда по-плътна и подредена (Фиг. 17)



Фиг.17 Пре-лимфатична мрежа, кръвоносни и лимфни съдове в патологично непроменен мамарен паренхим при менструираща жена, менопаузална жена и във фронта на туморна инвазия при инвазивен дуктален карцином на гърдата:

А (1-3) Патологично непроменен мамарен паренхим при менструираща жена:

А1 Кръвоносни съдове и пре-лимфатични структури CD 34; 100x

А2 Лимфни съдове D2-40; 100x

А3 Сборно изображение, сглобено от предходните два среза. Вижда се добре развита пре-лимфатична мрежа.

Цветни обозначения: зелено – пре-лимфни съдове; червено – кръвоносни съдове; жълто – лимфни съдове; синьо – дукто-лобуларна единица

Б (1-3) Патологично непроменен мамарен паренхим при менопаузална жена:

Б1 Кръвоносни съдове и пре-лимфатични структури CD 34;100x

Б2 Лимфни съдове D2-40; 100x

Б3 Сборно изображение, сглобено от предходните два среза. Вижда редуцираната до липсваща пре-лимфатична мрежа. Цветни обозначения: зелено – пре-лимфни съдове; червено – кръвоносни съдове; жълто – лимфни съдове; синьо – дукто-лобуларна единица

В (1-3) Фронт на туморна инвазия при инвазивен дуктален карцином на гърдата:

В1 Кръвоносни съдове и пре-лимфатични структури CD 34;100x

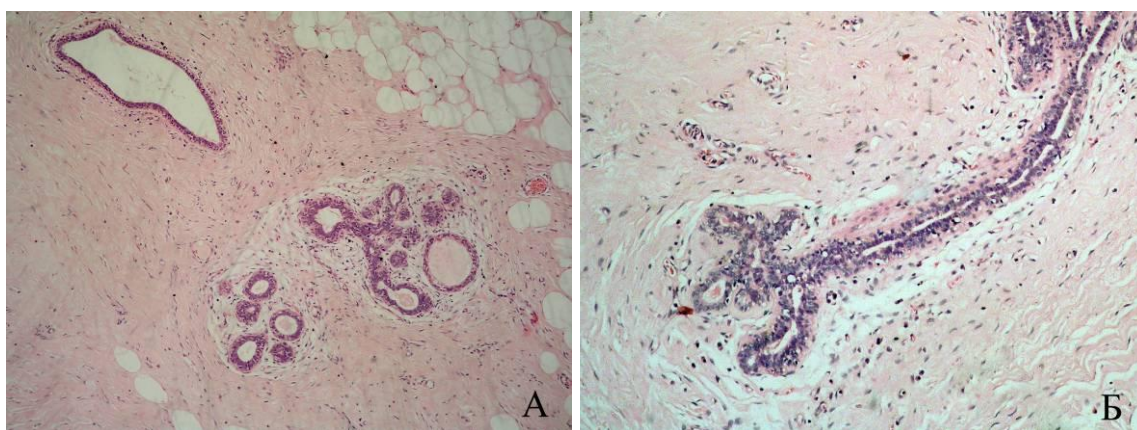
В2 Лимфни съдове D2-40; 100x

В3 Сборно изображение, сглобено от предходните два среза. Вижда се липсата на пре-лимфатични структури вътретуморно, и в ограничен периметър пери-туморно. Цветни обозначения: зелено – пре-лимфни съдове; червено – кръвоносни съдове; жълто – лимфни съдове; синьо – дукто-лобуларна единица; лилаво - тумор

В интралобуларната строма, пре-лимфатичните структури са разположени нагъсто, като обграждат терминалната дукто-лобуларна единица и са свързани с пре-лимфатичните канали от интерлобуларната строма. Пре-лимфатичните, разположени в по-плътната интерлобуларна строма, са по-нарядко разположени, като завършват около лимфни капилляри. Лимфните капилляри, както и лимфните съдове от по-голям калибър (пре-колекторни и колекторни лимфни съдове) не се срещат в интралобуларната строма. Кръвоносните съдове се срещат както в интра- така и в интерлобуларната строма. Установи се, че капиллярите се срещат предимно в интралобуларната строма, докато по-едрокалибрените артерии,

артериоли, вени и венули са по-характерни за интерлобуларната строма (Фиг.17 А1, А3).

В оцветени с хематоксилин и еозин тъканни материали от патологично непроменен мамарен паренхим на жени, навлезли в менопауза, липсва отчетливото обособяване на интра– и интерлобуларна строма. При оцветяване с хематоксилин и еозин интралобуларната строма не се забелязва, а интерлобуларната строма изглежда плътна и подредена и по-хипоцелуларна, в сравнение с тази, при менструиращите жени (Фиг.18).



Фиг 18 А) Мамарна тъкан с начални инволутивни промени (сливане на ацини и наличие на ацини с кистично-дилатиран вид) и запазена интралобуларна строма около терминалната дукто-лобуларна единица – по-светла и по-рехава тъкан в сравнение с интерлобуларната строма. ХЕ, 100x; Мамарна тъкан с напреднали атрофични промени. Интралобуларна строма не се забелязва ХЕ, 100x.

При оцветяване със CD34 се забелязва обособяване на наблюдаваното в интралобуларната строма, разполагане нагъсто на пре-лимфатични структури, които обграждат инволуиралата терминална дукто-лобуларна единица. Пре-лимфатиците, разположени в по-плътната интерлобуларна строма, са разпръснати и разположени произволно, на рядко, като връзката им с лимфните капиляри не личи добре. Лимфните капиляри, както и лимфните съдове от по-голям калибър (пре-колекторни

и колекторни лимфни съдове) не се срещат в близост до терминалната дукто-лобуларна единица (интралобуларната строма). Кръвоносните съдове се срещат както в интра-, така и в интерлобуларната строма. Установи се, че подобно на паренхима от гърда при менструиращите жени, капилярите се срещат предимно в интралобуларната строма, докато по-едрокалибрени артерии, артериоли, вени и венули са по-характерни за интерлобуларната строма (Фиг.17 Б1 и Б3).

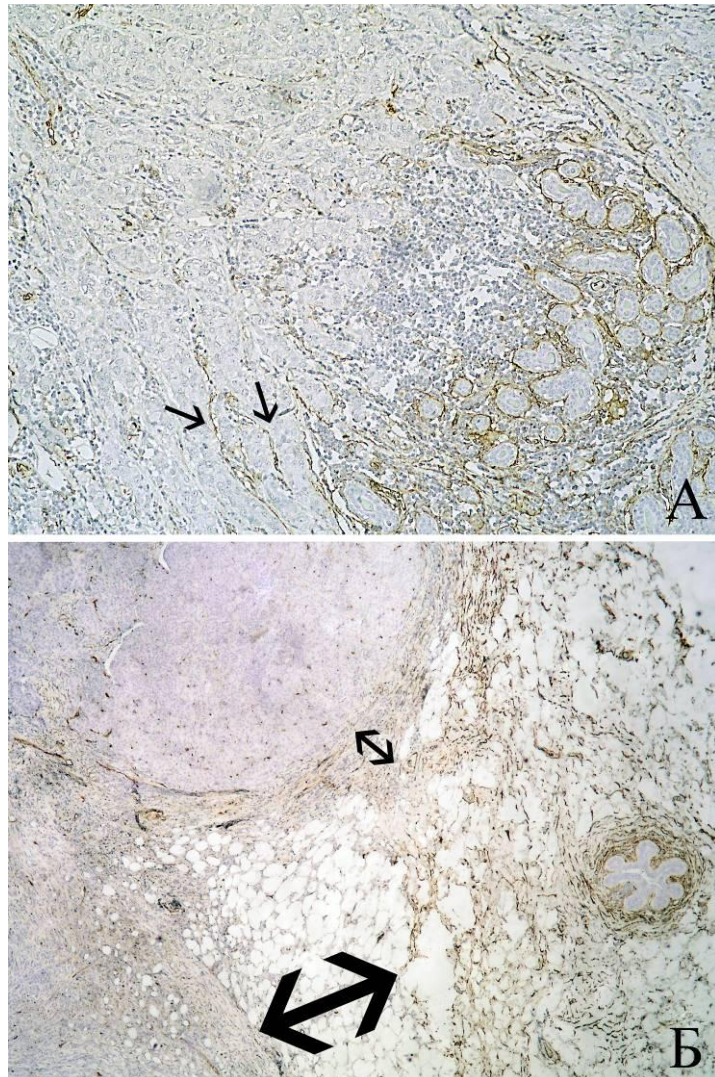
При направеният количествен анализ на пре-лимфатичната система и лимфните съдове на гърдата в зависимост от менструалния статус се установи, че пре-лимфатичната мрежа (отчетена като брой CD34 позитивни фибробласти) е значимо по-развита при менструиращи жени, в сравнение с жени в менопауза (Табл. 6).

Табл.6 Сравняване на броя CD34 позитивни фибробласти в отдалечената пери-туморна строма (интра- и интерлобуларната) при менструиращи жени и жени в менопауза.

	п	Брой CD34 поз. Фибробласти Ме (от -от)	К-W
Менструиращи	28	731.0 (417.0-1019.0)	К-W =61.04; p<0.0001
Менопаузални	77	143.0 (87-228)	

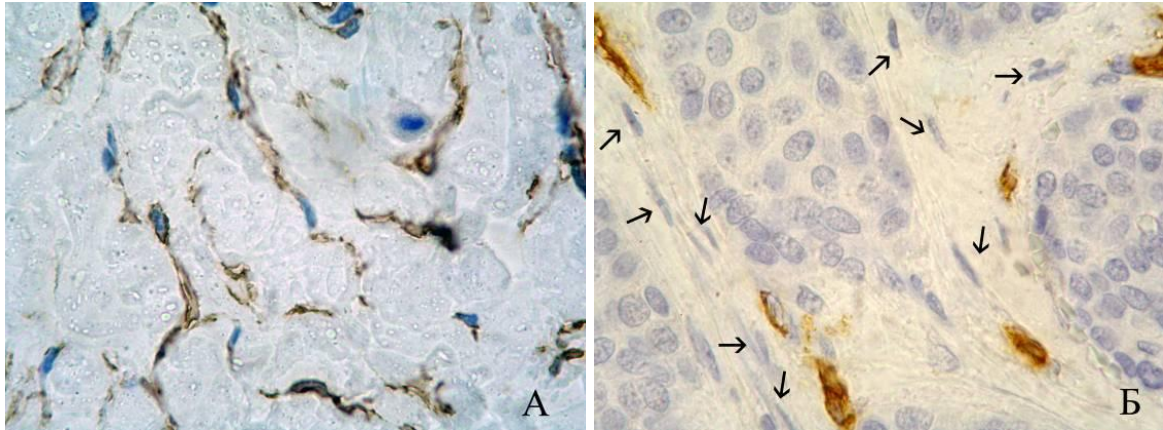
При мамарния паренхим, засегнат от инвазивен туморен растеж, се установи „изчезване” на пре-лимфатичните структури в туморната строма и в ограничен периметър пери-туморно (Фиг.17 В1 и В3). Наблюдават се известни различия и нюанси в зависимост от типа на туморната инвазия. При предимно инфилтративно растящите тумори (и особено лобуларни карциноми), може да се наблюдава навлизане на туморни клетки в частично запазените пре-лимфатичните структури във фронта на туморна

инвазия (Фиг. 19А), което не се наблюдава при предимно експанзивно растящите карциноми на гърдата (Фиг. 19 Б).



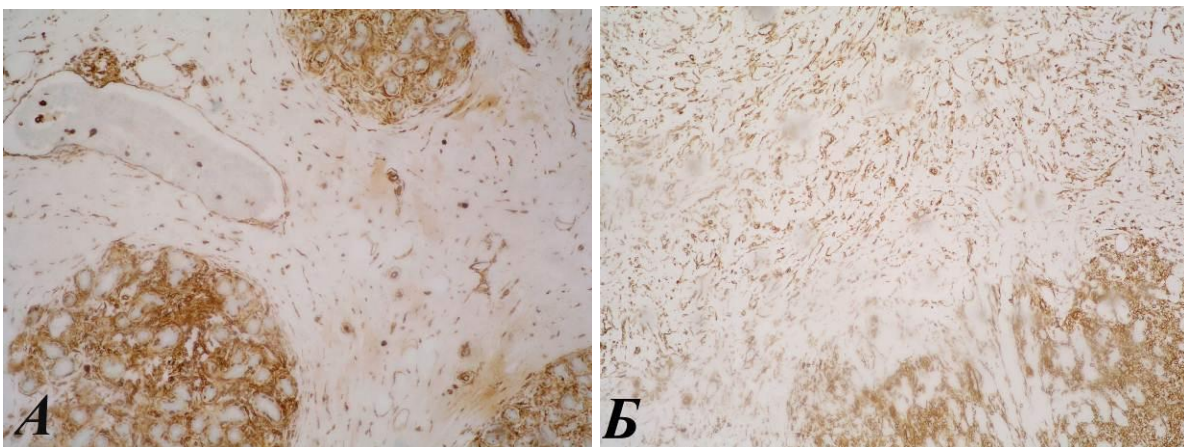
Фиг. 19 А Предимно инфилтративно растящ инвазивен дуктален карцином на гърдата, растящ по хода на пре-лимфатичната мрежа; CD34, 100x; Б) При експанзивно растящите инвазивни дуктални карциноми на гърдата се наблюдава избутване на нормалната мамарна строма. Количеството на CD34 позитивни фибробласти намалява в стромата, непосредствено заобикаляща тумора; CD34, 100x.

Като цяло обаче, характерните за нормалната мамарна строма CD34 фиброцити се заменят от по-сочни източни клетки (фибробласти) в туморната строма (Фиг. 20).



Фиг. 20 А) Нормална мамарна строма, съдържаща CD34 фиброцити, тапициращи ходовете на пре-лимфатичните ходове. CD34, 1000x; Б) На фона на имунопозитивни ендотелни клетки се наблюдава липса на имунохистохимично оцветяване сред фибробластите от туморната строма (означени със стрелки); CD34, 1000x.

При имунооцветяване с виментин на нормална строма и туморна строма прави впечатление, че фиброцитите/бластите са запазили своята позитивност за виментин (Фиг 21).



Фиг. 21 Нормалната мамарна строма, съдържаща виментин позитивни фиброцити; виментин, 100x; Б) Фибробластите от туморната строма демонстрират имунопозитивност за виментин; виментин, 100x

Кръвоносните съдове, предимно от капилярен тип се срещат в туморната строма, докато лимфни съдове се срещат по изключение вътретуморно, като в тези случаи те са във външната 1/3 от тумора.

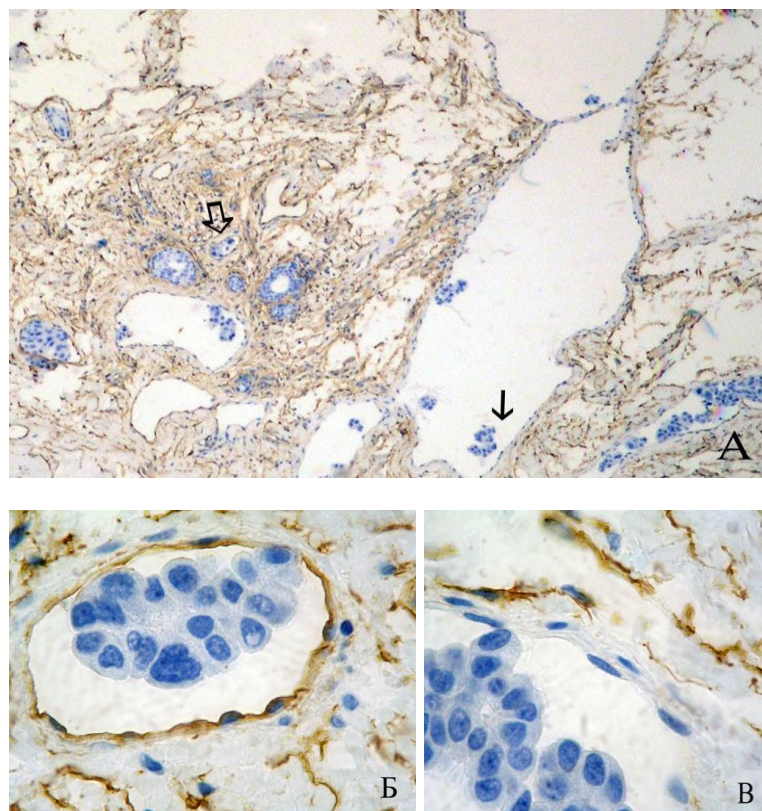
При направения анализ на лимфно-съдовата плътност пери- и интра-туморно при менструиращи и менопаузални жени се установи, че лимфно-съдовата плътност е сигнификантно по-висока при менструиращи пациентки, в сравнение с пациентки в менопауза (табл. 7).

Табл. 7 Зависимост на лимфно-съдова плътност интра-туморно (А) и пери-туморно (Б) от менструалния статус.

Менструален статус	n	(А) Лимфно-съдова плътност интра-туморно Ме (от –до)	K-W	(Б) Лимфно-съдова плътност пери-туморно Ме (от –до)	K-W
Менструиращи	n =28	2.0 (0.0 – 15.0)	K-W = 4.45482; p=0.035	7.5 (0.0 – 40.0)	K-W = 7.60882; p=0.006
Менопаузални	n =77	0.0 (0.0 – 11.0)		5.0 (0.0 – 28.0)	

При наслагването на CD34 и D2-40 оцветените срези се установи позитивност за CD34 в лимфните капиляри при 103 (79.23%), която рядко се наблюдава при лимфните съдове от по-голям калибър (преколекторни лимфни съдове), където оцветяването е слабо по интензивност.

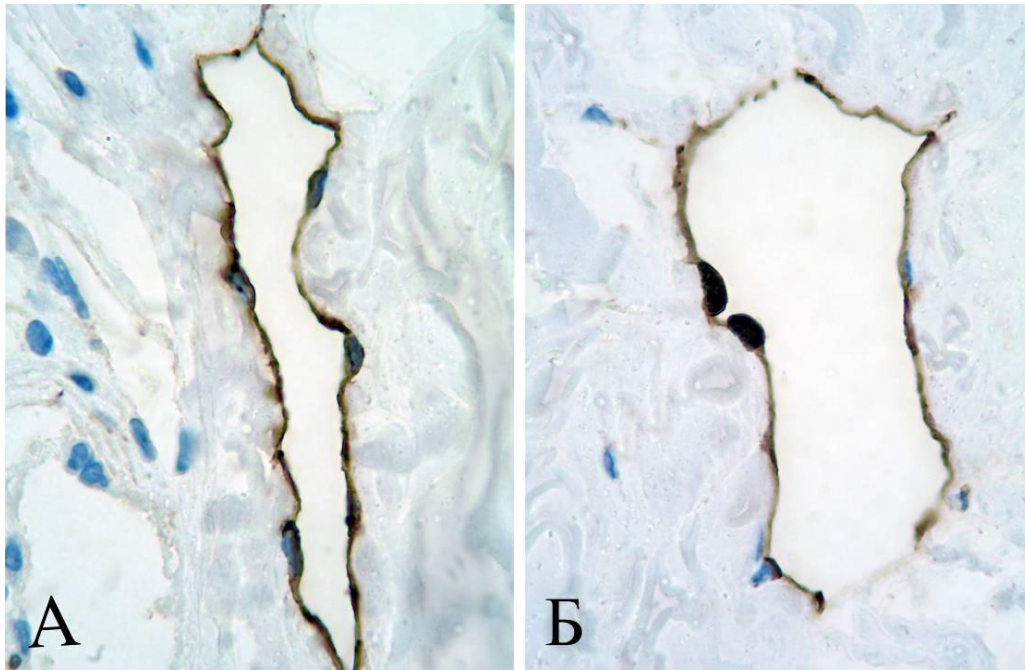
Наблюдаваната CD34 позитивност е както интра- така и пери-туморна в съдове, неангажирани от туморния растеж (лимфно-съдова инвазия) и в съдове с туморни емболи (Фиг.22).



Фиг 22 А) Позитивност за CD34 в лимфните капилляри съдържащи съдови емболи (контурирана стрелка) и липса на CD34 позитивност в лимфните съдове с по-голям калибър - събирателни лимфни съдове (стрелка). CD34, 100x; Б) лимфен капиляр, позитивен за CD34, съдържащ съдов ембол (детайл). CD34, 1000x; В) събирателен лимфен съд, негативен за CD34, съдържащ съдов ембол (детайл). CD34, 1000x.

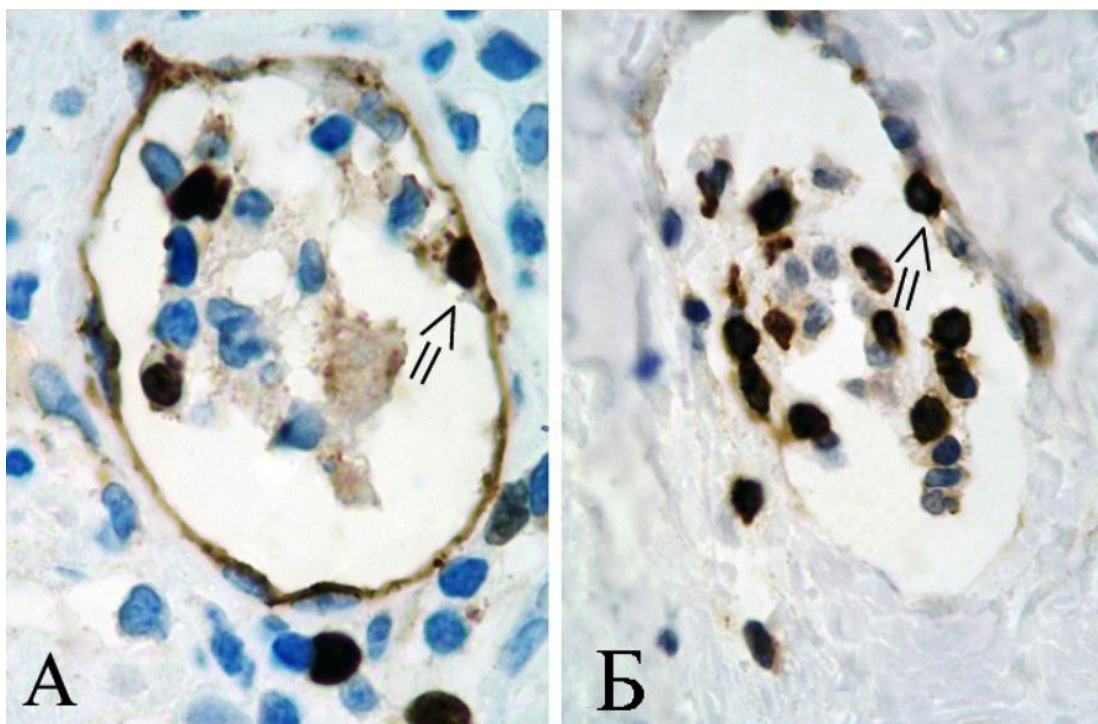
4.3 Проучване на наличието на тумор-асоцирана лимфангиогенеза при РГ и вероятните механизми, по които тя се реализира.

Използването на модифициран протокол, базиран на двойно маркиране позволи интерпретация на имунохистохимичното оцветяване (Фиг. 23).



Фиг. 23 А Лимфен съд с непролифериращ ендотел. Цитоплазмена позитивност за D2-40 и липса на ядрена позитивност за Ki-67- ядрата на ендотелните клетки са сини (оцветени от хематоксилин). D2-40/Ki-67, 1000x; Б) Проплифериращ ендотел- Ki-67 позитивни ядра на ендотелните клетки, на фона на цитоплазмена позитивност за D2-40. В срещуположната страна на съда се наблюдава пролиферативно неактивен ендотел – синьо ядро. D2-40/Ki-67, 1000x.

Когато Ki-67 позитивността при тумор-свързаните лимфни съдове се разгледа в контекста на CD3/CD20 оцветените кореспондиращи срези, при 6 (30%) случая (тъканни материала) първоначално смятаните за лимфно-ендотелни клетки, се установиха CD3 позитивни /Ki-67 позитивни клетки. Експресирания фенотип отговаря на активирани Т-лимфоцити, прикрепени към стената на лимфен съд (Фиг. 24).



Фиг. 24 А) Ki-67 позитивни клетки в лумена на лимфен капиляр. Една от клетките, позитивни за пролиферативния маркер е прикрепена за ендотелната повърхност на лимфния съд. D2-40/Ki-67, 1000x; Б) Лумен от лимфен капиляр, при който е открита позитивност за Ki-67. След оцветяване със CD3 се установи, че се касае за активиран Т-лимфоцит. D2-40/Ki-67, 1000x

Медианния процент на Ki-67 позитивни клетки свързани с лимфно-съдовия ендотел (включително CD3 позитивните /Ki-67 позитивните клетки) от всички преброени лимфно-ендотелни клетки за препарат е 1.15% (от 0.0 до 8.2 %), а медианния процент на Ki-67 позитивни лимфно-ендотелни клетки е 0.8 % (от 0.0 до 3.4%) от всички преброени лимфно-ендотелни клетки за препарат. При сравняването на отчетените като Ki-67 позитивни клетки свързани с лимфно-съдовия ендотел (включително CD 3 позитивните/Ki-67 позитивните клетки с Ki-67 позитивни лимфно-ендотелни клетки се установи, че при 6 случая медианните стойности на лимфноендотелна пролиферация отчетени като Ki-67 позитивни лимфно-

ендотелни клетки са по-ниски от тези отчетени при случаите, включващи CD 3 позитивни /Ki-67 позитивни клетки свързани със съдовата стена. При 14 случая медианните стойности на пролиферативния лимфоендотелен индекс съвпадат при двете изследвани групи. Не са наблюдавани случаи, при които CD 3 позитивните/Ki-67 позитивни клетки са по-малко от Ki-67 позитивните лимфо-ендотелни клетки. При ниво на значимост $p < 0.05$ разпределенията в двете групи се различават значимо $p = 0.041$.

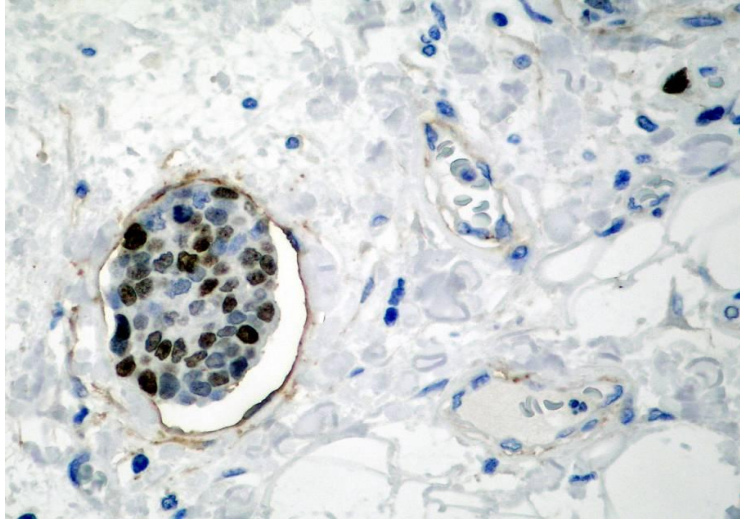
Наблюдаваните медианни стойности на лимфо-ендотелна пролиферация (пролиферативен индекс) свързани с карциномите на гърдата са 0.8% (от 0.0 до 3.4%) $n = 20$. Медианните стойности на лимфоендотелната пролиферация при материал от некарциномни, непролиферативни лезии е 1.1 % (от 0.0 до 2.7%) $n = 15$. При сравняването на медианните стойности на пролиферативната активност при лимфния ендотел при РГ с мамарен паренхим свързан с некарциномни, непролиферативни лезии се установи липса на значими разлики $K-W = 154.0$; $p = 0.547$.

Липса на статистически значими разлики се установи и при сравняването на лимфо-ендотелния пролиферативен индекс при пациенти с РГ с негативен и пациенти с позитивен аксиларен статус. (Табл. 8).

Табл. 8 Отношение на същинската лимфоендотелна пролиферация установена при рака на гърдата към статуса на аксиларните лимфни възли.

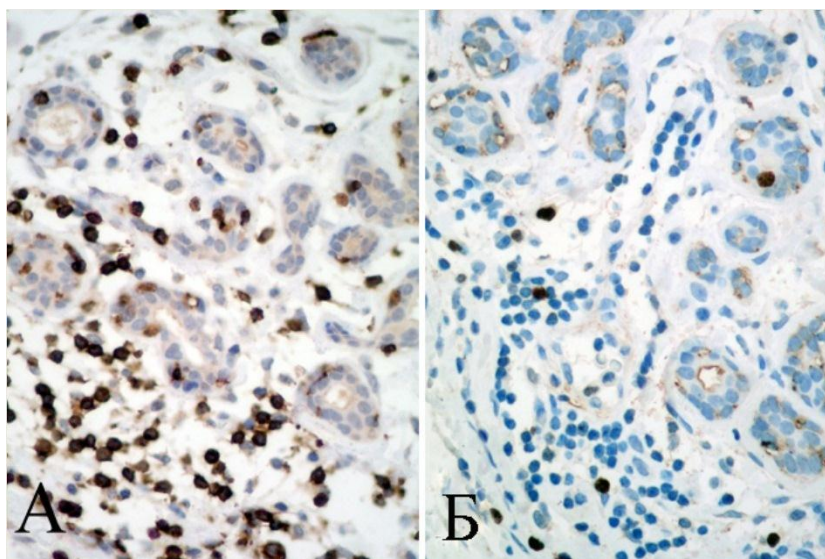
Аксиларен статус (N)	n	Средно аритметично +/- CO (%)	Student's t - test
Негативен	n=10	0.63 +/- 0.73	t= - 1.43; p=0.171
Позитивен	n=9	1.21 +/- 0.99	

Лимфно-съдова инвазия се откри при 5 (25%) от изследваните случаи с РГ. Не се откри случай на пролифериращ лимфно-съдов ендотел в съдовете с лимфно-съдова инвазия (Фиг 25).



Фиг. 25 Относително висока митотична активност в лимфно-съдова инвазия. Ендотелните клетки личат добре, което позволява лесна интерпретация на имунохистохимичната реакция D2-40/Ki-67, 400x

Кръглоклетъчни инфилтрати са наблюдавани в 19 (95%) от изследваните случаи. Те се разполагат често около инвазирани и частично или цялостно разрушени дукто-лобуларни единици или са прилежащи към туморния инвазивен фронт (Фиг 26). В описания лимфоцитарен инфилтрат преобладават предимно Т- (CD3 позитивните) лимфоцити и рядко, огнищно се откриват В- лимфоцити (CD20 позитивни). В интралобуларната строма на нетуморната, невъзпалително- променна гърда се установи наличието на единични В- и Т- лимфоцити.



Фиг. 26 А) Т-лимфоцитни (CD3 позитивни) инфилтрати в частично разрушена дукто-лобуларна единица прилежаща към туморния инвазивен фронт CD3, 400x ; Б) В- лимфоцитни (CD20 позитивни) единични клетки в частично разрушена дукто-лобуларна единица прилежаща към туморния инвазивен фронт CD20, 400x.

Медианните стойности на броя на активираните Т- лимфоцити, свързани с туморите при пациенти с негативен аксиларен статус, не се различават значимо от тези, наблюдавани при пациенти с позитивен аксиларен статус (Табл. 9).

Табл.9 Връзка на Ki-67 позитивните Т-лимфоцити с аксиларния статус.

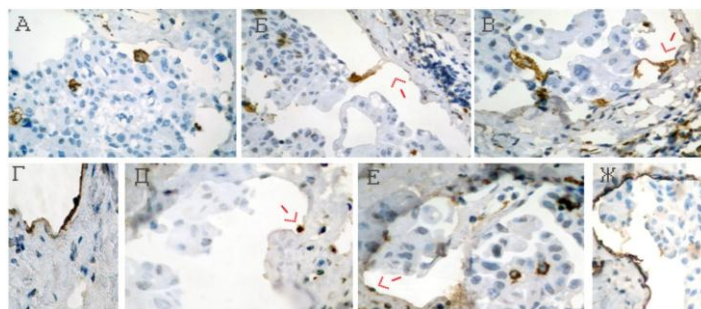
Аксиларен статус (N)	n	Me (от -до)	K-W
Негативен	n= 10	2.2 (0.0 - 23.2)	K-W=0.11; p=0.741
Позитивен	n=9	2.4(0.0 - 3.6)	

Средният брой на лимфно-ендотелните клетки, заграждащи лумена на един лифен съд при интра-туморните лимфни съдове е $3.20 \pm 1.14 / 1.2 \text{ мм}^2$, което не се отличава сигнификантно от средния брой лимфно-

ендотелни клетки, заграждащи лумена на лимфните съдове от нормалния мамарен паренхим, които са $3.18 \pm 0.27 / 1.2 \text{ мм}^2$ $t = -0.04$; $p = 0.97$.

Средният брой на лимфно-ендотелни клетки, заграждащи лумена на един лимфен съд при пери-туморните лимфни съдове е $7.34 \pm 0.63 / 1.2 \text{ мм}^2$, което е значително по-високо от средния брой лимфно-ендотелни клетки, заграждащи лумена на лимфните съдове от нормалния мамарен паренхим, които са съответно $3.18 \pm 0.27 / 1.2 \text{ мм}^2$ $t = -12.03$; $p < 0.0001$.

Не се установи връзка на CD 68 позитивни клетки с лимфни съдовете в нормалния мамарен паренхим. При изследването на наличието и разположението на CD68 позитивни клетки, се установи наличието им както пери-туморно, така и в непосредствена връзка с морфологично променените пери-туморни лимфни съдове. При подробен оглед, се откриха CD 68 позитивни клетки, прикрепени към ендотелната повърхност на пери-туморните лимфни капиляри. Според нашите наблюдения, почти във всички случаи, наличието на подобна адхезия на CD 68 позитивни клетки, се съпътства от перивазално струпване на лимфоцити. При осем от проучените случаи в съдове се установи наличието на средно големи по размер, силно позитивни CD 68 клетки, както и на ендотелоподобни CD 68 позитивни клетки свързани с ендотела на пери-туморните съдове (Фиг. 27). Установи се че, последните два „типа“ CD 68 позитивни клетки са позитивни и за лимфоендотелния маркер D2-40.



Фиг. 27 Потенциални фази от моноцитна трансдиференциация

А) Дилатиран лимфен съд, съдържащ туморен ембол. Сред туморните клетки се откриват CD 68 позитивни клетки. CD 68, оригинално увеличение x400; Б, В) Лимфни съдове, съдържащи туморни емболи в лумена, на които се откриват CD 68 позитивни клетки (означени със стрелки), които са свързани със съдовия ендотел. От външната страна на тези съдове се открива струпване на лимфоцити. CD 68, оригинално увеличение x400; Г) Участък, съответен на фотография Д, изработен върху непосредствено последователен срез. Означената на фотография Д клетка е D2-40 позитивна. D2-40, оригинално увеличение x400; Д) Относително малка по размер, окръглена клетка, свързана с лимфно-съдовия ендотел, силно позитивна за CD 68 (означена със стрелка); CD 68, оригинално увеличение x400; Е) Дилатиран лимфен съд, съдържащ туморен ембол. Една от ендотелните клетки на съда (означена със стрелка) е CD 68 позитивна. CD 68, оригинално увеличение x400; Ж) Участък съответен на фотография Е, изработен върху непосредствено последователен срез. Същата клетка е позитивна за D2-40. D2-40, оригинално увеличение x400.

4.4. Проучване на морфометричните показатели (ЛСП; СЛСП и ОЛСП) за ЛС васкуларизация при карциномите на гърдата и тяхната връзка с ЛСИ и статуса на аксиларните лимфни възли

От изследваните 130 случая, оценка на лимфно-съдовата инвазия и лимфно-съдовата васкуларизация при карциномите на гърдата е осъществена при 111 (85.38%) от случаите, при които се откриха свързани с тумора лимфни съдове (пери- и интра-туморни лимфни съдове). При останалите 19 (14.26%), не се откриха лимфни съдове и статуса на съдова инвазия и лимфно-съдовата васкуларизация се прие за неясен.

Аксиларният статус е определен като позитивен при 60 (46.15%), като негативен при 49 (37,69%), а при останалите 21 (16.15%) случаи той е неизяснен (Nx). Съдовата инвазия (интра- и пери-туморна) е позитивна при

24 (21.62%) случая и негативна при 87 (78.38%) случая (установена върху D2-40/p63 имунооцветени препарати) .

Установиха се сигнификантни разлики между стойностите на лимфно-съдовата васкуларизация интра- и пери-туморно (Табл. 10).

Табл.10. Разлики между медианните стойности на лимфно-съдовата васкуларизация, отчетена като лимфно-съдова плътност (ЛСПл); относителна лимфно-съдова площ (ОЛСПц) и средна лимфно-съдова площ (СЛСПц) интра- и пери-туморно.

	интра-туморна	пери-туморна	интра-туморна	пери-туморна	интра-туморна	пери-туморна
	ЛСПл	ЛСПл	ОЛСПц	ОЛСПц	СЛСПц μm^2	СЛСПц μm^2
	n=111	n=111	n=111	n=111	n=44	n=44
МЕ (от- до)	0 (0-15)	6 (0-40)	0 (0 – 0.0804)	0.004385 (0-0.1022)	348.27 (54.84 – 14359.17)	754.43 (173.70–13035.88)
Mann-Whitney	W=-8.654071, p<0.0001		W= -8.626903, p<0.0001		W=-2.582876, p=0.0098	

Изследването на лимфно-съдовата васкуларизация в зависимост от биологичния тип на тумора, демонстрира сигнификантно повишена лимфоваскуларизация измерена като медианна ЛСПл интра-туморно при HER2 туморите на гърдата спрямо останалите типове (Луминален А, Луминален Б и ТНТ). Лимфно-съдовата васкуларизация измерена като медианна ЛСПл пери-туморно, както и измерена като медианна относителна ЛСПл пери-туморно и интра-туморно и медианна средна лимфно-съдова площ пери- и интра-туморно не се различават значимо при отделните молекулни типове рак на гърдата Табл. 11А и 11Б.

Табл. 11А) Сравняване на лимфно-съдовата васкуларизация при отделните молекулни типове рак на гърдата (като цяло)

		интра-туморна		пери-туморна		
	n	ЛСПл Ме (от-до)	К-W	n	ЛСПл Ме (от-до)	К-W
ЛумА	49	0.0 (0.0-13.0)	К-W =9.84641; p=0.0199171	49	5.0 (0.0-25.0)	К-W =3.954; p=0.266448
ЛумБ	11	1.0 (0.0-10.0)		11	5.0 (0.0-16.0)	
HER2	8	6.0 (0.0-15.0)		8	11.5 (0.0-40.0)	
ТНТ	9	0.0 (0.0-5.0)		9	6.0 (1.0-19.0)	
		интра-туморна		пери-туморна		
	n	ОЛСПщ Ме (от-до)	К-W	n	ОЛСПщ Ме (от-до)	К-W
ЛумА	49	0.0(0.0-0.39868)	К-W =6.38943; p=0.0941246	49	0.00392004 (0.0-0.10219)	К-W =2.49684; p=0.475859
ЛумБ	11	0.000330354(0.0-0.00382621)		11	0.00405661 (0.0-0.0601877)	
HER2	8	0.00234265(0.0-0.00754176)		8	0.00827038(0.0-0.039868)	
ТНТ	9	0.0(0.0-0.0143107)		9	0.000120544(0.000120544-0.0395735)	
		интра-туморна		пери-туморна		
	n	СЛСПщ Ме (от-до)	К-W	n	СЛСПщ Ме (от-до)	К-W
Лум А	17	456.8 (129.79-7120.04)	К-W =0.693562; p=0.874716	47	565.46 (35.43-1354.39)	К-W =2.85772; p=0.414082
Лум Б	6	422.135 (207.99-683.32)		10	698.29 (192.9 – 10748.9)	
HER2	6	366.675 (161.46-612.22)		7	739.07 (173.7-1270.42)	
ТНТ	4	834.495 (173.04 – 2555.75)		9	1354.39 (91.29-3741.58)	

11Б) Съпоставяне на лимфоваскуларизацията при отделните молекулни типове РГ, в групите при които се установиха статистически значими разлики или тенденция за такива.

Сравняван параметър	Сравнявани типове	Резултат (Mann-Whitney тест)	Значимост
ЛСПл интра- туморна	Лум. А и Лум. Б	W=313.0; p=0.3473	(НС)
	Луминален А и HER2	W=313.5; p=0.0024	*
	Луминален А и ТНТ	W=252.5; p=0.4312	(НС)
	Луминален Б и HER2	W=65.5; p=0.0746	(НС)
	Луминален Б и ТНТ	W=51.0; p=0.9350	(НС)
	HER2 и ТНТ	W=56.5; p=0.0457	*
ОЛСПщ интра- туморна	Луминален А и Луминален Б	W=310.0; p=0.3825	(НС)
	Луминален А и HER2	W=292.0; p=0.0134	*
	Луминален А и ТНТ	W=250.0; p=0.4692	(НС)
	Луминален Б и HER2	W=64.0; p=0.0987	(НС)
	Луминален Б и ТНТ	W= 50.5; p=0.9676	(НС)
	HER2 и ТНТ	W=27.0; p=0.3967	(НС)

НС – несигнификантна разлика; * - сигнификантна разлика

Не се установяват значими разлики по отношение на лимфогенното метастазиране в аксиларните лимфни възли между отделните биологични типове карциноми на гърдата $\chi^2 = 1.21$; Df=3; P=0.7508; n=77 (Табл. 12)

Табл. 12 Наличие на лимфогенното метастазиране в аксиларните лимфни възли при отделните биологични типове карциноми на гърдата.

	N (негативен)	N (позитивен)
Луминален А	20 (25.97%)	28 (36.36%)
Луминален Б	4 (5.19%)	5 (6.49%)
HER2	4 (5.19%)	6 (7.79%)
ТНТ	6 (7.79%)	4 (5.19%)

Изследването на отношението на лимфно-съдовата васкуларизация, отчетена като медианни: лимфно-съдова плътност; относителна лимфно-съдова площ и средна лимфно-съдова площ интра- и пери-туморно, към наличието на лимфно-съдова инвазия, както и към аксиларния статус , разкри някои статистически значими зависимости (табл. 13).

Табл.13 Отношение на лимфно-съдовата васкуларизация към наличието на лимфно-съдова инвазия и аксиларния статус.

	n	интра-туморна ЛСПл Ме (от-до)	K-W	n	пери-туморна ЛСПл Ме (от-до)	K-W
N (-)	46	0.00 (0.00-11)	K-W =5.488,p=0 .019	46	5.5 (0.00-40)	K-W =0.489, p=0.484
N (+)	52	1 (0.00-15)		52	6.5(0.00-28)	
ЛСИ (-)	87	0.00 (0.00-15)	K-W =9.08532, p=0.003	87	5.0 (0.00- 40)	K-W =6.66659, p=0.0098
ЛСИ (+)	24	2 (0.00-6)		24	8.5 (0.00-23)	
	n	интра-туморна ОЛСПщ Ме (от-до)	K-W	n	пери-туморна ОЛСПщ Ме (от-до)	K-W
N (-)	46	0.00(0.00- 0.0804)	K-W =4.309, p=0.038	46	0.0038(0.00-0.0396)	K-W =0.259, p=0.611
N (+)	52	0.0003(0.00-0.0451)		52	0.0047(0.00-0.1022)	
ЛСИ (-)	87	0.00 (0.00-0.0804)	K-W = 10.6586, p=0.001	87	0.0031(0.00-0.1022)	K-W =12.3461 p=0.0004
ЛСИ (+)	24	0.0009(0.00-0.0399)		24	0.0101(0.00-0.0602)	
	n	интра-туморна СЛСПщ Ме (от-до)	K-W	n	пери-туморна СЛСПщ Ме (от-до)	K-W
N (-)	14	396.98 (127.34 – 14359.20)	K-W =0.120, p=0.729	45	465.54 (89.93-3976.79)	K-W =0.449, p=0.503
N (+)	28	442.32 (54.84-8047.40)		49	650.96 (35.43-13035.90)	
ЛСИ(-)	30	387.865 (54.84-14359.20)	K-W =0.435828, p=0.509	84	523.65(35.43-13035.90)	K-W = 5.92598, p=0.015
ЛСИ(+)	18	441.125 (129.79-7120.04)		23	1125.51(173.70-10748.90)	

Не се установиха статистически значими разлики в лимфно-съдовата васкуларизация изразена като медианна ЛСП при растящите инфилтративно и експанзивно тумори (Табл.14).

Табл. 14 А) Сравняване на лимфно-съдовата васкуларизация изразена като ЛСП при растящите инфилтративно и експанзивно тумори интра-туморно; Б) сравняване на лимфно-съдовата васкуларизация изразена като ЛСП при растящите инфилтративно и експанзивно тумори перитуморно.

	А			Б		
	п	ЛСП интра-туморно Ме(от-до)		п	ЛСП перитуморно Ме(от-до)	
Тумори с инфилтративен растеж	106	0 (0-15.0)	K-W = 1.74899 ; p=0.186001	106	5.5 (0-40)	K-W = 0.0939372 ; p=0.75923
Тумори с експанзивен растеж	5	0 (0-1.0)		5	6.0 (2-18)	

4.5. Проучване на ЛСИ, изследване и оптимизиране на нивата на точност при използването на ЛСИ като предиктор на аксиларния статус и изследване на влиянието на ЛСИ и аксиларния статус, върху 5-годишната преживяемостт при стандартно лекувани пациенти с инвазивен РГ.

Пери- и интра-туморна лимфно- съдовата инвазия определена на оцветени с ХЕ срези се откри при 30/130 (23.08%), като при 25/130 (20%) случая се откриха само туморни емболи около туморите (перитуморно), в 1 от случаите туморни емболи се откриха перитуморно и интра-туморно, а в 4 случаи се откриха туморни емболи интра-туморно.

Пери- и интра-туморна лимфно-съдовата инвазия, определена върху D2-40/p63 оцветени срези, се откри при 24/111* (21.62%) като в 4/111 (3.60%) случаи се откриха емболи в интра-туморни лимфни съдове, в 1/111 (0.90%) случаи се откри ЛСИ пери- и интра-туморно, а в 19/111 (17.12%) случаи се откри ЛСИ само пери-туморно. *-19 случая са преценени като неинтерпретируеми, поради липсата на позитивирани за D2-40/p63 съдове.

При съпоставянето на определената върху оцветени с ХЕ срези тумор свързана съдова инвазия пери- и интра-туморно с тази установена върху D2-40/p63 оцветени срези се установи наличие на умерено силна конкордантност между двата метода ($\kappa = 0.464$). При 73 (65.77%) от случаите, неоткриването на лимфно-съдови емболи върху ХЕ оцветени срези пери- и интра-туморно, се потвърди при оценката на имунооцветени с D2-40/p63 срези. При 14 (12.61%) от случаите, при които се заподозря наличието на лимфно-съдова инвазия, последната не се потвърди посредством ИХХ. При 8 (7.21%) от случаите, при които лимфно-съдовата инвазия е преценена като липсваща на ХЕ оцветени срези, се установи наличие на лимфно-съдова инвазия посредством D2-40/p63 оцветяването. При 16 (14.41%) от случаите ЛСИ разпозната върху ХЕ оцветени срези се потвърди при селективното имунооцветяване с D2-40/p63.

При интра-туморните лимфни съдове се установи наличие на конкордантност по-лоша от произволния шанс между двата метода ($\kappa = 0.0472$), като 101 (90.10%) от случаите неоткриването на лимфно-съдови емболи върху ХЕ оцветени срези се потвърди при оценката на имунооцветени с D2-40/p63 срези. При 5 (4.50%) от случаите, при които се заподозря наличието на лимфно-съдова инвазия, последната не се потвърди посредством имунохистохимично изследване. При 5 (4.50%) от случаите, при които лимфно-съдовата инвазия е преценена като липсваща на ХЕ оцветени срези, се установи наличие на лимфно-съдова инвазия.

При нито един (0.00%) от случаите ЛСИ разпозната върху ХЕ оцветени срези не се потвърди при селективното имунооцветяване с D2-40/p63.

При перит-уморните лимфни съдове се установи добра конкордантност между двата метода ($\kappa=0.618$), като в 81 (72.98%) от случаите, неоткриването на лимфно-съдови емболи върху ХЕ оцветени срези, се потвърди при оценката на имунооцветени с D2-40/p63 срези. При 10 (9.01%) от случаите, при които се заподозря наличието на лимфно-съдова инвазия, последната не се потвърди посредством имунохистохимично изследване. При 4 (3.60%) от случаите, при които лимфно-съдовата инвазия е преценена като липсваща на ХЕ оцветени срези се установи наличие на лимфно-съдова инвазия след оцветяване с D2-40/ p63. При 16 (14.41%) от случаите ЛСИ разпозната върху ХЕ оцветени срези се потвърди при селективното имунооцветяване с D2-40/p63.

Установи се , че аксиларният статус корелира статистически значимо с лимфно-съдовата инвазия интра- и пери-туморно, оценена върху D2-40/p63 оцветени срези, като в 41 (41.84%) от изследваните случаи се установи, че негативният аксиларен статус кореспондира с отсъствие на лимфно-съдова инвазия. В 5 (5.10%) се откри лимфно-съдова инвазия на фона на негативна аксила и при 35 (35.71%) случая не се откри лимфно-съдова инвазия, при позитивен аксиларен статус, а при 17 (17.35%) случая наличието на туморни метастази в аксиларните възли кореспондира с наличието на лимфно-съдова инвазия ($\chi^2 = 5.48$; $p=0.019$; $n=98$).

Определянето аксиларния ататус на базата на ЛСИ като цяло (пери- и интра-туморно) оценена върху D2-40/p63 оцветени срези при РГ е метод който притежава 89.13% специфичност, 32.69% чувствителност, 77.27% позитивна предсказваща стойност, 53.95% негативна предсказваща стойност и точност - 59.18 %.

Установи се, че ЛСИ оценена върху D2-40/p63 оцветени срези при тумори с прилежаща перитуморна тъкан <3мм не корелира с аксиларния статус, докато ЛСИ оценена при тумори с прилежаща перитуморна тъкан >3мм корелира сигнификантно с аксиларния статус (Табл. 15), и притежава по-висока точност като предиктор на аксилата, спрямо групата, при която размерът на перитуморната тъкан е под 3мм (Табл.16)

Табл.15 Корелация на ЛСИ оценена върху D2-40/p63 оцветени срези с аксиларния статус при тумори с прилежаща перитуморна тъкан (ПТ) по-малко от 3мм и повече от 3мм

	N(-) ПТ под 3мм	N(+ПТ под 3мм	N (-) ПТ над 3мм	N(+ПТ над 3мм
ЛСИ (-)	16 (35.56%)	24(53.33%)	25 (47.17%)	11 (20.75%)
ЛСИ (+)	2(4.44%)	3(6.67%)	3 (5.66%)	14 (26.42%)

$\chi^2=0.00$; Df=1; p=1.00; n= 45

$\chi^2=10.44$; Df=1; p=0.0012; n= 53

Табл. 16 Специфичност, чувствителност, позитивна предсказваща стойност, негативна предсказваща стойност и точност при предсказването на аксиларния статус при РГ въз основа на ЛСИ оценена върху D2-40/p63 оцветени срези при тумори с прилежаща перитуморна тъкан по-малко от 3мм и по-вече от 3мм.

	специфичност	Чувствителност	ППС	НПС	точност
<3мм	88.88%	11.11%	60.00%	40.00%	42.22%
>3мм	89.29%	56.00%	82.35%	69.44%	73.58%

ППС- позитивна предсказваща стойност; НПС – негативна предсказваща стойност

Наличието на хистологично откриваема на базата на имунооцветяване ЛСИ не корелира с резултатите от сентинелна биопсия на гърдата Табл. 17.

Табл.17 Корелация на ЛСИ с резултатите от сентинелна биопсия на гърдата

	Стражеви възел свободен от метастази	Стражеви възел ангажиран от метастази
ЛСИ (-)	21(48.84%)	11(35.58%)
ЛСИ (+)	7(16.28%)	4(9.30%)

$\chi^2=0.00$; Df =1; p = 1.00; n=43

При 34/80 (42.50%) от случаите на инвазивен дуктален карцином на гърдата се установиха несъвпадения между аксиларния статус и статуса на лимфно-съдовата инвазия, докато при 46/80 (57.50%) се установиха съвпадения (без да се взема под внимание количеството на изследваните пери-туморни тъкани). При лобуларните карциноми на гърдата и при смесените карциноми съдържащи дуктална и лобуларна компонента, се установиха несъвпадения при 6/12 (50.00%) от случаите, като само при два от деветте случая (22.23%) с позитивен аксиларен статус се откриха единични туморни клетки в лимфни съдове (след имунохистохимично изследване с D2-40/p63). За сравнение при 17 от 44 (38.64%) инвазивни дуктални карцинома с метастази в аксиларните лимфни възли се откри лимфно-съдова инвазия. При останалите хистологични типове, подобно на инвазивните дуктални карциноми на гърдата преобладават случаите на съвпадение между лимфно-съдовата инвазия и аксиларния статус - в случая липса на туморни метастази в аксиларните лимфни възли и негативна лимфно-съдова инвазия).

Средната стойност на проследяване на настоящата група пациенти е 45.59 месеца (от 3 до 60 месеца). От проследяваните пациенти живи са 78, 37 са починали, а 15 са отпаднали от проследяването.

Установи се, че средната възраст на 37^{-те} екзитирани пациенти с РГ е 65.50 +/- 10.73 (от 44 до 82 години), която е статистически значимо по-висока от средната възраст на 78^{-те} пациенти с РГ, преживяли изследвания времеви интервал - 60.47 +/- 11.61 (от 30 до 81) $F = 4.87$; $p = 0.0294$.

Допуска се, поне за част от по-възрастните пациенти, рака на гърдата с неговите усложнения да не се явяват непосредствена причина за настъпилата смърт. Не бива да се забравя, че причината за смъртта при голяма част от починалите от тази група пациенти (починали в домовете си, онкологично болни пациенти с морфологично верифициран карцином) не е установена с обдукция. С оглед на това паралелно с разликите в приживяемостта ще бъде тествана и сравнена и възрастовата структура на пациентите от отделните сравнявани групи.

Установи се статистически значимо влияние на аксиларния статус, но не и на наличието и липсата на ЛСИ, върху 5-годишната преживяемост при стандартно лекувани пациенти с ПГ (Табл. 18).

Табл. 18 Сравняване на преживяемостта при пациенти с негативен и пациенти с позитивен аксиларен статус и пациенти с наличие на ЛСИ и пациенти без ЛСИ посредством (Logrank test)

	n	χ^2	Df	p	HR	CI 95%
Сравняване на N0 пациенти с пациентки с позитивен аксиларен статус	97	4.0554	1	0.0440	2.3221	1.1121 до 4.8489
Сравняване на пациенти с ЛСИ и пациенти при които не е открита ЛСИ	97	0.2399	1	0.6243	1.2220	0.5217 до 2.8625

С оглед да се избегнат грешки в интерпретацията на преживяемостта породени от сериозни възрастови разлики между групата на живите и починалите пациенти, изследваните групи се съпоставиха по възраст.

Липсва статистически значима разлика във възрастта на пациентите с N0 статус при които е оценена преживяемостта - 62.46 ± 9.95 (от 42 до 82) години $n=41$ и пациентите с позитивен аксиларен статус $n=59$ - 62.58 ± 12.03 (от 30 до 81) години; $F=0.00$; $p=0.9607$;

Липсва статистически значима разлика във възрастта на пациентите без ЛСИ при които е оценена преживяемостта (макар, че се набелязва тенденция пациентките с негативна ЛСИ да са по-възрастни) - $n=77$ средно 63.94 ± 11.20 (от 30 до 82) години сравнено с пациентите с позитивна ЛСИ $n=23$ средно 58.91 ± 12.04 (от 38 до 82 години) $F=3.44$; $p=0.0667$.

ГЛАВА V

Дискусия и практически препоръки

Дискусия по задача 1.1- оценка на приложимостта на D2-40 като ЛЕ маркер в контекста на нормалната и засегнатата от туморен растеж гърда, както и определяне степента на пространствено ориентиране при лимфните съдове на гърдата.

Първият съществен проблем за решаване, при изследването на лимфните съдове на гърдата в контекста на туморен растеж, се явява избора на специфичен лимфноендотелен маркер за тази локализация, както и оптимизиране на протокола за имунооцветяване в контекста на нормалната морфология и туморния растеж. За целите на настоящето проучване се избра антиподопланиновото анти-тяло D2-40.

Нашето проучване установи известна закономерност в подреждането на лимфните съдове в мамарния паренхим. Непроизволното разпределение на пространствената организация на лимфните съдове сред мамарния паренхим налага използването на унифициран подход при избора на срезна равнина при хистологични материали от гърда. С оглед избягването на грешки, породени от срезната равнина, от която е изготвен хистологичния препарат е добре да се избират или само предимно перпендикулярни на надлъжната ос на по-големите канали хистологични срези или само предимно успоредни на надлъжната ос на по-големите канали.

Потвърждават се досегашните наблюдения за експресията на D2-40 в мамарните тъкани в норма и свързани с туморен растеж. Съгласно данните от публикуваните в периодичните издания проучвания, D2-40 е един от най-често използваните и най-удачните маркери за визуализиране на лимфните съдове в нормални и патологично променени лимфни съдове.

Морфологичните характеристики на миоепителните клетки и тяхното разположение в нормалните мамарни тъкани не предполага

възникването на затруднения при отличаването им от ендотелните клетки на лимфните съдове.

Нашето проучване потвърди възможността за погрешна интерпретация на D2-40 позитивността при наличие на солиден тип на дукталния карцином ин-ситу, както и лобуларния карцином ин-ситу. Установи се, че използването на допълнителен цитоплазмен миоепителен маркер като α - SMA (предложен от някои автори) на последователни срези, не подобрява интерпретационните възможности спрямо D2-40. Причината е позитивността на гладкомускулните клетки на преколекторните и колекторните лимфни съдове за α - SMA. Съгласно настоящите наблюдения, използването на p63 (ядрен миоепителен маркер) е за предпочитане при трудна за интерпретиране D2-40 позитивност.

Решение на проблема с интерпретацията на D2-40 при гореупоменатите случаи е използването на двойно маркиране . Наблюденията от настоящето проучване показаха, че съчетаното използване на двете първични антители (D2-40 и p63) върху един препарат е възможно поради сходните технически изисквания на работните протоколи за всяко едно от тях, а различната експресия- ядрена (за p63) и цитоплазмена (за D2-40) позволява лесна интерпретация на оцветяването при използване на една визуализираща система.

Съгласно проведените изследвания, използването на паралелно оцветяване на последователни срези с D2-40 и p63, както и използването на двата маркера като коктейл (по описан от нас протокол) при оцветяването на един хистологичен препарат, подпомагат сигурното разграничаване на туморен растеж в силно деформирани дуктални и лобуларни структури от лимфно-съдова инвазия.

Съгласно настоящите резултати за 0.90% от пациентите от произволно подбрана популация, използването на D2-40/p63 протокол за

идентифициране на ЛСИ вместо използването само на D2-40 би било решаващо за последващото терапевтично поведение.

Понастоящем, наличните в литературата данни за експресията на подопланин при карциномите на гърдата са оскъдни. [Chu AY и сътр., 2005; Bassarova AV и сътр., 2006; Ordonez NG, 2005].

В специализираните научни издания по проблема се обсъжда ролята на подопланиновата експресия от туморите за типа на туморната инвазия и метастазиране [Wicki A и Christofori G, 2007; Wicki A и сътр. 2006].

Настоящото изследване не кореспондира с публикуваните данни от Wicki A [Wicki A и сътр., 2006] за ролята на подопланина при туморната клетъчна миграция. Несъответствията на фона на оскъдната информация в литературата към момента налагат допълнително изследване на проблема.

Дискусия по задача 1.2- Провека приложимостта на препоръчвания Chalkley шаблон за оценка на лимфно-съдовата васкуларизация при РГ и сравняването и с лимфно-съдовата васкуларизация отчетена посредством компютърен образен анализ.

Редом с предлагания от Weidner [Weidner N, 1995] алгоритъм за оценка на лимфоваскуларизацията като съдова плътност (брой съдове за единица площ), широко се препоръчват и метода на Chalkley за отчитане на относителната съдова площ и компютърния образен анализ, посредством който могат да се оценят редица метрични показатели, в това число диаметри, площи, относителни площи, както и интензитети на имунопозитивността.

Съгласно Lennox B [Lennox B, 1975], при относителна площ на обектите между 1% и 10% е препоръчително да се използва шаблон със

100 точки. Относителните лимфносъдови площи, установени с компютърен образен анализ и представени като процент от общата площ на изследваното поле, попадат в интервала 0.01%-10%. Това създава предпоставки за високи нива на грешка.

Емпирични данни от нашето проучване показваха, че стойностите за лимфна васкуларизация получени посредством Chalkley, при размер на точките 0.05%, както и 1.29% от размера на шаблона, са значимо свързани с действителната относителната площ, заета от лимфните съдове. Въпреки тази връзка обаче, Chalkey сборът е относително слабо информативен относно реалната лимфносъдова площ.

Съгласно настоящите резултати, се препоръчва използването на компютърния образен анализ при изчисляването на относителната лимфносъдова площ при РГ.

Дискусия по задача 1.3. – проучване на феноменът съд в съда, като потенциален източник на грешка при морфометричния анализ (оценката на съдовата плътност, обема и площта) на лимфните съдове на гърдата

Наличието на съдово-съдови комплекси с участието на лимфни съдове, подобни на тези описани от Merchant S. и сътрудници при венозни съдове в гърдата е сериозен замъгляващ фактор при оценка на съдовата площ [Merchant S и сътр., 2002]. При откритите и описани случаи на феномена съд в съда, не се касае за наличието на същинско влагане на кръвоносни съдове в лимфните съдове или кръвоносни (венозни) съдове, а по-скоро за съдово-стромални протрузии в лумена на лимфните или венозните съдове, които силно стесняват съдовия просвет.

Съдово-стромалните протрузии са изключително характерни за лимфните съдове от по-голям калибър- събирателни лимфни съдове. Ниският процент, в който са установени съдово-стромални протрузии в

лумена на лимфните съдове, вероятно се дължи на рядкото им попадане в хистологичните срези и то в напречно сечение, при което е възможно идентифицирането им.

Вероятно, артериоло-стромалните протрузии са функционални, транзиторни морфологични комплекси, характерни за състояние на относителен метаболитен покой на мамарния паренхим. При случаи на туморна емболизация и лимфостаза, лимфните съдове са окръглени и дилатирани, а описваните протрузии почти или изцяло липсват.

По всяка вероятност наблюдаваните съдово-стромални протрузии се явяват динамични (активни/пасивни) регулаторни механизми, които посредством промяната на напречното сечение на колекторните лимфни съдове осигуряват постоянно налягане на лимфата при широк диапазон физиологични и патологични състояния, свързани с повишена активност на обменните процеси в мамарния паренхим. Това постоянно налягане осигурява стабилен лимфооток и нормално циркулиране на тъканната течност в мамарния паренхим.

Не трябва да се забравя, че гърдата е лишена от контрактилни структури, които да подпомагат лимфния дренаж. Съществува вероятност съдово-съдовите комплекси, описани в това проучване, да изпълняват помпени функции. Този механизъм е подобен на помпения механизъм при който пулсациите на съседни артерии подпомагат движението на лимфата [Белова, Н., 2008], но в случая, предаването на импулса би било значително по-ефективно, тъй като целия артериален съд е вложен в лимфния съд.

Феномена „съд в съда” трябва да се има в предвид при извършването на количествена хисто-морфологична оценка на лимфната система. Смятаме, че лимфният дренаж на гърдата е уместно да се изследва по-скоро функционално, от колкото хистологично.

Не бива да се изключва окончателно и възможността наблюдавания феномен да е артефициален в девитализираните мамарни тъкани.

Дискусия по задача 2- проучване на пре-лимфатичната система на гърдата в норма и в контекста на карциномен растеж.

Понастоящем, описаните наблюдения, потвърждават наличието на прелимфатична система в гърдата [Asioli S и сътр., 2008] и редуцирането ѝ при наличието на инвазивни карциноми [Barth PJ и сътр. 2002; Иванов И и сътр. 2008; Kuroda N и сътр., 2005], като демонстрират за пръв път, наличието на динамика в морфологията ѝ в зависимост от менструалния статус.

За лимфния дренаж на тумора вероятно имат съществено значение непосредствено перитуморно разположените лимфни капилляри, които са локализирани сред интактна строма и вероятно притежават запазена функционалност (захванати за стромата анкерни филаменти). Твърде вероятно е туморната инвазия в лимфни съдове да се осъществява именно в тази зона.

Перитуморната зона (дренираща тумора) теоретично се явява най-удачна за депониране на лимфотропни маркери при извършване на сентинелна биопсия. Обосновката на това твърдение е следната: инжектирането на лимфотропен маркер интратуморно ще е със значително забавен период на пренос (проста дифузия), която вероятно изисква допълнително време и удължава времето на процедурата.

Възрастовите промени в гърдата (загуба на пре-лимфатични структури и редуциране на лимфно-съдовия брой за единица площ), съчетани с рак, водят до силно нарушение на структурите осигуряващи лимфен дренаж, което би обяснило наблюденията на някои автори, че сентинелната биопсия може да се окаже несполучлива в по-голям процент при възрастни жени [обобщено в Filippakis GM и Zografos G, 2007]. При своето проучване върху серия от 202 аутопсионни случаи на лимфогенното метастазира при РГ Степанов установява, че лимфогенното метастазиране

се наблюдава в 83% от случаите (в 100% от случаите до 40 годишна възраст, в 80.8% от случаите на пациенти между 40 и 70 годишна възраст и в 25% при пациентите над 70 годишна възраст [Степанов В, 1985]).

Изложените данни подкрепят идеята за възрастова атрофия, водеща до значително редуциране на лимфа-дрениращия апарат на гърдата, неговия потенциал и евентуално достъпа на туморни клетки до лимфни съдове и осъществяване на лимфогенно метастазиране.

Дискусия по задача 3- проучване на наличието на тумор-асоциирана лимфангиогенеза при РГ и вероятните механизми, по които тя се реализира.

Съгласно данните от настоящето проучване, изключването на „фалшива” лимфно-ендотелна пролиферация (породена от Т-клетъчна адхезия към лимфносъдовите стени) изисква оценяването на последната да се извършва съгласувано с непосредствено-последователни хистологични препарати оцветени за CD3и CD20 или един препарат с маркиране за поне три маркера- D2-40, Ki-67 и CD3. Статистически незначимата разлика между лимфноендотелната пролиферация, наблюдавана в нетуморен, незасегнат от пролиферативни лезии мамарен паренхим и при РГ е в подкрепа на тезата за липса на активна лимфно-ендотелна пролиферация при РГ [van der Schaft D и сътр., 2007; Vleugel M и сътр., 2004; Williams C и сътр., 2003].

Съгласно прегледа на повечето достъпни литературни източници, това е първото проучване, което дискутира възможността за грешка при отчитането на лимфно-ендотелната пролиферация посредством Ki-67 породена от наличието на активирани (Ki-67 позитивни) Т-лимфоцити прикрепени към стената на лимфните съдове.

Липсата на връзка на броя на активираните лимфоцити с аксиларния статус предполага ограничената му роля за лимфогенното метастазиране на изследваните тумори. Твърде вероятно е клетъчният имунен отговор да

изпълнява важна роля за туморната прогресия, както отбелязва de Nardo D [de Nardo D и Coussens L, 2007], но оценката му вероятно изисква подробен и цялостен подход.

Интра-туморните лимфни съдове наблюдавани при РГ, по своята същност, са съдове от нормалния мамарен паренхим, прорастнати от тумора. В подкрепа на това, е липсата на значима разлика между броя лимфно-ендотелните клетки, средно заграждащи лумена на интра-туморен лимфен съд и тези на лимфните съдове от нормалния мамарен паренхим. Сигнификантно понижената интра-туморна лимфно-съдова плътност спрямо перитуморна лимфно-съдова, кореспондира с наличието на дезинтеграция и разширяване на нормалните структури, прорастнати от интензивно нарастващия тумор. В литературата се обсъждат произхода и дефиницията на перитуморните лимфни съдове. Според едни автори, те са дилатирани лимфни съдове, принадлежащи на нормалния мамарен перитуморен паренхим [Vleugel MM и сътр., 2004; Williams CS и сътр., 2003]. Други автори смятат, че лимфните съдове възникват посредством активна лимфангиогенеза [van den Eynden GG и сътр., 2006; Cunnick GH и сътр., 2008]. Данните в литературата за наличието на лимфна ендотелна пролиферация сред тумор-свързаните лимфни съдове при РГ са противоречиви [van der Auwera I Research и сътр., 2004; Karpanen T и сътр., 2001; Van der Auwera I и сътр., 2005; van der Schaft D и сътр., 2007; Vleugel MM и сътр., 2004; Williams C и сътр., 2003]. Същевременно обаче е известно, че РГ е съпътстван от обособяването на морфологично променени (дилатирани) перитуморни лимфни съдове [Padera TP и сътр., 2002; Leu AJ и сътр., 2000]. Няма ясно становище, какви са механизмите и морфологията, стоящи зад перитуморната лимфно-съдова дилатация при РГ.

В същото време обаче, отсъствието на активна лимфно-ендотелна пролиферация, не е в състояние да обясни, сигнификантно повишения брой лимфно-ендотелни клетки, тапициращи лумена на „дилатираните“ перитуморни лимфни съдове.

Уместно е да се отбележи, че оценяваните лимфни съдове, както в нормалната, така и в перитуморната тъкан, е извършвано само сред съдове, морфологично отговарящи на капилярни и преколекторни лимфни съдове, при еднаква ориентация на срезната повърхност спрямо дългата ос на мамарните канали.

Използването на антитяло срещу CD 68 се продиктува от факта, че настоящият е относително специфичен маркер за моноцити и макрофаги. Поради данните за неспецифична реактивност спрямо фибробласти от нормална и засегнатата от тумор мамарна строма, както и към туморни клетки [Kunz-Schughart LA и сътр. 2003], в настоящето изложение, се използва термина CD 68 позитивни клетки. Нашите наблюдения показаха връзката на дилатираните перитуморни лимфни съдове с наличието на повишен брой CD 68 позитивни клетки (най-вероятно моноцити). Последните отсъстват сред лимфните съдове от нормалния мамарен паренхим. Този факт подкрепя идеята, че макрофагите имат отношение към процеса на туморна лимфангиогенеза [Keřjaschki D, 2005].

Дискусия по задача 4- проучане на морфометричните показатели (ЛСПл; СЛСПц и ОЛСПц) за ЛС васкуларизация при карциномите на гърдата и тяхната връзка с ЛСИ и статуса на аксиларните лимфни възли.

Настоящите резултати потвърждават общоприетото схващане, че карциномите на гърдата притежават значително редуцирана лимфно-съдова мрежа, спрямо перитуморните зони и нормалните мамарни тъкани [Vleugel MM и сътр., 2004]. Описанието на интратуморните лимфни съдове като приплеснати и малко на брой, разположени предимно в периферните зони на тумора, се подкрепя от значимо по-ниските стойности за лимфно-съдова плътност и относителна площ на лимфните съдове, разположени интратуморно, спрямо перитуморните лимфни съдове, наблюдавани в

настоящото проучване. Сходни данни за разлики между интра и перитуморна ЛСПл посочват и други автори [Van der Auwera I и сътр., 2005; El-Gohary YM и сътр., 2008].

Установената в нашето проучване повишена ЛСП интратуморно при HER2 свръхекспресиращите карциноми на гърдата спрямо останалите биологични типове, кореспондира с данните в литературата за връзка между HER2 и експресията на VEGF [Kumar R и Yarmand-Bagheri R., 2001; Koukourakis MI и сътр., 2003; Russell KS и сътр., 1999], както и за лимфангиогенеза, обусловена от HER2 индуцирана, повишена експресия на VEGF-C [Zhang GH и сътр. 2007]. Липсата на лимфоендотелна пролиферация в нашите проучвания (глава 4.3) не изключва напълно възможността за наличието на такава. Обичайно прото-онкогена HER2/неу или кодирания от него протеинов рецептор HER2 са амплифицирани/ свръхекспресирани в до 25–30% от всички карциноми на гърдата [Estévez LG и Seidman AD, 2003]. Твърде вероятно е наличието на лимфоендотелна пролиферация при тях да се „изгубва” при статистическия анализ на HER2 свръхекспресиращите тумори в една група с останалите карциноми и сравняването им с нормален мамарен паренхим.

Въпреки повишените показатели на вътретуморна лимфоваскуларизация, лимфогенното метастазиране, отчетено като състояние на аксиларния статус (метастази в аксиларни лимфни възли) не е повишено при HER2 свръхекспресиращите карциноми спрямо останалите молекулни типове, изследвани посредством имунохистохимия. Това свидетелства за невъзможността на евентуално новосформираните съдове при HER2 свръхекспресиращите карциноми да обезпечат лимфогенно метастазиране, вероятно поради функционална незрялост.

Нашето проучване потвърди наблюденията, че лимфно-съдовата плътност интратуморно е свързана с аксиларния статус при карциномите на гърдата [El-Gohary YM, 2008; Ran S и сътр., 2010]. Освен това съгласно настоящето

проучване относителната лимфно-съдова площ вътретуморно, показва статистически значима връзка с аксиларния статус. Реално тази разлика се изразява в това, че наличието на дори един лимфен съд вътретуморно е сигнификантно свързано с по-често засягане на аксиларните лимфни възли, спрямо карциномите на гърдата, при които лимфни съдове не се откриват вътретуморно.

Средната площ на лимфните съдове, инфилтрирани от тумора, както и средната площ на лимфните съдове около тумора не са определящи за лимфогенното дисеминиране на мамарните карциноми в аксиларните лимфни възли.

Лимфносъдовата плътност и относителната лимфно-съдова площ не са свързани статистически значимо с аксиларния статус при РГ. Липсата на статистически значима връзка между перитуморната лимфносъдова плътност и аксиларния статус противоречи на данните на [El-Gohary YM и сътр., 2008], както и на данните от проучването на [Kandemir NO и сътр., 2011].

Настоящото проучване потвърждава ролята на повишената вътретуморна лимфно-съдова плътност за възникването на ЛСИ при рака на гърдата [El-Gohary YM и сътр., 2008], както и ролята на повишената перитуморна лимфно-съдова плътност за наличието на лимфно-съдова инвазия [Kandemir NO и сътр., 2011]. Практически в този случай, интра- и перитуморните лимфни съдове се разделят от инвазивния фронт на тумора. Това е мястото, където възниква ЛСИ и е логично тя да е функция и на двете категории лимфна васкуларизация. Аксиларният статус е функция предимно на интра-туморната лимфо-васкуларизация, поради факта, че колонизирането на аксиларните възли от туморите изисква време, в което достигнатите перитуморни ЛС, с възникнала ЛСИ в тях, ще са станали интра-туморни.

Въпреки описаните статистически значими зависимости и тенденции на лимфогенното метастазиране спрямо лимфно-съдовата васкуларизация,

съществуват отделни тумори с наличие на вътретуморни лимфни съдове, които не са реализирали лимфогенна дисеминация. Това предполага и потвърждава схващането, че лимфогенното дисеминиране е сложен процес обусловен от наличието на лимфни съдове и сложна система от химически стимули [Muller A и сътр. 2001; Mashino K, и сътр. 2002].

Дискусия по задача 5- проучване на ЛСИ, изследване и оптимизиране нивата на точност при използването на ЛСИ като предиктор на аксиларния статус и изследване на влиянието на ЛСИ и аксиларния статус, върху 5 годишната преживяемостт при индивидуализирано стандартно лекувани пациенти с инвазивен РГ.

Съществуват отклонения при определянето на лимфно-съдовата инвазия върху ХЕ спрямо определените върху имунооцветени с D2-40/p63 срези. Като цяло, съгласуваността между резултатите отчетени върху ХЕ и върху D2-40/p63 при интра- и перитуморната ЛСИ е умерено силна.

Разгледани по отделно интра- и перитуморната ЛСИ се характеризират с различна степен на съгласуваност. Докато перитуморно, се установи добра съгласуваност между резултатите, отчетени върху ХЕ и върху D2-40/p63, то при интратуморната ЛСИ резултатите са по-лоши от произволния шанс.

Липсата на пълно припокриване между резултатите постигнати при отчитането на ЛСИ върху ХЕ и D2-40/p63 оцветени срези вероятно се обуславя частично от изчерпването на тъканта, съдържаща ЛСИ при подравняването на срезната повърхност на парафиновото блокче (стъпка от процеса на рязане).

В ежедневната практиката би било уместно, перитуморната инвазия да се отчита директно върху ХЕ оцветени срези, когато последната е налична, поради добрата конкордантност, която се постига. Ако ЛСИ

инвазия не се установи или последната е несигурна е уместно материалите да се ретестват с ИХХ маркери.

В произволно подбрана група от рутинно биопсично изследвани карциноми на гърдата ЛСИ е относително слаб предиктор на ипсилатералния аксиларен статус. Макар и да е сигнификантно свързана с аксиларния статус, ЛСИ определена на базата на ИХХ оцветяване при предимно Т2-Т4 група тумори е слаб предиктор за аксиларния статус. Подобни резултати са постигнати от други автори, изслеващи сходна популация от тумори, независимо дали са ползвали или не лимфно-ендотелен имуномаркер [Kim LS и сътр., 1998 ; Marinho VFZ и сътр., 2008]. При разделянето на изследваните случаи на такива, при които ЛСИ е оценена в перитуморни тъкани отстоящи до 3мм от тумора и такива отстоящи на 3мм и повече от тумора, направи впечатление повишаването до 73.58% на точността на ЛСИ като предиктор на лимфогенно метастазиране към ипсилатералните аксиларни лимфни възли при случаите с перитуморни тъкани над 3 мм перитуморни тъкани. Подобни стойности на точност са постигнати от Байчев Г [Байчев Г и сътр. 1997] и Abner AL и сътр.[Abner AL и сътр. 1998], които изследват тумори до 20мм (само Т1 тумори), както и други автори [El Sheikh SM и Awad AT 2008; Gurleyik G, и сътр. 2007; Marinho VFZ, и сътр. 2008; Van den Eynden GG и сътр. 2006] които изследват предимно Т1 тумори.

Обособяването на група пациенти с позитивен статус на съдова инвазия, не свързан с разпространение в аксиларните лимфни възли, е условно възприет като фалшиво позитивен резултат за лимфогенно дисеминиране. Съгласно извършени проучвания върху 202 аутопсионни случаи на пациенти с РГ Степанов В съобщава наличие на лимфогенни метастази, засягащи най-често далечните лимфни възли– в 41.1% и регионалните лимфни възли– в 22.7 %. Съгласно автора, най–често срещани са метастазите в медиастиналните– 31.3%, следвани от аксиларните– 14.4% , като по нататък се нареждат парааорталните,

хилосните белодробни, паратрахеалните, порто-хепаталните, бифуркационно трахеалните, мезентериалните, парастерналните, ретроперитонеалните и подключичните лимфни възли [Степанов В, 1985]. Твърде вероятно е наличието на позитивна лимфно-съдова инвазия при някои случаи на РГ да е свързано с наличието на лимфогенно метастазиране към някои от посочените лимфни възли с изключение на аксилата. В подобни случаи, особено когато наличието на лимфогенни метастази би променило терапевтичния подход, би следвало да се извършат допълнителни образни изследвания за елеминиране на възможни екстрааксиларни метастази.

Данните за липсата на връзка между ЛСИ и находката при сентинелна биопсия потвърждават данните установени от Britto AV и сътр. [Britto AV и сътр. 2009]. По всяка вероятност препълнените с туморни емболи лимфни съдове, които лесно и повторно (на последващи срези) могат да бъдат открити, възпрепятстват навлизането и придвижването на лимфотропното багрило по пътя до засегнатия ЛВ. Уместно е сентинелната биопсия и ЛСИ да се използват като допълващи се методи. Съществуват известни затруднения при точното определяне на лимфно-съдовата инвазия при лобуларните карциноми на гърдата и лобуларната компонента на смесените карциноми. Настоящите наблюдения потвърждават данните дискутирани от Laser J и сътр. [Laser J и сътр., 2008], според които лимфно-съдова инвазия се наблюдава значително по рядко при инвазивните лобуларни карциноми на гърдата в сравнение с честотата с която се открива при инвазивен дуктален карцином.

Въпреки че отчетената по оптимизиран протокол ЛСИ (имунохистохимично оцветяване с D2-40/ p63) притежава добра предсказваща стойност спрямо аксиларния статус, тя няма значима предсказваща стойност спрямо пет-годишната преживяемост при индивидуализирано, стандартно лекувани пациенти. Това противоречи на

данните на Gudlaugsson и сътрудници, съгласно които ЛСИ установена посредством двойно маркиране с D2-40/p63 притежава допълнителна предсказваща стойност при случаи с високопролиферативен операбилен РГ [Gudlaugsson E и сътр., 2011].

Потвърждава се ролята на аксиларния статус, като предсказващ фактор за пет-годишната преживяемост при пациенти с РГ [de Mascarel I и сътр. 1992; Cianfrocca M и Goldstein LJ, 2004; Kuru B и сътр., 2008].

ГЛАВА VI

Изводи и заключение

Изводи: От проведените изследвания и получените резултати, както и от тяхното съпоставяне с резултатите на други съвременни автори се достигна до следните изводи:

1. Антитялото D2-40 е подходящ маркер за оценка на лимфните съдове на гърдата, поради наличието на специфична експресия за маркера от страна на лимфните ендотелни клетки, липсата на експресия от страна на ендотелните клетки на кръвоносните съдове и наличие на позитивна вътрешна контрола (миоепителни клетки). При ин-ситу карцином и засягане на терминалните дукто-лобуларни единици на гърдата от туморен растеж е уместно приложението на коктейл от D2-40/ p63 антитела за разграничаването на ЛСИ от туморен растеж в дуктални и лобуларни структури.
2. Ролята на подопланиновата експресия (позитивността за D2-40) от страна на туморните клетки и връзката ѝ с типа на туморната миграция (колективна клетъчна миграция или миграция на единични туморни клетки сред тъканите) остава неясна. Очевидно е, че подопланиновата експресия не е определяща за наличието на групова клетъчна миграция при болшинството карциноми на гърдата.
3. Трудно може да се постигнат оптимални резултати при изследването на лимфно-съдовата васкуларизация при карциномите на гърдата с

Chalkley шаблон. Препоръчваме компютърния образен анализ за оценка на лимфно-съдовата васкуларизация при рака на гърдата.

4. Феноменът “съд в съда” представлява компонент на нормалната мамарна хисто-морфология на гърдата. Описаните съдово-съдови структури представляват сериозен замъгляващ фактор при извършването на морфометрични проучвания върху лимфно-съдовата васкуларизация на гърдата. Теоритично, съдово-съдовите комплекси от типа „съд в съда“ притежават сериозен регулаторен потенциал.
5. Пре-лимфатичната система, както и лимфната система търпят инволюция след настъпване на менопауза. При карциномите на гърдата се наблюдава изчезване на пре-лимфатичната система вътретуморно и в ограничен периметър около туморите, което е по-добре изразено при експанзивно растящите тумори и значително по-слабо при инфилтративните тумори.
6. Начините на лимфоваскуларизация при най-често срещаните морфологични варианти на РГ са прорастване на тумора около съществуващи лимфни съдове от нормалните мамарни тъкани (най-чест), клетъчна трансдиференциация (притежаваща модифициращ ефект) и лимфно-ендотелната пролиферация (не може категорично да бъде отхвърлена). Необходимо е обстойно проучване на лимфо-ендотелната пролиферация при HER2 свръхекспресиращите тумори.
7. Наличието на голям брой интра-туморни лимфни съдове трябва да се вземе под внимание в случаите, когато аксиларният статус е неизвестен, а оценката на ЛСИ е затруднена. Наличието на свързани

с тумора лимфни съдове е важно, но не е единственото необходимо условие за реализиране на лимфогенно метастазиране.

8. Оптимизирането на оценяването на ЛСИ изисква последното да се извършва върху оцветени с ХЕ или D2-40/ p63 препарати от тумори съдържащи повече от 3 мм пери-туморна тъкан. При инвазивни карциноми на гърдата с размери до 20 мм, липсата на ЛСИ върху ХЕ и ИХХ оцветени срези може да се приеме като негативна ЛСИ. При инвазивни карциноми на гърдата с размери над 20мм в диаметър, липсата на ЛСИ върху ХЕ и ИХХ оцветени срези е уместно да се приема като неясен резултат.
9. Оптимизираното (спрямо аксиларния статус) определяне на ЛСИ не я прави предсказваща за 5-годишната преживяемост при РГ. Пациентите с позитивен аксиларен статус са с по-лоша прогноза за 5-годишна преживяемост.

Практическа значимост на разработката

Приноси с практично-приложен характер:

1. Създаване на адаптиран имунохистохимичен протокол базиран на две антитела и един хромоген за разграничаване на ЛСИ от дуктална или лобуларна интраепителна неоплазия.
2. Разработване на алгоритъм за прогнозиране на аксиларния статус при РГ на базата на ЛСИ с точност около 70%.
3. Изработване на модифициран Chalkley шаблон (адаптиран към микроскоп Olympus BX 40).
4. Създаване на алгоритъм за прецизно отчитане на лимфно-съдовата васкуларизация (модификация на метода на Weidner N) при РГ и създаване на бланка за нейното документиране.

Научно– теоритични приноси:

1. За пръв път в достъпната литература е описана количествено неангажирана от малигнем растеж пре-лимфатична система на гърдата в контекста на менструалния статус . Описани са промените в пре-лимфатичната система в контекста на карциномен растеж.

2. За пръв път в достъпната литература е описана лимфно-съдово-артериалната разновидност на феномена „съд в съда” в мамарния паренхим и смисъла му в контекста на дигиталния морфометричен анализ на лимфната система.
3. За пръв път в достъпната литература са описани някои възможни грешки при отчитането на лимфно-ендотелна пролиферация, породени от лимфоцитна инфилтрация.
4. За пръв път в достъпната литература е отбелязана неприложимостта на Chalkley шаблон за оценка на лимфангиогенезата при РГ
5. За пръв път в страната е разгледана лимфангиогенезата в контекста на молекулните типове на рака на гърдата.

Приноси с потвърдителен характер:

1. За пръв път в страната разглежда подробно имунореактивността за D2-40 в нормалните структури на гърдата и при мамарните карциноми.
2. Потвърждава се липсата на лимфно-ендотелна пролиферация при карциномите на гърдата
3. Потвърждава се ролята на лимфно-съдовата инвазия за прогнозирането на аксиларния статус.
4. Потвърждава възможността за наличие на трансдиференциация на моноцити в лимфно-ендотелни клетки.
5. Потвърждава прогностичната роля на аксиларния статус при РГ
6. Потвърждава липсата на корелация между сентинелната биопсия и ЛСИ.

**Списък на публикациите и научните съобщения свързани с
дисертационния труд**

Публикации

1. **Иванов, И.**, Поповска, С., Бетова, Т., Байчев, Г., Динева, Т., Дикова, Зл. Имунохистохимично проучване на съдовете при феномена „съдове в съдовете” наблюдаван при хистологични материали от мамарен паренхим Военна Медицина, том. LXIII, брой 1, 2011, 17-21.
2. **Ivanov, I.** Activated lymphocytes associated to the lymphatic vascular wall may cause overestimation of lymphatic endothelial cell proliferation in breast cancer J. Biomed. Clin. Res., vol.3, Issue 2, 2010, 100-107.
3. **Иванов, И.**, Поповска, С., Бетова, Т., Байчев, Г. Произход на туморасоциираните лимфатици при рака на гърдата- морфологично проучване на туморната лимфно-съдова васкуларизация Военна Медицина, том. LXI, брой 4, 2009, 27-33.

Научни съобщения

1. **Ivanov, I.**, Popovska, S., Betova, T., Baitchev, G. Reasons for over- and underestimation of lymphatic vessel invasion in breast cancer. EJC Supplements, vol.8, Issue 3, 2010, 170-171.
2. **Ivanov, I.**, Popovska, S., Betova, T., Dineva, T. Single detection kit, double antibody cocktail (D2-40/ p63) protocol for identification of lymphatic vascular invasion in breast tissues containing extensive intraductal/-lobular tumour growth. Virchows Arch., vol.459, Suppl 1, 2011, S1-S329.
3. **Иванов, И.**, Динева, Т., Дикова, Зл., Поповска, С. Изследване на приложимостта на chalkley шаблон за оценка на лимфната васкуларизация при карциномите на гърдата Сборник доклади от научна конференция „50 години от полета на първия човек в космоса”, vol.2, 2011, 168-175.

**Clinical and morphological aspects of the tumor -
associated lymphatic vessels in breast cancer**

Ivan Nedkov Ivanov, MD

Department of Pathology, MU-Pleven

PhD Thesis

Scientific Advisor:

Assoc. Prof. Savelina Popovska, MD, PhD

Official reviewers:

Prof. Ivan Mihailov, MD, DMSc

Assoc. Prof. Anna Mihova-Pancheva, MD, PhD

ANNOTATION

Breast carcinomas (BC) spread predominantly via the lymphatic system. Evaluation of tumor-associated lymphatic vessels may improve the understanding of BC progression.

The aim of our investigation was to study the morphological particularities of the tumor-associated lymph draining system in primary BC.

A total of one hundred and eighty seven patients with BC were evaluated in a retrospective study. Additional fifteen tissue samples from patients with benign breast lesions were evaluated as healthy controls. Immunohistochemical staining was performed in accordance to standard protocols. Lymphatic vascularisation was evaluated using several methods.

The D2-40 antibody was found to stain lymphatic vascular endothelium as well as myoepithelial cells of the glandular parenchyma. The D2-40/p63 protocol was found to be useful in identifying lymphatic vascular invasion (LVI) in cases with intraductal and /or intralobular tumor growth. The pre-lymphatic system of the breast was found to be dependant on the patient's age and presence of invasive tumor growth. Intratumoral lymphatic vascular density was associated with the presence of LVI and positive axillary lymph node status. LVI was found to be associated with lymph node status especially in cases when it was accessed in peritumoral tissues larger than 3mm in size. Positive axillary lymph node status was associated with less than 5-year survival, while LVI was not associated with survival rates.

The tumor associated lymphatic vessels play an important role in tumor dissemination. Some quantitative and morphological characteristics of tumor-associated lymphatic vessels have important implications for clinical practice.

СЪДЪРЖАНИЕ:

	стр.
Използвани съкращения	3
ГЛАВА I Въведение	4
ГЛАВА II Цели и задачи.....	5
ГЛАВА III Пациенти, материали и методи	7
ГЛАВА IV Собствени проучвания и резултати	14
ГЛАВА V Дискусия и практически препоръки.....	62
ГЛАВА VI Изводи и заключение.....	77
Практическа значимост на разработката	80
Публикации и научни съобщения свързани с дисертацията	82