

*Медицински Университет-Плевен
Факултет „Медицина”
Катедра „Патологоанатомия”*

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНИ И ФЕНОТИПНИ АСПЕКТИ НА ТРОЙНО НЕГАТИВНИТЕ КАРЦИНОМИ НА ГЪРДАТА

Доц. д-р Савелина Любенова Поповска д.м.

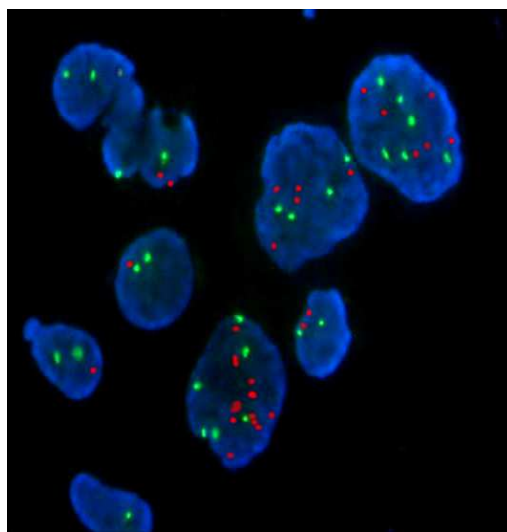
АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за получаване на научната степен
„доктор на медицинските науки**

Научна специалност: 03.01.03
„Патоанатомия и цитопатология”

Научен консултант - Vincenzo Eusebi, MD

Плевен, 2014



Дисертационният труд е реализиран с грант от Japan Society for the Promotion of Science-JSPS Postdoctoral Fellowship и е изпълнен в Лабораторията по Молекулярна Патология на Университета Каназава, Ишикава провинция, Япония.

“Ако не беше голямата вариабилност между отделните индивиди, медицината щеше да е повече наука, а не изкуство.”

Sir William Osler 1892

СЪДЪРЖАНИЕ:

	стр.
I. Въведение	7
II. Цел	7
III. Материал и методи	9
3.1. Обща характеристика и основни групи пациенти	9
3.2. Статистически методи за анализ на получените данни	15
IV. Собствени проучвания и резултати	15
4.1. Проучване на честотата и клинично-патологичните характеристики на пациентките с ТНКГ	15
4.1.1. Проучване на честотата ТНКГ в национален и регионален мащаб	15
4.1.2. Проучване на клинично-патологични характеристики на ТНКГ.....	16
4.1.2.1. Проучване на възрастовата характеристика на ТНКГ	16
4.1.2.2. Проучване на размера на първичния тумор при ТНКГ и контролната група	16
4.1.2.3. Проучване на лимфно-възловия статус при ТНКГ и контролната група	16
4.2. Проучване на преживяемостта на пациенти с ТНКГ в сравнение с неселектирана контролна група	17
4.3. Проучване на морфологичната находка и хистопатологичните характеристики на ТНКГ	19
4.3.1. Проучване на хистопатологичната находка при инвазивни дуктални карциноми, „неспециални” типове-ИДК, NST	20
4.3.2. Проучване на хистопатологичната находка при инвазивни карциноми, т.нар. „специални” типове с тройно негативен фенотип	26
4.4. Проучване на преканцерозните лезии в групата на ТНКГ	40
4.4.1. Ин ситу карциноми и АДН	40
4.5. Проучване на промяната в нетуморната тъкан при ТНКГ и морфологични аспекти на прогресията на ТНКГ	40
4.5.1. Промени в съседната и не-неопластичната тъкан при ТНКГ ...	40
4.5.2. Морфологични аспекти на прогресията на ТНКГ	41
4.6. Проучване на лимфносъдовата васкуларизация на първичния тумор при ТНКГ и контролната група	42
4.7. Проучване на имунофенотипа на ТНКГ в зависимост от моделите на експресия на цитокератини, базални биомаркери и маркери за мезенхимна и миепителина диференциация	44
4.7.1. Експресия на базален СК 5 в проучваната група ТНКГ	44
4.7.2. Проучване на експресията на EGFR в групата ТНКГ	47
4.7.3. Проучване на амплификацията на EGFR гена с метода FISH ..	48

4.7.4.	Експресия на базален СК 17 в проучваната група ТНКГ	50
4.7.5.	Експресия на базален СК 14 в проучваната група ТНКГ	51
4.7.6.	Експресия на луминални цитокератини-СК 8/18 в групата на ТНКГ	51
4.7.7.	Експресия на селектирани маркери за мезенхимна и миоепителна диференциация в групата на ТНКГ	53
4.7.8.	Експресия на маркера p 63 за миоепителна диференциация ...	53
4.7.9.	Проучване на експресията на ТНКГ за c-KIT	54
4.7.10.	Проучване на експресията на p-cadherin в групата на ТНКГ ...	57
4.7.11.	Проучване на експресията на Caveolin -1 в групата на ТНКГ ..	58
4.8.	Проучване на характеристиките на ТНКГ за експресия на p53 гена, Cyclin E1, Ki-67 и андрогеновите рецептори	61
4.8.1.	Проучване на експресията (акумулацията) на мутантния протеин на P53 гена	61
4.8.2.	Проучване нивото на експресия на Cyclin E 1 в групата на ТНКГ	62
4.8.3.	Проучване нивото на експресия на Ki-67 в групата на ТНКГ .	63
4.8.4.	Проучване нивото на експресия на AR в групата на ТНКГ	65
	V. Изводи и препоръки	69
	VI. Заключение	75
	VII. Приноси на разработката	77
	VIII. Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд	78
	IX. Списък намерените цитирания на публикации, свързани с дисертационния труд	83

Дисертационният труд съдържа 363 стандартни машинописни страници, 21 таблици, 133 фигури и 1 приложение. Книгописът включва 644 заглавия, от които 7 на кирилица и 637 на латиница, като 501 от последните 10 години.

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе наг.
отчаса в зала Амброаз Паре, ПЛЕАЕЦ, Медицински Университет-гр.
Плевен, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени
и заемане на академични длъжности в МУ-Плевен и въз основа на заповед N.....
отг.на Ректора на МУ-Плевен, пред научно жури в състав:*

Председател:

Доц. Д-р Евлоги Маринов, д.м.-вътрешен член

Членове:

Проф. Д-р Цана Бошнакова-Празникова, д.м.н.външен член и рецензент

Проф. Д-р Иван Михайлов, д.м.н. външен член и официален рецензент

Проф. Д-р Константа Тимчева, д.м. външен член и официален рецензент

Доц. Д-р Веселин Беловеждов, д.м. външен член

Проф. Д-р Ташко Делийски, д.м.н. вътрешен член

Проф. Д-р Емилиан Иванов, д.м. вътрешен член

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Патологоанатомия на МУ-Плевен и на интернет страницата на Университета.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА

АКК	Аденоидно-Кистичен Карцином
AR	Андрогенов рецептор
ER α	Естрогенов(и) рецептор(и) алфа
ЕМТ	Епително- мезенхимна трансдиференциация
RgR	Прогестеронов(и) рецептор(и)
ТМВ	Топлинно медирано възстановяване
ДКИС	Дуктален Карцином Ин Ситу
ИДК	Инвазивен дуктален карцином
ИЛК	Инвазивен лобуларен карцином
ИТРСЛП	ИнтраТуморна Релативна Лимфно-Съдова Площ
ИХХ	Имунохистохимия
КГ	Карцином на Гърдата
л.в.	лимфни възли
ПТРСЛП	ПериТуморна ЛимфноСъдова Плътност
РГ	Рак на гърда
РМЖ	Рак на млечна жлеза
ТДЛЕ	Терминална дукту-лобуларна единица
ТИЛ	Тумор-инфилтриращи лимфоцити
ТИЛ	Тумор инфилтриращи лимфоцити
ТНКГ	Тройно негативен карцином на гърдата
Cav-1	Caveolin -1
CISH	Chromogenic In Situ Hybridization
CK5	Cytokeratin 5
CK8/18	Cytokeratin 8/18
CK 14	Cytokeratin 14
EGFR	Epidermal growth factor receptor
H&E	Hematoxylin and eosin
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
LVI	Lympho Vascular Invasin
NST	No Special Type

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът на млечната жлеза е най-често диагностицираното злокачествено заболяване сред жените и една от водещите причини за смърт от онкологични заболявания сред тях в целия свят.

В последните години геномиката промени парадигмата на възприемане на карцинома на гърдата (КГ) като неоплазма, характеризираща се с морфологична, биологична и генетична комплексност и хетерогенност.

Напредъкът в лечението се дължи на по-доброто разбиране на биологичната характеристика на тумора. Отделните морфологични и биологични типове се характеризират с различен патологичен, клиничен и биологичен ход, което доведе до стратификация на пациентите и разработване на индивидуализирана лечебна стратегия и терапевтично поведение при отделните подтипове тумори.

Тази концепция за субкласифициране на туморите, на базата на техния молекулярен модел, резултат в по-ясна клинична прогноза, селекция на адекватни терапевтични схеми и предикция на отговора към предстоящото лечение.

Тройно негативният карцином на гърдата (ТНКГ) е клинично дефиниран, уникален субтип РГ, предизвикателство пред онколозите за диагностика и прилагане на успешна терапевтична стратегия.

Тази неоплазма е с важно значение, защото се среща рядко и не се лекува с хормонална или анти-HER 2 терапия, поради липсата на таргети от негативността за хормонални рецептори и HER 2. Вътрегрупово, ТНКГ е хетерогенна единица, обединяваща отделни субгрупи, с различна морфология, биология, прогноза и стратегия за терапия.

Необходими са задълбочени морфологични и допълващи конвенционалната патология изследвания, фокусирани върху разнообразието и сигналните пътища на тази уникална неоплазма.

Настоящото проучване е мотивирано от нуждата за изясняване на различните морфологични и молекулярни субтипове при КГ и подходите за тяхната оценка в контекста на практическото им клинично приложение.

II. ЦЕЛ

Предвид клиничното значение на ТНКГ, хетерогенността на тази неоплазма по отношение на морфологичната находка, имунофенотипа и значението на това разнообразие за прилагане на индивидуални терапевтични интервенции си поставихме за **ЦЕЛ** да проучим:

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНИТЕ И ФЕНОТИПНИ АСПЕКТИ НА ТРОЙНО НЕГАТИВНИТЕ КАРЦИНОМИ НА ГЪРДАТА

В тази връзка си поставихме следните основни задачи:

1. Да се анализират честотата и клинично-патологичните характеристики на пациентки с ТНКГ и да се сравнят параметрите с тези на контролна група от не-тройно негативни карциноми на гърда.
2. Да се сравни общата преживяемост на пациентите с ТНКГ и контролната група.
3. Да се опишат морфологичната находка и хистопатологичните характеристики на ТНКГ.
4. Да се изследват преканцерозните лезии в групата на ТНКГ.
5. Да се анализират промените в нетуморната тъкан при ТНКГ и да се опишат морфологични аспекти на прогресията на ТНКГ.
6. Да се проучи лимфно-съдовата васкуларизация на първичния тумор при ТНКГ и се сравни с контролна група от ИХХ определени субтипове карциноми на гърда.
7. Да се проучи имунофенотипа на ТНКГ в зависимост от моделите на експресия на базални и луминални цитокератини, експресия на базални биомаркери и маркери за мезенхимна и миепителина диференциация.
8. Да се определят характеристиките на ТНКГ по отношение на експресията на тумор супресорния ген p53, Cyclin E1, пролиферативен статус на първичния тумор и AR.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1.Обща характеристика и основни групи пациенти

Проучването е ретро и проспективно за период от 2004 до 2013 година. За изпълнение на целите по задачите са проучени различни групи пациентки през различни времеви периоди (схематично представени на фиг.1). Честотата на ТНКГ е проучена от 2011 до 2013 от случаите на УМБАЛ-Плевен и в национален мащаб на база информация от националния раков регистър за същия период. За ТНКГ е приеман имунофенотип на инвазивен КГ, при който не се установява имунооцветяване за ER и PgR с методите на ИХХ оцветяване или < 1%; негативна ИХХ реакция за HER 2 (0 и 1+) и липса на амплификация, с методите на CISH при неясно имунооцветяване (2+).

За изпълнение на задачите пациентките са изследвани морфологично и с методите на ИХХ и ISH. От парафиновите блокчета са селектирани 71 случая за изследване на 17 биомаркера, при които е наличен материал за ИХХ и ин ситу техники.

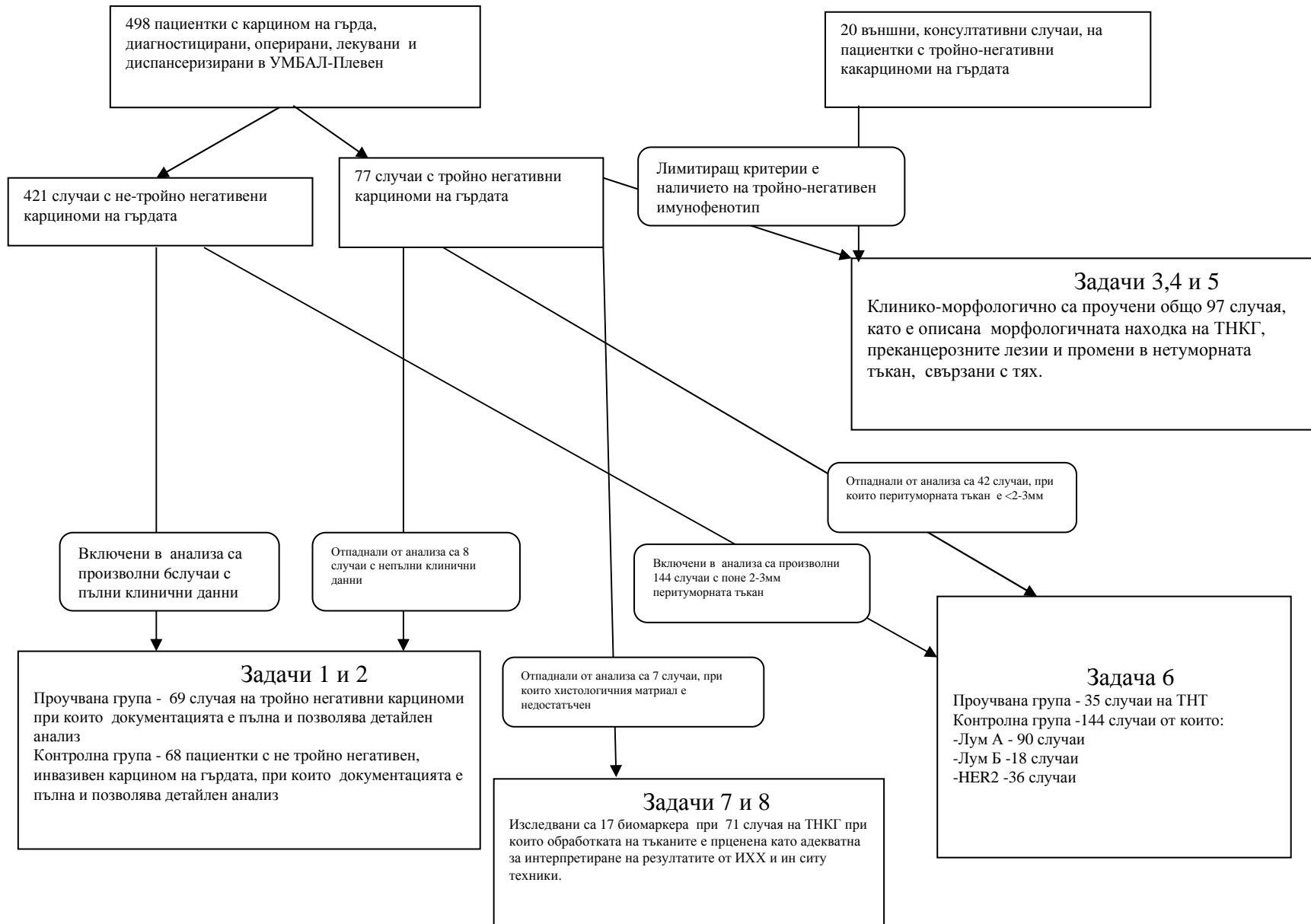
FISH техника за проучване на бройни генни аномалии на EGFR е извършена ретроспективно при 29 случая, при които сигналите са били годни за интерпретация. Селектираните материали за морфологично изследване са обработени рутинно, фиксирани във формалин и включени в парафин.

За морфологичната диагноза блокчетата са срязвани с дебелина 4 μ m и са оцветявани с H&E. Последващи срези за ИХХ изследване и ин ситу хибридизационни техники от пациентски блокчета са монтирани върху адхезивни стъкла.

В диагностичния процес на ТНКГ се премина през следните етапи: определяне на хистотип на тумора, грейдинг, архитектурни особености на първичния тумор, туморната инфилтрация от лимфоцити (ТИЛ), in situ компонента и пренеопластични лезии в първичния тумор, зони и вид на некрози, цитологични и стромални характеристики на тумора.

На фиг.1. схематично са представяне на групите пациентки, проучвани по поставените задачи.

Фиг. 1.



Имунофенотипизирането е извършено с различни първични антитела по инструкции на фирмите–производители. За визуализация на ИХХ реакция е използвана FlexEnVision система/ДАКО. Антителата, техните характеристики, като клон, работни разреждания, фирма-производител и начин на антигенно възстановяване са показани на табл.1.

Табл.1. Обща информация за антителата. ТМВ-топлинно медирано възстановяване.

Първично антитяло	Клон	Разреждане	Производител	Тип на антигенно възстановяване
HER2 поликлонално античовешко	c-erbB-2 клон 1100 oncoprotein	1:250	Dako Cytomation	ТМВ -водна баня; t=95-98°C; време 40 min
ER Мише античовешко	SP1 α	Готово за употреба	Dako Cytomation	ТМВ- водна баня; t=95-98°C; време 40 min
PgR Мише античовешко	PgR 636	Готово за употреба	Dako Cytomation	ТМВ- водна баня; t=95-98°C; време 40 min
Ki67 Мише, моноклонално античовешко	Клон MIB 1	Готово за употреба	Dako Cytomation	ТМВ- автоклав; 16 psi; t=124° C; Време 1 min
p53 Мише, моноклонално античовешко	Клон DO7	Готово за употреба	Dako Cytomation	ТМВ- автоклав; 16 psi; t=124° C; Време 1 min
СК 14 Мише, моноклонално античовешко	LL002	1:20	Novo Castra	ТМВ - автоклав; 16 psi; t=124° C; Време 1 min
AR Мише, моноклонално античовешко	Клон AR 441	Готово за употреба	Dako Cytomation	ТМВ-автоклав; 16 psi; t=124° C; Време 1 min
Vimentin поликлонално античовешко	Клон V9	1:100	Dako Cytomation	Proteinkinase K
C-kit поликлонално античовешко		1:50	Dako Cytomation	ТМВ- тенджерата под налягане ; 16psi; t= 124° C; Време 1 min; Citrate buffer pH 6.0
EGFR	ДАК-Н1- WT	Готово за употреба	Dako Cytomation	Proteinkinase K
P-cadherin	Клон 56	1:100	BD, Transduction Lab	ТМВ - автоклав; 16 psi; t=124° C; Време 1 min; Citrate buffer pH 6.0
СК5 Моноклонално античовешко	Клон XM 26	1:100	Novocastra	ТМВ- автоклав; 16 psi; t=124° C; Време 1 min; Citrate buffer pH 6.0

CK17 моноклонално античовешко	Клон E3	1:20	Dako Cytomation	TMB- автоклав; 16 psi; t= 124° C; Време 1 min
CK8 моноклонално анти човешко	Клон UCD/PR- 10.11,Zym 5.2	Готово за употреба	Zymed	TMB - автоклав; 16 psi; t= 124° C; Време 1 min; Citrate buffer pH 6.0
Cyclin E Protein моноклонално античовешко	Клон 13A3	1:15	DBS	TMB - автоклав; 16 psi; t= 124° C; Време 1 min; Citrate buffer pH 6.0
Caveolin-1	Клон 2297	1:100	BD Transduction Lab	TMB - автоклав; 16 psi; t= 124° C; Време 1 min; Citrate buffer pH 6.0
p63	4A4	Готово за употреба	Dako	TMB - MW при 98 °C , 800 W 30 min Dako Target retrieval solution, pH 6.0
D2-40	D2-40	1:100	Dako Cytomation	TMB–тенджера под налягане ;16 psi; t= 124° C; Време-1 min

FISH реакцията за EGFR е извършена с фармакодиагностичен кит на Vysis, по инструкции на фирмата. Изпълнението на **CISH** реакция за HER 2 е следвало стриктно препоръките на фирмата производител-Zymed.

ИХХ реакция за **EGFR** е преценявана, използвайки 4 степенна скала- (0, 1+, 2+ и 3+, подобно на интерпретацията на HER 2. Стойности от 2 и 3 + са приемани за позитивно имунооцветяване.

HER2 е приеман за позитивен, като изключващ критерии за групата на ТНКГ, ако ИХХ оцветяване за HER2 е пълно, униформено и интензивно мембранно оцветяване на >10% от инвазивните туморни клетки - (3+). Случаите с непълно, слабо (1+) или липсващо (0) мембранно оцветяване са приемани за негативни. Случаите с двусмислен или несигурен резултат са ретествани с CISH. HER-2 е приеман за амплифициран с техниката на CISH, при отчетени най-малко 6 и повече генни копия в повече от 10% от ядрата на туморните клетки. За отчитане на FISH пробата за EGFR е изчислявано съотношението на генните копия за EGFR (LSI-EGFR) към броя на центромерите на 7 ма хромозома (CEP7). Броени са от 20 до 60 ядра от всеки подходящ случай. Съотношението LSI-EGFR към CEP7 \geq 2.0 е приемано за амплификация на гена за EGFR. За полизомия е приемана находка, при която в \geq 40% от ядрата на туморните клетки е установявано \geq 3 копия за седма хромозома.

Имунооцветяването за **Cav-1** е отчитано в стромални фибробласти и туморни клетки полуколичествено, като процент и интензивност. ИХХ оцветяване е отчитано по интензитет, съответно: 0- негативен, 1- слабо позитивен; 2- умеренопозитивен; 3- интензивно позитивен и като процент на оцветени туморни и стромални клетки: 0-липсва оцветяване, <1% от клетките са оцветени; 1- 1% до <10%; 2- от \geq 10% до <25%; 3- от \geq 25% до <50%; 4- \geq 50%, локализирано в периферията на клетката–мембранно и в

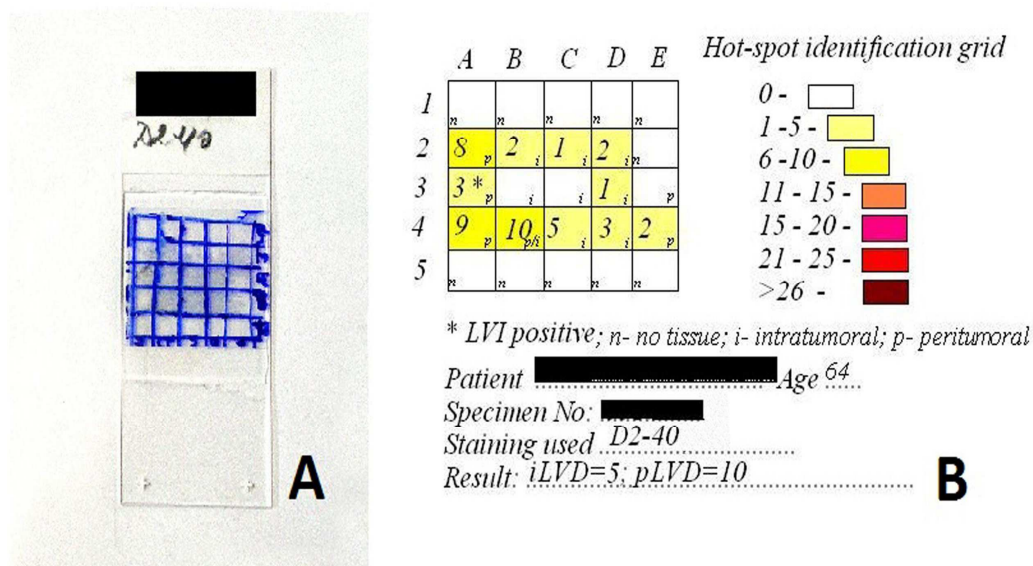
цитоплазмата на туморните клетки и стромалните фибробласти. Резултат от сбора на оцветяване по интензитет и процент (скор) над 4 е смятан за позитивен. Интерпретацията на ИХХ имунооцветяване с граници за позитивност е представена на табл. 2. D2-40 / p63 оцветените структури са интерпретирани като специфични за лимфни съдове, ако ИХХ оцветяване е „непрекъснато” умерено до силно цитоплазмено оцветяване. За определяне на субтиповете КГ са използвани ИХХ маркери. Според имунопрофилите субтиповете КГ са дефинирани като: Луминален А (ER+ и/или PgR+, HER2-), Луминален В (ER+ и/или/ PgR+, HER2+), HER2 свръхекспресиращ (HER2+, ER/PR-) и ТНКГ (ER-, PgR- и HER2-).

Табл.2.Интерпретация на имунохистохимичното оцветяване за различните маркери.

Биомаркер	Граница на позитивност	Локализация на маркера
HER2	>10%	Строго мембранна
ER	≥1%	Строго ядрена
PgR	≥1%	Строго ядрена
Ki67	≥15%	Строго ядрена
p53	>10%	Строго ядрена
CK 14	≥5	Мембранна и цитоплазмена
AR	≥10%	Строго ядрена
Vimentin	≥20%	Цитоплазмена
C-kit	≥20%	Цитоплазмена
P-cadherin	≥20%	Мембранна и цитоплазмена
CK 5	Хетерогенен 5-69% Хомогенен >70%	Мембранна и цитоплазмена
CK 17	>5%	Мембранна и цитоплазмена
CK 8	>5%	Мембранна и цитоплазмена
EGFR	>10%	Мембранна и цитоплазмена

Cyclin E 1	>50%	Ядрена
Caveolin-1	≥20%	Мембранна и цитоплазмена
BRCA 1	>10%	Ядрена и цитоплазмена
EGFR	2+ и 3+	Мембранна цитоплазмена
P63	>20%	Ядрена
D2-40 / p63		непрекъснато, интензивно цитоплазмено и ядрено оцветяване.

Лимфно-съдовата инвазия (LVI) е определяна с ИХХ метод с антитяло D2-40/p63. За LVI е приемано всяко струпване от туморни клетки в рамките на D2-40 позитивни структури, тип “телена мрежа”- силно, непрекъснато, цитоплазмено оцветяване. Лимфносъдовият васкуларитет е определян в няколко стъпки. Първо D2-40/p63 оцветените слайдове са покривани със стъкла, шампирани с решетка 20 x 20mm, изградена от 25 малки квадратчета всяко с размери 4x4mm (фиг.2 А). Слайдовете са скенирани на увеличение 40x. Броят на лимфатиците е определян във всеки квадрат и резултатът е нанасян в специално разработена за целта таблица (фиг.2 В).



Фиг. 2. (А) Покривно стъкло с разграфена мрежичка 20x 20мм.;
(В) Индивидуална таблица за оценка на „горещи петна”, използвана в проучването.

ИХХ оцветени препарати с MIB-1 антитяло са прегледани на увеличение 100x на микроскоп Olympus BX 40. Подбирани са три

неприпокриващи се, представителни за тумора зони, заснемани на увеличение 400x с микроскоп Olympus BX 40, с дигитална камера Olympus, модел 5050 zoom. Компютър–асистирано изброяване на имунопозитивните туморни ядра е извършвано със софтуерния продукт Image Tool.

3.2. Статистически методи за анализ на получените данни

Статистическият анализ е извършван с помощта на следните методи: честотен и графичен анализи; методи за проверка на хипотезите – непараметричен анализ, извършващ се с помощта на критерий χ^2 за търсене на зависимост между две качествени променливи, с прието ниво на значимост $p < 0.05$. Категоричните данни са анализирани по отношение на тяхната честота. Сравнение на категориите данни е правено с теста на Fisher или с Pearson chi-square тест.

Общата преживяемост е измервана за периода от рандомизацията до настъпил момент на летален изход. Разпределението на събитията във времето е представено с помощта на кривите на Kaplan-Meier, които са сравнявани с log-rank теста. Статистическият анализ на изследваните данни е извършван с помощта на софтуерния продукт Statgraphics plus 2.0. Стойности за $p < 0.05$ са приемани за значими.

IV. СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ, РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Проучване на честотата и клинично-патологичните характеристики на пациентките с ТНКГ

4.1.1. Проучване на честотата ТНКГ в национален и регионален мащаб

За проучвания от нас период 2011-2013 в УМБАЛ Д-р „Георги Странски” са диагностицирани и оперирани общо 498 случая с КГ с морфологично доказан карцином, а от тях с тройно негативен фенотип са установени общо 77 случая (15.4%).

По данни на националния раков регистър в страната за същия времеви интервал са регистрирани общо 8718 случая с КГ. От тях 8400 (96.3%) са с морфологично верифицирани тумори, а от тях при 4858 случая (57.8%) има налична информация и за трите рецептора. От тези 4858 пациенти с КГ, тройно негативни са установени 458 случая (9.4%).

4.1.2. Проучване на клинично-патологичните характеристики на ТНКГ

4.1.2.1. Проучване на възрастовата характеристика на ТНКГ

В нашето ретроспективно изследване за периода е подбрана група от тройно негативни тумори, като всички пациентки са жени на възраст от 23 до 81 години (средна възраст 50.2 години). Намери се тенденция пациентите да са по-млади, в сравнение с контролната група. Този показател обаче не достига статистически значима разлика между групите в разпределението на пациентките по възраст ($p=0.086$). Разпределението по възраст на случаите с ТНКГ, сравнено с това в контролната група, показва тенденция ТНКГ да се срещат в по-млада възраст, без тя да достига статистическа значимост.

4.1.2.2. Проучване на размера на първичния тумор при ТНКГ и контролната група

По отношение на размера на първичния тумор, в ранен стадий (Т1-категория) са диагностицирани повече пациентки от контролната група-48.53%, в сравнение с групата на ТНКГ-20.9%. По отношение на Т2 критерия, пациентки от контролната група са били установени в 32.35 % срещу 43.29 % от групата на ТНКГ.

Съществува разлика в разпределението на случаите в Т3 и Т4 категориите в контролната група и тази с ТНКГ. В Т3 категория от контролната група са установени 7.35% случая, срещу 10.45% от изследваната група и съответно в Т4 категория- 11.76% от контролната и 25.37% от изследваната група. В проведеното проучване тези разлики достигат статистическа значимост ($p=0.007$).

4.1.2.3. Проучване на лимфно-възловия статус при ТНКГ и контролната група

По отношение на аксиларния лимфно-възлов статус, тройно-негативните карциноми се намериха по-често в N0 категорията, без метастази в лимфните възли- в 44.12%, в сравнение с 35.85% от контролната група. В N1 и N2 категорията преобладаващи са пациентите от контролната група-37.74% за N1 и 22.64% за N2, срещу 29.41% и 17.65% от групата на ТНКГ. В N3 категорията попадат предимно случаи от изследваната група-ТНКГ-8.82% срещу 3.74% за контролната група.

Потърсихме корелация между големината на тумора и статусът на л.в. - (Т и N), като такава беше установена само в контролната група (статистически значима $p=0.025$, $R=0.308$).

В групата на ТНКГ се установи слаба положителна връзка (с коефициент на корелация $r=0.192$), която не достига статистически значима стойност ($p=0.12$). Липсва статистически значима корелация между размера на първичния тумор и статусът на лимфните възли при ТНКГ. От 137 пациента в двете изследвани групи с неизвестен статус за разпространение на заболяването към момента на поставяне на диагнозата са 120. От останалите 17, с метастази са 9 от тройно негативните и 3 от контролите. Останалите 5 пациентки нямат метастази за целия срок на наблюдение. Не се установи статистически значима разлика между изследваната и контролната група.

Като цяло, ТНКГ имат по-лоша прогноза в сравнение с останалите субтипове, като може да се свърже с ниската степен на диференциация на първичния тумор, която преобладаваше в проучваната от нас изследвана група.

По литературни данни честотата на ТНКГ в неселектирана кохорта варира, в зависимост от метода на изследване и границата за позитивност на хормонални рецептори, приблизително от 11 до 20%. Честотата за нашето проучване за ТНКГ е в границите на този интервал. Прави впечатление обаче, по-ниската честота на ТНКГ в национален мащаб за проучения период – само 9.4% в сравнение с литературните данни и в сравнение с резултатите от нашето проучване.

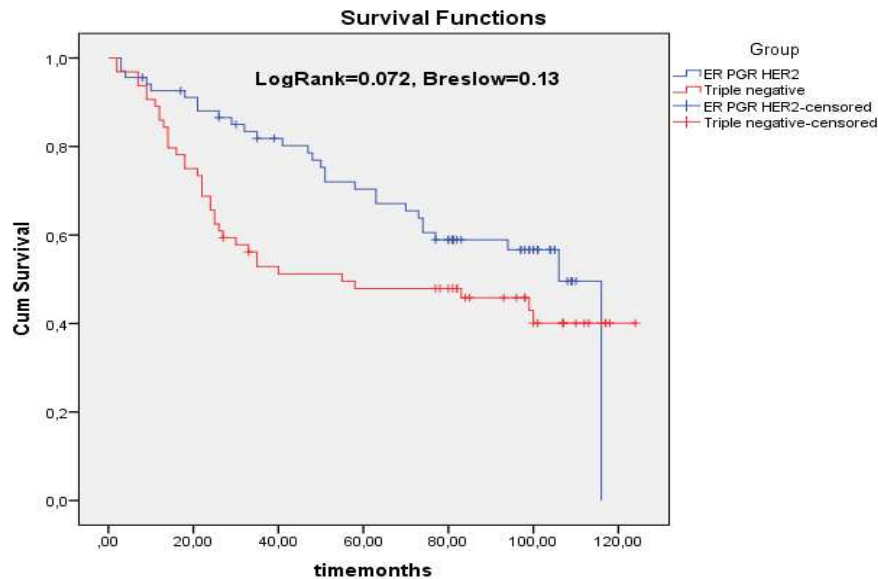
ТНКГ по-рядко се асоциират с метастази в лимфните възли, както установихме в нашето проучване, което се подкрепя и от други авторски колективи. Независимо от ниския риск за аксиларни метастази, пациентките с ТНКГ са с лоша прогноза, което предполага хематогенен тип метастазирание и налага приложение на цитостатична терапия, независимо от негативния аксиларен статус. Липсата на корелация между размера и статуса на л.в. е характерна находка за ТНКГ и е значима разлика с луминалните тумори.

В нашето проучване не се установи статистически значима разлика между проучваната и контролната групи по отношение на М категорията към момента на поставяне на диагнозата. По принцип М категорията е трудно да бъде интерпретируема, поради преобладаване на случаи, при които липсват данни за екзактно стадиране на пациентките и в двете групи.

4.2. Проучване на преживяемостта на пациенти с ТНКГ в сравнение с неселектирана контролна група

За реализиране на задача 2 е използван метода на Kaplan-Meier. При сравняване на времето на преживяемост се установи статистически значима разлика между двете изследвани групи. В групата на ТНКГ средната обща преживяемост е 68 месеца, срещу 84 месеца при контролите.

При пациентките с ТНКГ общата преживяемост е била средно с 16 месеца по-кратка, сравнена с контролната група-фиг.3.



Фиг.3. Криви за обща преживяемост при двете групи за период от първите 5 години.

За прецизиране силата на разликата между двете проучвани групи, анализирахме преживяемостта в подгрупите, преживели и непреживели 5 годишен период.

Установи се средна преживяемост от 22 месеца за групата от тройно-негативни карциноми, срещу 32 месеца за контролната група, което е статистически значимо ($p=0.02$).

Установи се и факта, че пациентките с ТНКГ, ако преживеят първите 5 години, имат средно по-голяма преживяемост от контролите (119 срещу 107 месеца). Тази тенденция обаче, не достига статистическа значимост.

Нашите резултати за по-малка средна обща преживяемост в групата на ТНКГ до петата година съвпадат с преобладаващите литературни данни за по-висока смъртност до петата година, която след този период постепенно намалява.

Различните субтипове КГ притежават различни генни експресионни профили, които могат да се докажат с различни модели на генетични анализи, които да предвидят мястото на метастазирането на първичния тумор. Идентификацията и проучването на тези гени ще доведе до по-екзактно предсказване на вероятния ход на заболяването.

4.3. Проучване на морфологичната находка и хистопатологичните характеристики на ТНКГ

Във връзка с поставената задача, клинико-морфологично бяха проучени общо 97 тумори, селектирани ретроспективно от последователни случаи на оперирани по повод на карцином на гърдата и от външни консултативни случаи, отговарящи на същите критерии.

Класификацията на хистологичните варианти е направена съгласно 4 то издание на СЗО, 2012 година. Разпределението на изследваните по задача 3, общо 97 случая по морфологични типове на първичните тумори е представено на таб. 3 и е както следва:

Табл.3. Разпределение по морфологични типове на ТНКГ.

Хистологичен вид на тумора/хистотип	Брой случаи/Процент
Инвазивен карцином, NST	53/54.63%
Карцином с централна некроза	2/2.06%
Инкапсулиран папиларен карцином, солиден вариант	1/1.03%
Класически медуларен карцином	6/6.18%
ТНКГ с медуларни характеристики	12/12.37%
Лобуларен карцином	2/ 2.06%
Апокринен карцином	3/3.09%
Секреторен карцином	1/1.03%
Метапластичен карцином	
• Източеноклетъчен карцином	6/6.18%
• Плоскоклетъчен карцином	2/ 2.06%/
• Матрикс продуциращ карцином	2/ 2.06%
Миепителин карцином	2/ 2.06%
Аденоидно-кистичен карцином (АКК)	3/3.09%
Невроендокринен карцином	1/1.03%
Карцином, наподобяващ tall cell папиларен карцином на щитовидната жлеза	1/1.03%
Общо случаи	97/100%

Преобладаващ хистологичен вид на пациентите от групата на ТНКГ са инвазивните карциноми, NST или т.нар. неспециални типове-54 случая - 55%.

Поради голямото морфологично разнообразие на туморите, попадащи в групата на ТНКГ, в която влизат както специални типове, така и инвазивни дуктални карциноми от „неспециален” тип, находката в морфологичната картина ще се разгледа поотделно за двете групи ТНКГ.

4.3.1. Проучване на хистопатологичната находка при инвазивни дуктални карциноми, „неспециални” типове-ИДК, NST

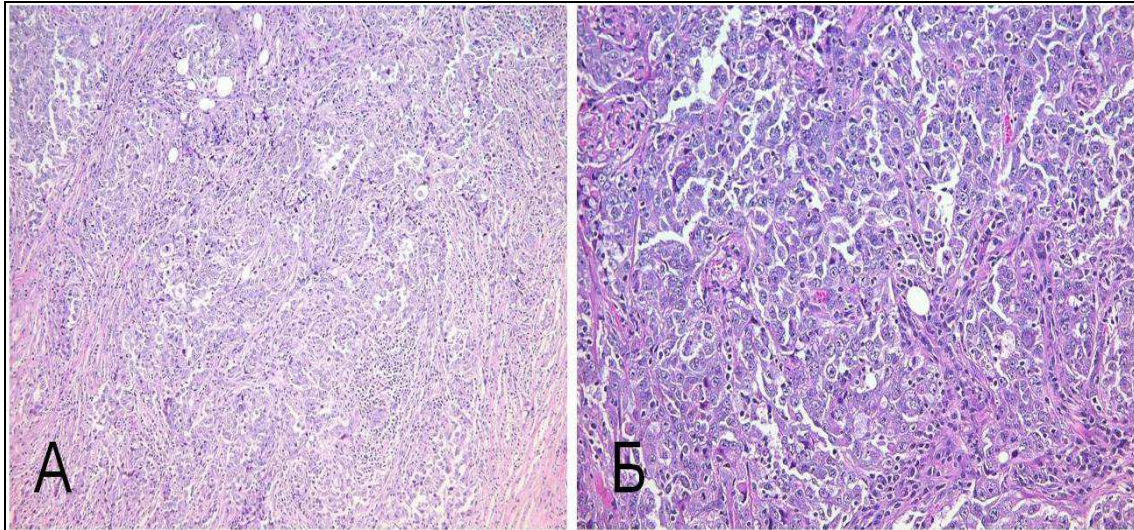
По принцип диагнозата инвазивен карцином, неспециален тип е поставяна по изключение, когато неоплазмата не покрива критериите за специални типове. С диагноза ИДК, NST се оказаха преобладаващ брой от изследваните морфологично случаи-53 (54.63%%).

Характерна находка при инвазивните дуктални карциноми, неспециални типове по отношение на архитектурен модел на строеж на тумора се оказа предимно солидният с избутващ начин на растеж. Морфологичните характеристики на проучените ТНКГ са представени на табл.4.

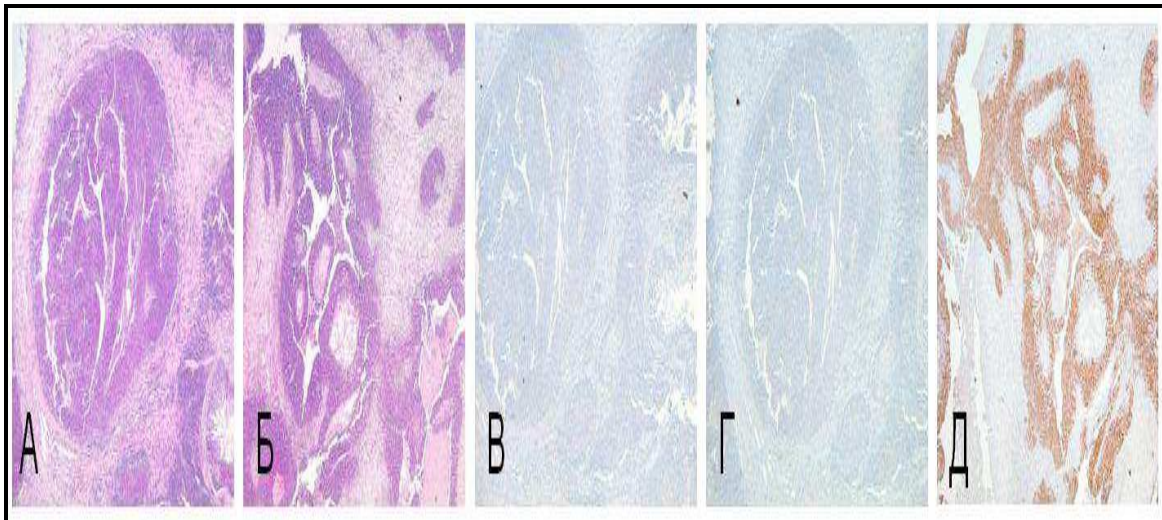
Табл.4. Морфологична характеристика на проучените ТНКГ

Показатели	Грейд	Брой/%
Характеристики	G3	62(62,89%)
	G2	34 (35,05%)
	G1	2(2,06%)
Граници	Избутващи Инфилтративни	65 (67,01%) 32 (32,99%)
Некрози	Географски Фокални Липсващи	50(51,55%) 37(38,14%) 10(10,31%)
Калцификати	Налични Липсващи	5 (5,15%) 92 (94,85%)
Стромни възпалителни инфилтрати	Обилни Умерени Слабо изразени/липсващи	60 (61,86%) 34 (35,05%) 3 (3,09%)
Преинвазивни лезии, ин ситу компонента	Наличен DCIS Липсва DCIS	10(10.31%) 87(89,69%)

Туморните клетки в повечето от случаите са аранжирани в солидни гнезда, разположени в дезмопластична строма (фиг.4). В отделни случаи първичният тумор е представян с комплексна, макропапиларна архитектура, подобна на високостепенни серозни папиларни карциноми на яйчниците (фиг.5).



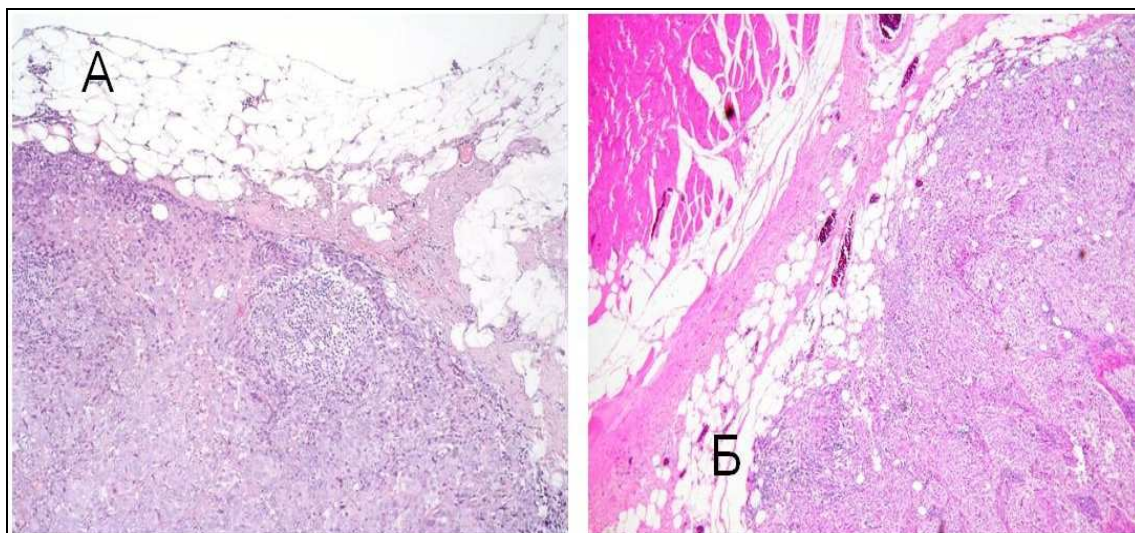
Фиг.4.-Солидна архитектура на ТНКГ без формиране на тубули, оцв.Н&Е, увел.100х Б- оцв.Н&Е, увел 200х



Фиг.5. А-Комплексна папиларна архитектура на ТНКГ.А,Б-оцв.Н&Е, увел.200х В, Г- ИХХ за ER, Her 2.оцв.Н&Е, увел 200х Д-ИХХ с антияло срещу СК5.

Освен солидният архитектурен модел, в групата на високостепенните ТНКГ се среща и модел, при който туморните клетки образуваха лентовидни структури, поради заемащите голяма площ зони на некроза (фиг.22А).

Начинът на растеж в по-голяма част от случаите е „избутващ” без туморът да навлиза в съседните тъкани (фиг.6). Алтернативен модел на растеж е инфилтриране на мастната и фиброзна тъкан. Често този модел е асоцииран с дезмоплазия на стромата на тумора и формиране на депозити от еозинофилен материал, между туморните клетки. Инфилтративен растеж на тумора е регистриран при 33% от случаите с ТНКГ, като за повечето от тях установихме и наличие на еозинофилен интерцелуларен матрикс, намиращ се около клетките, инфилтриращи стромата и съседните тъкани.



Фиг.6. А, Б "Избутващ" начин на растеж на карцинома, без да навлиза в мастната тъкан.оцв.Н&Е, увел.100х Б

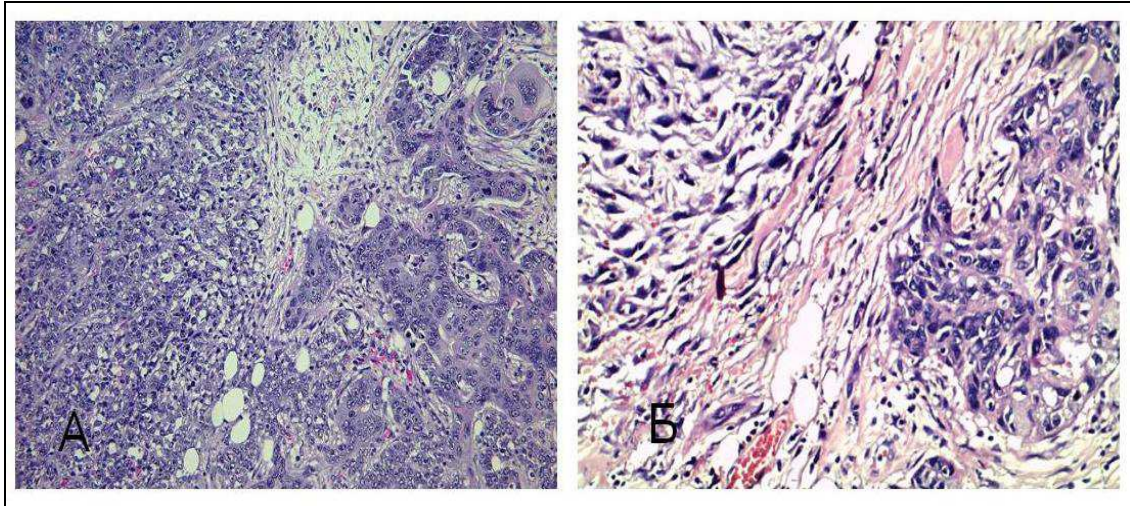
Калцификати са установени в малък брой от туморите-един, които е хетерогенен, с преобладаваща тройно-негативна компонента и луминална съставка, позитивна за ER и в четири от случаите-при карциноми с тройно негативен фенотип (5.15%).

Стромата на тумора при инвазивните карциноми, NST, G3 се установи активно пролиферираща или оскъдна, със зони на некрози и кръвоизливи.

Друга характерна и преобладаваща находка в групата на ТНКГ е изразената ядрена атипия на туморните клетки. По-голяма част от туморите с инвазивни карциноми от неспециалните типове, бяха нискодиференцирани, G3 (74%) тумори. Ядрените промени в проучваната група от инвазивни дуктални, NST ТНКГ се изразяваха в полиморфизъм на ядрата, неправилни очертания на ядрената мембрана, фокално проминентни нуклеоли, струпване на хроматина, хиперхромазия и неправилности в ядрената мембрана на туморните клетки.

Моделът на строеж на хроматина в повечето от случаите е везикуларен с различни еозинофилни или амфилофилни ядърца, по-рядко-дифузен хетерохроматин.

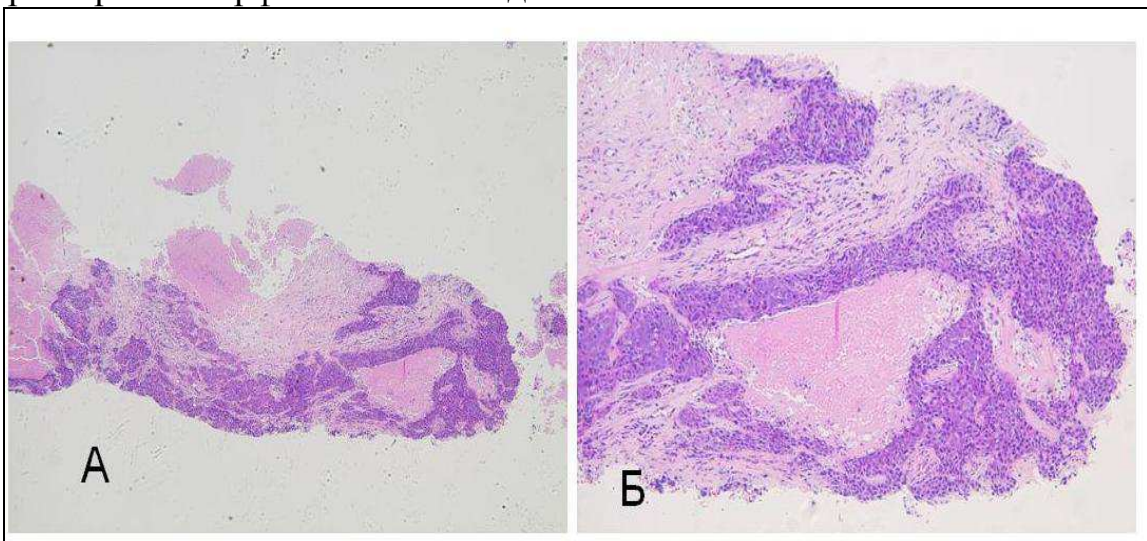
Вътретуморен хетерогенитет, с участъци от тумора, показващи различен морфологичен модел се установи при 12 случая (16.9%) (фиг.7).



Фиг.7.А, Б-ТНКГ с вътретуморна хетерогенност-различни зони в тумора-А-солидна в ляво и жлезиста част Б-източеноклетъчна в ляво и с дуктална, G3, морфология в дясно оцв.Н&Е, увел200х

Зони на туморна некроза са установени при 61% от случаите с ТНКГ. Некрозата обикновено е локализирана в централната зона на тумора по типа на „географска” некроза. Освен обширни некрози се намериха и случаи с ограничени зони на некрози, ‘комедо” тип, както и участъци с хеморагично инфарциране.

Гореописаните характерни морфологични особености, позволяват разпознаване на ТНКГ на дебелоиглена инцизионна биопсия, поради характерната архитектура на тумора и зоните на некроза, които заемат голяма част от площта на биопсията-фиг.8. В нашето проучване 4 ТНКГ са диагностицирани и разпознати с метода на инцизионна биопсия, по характерната морфологична находка.

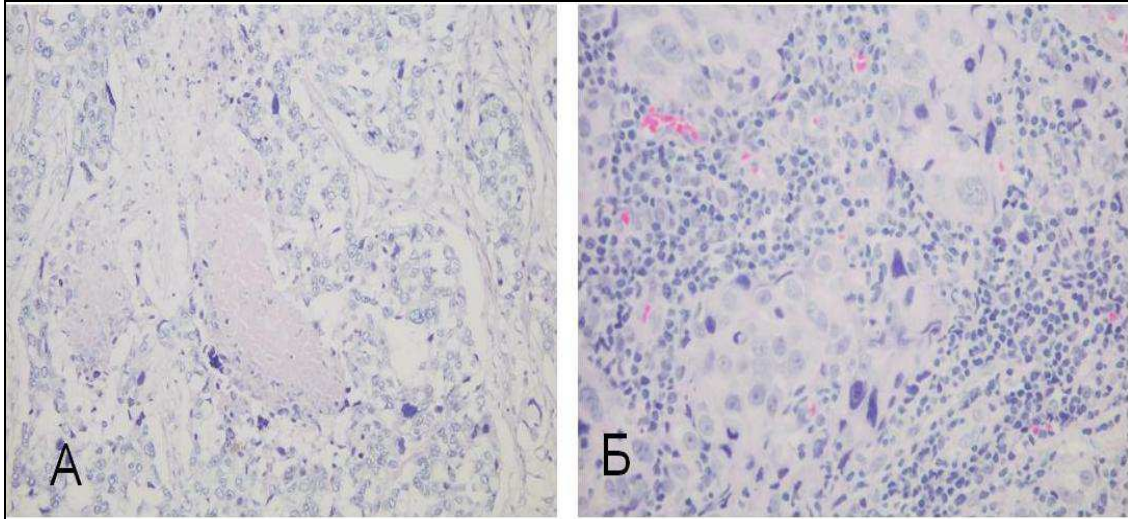


Фиг.8.Дебелоиглена инцизионна биопсия -инвазивен карцином, NST, G3, зона на коагулационна некроза оцв.Н&Е, А увел 100х , Б-увел. 200х

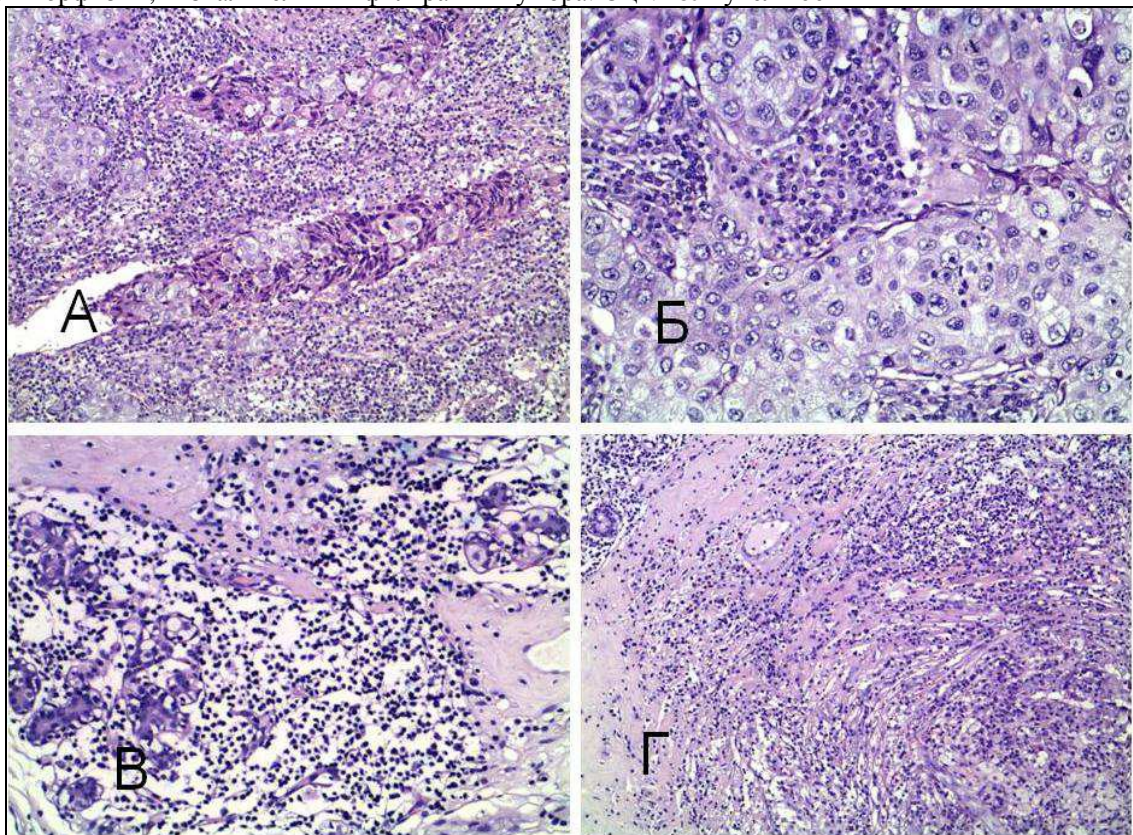
Дезмоплазия на стромата е намерена при 32 случая, представена като активна пролиферация от фибробласти. Формиране на фиброзни възли, особено в централните зони е установена в 51 случая от

ТНКГ(52.04%). Ангиоинвазивен растеж се намери в периферията на тумора при 48% от ТНКГ.

По-честа се намери комбинацията високостепенен, G3 карцином и лимфоцитна инфилтрация и дезмоплазия в стромата на тумора $p < 0.001$ (фиг.9). Възпалителните инфилтрати бяха представени най-добре при медуларния карцином и тези с медуларна характеристика. Локализацията се намери както интратуморно и перилобуларно.



Фиг.9.А Високостепенни ТНКГ-А-изразен полиморфизъм, фокални некрози, солиден модел на строеж.Липсват лимфоцитни инфилтрати в тумора. Б- Типичен медуларен карцином, изразен ядрен полиморфизъм, възпалителни инфилтрати в тумора. Оцв.Н&Е увел 200 х



Фиг.10 А, Б Високостепенен ТНКГ с медуларна характеристика -А-изразен полиморфизъм, и интратуморни възпалителни инфилтрати. В- лобул с перилобуларни възпалителни инфилтрати Г- Лобулит и интратуморни възпалителни инфилтрати. Оцв.Н&Е увел 200 х

Карциноми с обилна лимфоцитна инфилтрация ($\geq 50\%$) с локализация в стромата или интраепително, установихме в 49 случая от изследваните 97 ТНКГ(50.51%). В 12 случая (12.37%) се установи умерено количество лимфоцити(до 50%). При останалите 36 случая (37.11%) липсваха лимфоцити в тумора (фиг.10). По-голямата част от ТНКГ, имащи обилно количество от ТИЛ, са локализирани предимно в стромата на тумора-при 25/49(51.02%) и по-рядко бяха намерени с интраепителна локализация -при 24/49 (48.87%).

Патологично-образната корелация е важна и интегрална част в мултидисциплинарния подход за диагностиката на тази неоплазма. Класическите образни белези на КГ като спикули и калцификати рядко се намират при ТНКГ. Повечето от проучваните от нас случаи са представени като овална маса, с гладки очертания, без асоциирани калцификати в туморните клетки и в стромата. При скринингово мамографично изследване даже ТКНГ с големи размери могат да бъдат пропуснати, затова е препоръчително при изследване на високорисков контингент да бъдат използвани по-чувствителни методики като MRI. Поради експанзивният им начин на растеж, при ТНКГ е наложително те да бъдат оценявани в ДД план при образни находки с овални очертания като кисти, бенигнени лезии или абсцеси. В повечето от изследваните случаи на ТНКГ липсваха калцификати, локализирани в туморните клетки и в стромата, което е важен радиографски диагностичен белег.

Описаните характеристики на туморната строма и начин на растеж водят до откриване на ТНКГ в по-напреднал стадии, когато лезията стане палпируема и пациентката има изявена клинична симптоматика.

Най-чест морфологичен представител, в групата на ТНКГ се установи високостепенен инвазивен карцином с централна некроза, избутващ растеж и фиброзна пролиферация в стромата, което съвпада с литературните данни.

Централната фиброза, която е честа находка в нашето проучване е важен рисков фактор, независим от митотичния индекс. Тя се дължи на процес на организация, в зоните на некрози. В стромата на G3 карциномите по-често се установява интратуморна и перилобуларна възпалителна инфилтрация в паренхима на гърдата.

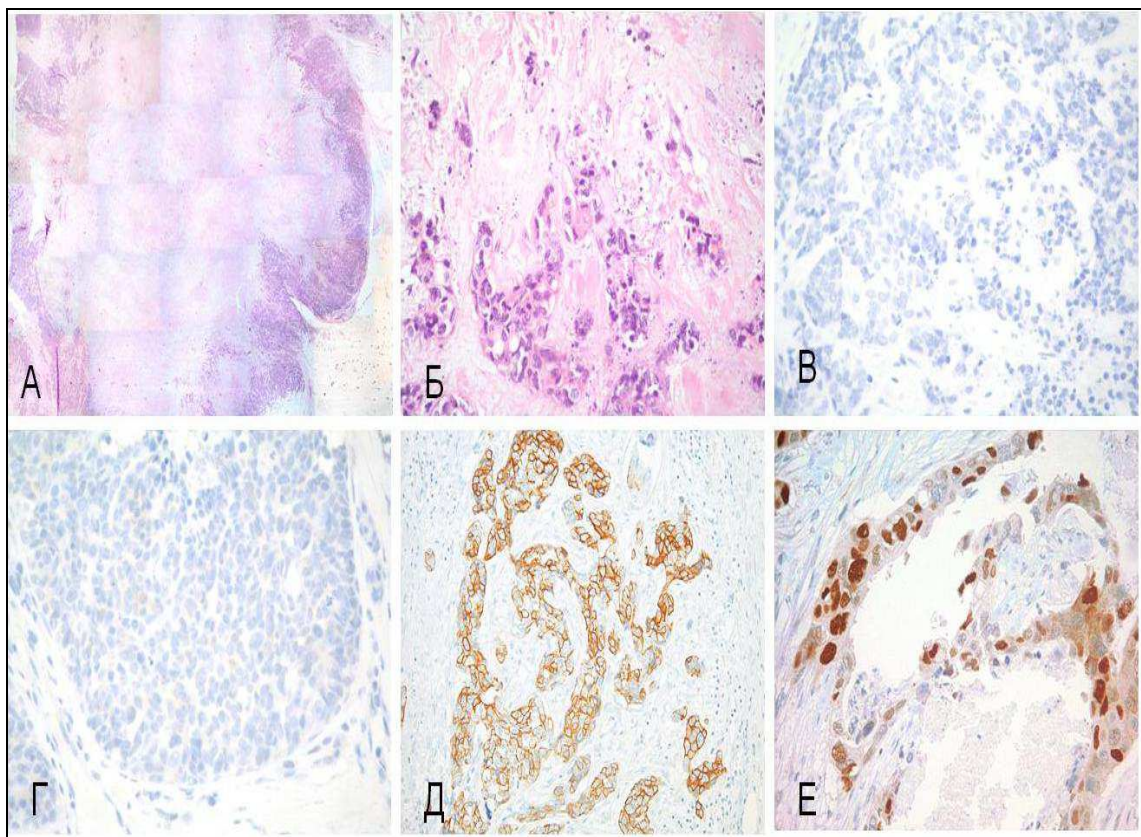
Лимфоцитната инфилтрация има потенциал да стратифицира пациентите на различни групи, в зависимост от прогнозата при ТНКГ. Най-често ТИЛ са характерни за силно пролифериращите тумори и се свързват с добър отговор към проведена адювантна и неоадювантна химиотерапия. Имуניתетът при ТНКГ е важен фактор за предвиждане на изхода на заболяването и отговорът към терапия и възможност за приложение на Т-клетъчни check-point инхибитори с цел модулиране на имунитета при ТНКГ. ТИЛ могат да бъдат и таргет за терапия и възможност за подобряване на изхода от това заболяване.

Необходимо е да се стандартизира преценката на количеството на ТИЛ на рутинно оцветяване и да приложи този показател като биомаркер за прогноза и отговор към терапия.

4.3.2. Проучване на хистопатологичната находка при инвазивни карциноми, т.нар. „специални” типове с тройно негативен фенотип

В групата на ТНКГ се намериха различни специални типове карциноми, които са обединени от тройно негативния фенотип и от това, че водещ патогенетичен път при тях не е свръхактивацията на ER и HER 2.

Специалните типове ТНКГ се намериха представени с отделни казуси, които са редки, с характерна морфологична находка, и създават ДД проблеми, в хода на диагностичния процес.



Фиг.11. А- Тумор с обширна зона на централна некроза оцв. Н&Е.(Б).Туморът е негативен за ER и HER 2 (фиг.В и Г) Д-ИХХ реакция с антитяло срещу СК 5/6, Е-ИХХ реакция с антитяло срещу Cyclin E 1. увел.400 x

• Карцином с централна некроза

Един от тези случаи е инвазивен карцином с обширна зона на централна некроза, развил се у пациентка на 45 години. Макроскопски туморът се представи като унифокална туморна формация с експанзивен растеж с размери 2.5 cm. В центъра се установи жълтеникава зона на

некроза, заемаща над 30% от площта, отговарящ на критериите за карцином с централна и преобладаваща некроза.

Хистологично тази централна, ацелуларна зона е заобиколена от жизнени, недиференцирани туморни клетки с минимална дуктална диференциация-т.е. липса на формиране на тубули, с тройно негативен фенотип-отрицателен за стероидни рецептори и HER2, с базалоиден фенотип-позитивен за EGFR и СК 5. Туморът показва и високо ниво на експресия на Cyclin E1(фиг.11).

Карциномът с централна некроза е един от най-агресивните варианти на ТНКГ и е с характерна хистологична находка, която трябва да се разпознава и отбелязва в патологичния отговор.

Друг случай на рядък морфологичен вариант в кохортата ТНКГ, който се намери е

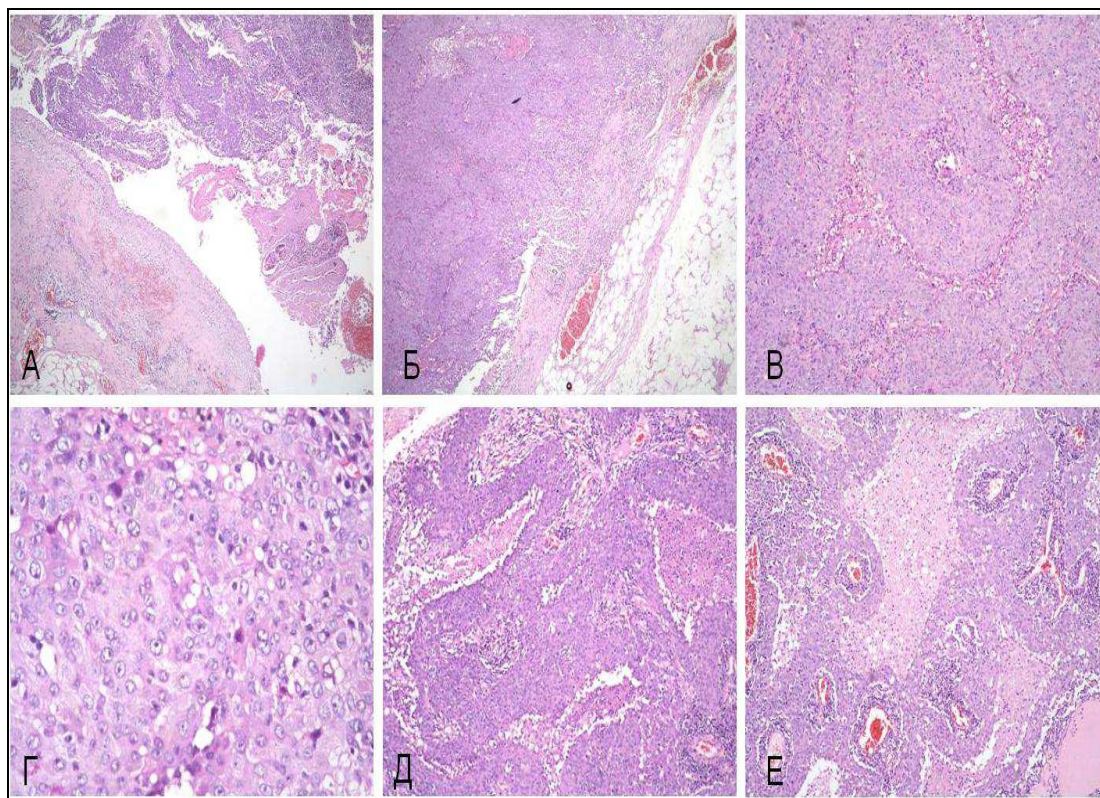
- **Инкапсулиран, солиден, папиларен, ТНКГ с базалоиден фенотип при 35 годишна, бременна пациентка**

Макроскопски туморът се представя като кистична формация с размери 4/3.5/4 см с белезникаво-розов цвят.

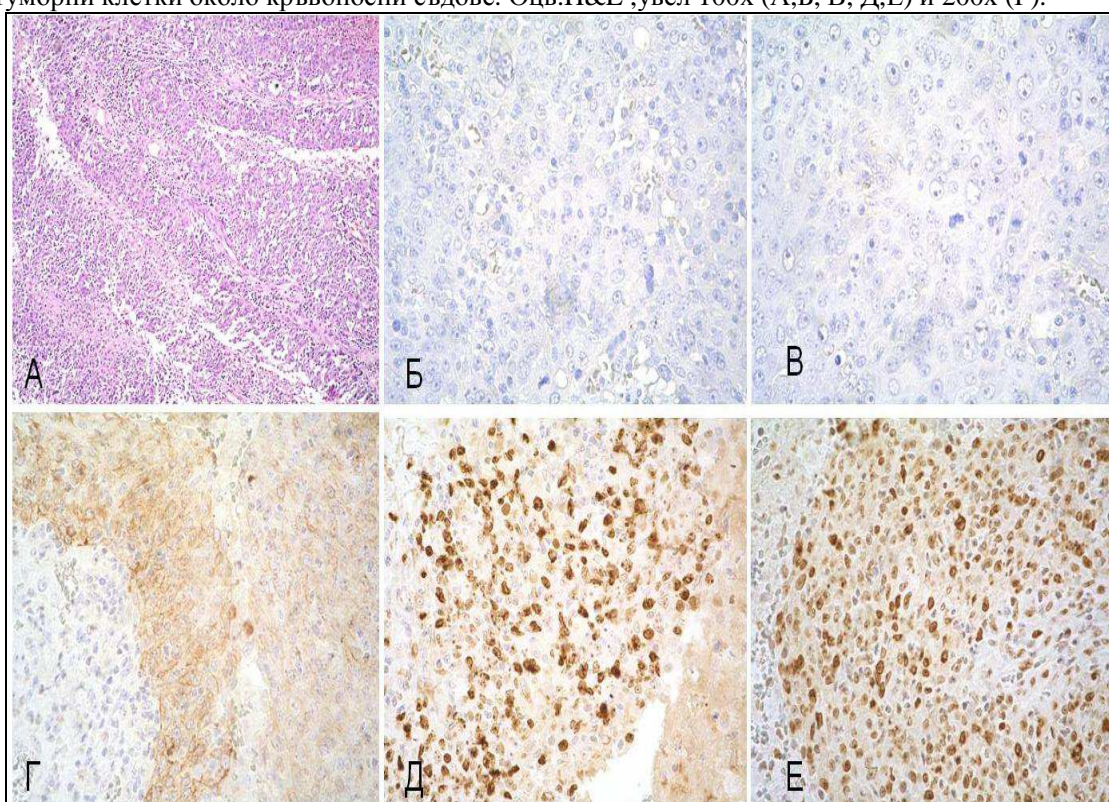
Микроскопски карциномът е разположен в кистична формация, изградена от фиброзна тъкан (фиг.14 А). Неоплазмата, локализирана в кистичното пространство, показва предимно солиден строеж с добра васкуларизация(фиг.12.В).

Различават се папиларни формации, изградени от фиброваскуларна строма и тапицирани с до 9 реда неопластичен епител. Туморните клетки в солидната зона са разположени в синцитиум, с недобра граница между тях, с овални и везикуларни ядра и лесно различими нуклеоли (фиг.12.Г). Намират се и зони с „комедо” некрози в паренхима на тумора (фиг.12.Д).

Туморните клетки са групирани предимно около кръвоносни съдове с необилна фиброзна строма (фиг.12.Е). Интратуморно, между туморните клетки се намириха пръснати лимфоцити, заемащи около 30% от площта на тумора (фиг.13 А).



Фиг.12 А-Стена от фиброзна киста с тумор в кукината с папиларен вид. оцв. Н&Е.Б-Връзка на туморните клетки със стената (Б). В-Солидна и папиларна архитектура на тумора. Г- Карцином с медуларна характеристика. Д-„Мрежовидна” архитектура, зони на комедонекрози. Е-Концентрация на туморни клетки около кръвоносни съдове. Оцв.Н&Е ,увел 100х (А,Б, В, Д,Е) и 200х (Г).



Фиг.13 А-Туморен паренхим със солиден строеж и инфилтрати от интратуморни лимфоцити (А). оцв. Н&Е,увел 200х. Б- ИХХ реакция с антитяло срещу ER. ИХХ – анти BRCA 1 (В). Г- Имунооцветяване за анти СК 5. Д-Висока пролиферативна активност на тумора-Ки-67 ИХХ реакция. Е-ИХХ реакция с антитяло срещу p53,увел. 400х

Морфологичната диагноза е инкапсулиран/интракистичен карцином, солиден папиларен вариант, G3. С методите на ИХХ около зоната на кистата не се установи оцветяване за миоепителен слой от клетки. Поради липсата на позитивност за миоепителния маркер p63, беше отхвърлена диагнозата ДКИС. Не се намериха обаче и сигурни данни за инвазивен карцином, състоящи се в инвазия на фиброзната капсула от неопластични клетки.

Поради развитието на неоплазмата в кистична формация, се прие диагнозата инкапсулиран карцином, като със сигурност се изключи ин ситу лезия. Липсата на ясна инвазия в стромата на гърдата и фиброзната капсула на лезията не позволява да се приеме концепцията, че карциномът е инвазивен. Такива случаи затрудняват патолога в рутинната ежедневна практика, с трудности в преценка на инвазията, проблеми с измерване на лезията, поради кистичните промени и невъзможност за екзактно стадиране на тумора.

ИХХ изследване с антитела срещу ER, PgR и HER 2, показва, че туморът е с тройно негативен фенотип (фиг.13Б). Направеното допълнително оцветяване за СК 5 показва неговата принадлежност към групата на базалоидните карциноми, поради позитивността за този маркер (фиг.13.Е). Туморът е с негативна ИХХ реакция за BRCA 1, позитивна за p53 и с данни за пролиферативна активност в 50% за Ki-67. Негативното имунооцветяване за BRCA 1, би могло да се свърже с липса на синтез на нормален белтъчен продукт. Причината най-вероятно е мутация в BRCA 1 гена. ИХХ реакция за p53 се намери позитивна за акумулация на патологичен мутантен протеин, което се асоциира с мутация на p53 гена.

Младата възраст на пациентката, данните за обремененост от фамилната анамнеза, тройно негативният фенотип, характерната морфология за наследствен карцином, липсата на ИХХ реакция за BRCA 1, в комбинация с имунопозитивност за p53, прави случая много вероятен за мутация на BRCA и подходящ за генетично изследване.

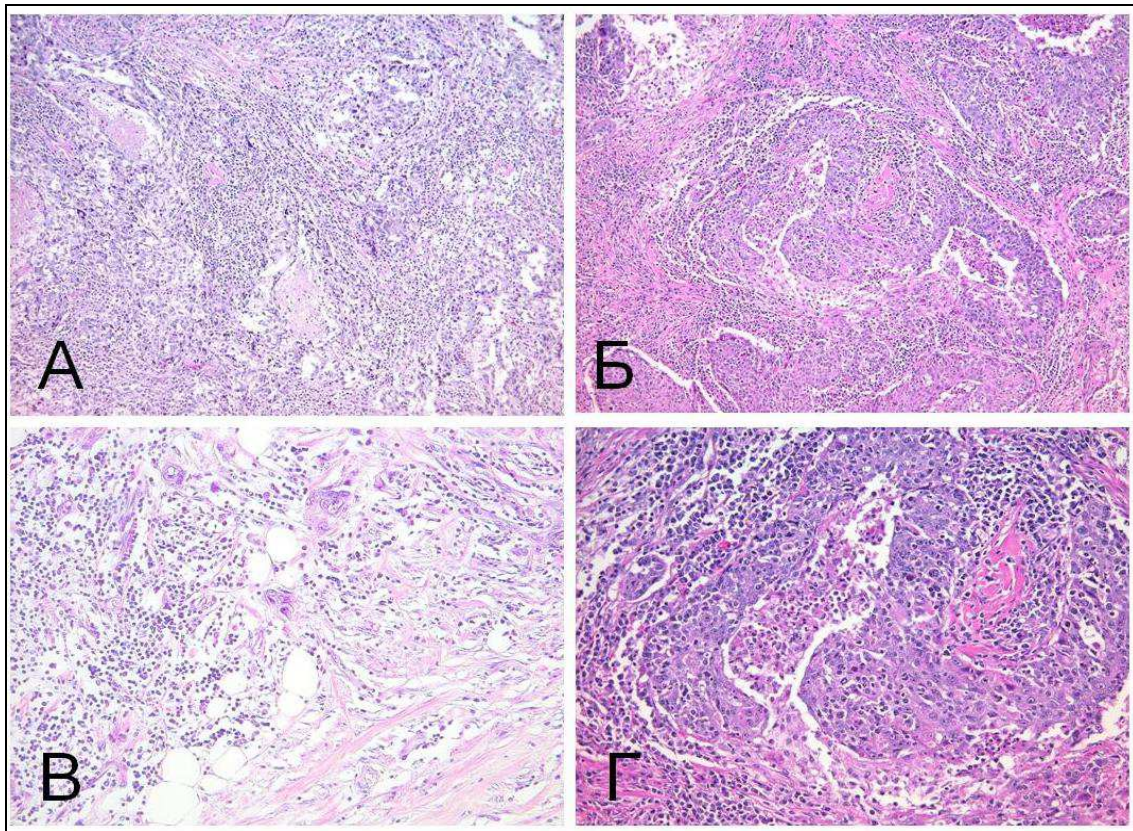
Друг интересен случай от проучваните в групата на ТНКГ е рядък вариант на папиларните неоплазми - карцином, наподобяващ tall cell вариант на папиларен карцином на щитовидната жлеза, с тройно негативен фенотип.

В тези случаи е необходимо да се прави ДД с метастаза от карцином на щитовидната жлеза.

От т.нар. специални типове карциноми в изследваната от нас група на ТНКГ доминиращ дял заемаха медуларните карциноми. Класическият медуларен карцином в 4 тоото издание на туморите на гърда на СЗО, е обединен с атипичния и инвазивните карциноми с медуларна характеристика, поради ниската репродуцируемост между патолозите. ТНКГ с типична медуларна характеристика в нашето проучване намерихме в 4 от изследваните 97 случая.

Медуларният карцином на гърдата е рядък, специфичен подвид на инвазивен карцином, който се среща в по-малко от 1% от инвазивните карциноми и се характеризира с определена макроскопска и хистологична характеристика. От клинична гледна точка неговото разпознаване е значимо, тъй като той има относително добра прогноза и при липса на метастази в л. в. пациентите могат да останат без последващо адювантно лечение.

В нашето проучване всички карциноми, които не отговаряха на стриктните критерии за поставяне на диагноза типичен медуларен карцином бяха поставени в групата на инвазивните карциноми, NST с медуларна характеристика и изразена лимфоцитна инфилтрация, които наброяват 12 и превишават честота на типичния медуларен карцином трикратно - фиг.14.



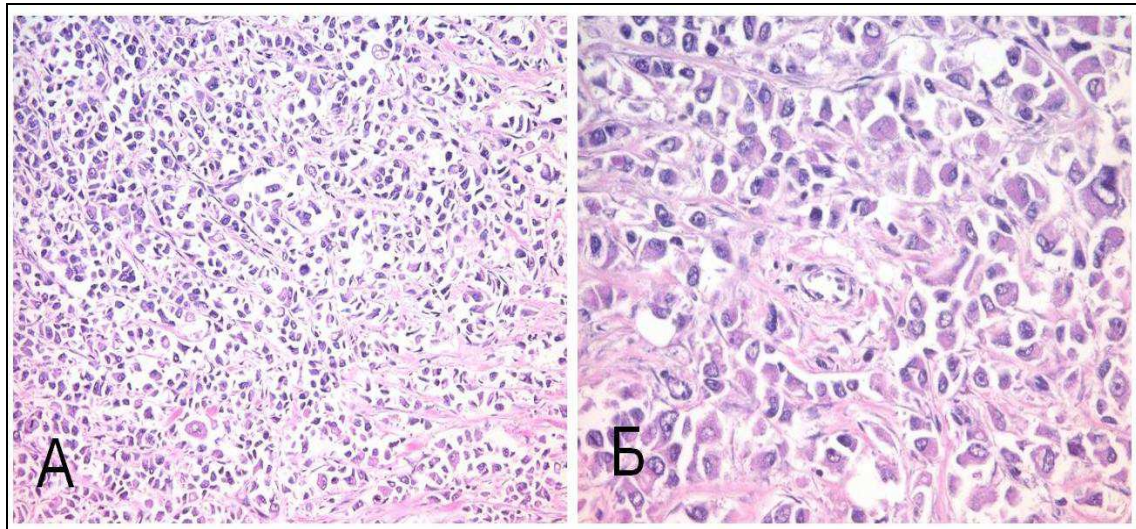
Фиг.14 А, Б, В, Г Инвазивни карциноми, NST, G3, с медуларна характеристика, изразена инфилтрация с лимфоцити.Карциномите са с ниска диференциация, проминентни нуклеоли, но показват инфилтративен растеж и не покриват критериите за типичен медуларен карцином. Оцв.Н&Е.увел 200х

- **Инвазивни лобуларни карцином с тройно негативен фенотип**

В нашето проучване с тройно негативен фенотип се установиха само 2 лобуларни карцинома. Морфологично единият е с характеристика на плеоморфен ЛК. Туморите са изградени от дискохезивни клетки в

солидни повлекла. За разлика от класическия вариант на ИЛК неоплазмите показва по-изразена целуларност, солиден начин на растеж и клетъчен атипизъм. Ядрата на туморните клетки са по-големи и показват по-изразени вариации.

Имунопрофилът на туморите включват тройно негативен фенотип и негативност за e-cadherin и показват обилна, еозинофилна цитоплазма в клетки, сходни с рабдомиобласти или такива с хистиоцитна морфология (фиг.15).



Фиг.15. Плеоморфен лобуларен карцином, оцв.Н&Е.Дискохезивни плеоморфни клетки (А) с ядрен полиморфизъм; клетки подобни на рабдомиобласти (Б) оцв.Н&Е. увел.200x

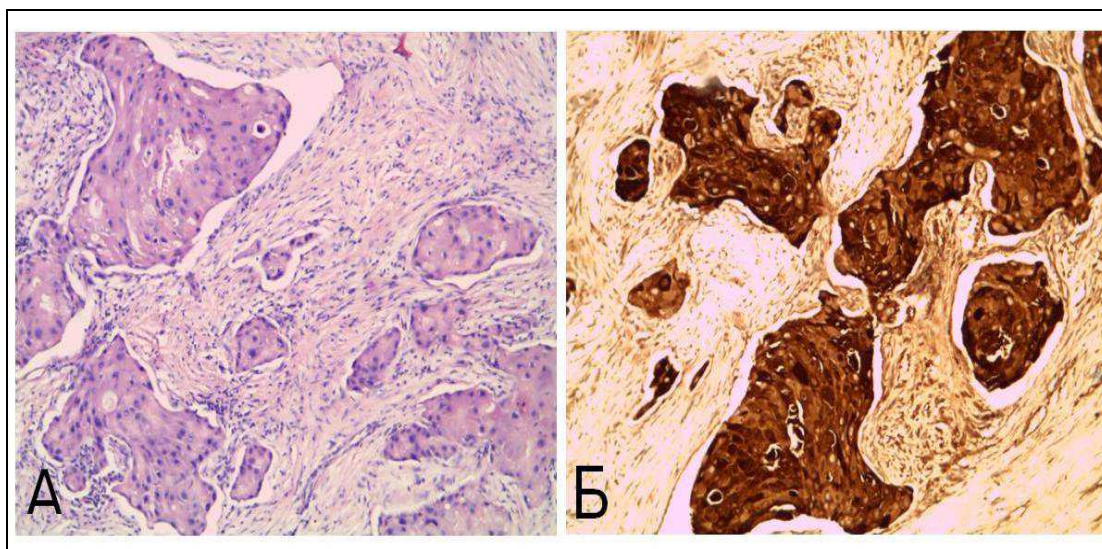
Вторият ИЛК е с морфологична характеристика на алвеоларен ЛК и с данни за апокринна морфология. Цитоплазмата е обилна и еозинофилна, леко гранулирана или светла. Ядрата са хиперхромни с изразена анизокариоза. При оцветяване за базални цитокератини и двата лобуларни карциноми се намериха негативни за СК5 и позитивни за AR, което ги поставя в групата на не-базалоидните ТНКГ.

В диагностичен план случаите на ИЛК, когато те принадлежат към групата на ТНКГ помага негативното имунооцветяване за e-cadherin. Тройно негативните ИЛК показват различна морфологична находка, в сравнение с класическите варианти на ЛК, които в 98% са позитивни за ER. На първо място те са със солидна, алвеоларна архитектура и не показват класическо подреждане в корди.

Тройно негативните ИЛК са с по-ниска степен на диференциация в сравнение с ИЛК, които най-често са от групата на Луминалните А тумори. Плеоморфният ИЛК е агресивен тумор с изразена склонност към рецидиви и по тази причина е необходимо е да се познават добре критериите за неговата точна морфологична диагностика.

- **Апокринен карцином**

Класически морфологичен вид на апокринен карцином се установи при 3 случая. Двата се намериха с морфология на дуктален и един-с характеристика на лобуларен карцином, негативен за e-cadherin. Хистопатологично при тези тумори се намери класическа апокринна морфология-изразена, обилна еозинофилна цитоплазма с апикални протрузии, грануларност и характерни големи и овални ядра с проминентни нуклеоли. ИХХ позитивност за GCDFP-15 и AR се намери и при трите случая на апокринен карцином-фиг.16.



Фиг.16. Морфология на апокринен карцином.А- Н&Е оцветяване, увел 200х Б-имунохистохимична реакция с антияло срещу GCDFP-15. увел. 200х.

Поради еозинофилната цитоплазма при апокринният карцином се налага да се прави ДД с грануларно-клетъчен тумор и ИХХ изследване за цитокератини и S-100 протеин помага в тази насока. В ДД аспект може да се мисли и за онкоцитен карцином, който е рядка находка в гърдата. Имунната реакция с антияло срещу GCDFP-15 при този вид карцином обаче е негативна. Друг специален тип на ТНКГ, наблюдаван в нашата група, е случай на секреторен или ювенилен карцином, който е нискостепенна неоплазма с добра прогноза.

- **Метапластични ТНКГ**

От групата на изследваните ТНКГ, метапластичен морфологичен фенотип показаха общо 12 случая. От тях най-често срещан морфологичен тип се оказа източеноклетъчният морфологичен вариант.

Източеноклетъчните карциноми, които преобладаваха в популацията от метапластични тумори, морфологично показваха дифузен

строеж, напомнящ на сарком. Туморите са изградени от атипични източени клетки, подредени в различни архитектурни модели като дифузен строеж, тип „рибена кост”, с подреждане на клетките като колело на каруца, напомнящ дерматофибросаркома протуберанс или най-често демонстрирайки смесени модели на строеж.

Цитоплазмата е светла или базофилна. Високостепенните метапластични карциноми макроскопски се характеризираха със зони на некрози и кръвоизливи (фиг. 17).

Хистологичната находка включва солидна туморна архитектура от преплитачи се източени клетъчни елементи с умерен полиморфизъм.

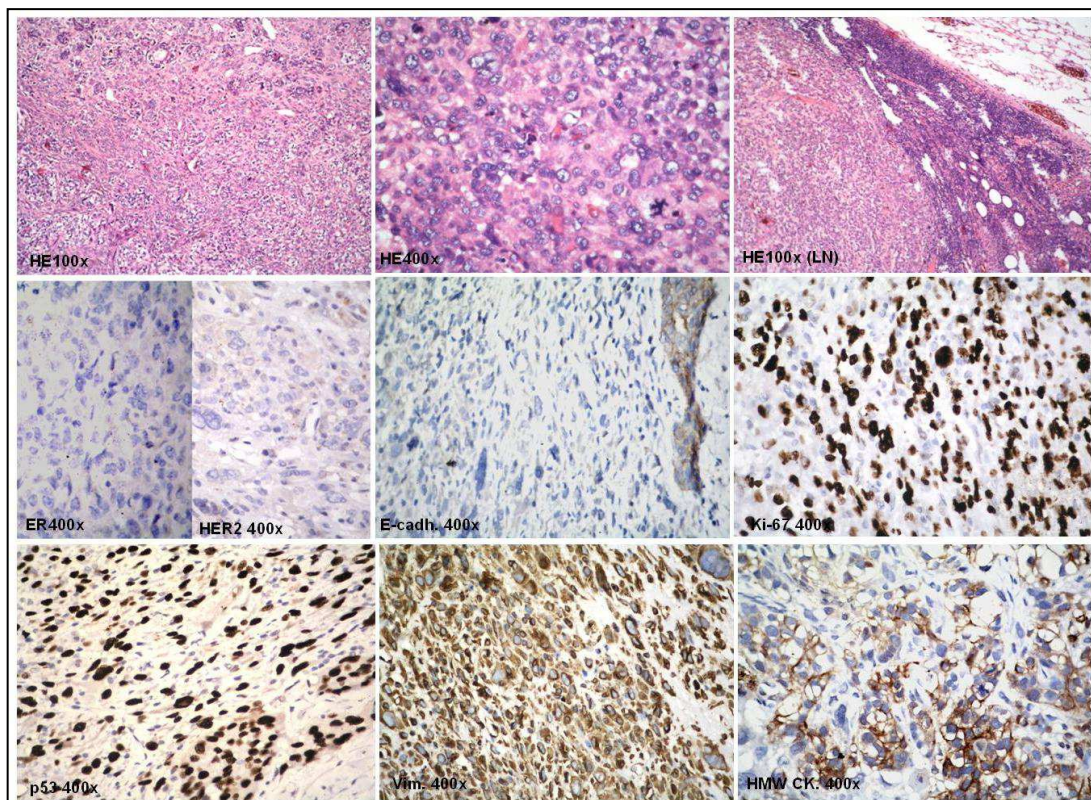
Попада се на множество митотични фигури, някои от които патологични (фиг.21). ИХХ тези тумори показват негативност за СК AE1/AE3 и позитивност за Vimentin (фиг.18).

Другите имунооцветявания от фенотипа на тумора са негативност за ER, PgR, HER 2, e-cadherin, и позитивност за p53 протеина (фиг.18).



Фиг.17. Макроскопски вид на high grade, метапластичен, източеноклетъчен карцином с тройно негативен фенотип, развил се на фона на сенилна, мастна инволюция на гърдата.

Случаите след направените ИХХ оцветявания са приети за метапластичен, високостепенен, съставен предимно от източени клетки карцином, с епително-мезенхимна трансдиференциация (ЕМТ).



Фиг.18. Основен тумор оцв.Н&Е,увел.100х -,увел. 100х, Среда горе- HE-основен тумор,увел 400х клетките са с източеноклетъчна морфология и овални ядра.Горе дясно-Метастаза от карцинома в лимфен възел, оцв HE, увел.100х, Среда ляво -негативно имунно оцветяване за ER увел.400х и -HER 2 увел.400х, среда - негативна имунна реакция за e-cadherin.среда дясно -висока пролиферативна активност на тумора за Ki-67-индекс 85%. Долу ляво-позитивна реакция за p53. увел.400х.среда долу -Туморните клетки са дифузно позитивни за Vimentin, увел.400х. Долу дясно-позитивно имунооцветяване за цитокератин тип HMW СК. увел 400х

EMT е морфологичен феномен, в основата на който стоят генетични промени, обуславящи променената морфология. При голяма част от ТНКТ двата тумор-супресорни гена Rb 1 и p53 са инактивирани. Rb 1 загубва способността за активация на 'клетъчно остаряване' и алтернативно активира клетъчна пролиферация, в условия на генетично нестабилни тумори. Загубата на pRb нарушава експресията на гена, отговорен за клетъчната адхезия -E-Cadherin. Нарушената функция на pRb и p53 увеличава клетъчната пролиферация и резултира морфологично в индуциране на EMT. Хетероложната трансдиференциация в гореописаните случаи е доказателство за способността на туморния епител за фенотипна пластичност.

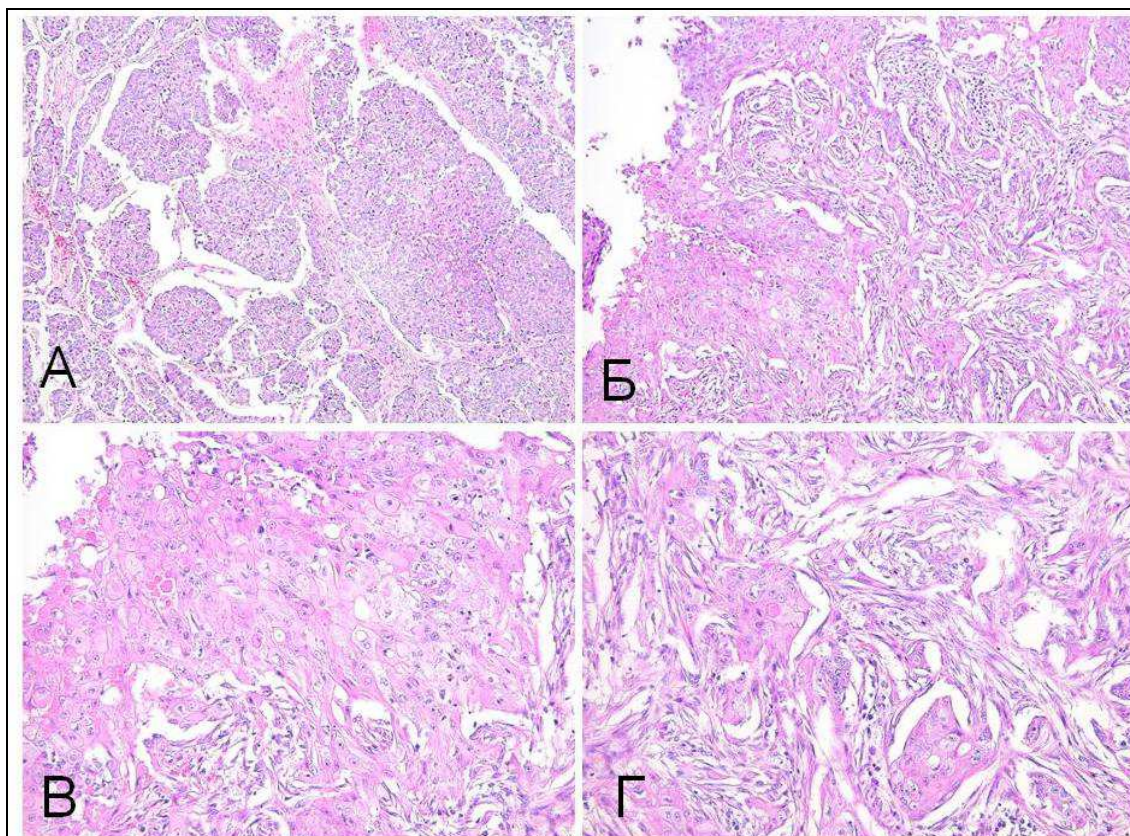
Следователно, морфологичният фенотип не отразява хистогенезата, а процеса на дедиференциация, развиващ се в късен етап на генерализация на неопластичната лезия.

Метапластичният карцином показва негативно имунооцветяване за повече от рутинно използваните цитокератини. Най-чувствителният маркер, който показва епителната природа при метапластичния карцином,

представящ се морфологично като сарком в нашия случай, се оказа HMW-CK- 903.

За да се постави със сигурност диагноза метапластичен източено-клетъчен карцином и да се направи точна ДД със сарком, трябва да се направи щателно изследване на различни зони от тумора и панел от СК и ЕМА. Доказателство за епителната природа на тумора е и разпространението му в регионалните л. в.

Към високостепенните карциноми от групата на метапластичните принадлежи и плоскоклетъчен карцином, при който се налага да се прави ДД с метастаза от такава неоплазма в гърда. В нашето проучване установихме 2 плоскоклетъчни карцинома. И двата демонстрираха белези на кератинизация, което улеснява диагнозата. Туморните клетки се намериха пролиферирали около малки, кистични пространства с морфологични данни за кератинизация - фиг.19 Г.



Фиг.19. Метапластичен плоскоклетъчен карцином на гърдата – А ,Б - Кистични пространства, около които се разполагат туморните клетки, оцв. Н&Е,увел 100х В, Г – Зони на кератинизация в тумора- В и Г.оцв.Н&Е,увел 100х Зоните на кератинизация се представят от типични, големи еозинофилни клетки с формиране на т.нар. „ракови перли”(фиг.60 Г,61,62)

Други „специални” типове карциноми, които се намериха в групата на ТНКГ са два случая на метапластичен карцином с формиране на хондроиден матрикс. При матрикс-продуциращите карциноми с хондроиден матрикс, последният е вискозен и това обуславя нодуларния характер на лезията и експанзивният ѝ растеж. Хондроитин сулфатът и

киселите глюкозаминогликани са основни компоненти на този матрикс и обуславят базофилията като характерна оцветителна находка.

Рядко са описани нискостепенни, G1 ТНКГ. В нашето проучване, вероятно поради неголемият общ брой на изследваните случаи, преобладаваха предимно high grade вариантите на метапластичните карциноми, които са с по-голяма честота в групата с тройно негативен фенотип.

Най-чест в нашето проучване се оказва източеноклетъчният вариант на метапластичния карцином с тройно негативен фенотип.

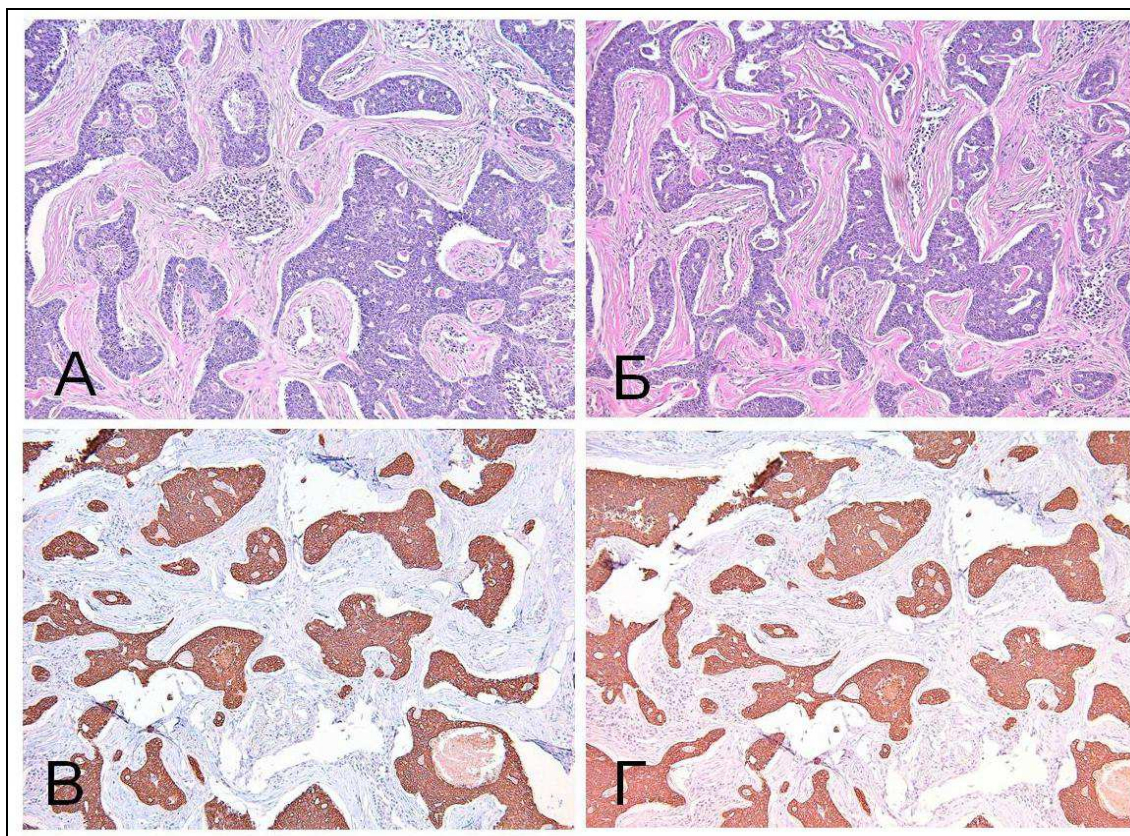
Често този тип се представя като нискостепенен сарком, представен от недобре кохезивни повлекла от клетки с източен вид, създаващи ДД проблеми.

- **Аденоидно-кистични карциноми (АКК)**

В серията от 97 карцинома с тройно негативен фенотип, се установиха и два аденоидно-кистични карцинома. Морфологично се представят с инвазивни карциноми, съставени от относително униформена популация от малки клетки с базофилна цитоплазма и пролифериращи жлези- адено-компонента, псевдожлезиста, цилиндроматозна компонента и зони с изразена продукция на базално-мембранен материал.

Повече от 30% от тумора са със солидна архитектура и базалоидно подреждане в периферията на гнездата. Между епителната компонента се намира отложен ацелуларен, еозинофилен материал, подобен на базална мембрана. Не се откри ин ситу компонента и в двата случая.

АКК карцином е епимиепителиална туморна лезия, изградена предимно от миепителиални клетки или по-точно от клетки, показващи предимно миепителиална диференциация. И двата случая на АКК показаха базален фенотип-позитивни за CK5 и EGFR (фиг.20).

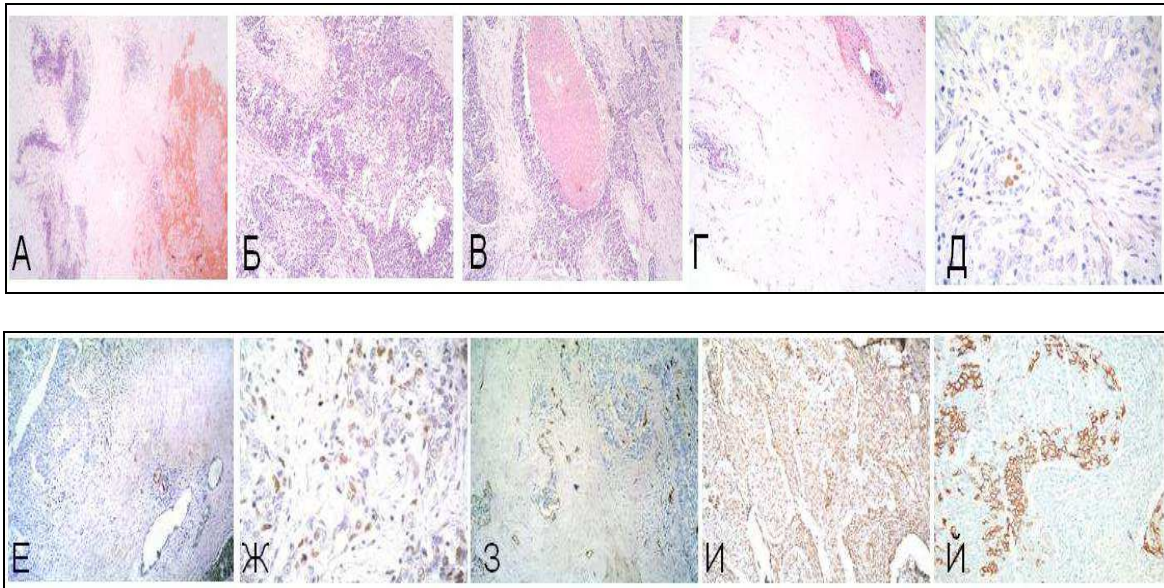


Фиг.20. АКК. А и Б-изразено отлагане на базалноподобен материал в стромата оцв.Н&Е, увел. 200x; В-имунооцветяване за СК5 и EGFR.увел. 200x

• Миоепителни карциноми с тройно негативен фенотип

Два от изследваните от нас карциноми с тройно негативен фенотип, бяха с миоепителна морфологична и ИХХ характеристика. Туморите се състояха от пролиферирали епителоидни и източени клетки и зони на кръвоизливи (фиг.21А) които се разполагаха огнищно (фиг.21.Б), показвайки гнезден строеж около кръвоносни съдове, със зони на некроза (фиг.21.В). В единия от случаите се намериха участъци с инвазия на туморни клетки в кръвоносни съдове-ангиоинвазиен растеж (фиг.21.Г).

Туморът е негативен за ER (фиг.24.Д) и PgR (фиг.21.Е) при позитивни вътрешни контроли. Имунопрофилът на тумора включваше позитивност за СК AE1/AE3, p63 (фиг.21.Ж), негативност за CD34 (фиг.21.З) дифузна, умерена имунопозитивност в цитоплазмата на туморните клетки за α -SMA и позитивност за СК 5 (фиг.21.И и Й).



Фиг.21. Миоепителен карцином с тройно негативен фенотип А- зони на кръвоизливи, Б-огнищно разположение на епителоидни и източени клетки, В-зони на некроза, Г-ангиоинвазивен растеж, Д-Негативен ER, Е-PgR, Ж-имунопозитивност за p63, З-негативна ИХХ реакция за CD 34, И-позитивност за α -SMA, Й - позитивност за СК 5. увел.100

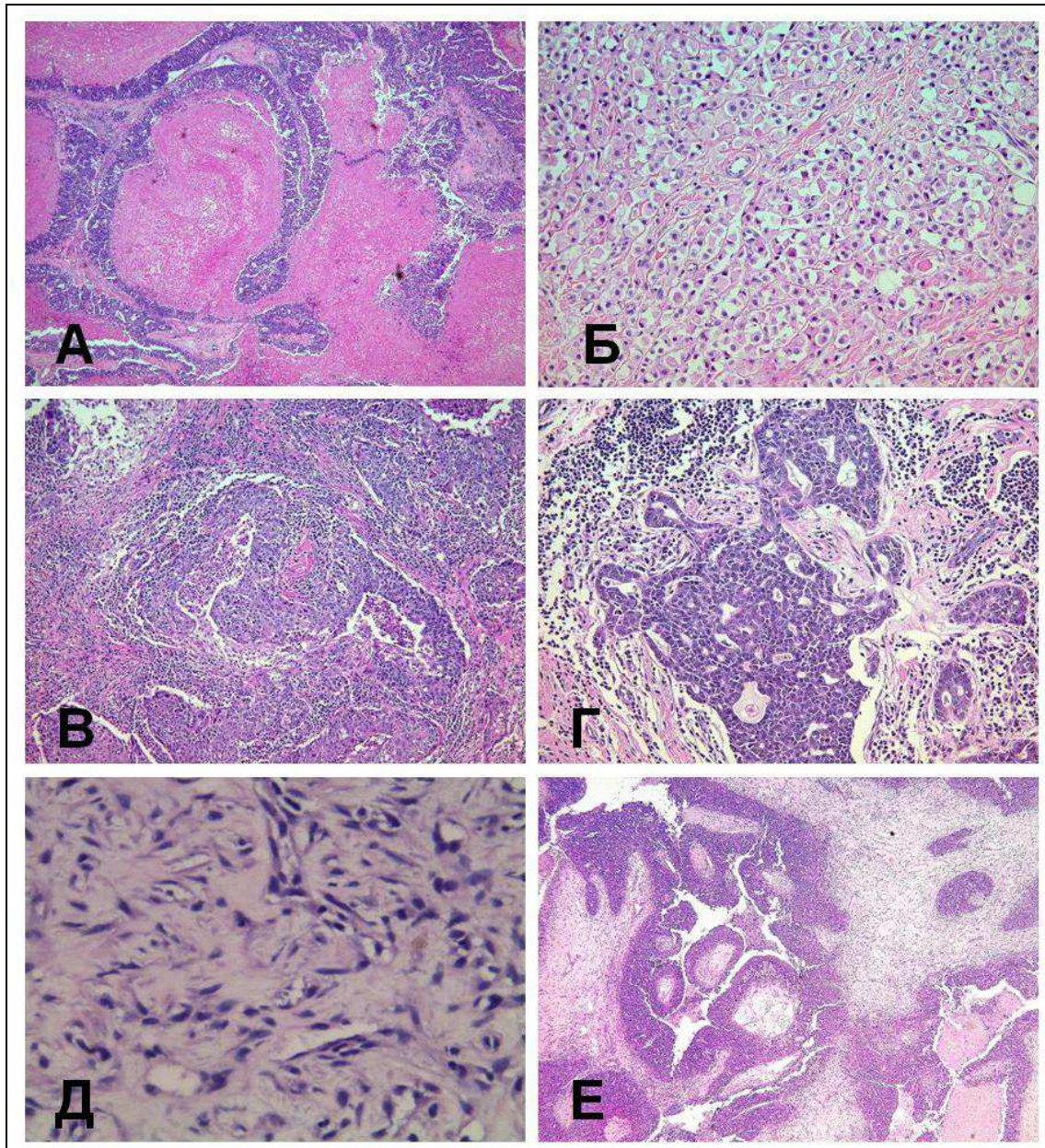
• Невроендокринен карцином с тройно негативен фенотип

Друг тумор от специалните типове с макроскопски експанзивен растеж в групата на ТНКГ за изследвания период се установи един невроендокринен карцином на гърдата. Хистологичната находка показва ограничен тип растеж на тумора, солидна и трабекуларна архитектура с псевдожлезисти формации и тенденция за периферна палисадност и формиране на розети. Около 80% от туморните клетки са позитивни за Chg A, което подкрепи диагнозата невроендокринен карцином. Няма приети критерии за градиране на карциномите на гърдата-т.е. дали грейдинга се формира от пропорцията на ендокринни структури, архитектурата на тумора, ядрения полиморфизъм и брой митози. Според СЗО, карциномите с невроендокринна диференциация са по-малко от 1%. Според 4-тото издание на СЗО невроендокринна диференциация, като позитивност дефинирана хистохимично или ИХХ достига до 30% от инвазивните карциноми и по-често се среща при муцинозен В-тип карцином-хиперцелуларен вариант.

До момента с представянето на толкова морфологично разнообразни варианти в групата на ТНКГ демонстрирахме интертуморната хетерогенност при тези неоплазми. Освен чистите ТНКГ в проучваните случаи се намери и хетерогенен тумор с преобладаващ ТНКГ, в съчетание с карцином с луминална диференциация.

В заключение ТНКГ са тумори, които се характеризират с интертуморен и интратуморен хетерогенитет. Цитологично ТНКГ са

изградени от клетки с източена, фокално плеоморфна или базална морфология и зони на сквамозна метаплазия, синцитиален начин на архитектурен строеж и клетки с изразена, понякога еозинофилна цитоплазма. На следващата фигура се демонстрира интертуморния морфологичен хетерогенитет (фиг.22).



Фиг.22.А-Инвазивен карцином, NST, G3, мрежеста структура. Б-Инвазивен лобуларен карцином, плеоморфен вариант, В- Инвазивен дуктален карцином, NST, G3 с медуларна характеристика, Г- Аденоиднокистичен карцином с формиране на псевдолумени, Д-Метапластичен, вретеновиден карцином, Е- Инвазивен папиларен карцином оцв.Н&Е, увел.200 х

Освен инвазивните, високостепенни дуктални NST карциноми, в нашето проучване се установиха и други морфологични видове ТНКТ от т.нар. специални типове карциноми. Такива са медуларните карциноми, метапластичните карциноми секреторен, АКК и папиларен карцином,

сходен с този на щитовидна жлеза, миепителиални карциноми, които показват базалоиден имунофенотип.

Инвазивните лобуларни карциноми също могат да експресират високомолекулярни СК, но по-често са негативни за тях, както ИЛК в нашето проучване, без да има убедителни данни, че на транскриптомно ниво принадлежат към групата на базалоидните неоплазми.

4.4. Проучване на честотата и видовете преканцерозни лезии в групата на ТНКГ

4.4.1. Ин ситу карциноми и атипична дуктална хиперплазия

В проучваните от нас 97 случая на инвазивни карциноми на гърдата с тройно негативен имунофенотип, само в 10 случая се установиха ин ситу карциноми (10.3%). Всичките ин ситу лезии се установиха от дуктален тип. При нито един от определените като ИЛК, не се установи ин ситу компонента.

Седем от ДКИС бяха със солидна морфология - 4 G2 и три G3. Останалите три бяха определени като комедо варианти на ДКИС -два G2 и един G 3. При един от метапластичните карциноми - източеноклетъчен вариант се намери атипична дуктална хиперплазия. За разлика от ДКИС лезията се намери локализирана само в един канал и поради нейната ограниченост беше преценена като ADH/DIN 2.

Друг тип намерена преканцероза в групата на ТНКГ е плоската епителна атипия-при 11 случая (14.28%).

По литературни данни истинска преканцероза на ТНКГ е микрогландуларната аденоза. В серията от проучените ТНКГ установихме два случая с микрогландуларна аденоза, съчетани с тумор и един случай на микрогландуларна аденоза, атипична микрогландуларна аденоза и ТНКГ. Поради рядкостта на лезията и диагностичните проблеми, която тя може да създаде, трябва да се има предвид и да се търси активно и при установяване да се отбелязва в отговора на биопсията.

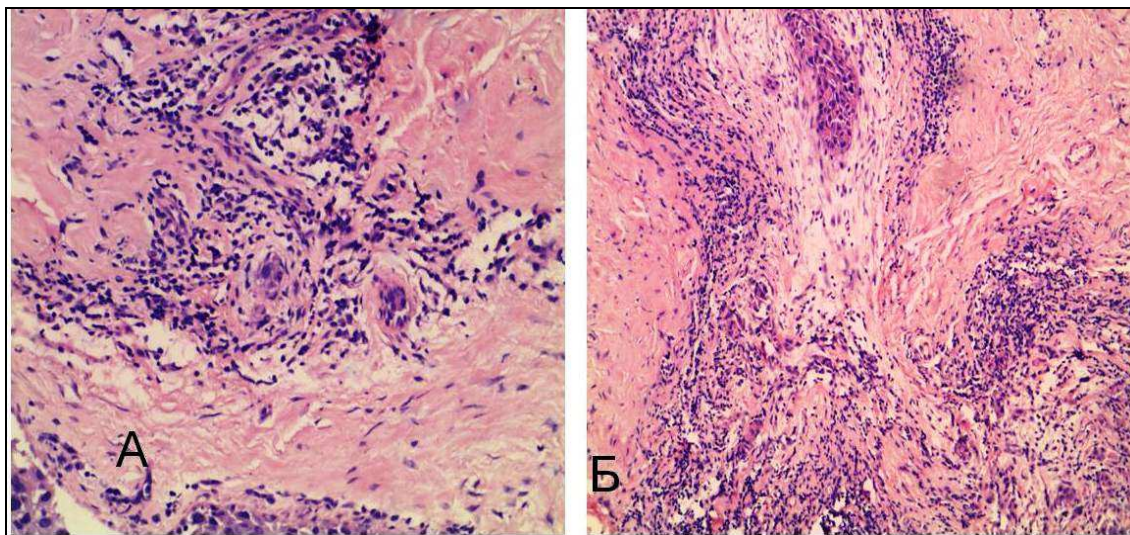
4.5. Проучване на промяната в нетуморната тъкан при ТНКГ и морфологични аспекти на прогресията на ТНКГ

4.5.1. Промени в съседната и не-неопластичната тъкан при ТНКГ

От изследваните 97 случая на пациентки с ТНКГ данни за лобулит се намериха при 19 (19,58%) пациентки. Това възпаление е представено най-често в ТДЛЕ и в съседни на карцинома и ин ситу лезиите тъкани и се състои от зрели лимфоцити и единични плазматични клетки. Лобулитът

се намери по-често асоцииран с карциноми с медуларна морфология, в които се регистрира и изразена стромна реакция от лимфоцити.

Освен данните за възпаление в не-неопластичната тъкан се установи и фиброзиране в стромата при 37 случая от ТНКГ (38.14%)-фиг.23.



Фиг.23.Хронично възпаление, състоящо се предимно от лимфоцити в периферията на тумора в лобули и ТДЛЕ, фиброза в стромата. оцв.Н&Е, увел 200 х

Възпаление в лобулитите от Т клетъчен тип в не-неопластичната тъкан, в близост до *in situ* или инвазивните карциноми, или в паренхимата на гърдата са намерени при направени профилактични мастектомии, при пациенти с доказан висок риск за наследствен карцином. Наследственият карцином на гърдата с мутация в *BRCA 1* гена, по-често се асоциира с медуларна морфология.

Според литературните данни лобулитът може да се разглежда като маркер за наследствен, базалоиден КГ. При находка лобулит от Т клетъчен тип и без клинични и морфологични данни за диабетна мастопатия в гърдата (приличащи на келоид промени във фиброзната строма) за случаи с неизвестна фамилна история, се препоръчва генетична консултация.

4.5.2. Морфологични аспекти на прогресията на ТНКГ

От описаните случаи с ТНКГ преобладават тези с локални рецидиви (при 19 случая -19.58%) и висцерални метастази - при 20 случая-20.61%). Не при всички морфологично изследвани пациентки обаче, разполагахме с данни относно хода на заболяването и регистрираните събития като локални и/или далечни рецидиви.

Клиничното поведение при метастази от ТНКГ и метакронен карцином на някой от висцералните органи е различно. Поради това, че

ТНKG и в частност базалните карциноми са нискодиференцирани тумори, тяхната клинична и морфологична проява в случай на метастазиране във висцералните органи създава сериозни ДД проблеми и те могат да бъдат възприети като нискодиференциран карцином с първична локализация в съответния орган.

За морфологично потвърждаване на метастаза от KG се препоръчва използването на панел от биомаркери. Обичайно имунофенотипът, характерен за KG включва позитивност за CK7, GCDFP15, Mammaglobin, AR, ER и липса на експресия за CK20, TTF-1 и WT1. При анализираният от нас метастатични случаи ИХХ панел, препоръчван за верификация на първичните KG се оказва неефективен, поради факта, че липсва експресия за CK7; CK20; GCDFP-15, Mammaglobin, ER, PgR и HER 2. При ТНKG, панелът включващ негативност за ER и HER2, позитивност за CK 5/6, и EGFR, може да бъде разширен с други базални маркери като CK 14, CK 17, Cav- 1, 2 и p-cadherin.

Практически полезно при разграничаване на висцерални метастази от ТНKG и първични тумори, се оказва съчетаването на стандартния ИХХ панел за гърда с разширен панел за базални карциноми.

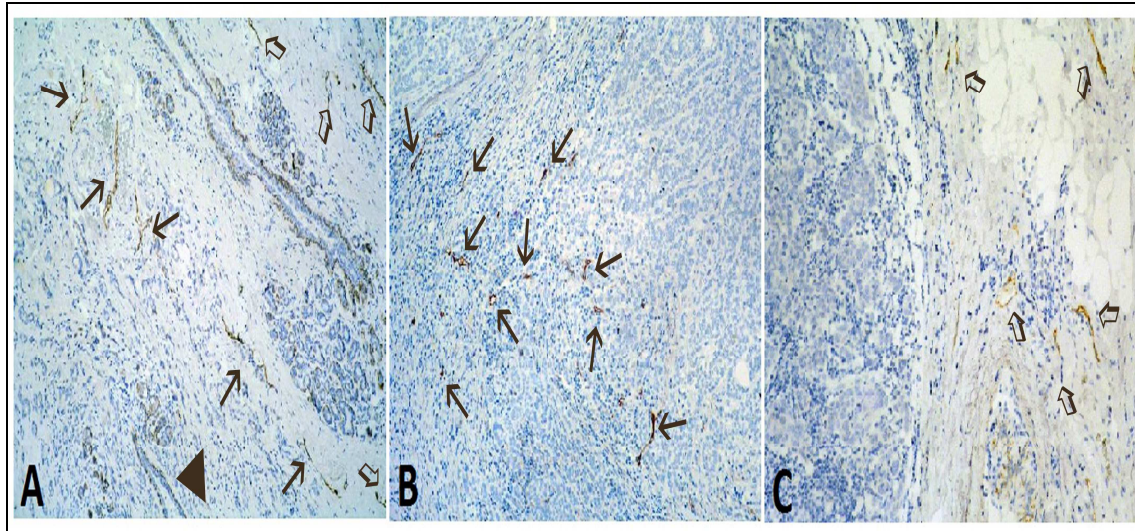
От особена важност е информацията от анамнезата и възможността за съпоставяне на морфологията и експресията на ИХХ маркери в първичния тумор и подозираната метастаза. Макар и затруднено, разграничаването на метастазите от базален карцином на гърда от първични тумори със съответна локализация е възможно, на базата на подробен анализ на клиничните данни, данните от анамнезата, проведена образна диагностика, както и задължителен, обстоен преглед на предходни биопсични материали от първичния мамарен карцином и предполагаемите рецидиви и метастази, както и използването на широк диференциално-диагностичен ИХХ панел от маркери за гърда.

4.6. Проучване на лимфносъдовата васкуларизация на първичния тумор при ТНKG и контролната група

От всичките 179 изследвани пациентки, преобладаващи- 90 (50.3%) се намериха силно позитивни за експресия на хормонални рецептори и негативни за HER 2, с пролиферативна активност под 15% за Ki-67 и бяха определени като Луминален А тип, 18 (10%) като Луминален Б тип, за които е характерно по-висока пролиферативна активност (Ki-67 над 15%) и по-ниски нива на експресия на стероидни хормони (PgR под 20%), негативен или позитивен HER 2 статус. Тридесет и шест (20%) бяха определени като HER 2 свръхекспресиращ и 35(19%) като ТНKG.

Проучването на лимфните съдове установи, че интратуморните лимфатици се намериха локализиращи предимно във външната 1/3 от KG, показващи предимно инфилтративен модел на растеж. Такива се

установиха от групата на Луминални А, Луминални Б и HER 2 свръхекспресиращи типове карциноми. Туморите с експанзивен туморен растеж, каквито се намериха при повечето от ТНКГ се установиха с оскъдно количество на интратуморно локализиращи лимфни съдове (фиг.24).



Фиг.24.А) Луминален А тип КГ– наблюдава се предимно инфилтративен тип на растеж и прорастване около дукту-лобуларни единици (глави на стрелки) и около колабирани лимфни съдове (стрелки). Лимфните съдове в туморната периферия са запазени, неразличими по размер и морфология от нормалните лимфни съдове (контурирани стрелки) D2-40, 100x; В) HER2 свръхекспресиращ карцином с инфилтративен тип на растеж. Лимфните съдове са локализиращи в туморната периферия (стрелки). Голяма част от тези лимфни съдове изглеждат по-малки от нормалните. ИХХ реакция за D2-40; 100x; С) ТНКГ–с експанзивен тип на растеж. В тумора не се откриват лимфни съдове. Перитуморните лимфни съдове са означени с контурирани стрелки D2-40; 100x

Лимфните съдове, разположени предимно в паренхимата на тумора са приплеснати, докато тези, локализиращи перитуморно са с нормална морфология или дилатирани. В 44 от случаите (25%), в лимфните съдове се установиха туморни емболи. В няколко от случаите ЛСИ беше наблюдавана във фронта на туморната инвазия. При изследването на интратуморната лимфносъдова плътност (ИТЛСП) при отделните субтипове на рак на гърдата се установиха значими разлики във васкуляризацията между Луминален А и HER2 типове, Луминален Б и HER2, както и между HER2 и ТНКГ. Интратуморната относителна лимфносъдова площ (ИТЛСП) демонстрира сигнификантни разлики при сравняването на Луминален А и HER2; Луминален Б и HER2. При останалите типове, включващ ТНКГ, разликите не се намериха статистически значими.

Перитуморната лимфносъдова плътност (ПТЛСП) не показва статистически значими разлики между изследваните субтипове на КГ.

Най-изразена вътретуморна лимфоваскуларна плътност се установи, при HER2 свръхекспресиращи тумори, която е значително по-висока от тази при ТНКГ и Луминалните А и Б типове. Липсва разлика в стойностите на ПТЛСП при ТНКГ, сравнена с другите отделните типове карциноми на гърдата.

Намаленият риск за аксиларни метастази, най-вероятно е следствие от предимно избутващия модел на растеж при повечето от тройно-негативните карциноми. Избутвайки и притискайки нормалните перитуморни тъкани, ТНКГ могат евентуално да доведат до колапс на нормалните лимфни съдове, заедно с интерлобуларната строма.

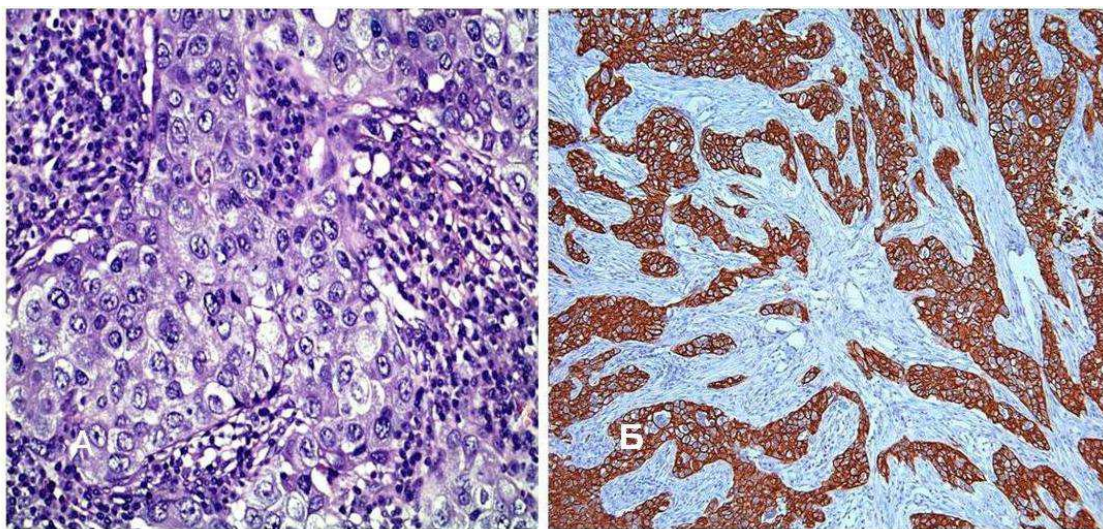
Резултатите от проучването са в потвърждение на теорията, че процесът на туморно метастазиране не е просто механичен транспорт на туморни клетки, а сложен многоетапен процес, зависещ от активността на молекулярните сигнални пътища и съдовата функционалност.

Независимо от лошата прогноза пациентите с ТНКГ имат намален риск за метастазиране в аксиларните л. в.

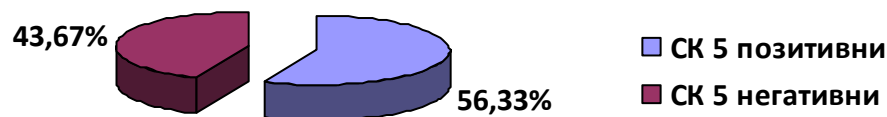
4.7. Проучване на имунофенотипа на ТНКГ в зависимост от моделите на експресия на цитокератини, базални биомаркери и маркери за мезенхимна и миоепителна диференциация

4.7.1. Експресия на базален СК 5 в проучваната група ТНКГ

В резултат на приложение на ИХХ реакция с антитяло, насочено срещу СК 5 се получи изразено цитоплазмено и мембранно оцветяване, общо при 40 случая от изследваните 71 ТНКГ, подбрани за ИХХ изследване (56.33%) (фиг.25,26).



Фиг.25. А-Инвазивен карцином с медуларна морфология Б-Позитивно цитоплазмено и мембранно имунооцветяване на туморни клетки с СК 5.увел.А-100х Б-увел. 200х



Фиг.26. Разпределение на ТНКГ по типа на експресия за СК 5.

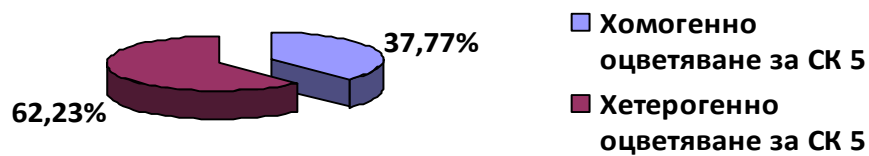
Установихме, че ИХХ реакция за СК 5 в групата на ТНКГ показва различни модели на оцветяване. Някои от туморите демонстрираха дифузно имунооцветяване на всички туморни клетки. Тумори с над 70% имунооцветяване за базалния маркер СК 5 са приемани за хомогенно оцветени, от 6 до 69%-за хетерогенно оцветени и под 5% имунооцветяване-за негативни. Интересен беше и намереният модел на имунооцветяване-дифузно, в целия паренхим, с редуване на отчетливо позитивни и напълно негативни зони тип „шахматна дъска” и фокално имунооцветяване по типа на пръснати групи от единични или струпвания от клетки.

Класификация на базалоидните ТНКГ в зависимост от начина на оцветяване за СК5

Базалните карциноми, определени като имунопозитивни за СК 5, на база начин на експресия на СК 5, бяха разделени на карциноми с дифузна експресия на базалния маркер СК 5-т. нар. „същински или истински базални”.

Другата група карциноми, при които се наблюдаваше хетерогенна експресия, с редуване на зони с негативно и такива с позитивно имунооцветяване бяха класифицирани като базо-луминални ТНКГ.

Разпределението на 45-те карцинома, определени като базални в зависимост от вида на позитивната експресия на СК 5 беше както следва: ТНКГ с хомогенно оцветяване за СК 5 се намериха общо 17 случая от (37.77%) (фиг.27), а с хетерогенен тип имунооцветяване - 28 случая (62.23%)-(фиг.28).

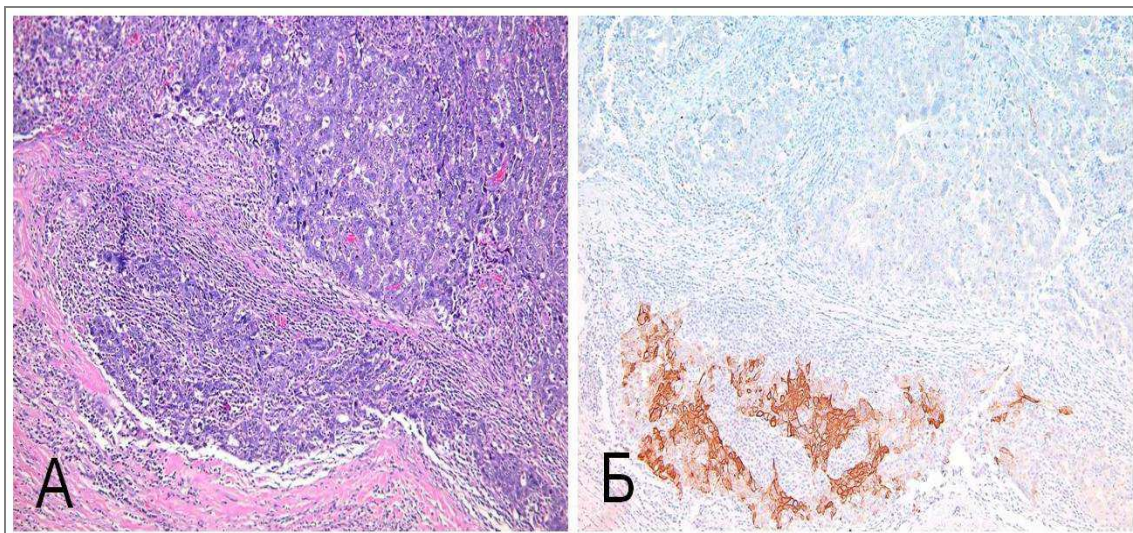


Фиг.27. Разпределение на базалните ТНКГ по типа експресия за СК 5.

Изразеното хетерогенно имунооцветяване се изразява в редуване на зони, негативни за имунооцветяване или фокално и огнищно позитивни за СК 5.

Поради характерния начин на имуно оцветяване за СК 5 тези неоплазми са приети за базо-луминален тип карциноми.

Процентът на оцветяване за базални СК при тях варира от 15-до 60%, със среден процент на оцветеност за базалния маркер СК 5 - 29 %.



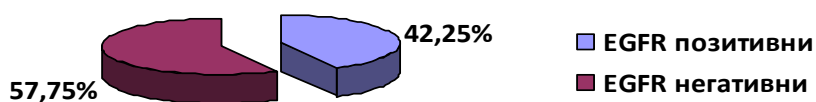
Фиг.28. А-Инвазивен карцином, NST, оцв.Н&Е, Б-ИХХ Фокална имунопозитивност за СК5, увел.-200х – Базо-луминален карцином.

Туморите показващи дифузно, униформено оцветяване за СК 5 показаха средно имунооцветяване в 85% (от 70 до 100%) и са приети са “същински” базалоидни карциноми в групата на ТНКГ.

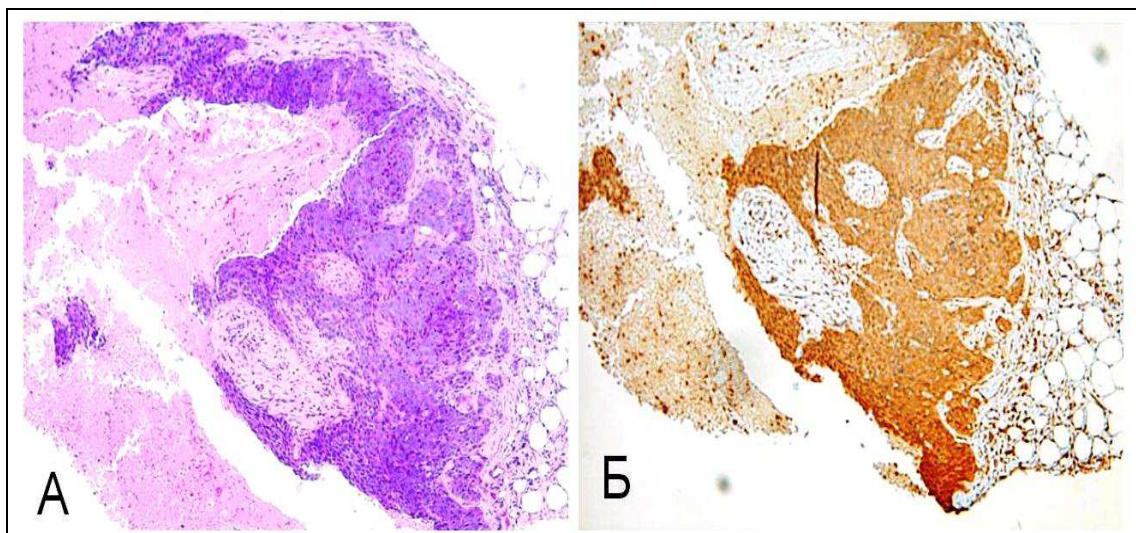
4.7.2. Проучване на експресията на *EGFR* в групата ТНКГ

EGFR имунооцветяването е определяно в 4 степени, като тълкуването на резултата е бинарен (негативни 0/- и 1+, и позитивни 2 и 3+).

В резултат на приложение на ИХХ реакция с антияло, срещу EGFR се получи ясно изразено, цитоплазмено и мембранно имуно оцветяване, общо при 30 случая от 71 те ТНКГ - (фиг.29,30) (42.25%).



Фиг.29. Разпределение на ТНКГ по типа на експресия за EGFR.



Фиг.30. А-Инвазивен карцином, NST, G3, Б -Позитивно цитоплазмено и мембранно имунооцветяване на туморните клетки с антияло, срещу EGFR - базален фенотип. увел.200x

Коекспресията на двата базални маркера СК 5 и EGFR, които по методика са приети, че дефинират базалния фенотип, се установи общо в 45 случая (63.38%). Комбинацията на експресията за всеки един от тези ключови биомаркери е представена на табл.5.

Табл.5. Разпределение на случаите по експресия за базални биомаркери -EGFR и CK5.

Експресия на маркери	Брой случаи
EGFR + CK5-	5
EGFR- CK5+	15
EGFR + CK5+	25
Общо дефинирани като базални	45 случая от 71 изследвани

От дефинираните като базалоидни ТНКГ, на база на експресия на единия или двата маркера, позитивни за EGFR са общо 24 случая и 21 са негативни. Чувствителността на ИХХ маркер за EGFR, за откриване на базалоиден фенотип се оказа 67%.

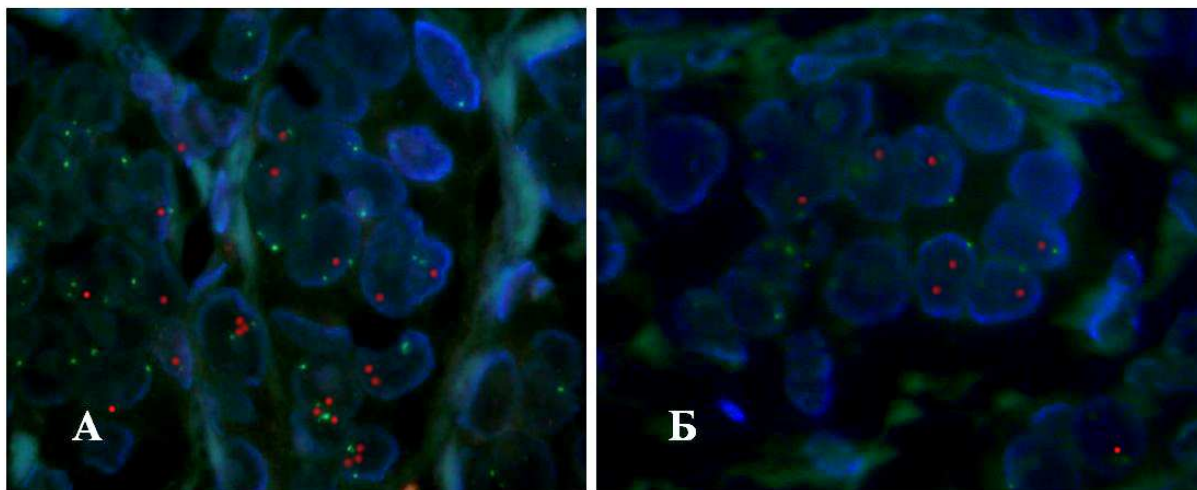
Позитивни за СК 5 от определените като базални 45 случая, са общо 40 случая. Чувствителността на СК 5 е по-висока за откриване на базалоиден фенотип-89%. На базата на позитивност за един или двата маркера-EGFR и CK5 от изследваните 71 случая с методите за определяне на имунофенотипа 45 случая показаха позитивност за един или за двата маркера.

4.7.3. Проучване на амплификацията на EGFR гена с метода FISH

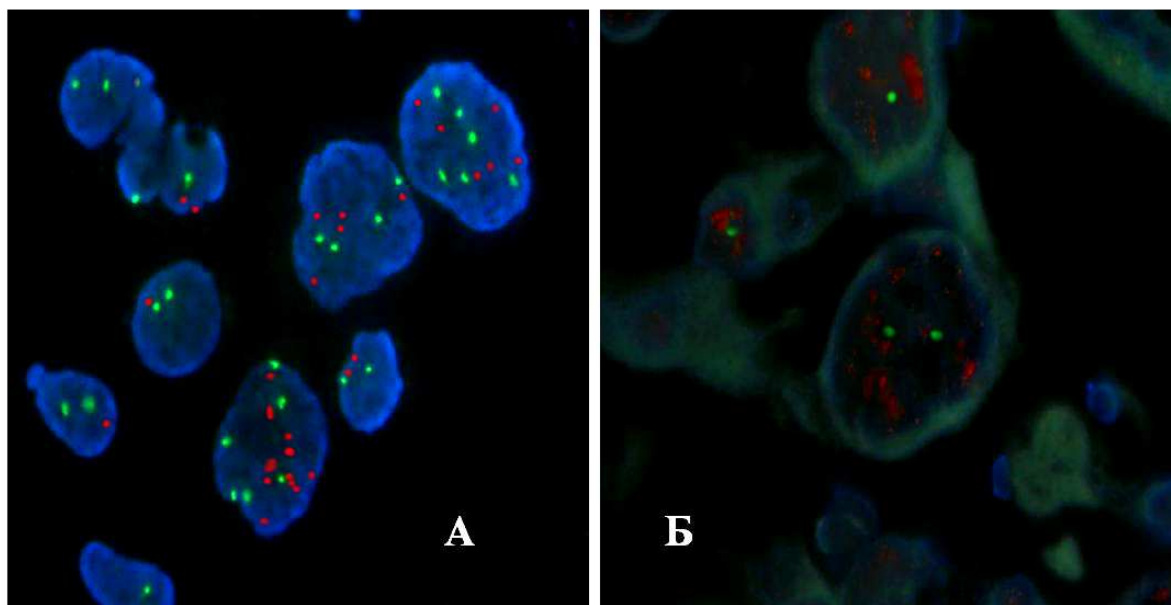
В проведеното от нас проучване изследвахме количествените промени на генните копия на EGFR с помощта на двойно-флуоресцентна проба и техниката на ин ситу хибридизация (FISH), както и експресията на протеина с ИХХ техника, в група от 29 подбрани случая на ТНКГ. При 20 случая е установена липса на сигнали, поради ензимна свръхдигестия или недостатъчно фиксиран материал, в преданалитичната фаза и са изключени от оценяването като неинтерпретируеми.

Повечето от туморите се намериха негативни за амплификация на EGFR - 26 случая в групата на ТНКГ(89.65%) (фиг. 31 А). При 10 случая (34.48%) се намериха данни за полизомия, без да е налице амплификация на EGFR гена (фиг.32 А). Всичките полизомични случаи са преценени като позитивни с ИХХ оцветяване- при 6 имунооцветяването е било 3+, а при останалите 4- 2+.

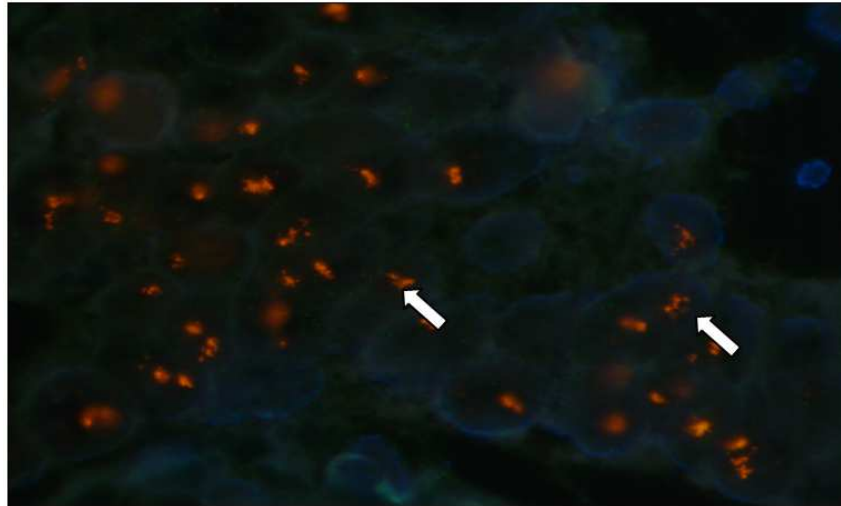
С амплификация за гена на EGFR се намериха само 3 случая от селектираните на подходящи за извършване на FISH техника, общо 29 случая (10,34%). От тях, 2 случая показаха ниско ниво на амплификация (фиг.32.Б) и само при един се установи високо ниво на амплификация с формиране на струпвания от генни копия на EGFR (фиг.33).



Фиг.31 FISH за EGFR без данни за амплификация EGFR FISH: Зелените сигнали са CEP7 (проба за центромери на хромозома 7); оранжевите сигнали са LSI-EGFR (locus specific identifier, EGFR). FISH, увел.200x



Фиг.32. А- Случай ТНKG с данни за полизомия, от 4 до 6 зелени сигнала за центромери на хромозома, стрелки 7. Б- Случай с данни за амплификация на EGFR гена - намножаване на оранжевите сигнали. FISH техника, увел.200x



Фиг.33. Случай с амплификация за EGFR гена с формирани големи струпвания от оранжеви сигнали за EGFR генни копия. FISH техника, стрелки увел.200x

В нашето проучване базалодните ТНКГ показват увеличена протеинова експресия за EGFR -в 42.25%, а амплификацията на EGFR гена беше намерена само в 10.34% .

От проведеното изследване на количествените промени на генните копия на EGFR с помощта на двойна FISH установихме липса на амплификация за гена на EGFR. Най-вероятно EGFR генната амплификация, не е механизъм за активация и свръхекспресия на протеиновия продукт на EGFR гена. Полизомията за 7 ма хромозома в групата на случаите, изследваните с двойна проба за EGFR гена с FISH, се оказва често явление и вероятен механизъм за свръхекспресия на протеина, което се установява с ИХХ техника.

В нашето проучване установихме, че амплификацията на EGFR гена е много рядко събитие в кохортата на ТНКГ.Това налага прилагането на съответна таргетна терапия само на строго селектирани пациенти с амплификация или мутация на EGFR, които са редки генетични алтерации при пациентите с ТНКГ.

4.7.4. Експресия на базален СК 17 в проучваната група ТНКГ

Освен СК 5 и EGFR, в проучването беше изследвана и експресията и на други базални биомаркери като цитокератини 14 и 17. В резултат на приложение на ИХХ реакция с антитяло, срещу СК 17 се получи цитоплазмено и мембранно оцветяване при 25 случая от всичките 71 изследвани ТНКГ- (35.21%).

От изследваните 45, дефинирани като базални карциноми, 21 са позитивни и за СК 14 (46.66% от базалните карциноми). От 26 те определени като небазални поради липса на експресия на един от двата маркера- СК 5 и

EGFR, за изследвания от нас маркер се намериха 3 позитивни за СК 14 тумори (11.5%).

Установи се статистически значима разлика в разпределението на експресията на СК 14 в двете подгрупи на ТНКГ-базална и небазална, с изразена по-честа позитивност при базалната група χ -квадрат с корекция на Yate's =8.506 ; p=0.00035.

4.7.5. Експресия на базален СК 14 в проучваната група ТНКГ

В резултат на приложение на ИХХ реакция с антитяло, срещу СК 14 се получи цитоплазмено и мембранно имунооцветяване при 28 случая от ТНКГ (39.43%).

Разпределението по подгрупи ТНКГ е както следва: от изследваните 45, дефинирани като базални карциноми, 26 се установиха позитивни и за СК 14 (48.9%).

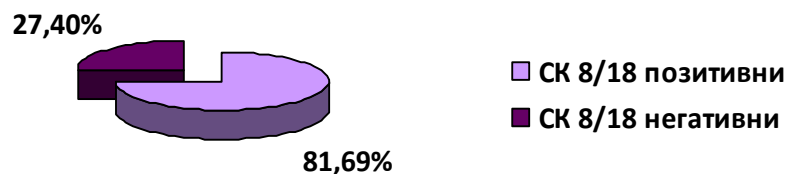
От 26-те определени като небазални, поради липса на експресия на един от двата маркера - СК 5 и EGFR се намериха само 2 тумора, имунопозитивни за СК 14 (7.69%).

Установи се статистически значима разлика в разпределението на експресията на СК 14 в двете подгрупи на ТНКГ-базална и небазална, с изразена по-честа позитивност при базалната група- χ квадрат с корекция на Yate's =15.27; p=0.0001.

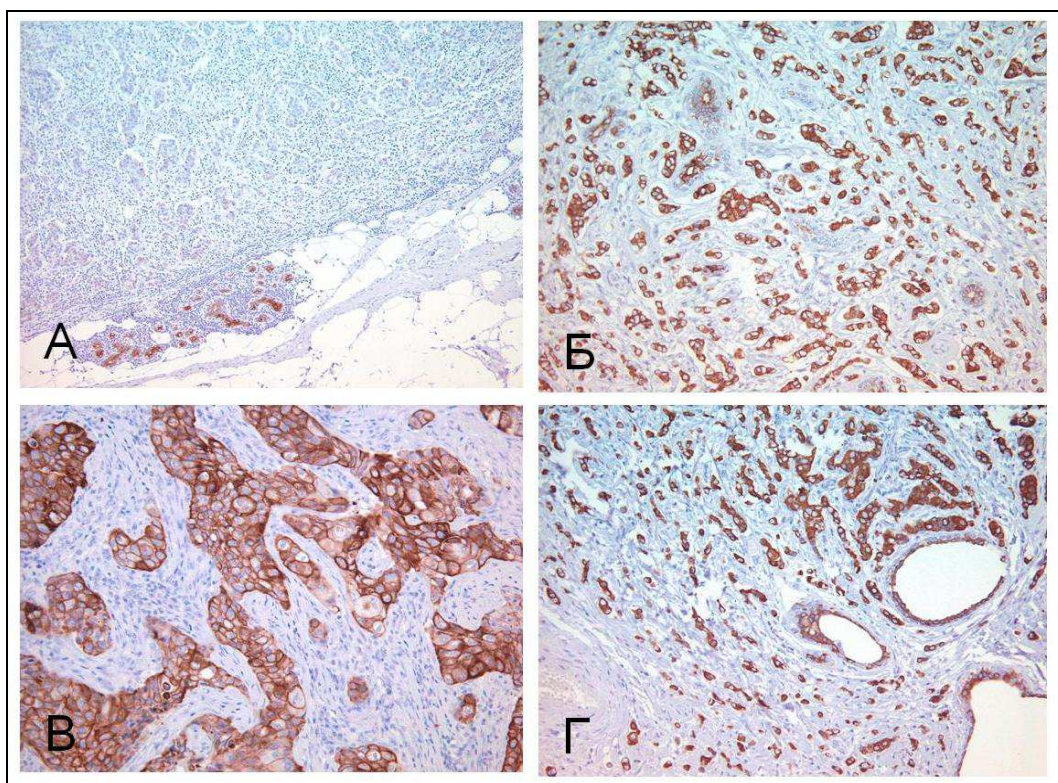
Фокално оцветяване за базални цитокератини по-често е установено при СК 17-при 10 случая (22.22%). Фокална позитивност за СК 14 се намери при 8 случая (17.77%), и при СК 5 – само при 4 случая (8.88%).

4.7.6. Експресия на луминални цитокератини-СК 8/18 в групата на ТНКГ

Освен базалните цитокератини, си поставихме за цел да проучим експресията на ТНКГ и на някои луминални цитокератини. От селектираните за ИХХ изследване блокчета от 71 случая, позитивни за СК 8/18 се намериха голям брой случаи-общо 58 (81.69%)-фиг 34,35.



Фиг.34. Разпределение на ТНКГ по тип експресия за СК 8/18.



Фиг.35А-Позитивна вътрешна контрола и негативен тумор. увел 100х. Б, В и Г-ТНКГ, показващи силна и дифузна позитивност за СК 8/18. Мембранна и цитоплазмена ИХХ реакция, увел. 200х

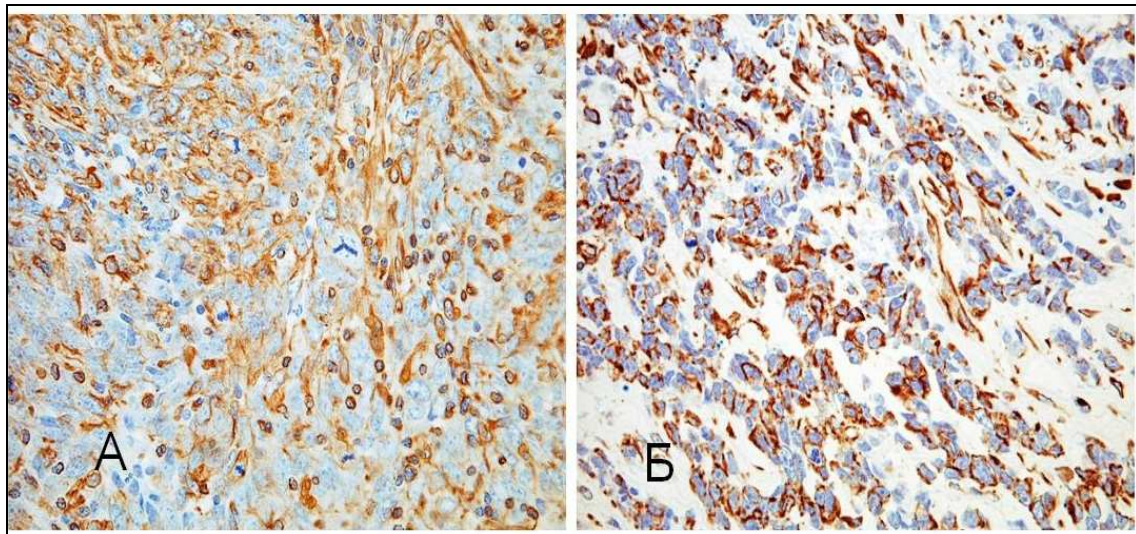
Позитивността за луминалния маркер СК 8/18 е цитоплазмена като локализация и се намери разпределена вътрегрупово по следния начин: от определените 45 случая, като базални ТНКГ имунопозитивност за СК 8/18 се намери при 34 тумора (75.6%).

Имунопозитивност за луминалният биомаркер СК 8/18 се намери в голям процент от ТНКГ - при 24 от всички 26 небазални ТНКГ(92.3%).

Установи се статистически значима разлика в експресията за луминалния биомаркер между двете субгрупи на ТНКГ - базални и небазални - $\chi^2=7.56$; $p=0.0060$. Експресията на СК8/18 се среща по-често в небазалните тумори в групата на ТНКГ.

4.7.7. Експресия на селектирани маркери за мезенхимна и mioepителна диференциация в групата на ТНКГ

Освен цитокератиновия профил на ТНКГ, си поставихме за цел да проучим и експресията на мезенхимния маркер Vimentin.



Фиг.36. А, Б Силна цитоплазмена експресия в туморните клетки за Vimentin. ИХХ реакция, увел 200x

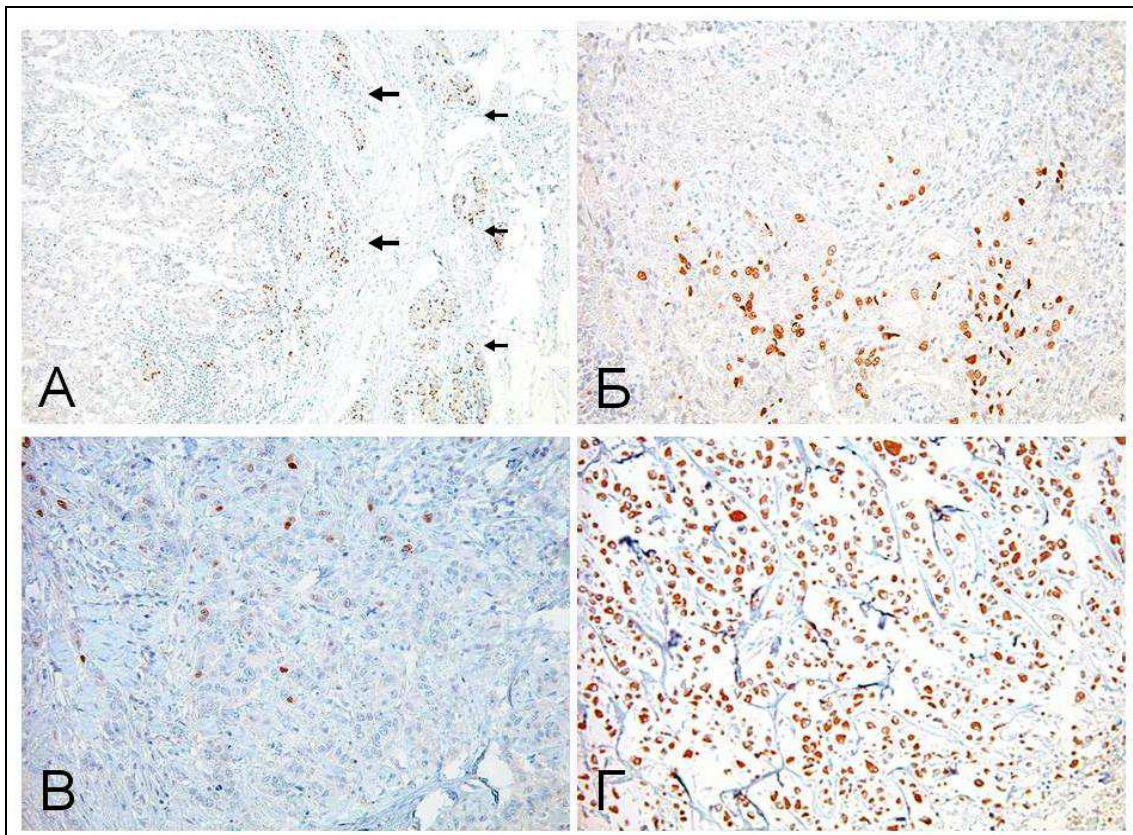
От селектираните 71 случая за ИХХ проучване позитивни за Vimentin се намериха общо 28 случая (39.43%) (фиг.36). Тези позитивни случаи са разпределени както следва-22 в базалоидната група от 45 случая (48.9%) и 6 от групата на общо 26 небазалоидни тумори (23.07%).

Установихме и статистическа значима разлика в позитивността по отношение на маркера за мезенхимна диференциация Vimentin между двете групи в полза на по-изразена имунореактивност в базалоидната група.

4.7.8. Експресия на маркера p 63 за mioepителна диференциация

С цел изследване на mioepителна диференциация/произход на ТНКГ проучихме 71 карцинома и се намери позитивно, ядрено оцветяване само в 4 случая. Преди да се отчете позитивност на ядрената реакция при всички случаи е търсена позитивна вътрешна контрола в нормалните mioepителни клетки около ацините и каналите в ТДЛЕ (фиг.37А).

Оцветяването за p63 е със строго ядрена локализация, с умерена, или по-слаба интензивност в сравнение с нормалната контрола. В два от изследваните случаи то беше огнищно, но над 20% от общата площ на тумора и в останалите два случая - дифузно (фиг.37 Б, В, Г). Разпределението на тези случаи по субвидове беше съответно: един случай с небазален имунофенотип (негативен за СК 5, 14, 17 и EGFR) и един случай, позитивен за СК 5 и EGFR, преценен като същински базален имунофенотип и два с хетерогенно имунооцветяване за p63.



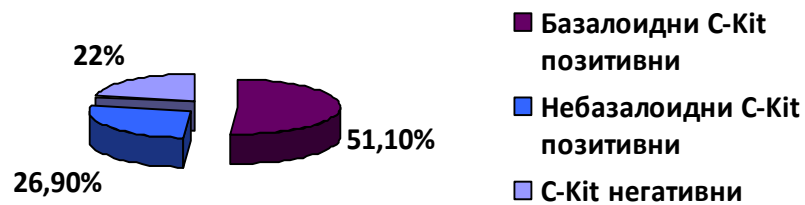
Фиг.37. А-Негативно оцветяване на туморните ядра за p63, при позитивна вътрешна контрола-миоепителните клетки на ТДЛЕ са ядрено маркирани (стрелки).ИХХ реакция, увел 100х.Б-Силно, фокално оцветяване на ядрата на туморните клетки. В-Умерено оцветяване на 30% от ядрата на туморните клетки. Г-Силно и дифузно имунооцветяване на ядрата на туморните клетки за p63. ИХХ реакция, увел. 200х

Освен гореописаните 4 случая от групата на ТНКГ, позитивен за p63 се намери и миоепителен карцином, представен подробно в главата за морфологично проучване на ТНКГ.

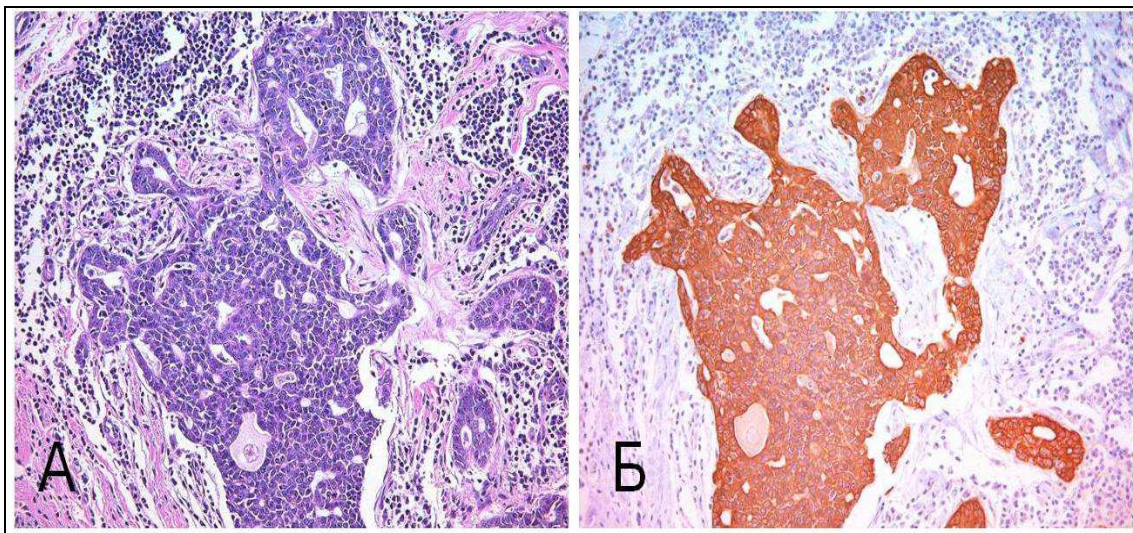
4.7.9. Проучване на експресията на ТНКГ за c-KIT

От проучените 71 случая на ТНКГ, селектирани за ИХХ изследване, позитивни за C-Kit (фиг.42) се намериха общо 30 случая (42.25%). Те са разпределени по групи, както следва - 23 в базалоидната група от 45

тумора (51.1%) и 7 са позитивни в групата на небазалоидните карциноми с тройно негативен фенотип-26.9%-фиг.38.



Фиг.38.Разпределение на карциномите по позитивност на с-kit.



Фиг.39. А-Инвазивен АКК на гърда, оцв.Н&Е,увел.100х В-Дифузно и хомогенно цитоплазмено и мембранно имунооцветяване на туморни клетки с антияло, насочено срещу с-KIT.увел.А, Б-увел. 100х

Установи се статистически значима разлика в разпределението на позитивността за CD 117 в двете субгрупи ТНКГ - базални и небазални.

Двукратно по-често, позитивни за KIT се оказаха тумори от групата на базалните карциноми ($\chi^2=3.951;p=0.0468$). И трите АКК с тройно негативен и базален фенотип се оказаха копозитивни и за с-KIT (фиг.39). В резултат на проучването на експресията на ТНКГ за с-KIT установихме висока честота на експресия на биомаркера в групата на ТНКГ, като позитивност се намери при всички случаи на АКК.

Съгласно каталога за експресия на човешките цитокератини, базалните цитокератини представляват високомолекулярни протеини, които се намират експресирани в базалните слоеве на стратифицирания епител. В гърдата те се позитивират предимно в базално локализиращия миоепителен слой и в малка пропорция в луминалния жлезист епител.

Двойното значение на термина базалност води до объркване, поради факта, че в повечето случаи той се интерпретира като белег на произход на тумора от миоепителни клетки. Това обяснение за произхода на базалните КГ обаче не е достатъчно.

Всички миоепител-специфични протеини, които се използват за дефиниране на миоепителен произход или диференциация, всъщност са с тумор-супресорни характеристики. В нашето проучване експресията за миоепителна диференциация се намери само в изолирани случаи в групата на ТНКГ, изследвани с ИХХ панел, за проучване на фенотипа на карцинома. Това поставя под съмнение твърдението, че този тип карциноми произлизат от миоепителни клетки. По-скоро се налага обяснението, че при някои изолирани случаи е налице способност на неопластичните клетки за диференциация към тази линия. С това се обяснява много ниската честота на позитивност за маркера за миоепителна принадлежност - р63.

Придобитата пластичност на някои типове прогениторни клетки може да бъде активирана по време на туморогенезата, което означава, че фенотипът-морфологичен или ИХХ, не отразява хистогенезата на тумора.

Коекспресията на базални и луминални маркери, подкрепя хипотезата, че ТНКГ не произлизат от базалните/миоепителни клетки, поради факта, че луминалната експресия не е характерна за тези структури.

Хетерогенната базална цитокератинова експресия е феномен, който се наблюдава в базо-луминалните тумори и показва характерен патогенетичен механизъм на канцерогенеза. Същият еквивалент, доказан на експериментални модели, показва активация на различни онкогенни сигнални пътища, които водят до хетерогенна експресия на различни СК-базални или луминални или до експресия само на базални или само на луминални интермедиерни филаменти.

По-голяма част от проучените 71 ТНКГ в 63.38% в нашето изследване се установиха базални и останалите 36.61% са не-базални. Преобладаващи са данните в литературата, че базалният и ТНКГ, определени с методите на генното профилиране или с ИХХ техника са неоплазми с неблагоприятен клиничен ход. В описаните от нас два случая на АКК и двата се оказаха с тройно негативен и същински базален фенотип, определен с позитивност за двата маркера-СК 5/6 и EGFR.

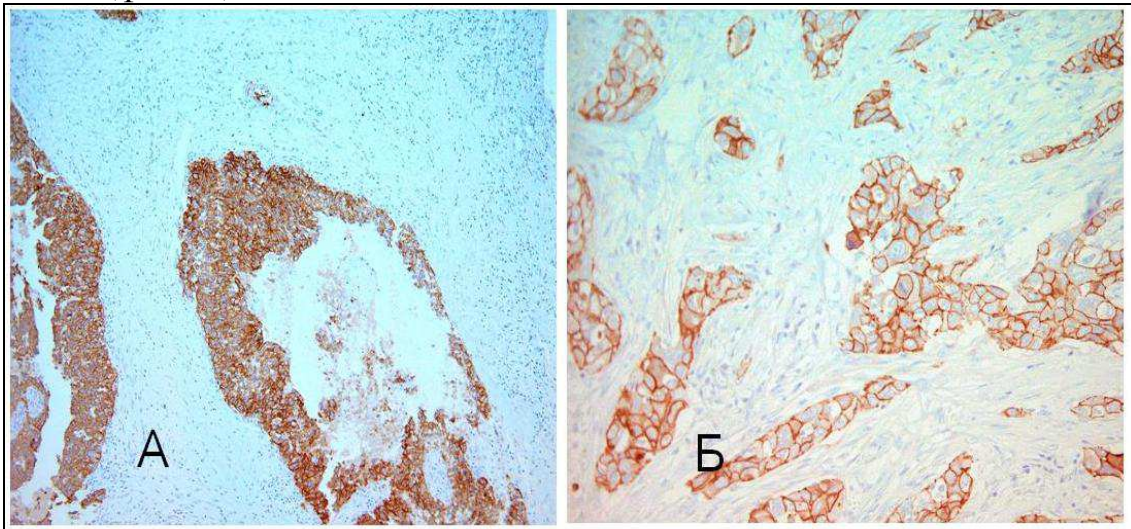
Няма международно приет маркер, който да е заместител на микроарей-базираното определяне на базален фентип, както няма и общоприета граница за ИХХ позитивност, вероятно поради използването

на тъканни микроцилиндри в проучванията. Поради факта, че в нашето проучване намерихме зони с фокална позитивност, специално за СК 17 и СК 14 преценихме, че методът на големите срези е по-адекватен, когато се проучва чувствителност на маркер, дефиниращ базалност. Базалността от гледна точка на ИХХ може да се разглежда и като програма, незадължително обхващаща всички клетки на неоплазмата. Феноменът базалност е репродуцируем, без да се търси явление за хомогенност на експресията за базални цитокератини.

Поради гореописаните причини е необходимо да се прилага интегративен подход в диагностиката на карцинома на гърда-да се има предвид като клинично значимо не само базалния имунофенотип, а комбинацията от морфология, грейд, стадии на заболяването и имунофенотип на тумора.

4.7.10. Проучване на експресията на p-cadherin в групата на ТНКГ

От всичките изследвани ТНКГ позитивни за p-cadherin се намериха общо 49 случая (69%). От дефинираните като базалоидни карциноми 45 тумора в групата на ТНКГ, 39 случая се намериха имунопозитивни за p-cadherin (фиг.40).



Фиг.40. А и Б – Изразена имунопозитивност за p-cadherin в базални карциноми с тройно негативен фенотип. Мембранно и цитоплазмено оцветяване ИХХ реакция. увел.200x

От тези 39 случая, почти всичките се намериха копозитивни и за СК 5. Само един позитивен за СК5 случай е негативен за p-cadherin. Позитивността варираше от силна до умерена, локализирана мембранно или цитоплазмено в туморните клетки.

Установи се статистически значима корелация между експресията на базалния маркер СК5 и тази на p-cadherin. Fisher exact test е със стойност на $p < 0.0001$; χ^2 , изчислен с корекция на Yate's е със стойност $=28.612$ и $p = 0.0001$.

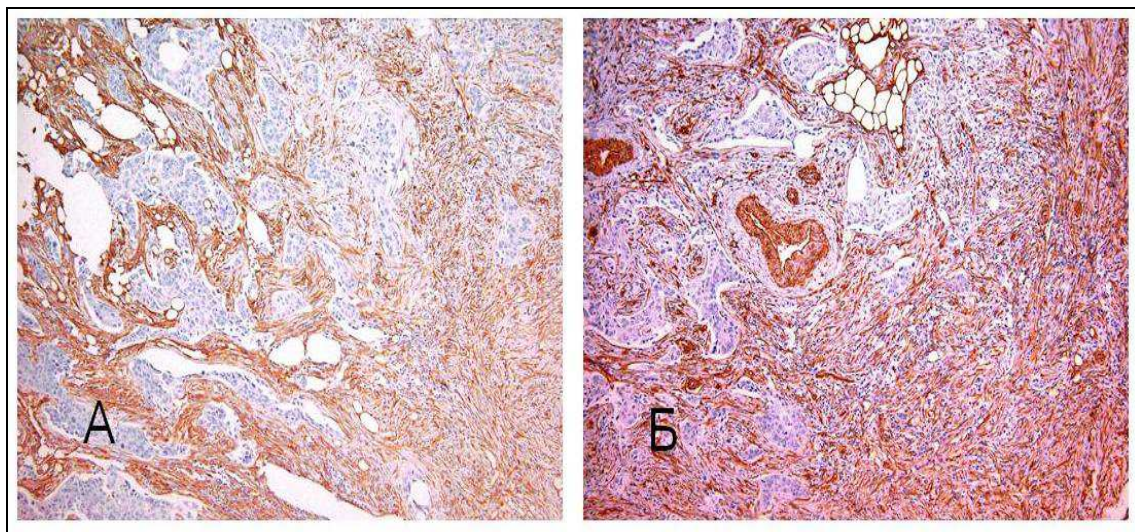
Експресията на p-cadherin преобладава в субгрупата на базалоидните ТНКГ. Този биомаркер показва аберантна експресия в малък процент, предимно високостепенни карциноми в общата популация на КГ. В групата на ТНКГ обаче, неговата експресия е значителна - в нашето проучване тя достигна до 69%. В този смисъл тройно негативните мамарни карциноми могат да се разглеждат като обогатена кохорта за аберантна експресия на p-cadherin.

По отношение на значението му като базален маркер, резултатите от всички проучвания показват, че той е надежден базален маркер, който в панел с други, като СК 5 може успешно да идентифицира базален фенотип на КГ, както се установи и в нашето проучване. Намираме за уместно добавянето на p-cadherin към панела от надеждни маркери за идентифициране на базален фенотип при ТНКГ.

4.7.11. Проучване на експресията на Caveolin -1 в групата на ТНКГ

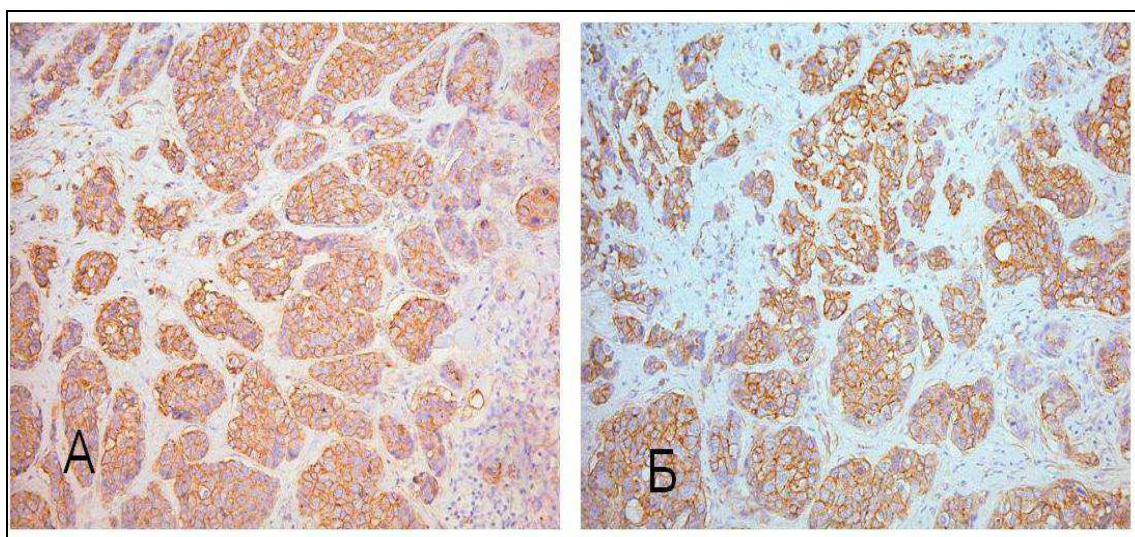
В резултат от приложението на антитяло, насочено срещу Caveolin -1 (Cav-1) се получи силно и умерено по интензивност имунооцветяване в цитоплазмата и мембраната на нормални базални структури в гърдата. Имунооцветяването за Cav-1 в туморните клетки се установи мембранно и цитоплазмено, вариращо от интензивно, умерено и слабо, дифузно или фокално. В стромата също се намери оцветяване на нормални структури като кръвоносни съдове, мастна тъкан и стромални фибробласти.

При позитивните случаи в стромата, оцветяването се намери дифузно, силно или умерено, локализирано във фибробластите. Оцветяването за кръвоносни съдове и адипоцити използвахме за вътрешна контрола на маркера - фиг.41.



Фиг.41. А, Б- Изразена имунопозитивност в стромалните фибробласти за Cav-1. (Б). Туморните клетки са негативни. ИХХ увел. 100х.

Практически всички изследвани небазални ТНКГ са негативни и за Cav-1, сравнени с близо 2/3 позитивни тумори от групата на базалните ТНКГ (фиг.42).



Фиг. 42. А, Б- Имунопозитивност на туморните клетки за Cav-1. Оцветени са мембраната и отчасти цитоплазмата на туморните клетки. ИХХ реакция с анти тяло срещу Cav-1 увел. 200х.

Установи се статистически значима разлика в експресията на Cav-1 при изследваните групи. Разпределението на позитивността на Cav-1 в съответните групи, е показано на табл.6.

Табл. 6. Разпределение на експресията на Cav-1 по подгрупи на ТНКГ.

	Базален фенотип	Небазален фенотип
Cav-1 негативен	15(21.12%)	25(35.21%)
Cav-1 позитивен	30(42.25%)	1 (0.01%)

Установи се статистически значима разлика в експресията на Caveolin -1 в туморните клетки в групата на базалните и небазалните ТНКГ– χ^2 – непараметричен тест) $\chi^2 = 7,05$, Df=1, p=0,0079.

Отчитане на експресията на стромалните фибробласти в тумора

От изследваните с методите на ИХХ 71 случая на ТНКГ при 19 от групата на базалоидните карциноми се намери загуба на Cav-1 експресия

От подгрупата на 26 те определени на базата на липса на експресията за EGFR и СК 5 небазални карциноми, 7 показаха липса на експресия за Cav-1 в стромалните фибробласти.

Не се установи обаче, статистически значима разлика в загубата на имунопозитивност в стромалните фибробласти в двете групи. Установява

се тенденция по-често тази загуба да се наблюдава в групата на базалоидните типове ТНКГ.

Експресията на Cav-1 в нормалните, неракови тъкани се намери локализирана предимно в базалните/миоепителни клетки на дуктулобуларната система на гърдата, както и в ендотелни клетки, фибробласти и адипоцити от стромата на жлезата. Това прави Cav-1 добър маркер за идентифициране на миоепителни клетки. Съгласно получените резултати от нашето проучване, Cav-1 експресията при КГ сигнификантно се свързва и с позитивността за базалност и може да допълни панела за базални биомаркери.

Важен е фактът, че Cav-1 експресията се асоциира с базалоидния фенотип при спорадичен и наследствен ТНКГ. Липсата на оцветяване на луминалните структури на гърдата в нормални условия за Cav -1 и изразената му експресия в миоепител и други структури, прави Cav-1 евентуален кандидат за миоепителен маркер. Намерената експресия и в други структури като адипоцити, ендотелни клетки и стромални фибробласти, прави този маркер чувствителен, но неспецифичен за миоепител.

Нашето проучване потвърди съществуващите литературни данни, че експресията на Cav-1 при карциномите на гърдата категорично се асоциира с “базалоидния” имунофенотип.

Съществува връзка между експресията на Cav-1 с експресията на базални маркери и липсата на позитивност на стероидни рецептори. Същинският базалоиден и базо-луминалният фенотип в нашето проучване са най-честите и най-често позитивните за Cav -1 сред различните фенотипове КГ.

Уместно е, експресията на Cav-1 да бъде отчитана като характерна за този субтип и той да бъде добавен към разширения панел за имунофенотипизация на базалоидния тип карцином за нуждите на рутинната диагностика.

Стромата в тумора е подложена на ремоделиране на структурата като сложна система от клетъчни структури, които си взаимодействат с туморния паренхим и помежду си и които не са статична величина. В нашето проучване не установихме статистически значима разлика в имунофенотипа на туморната строма при различните субтипове на КГ. Изглежда, че загубата на позитивността на стромните фибробласти или запазената позитивност за Cav-1, не е само функция на субтипа КГ, а е по-комплексен и динамичен процес, които заслужава да бъде проучен на молекулярно ниво при повече случаи, с проследяване на преживяемостта за различните видове стромален фенотип за Cav-1. Необходими са обширни ретроспективни проучвания за уточняване на прогностична роля на загубата на фибробластната стромална експресия на Cav-1.

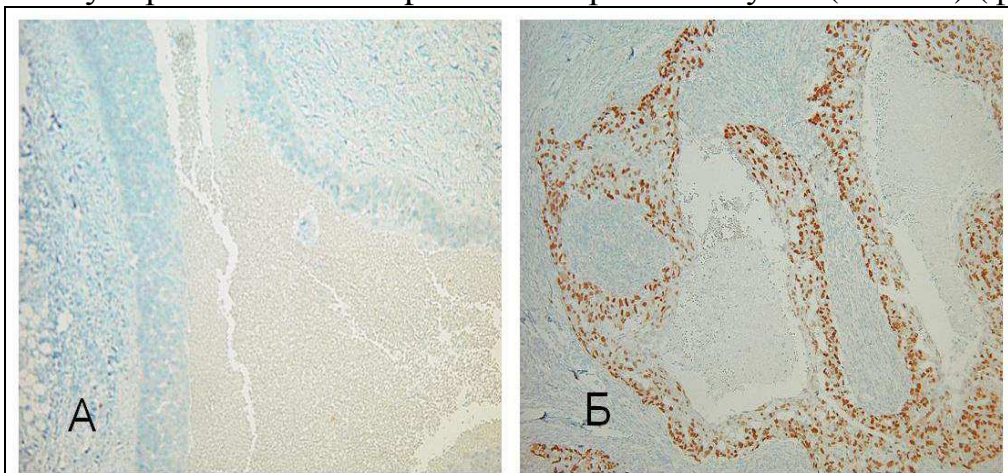
Туморната експресия за Cav-1 може да бъде потенциален биомаркер за идентификация на базален фенотип, в допълнение към приетите EGFR и CK 5/6.

Загубата на имунооцветяването на стромалните фибробласти е важен прогностичен фактор за рецидиви и това прави Cav-1 потенциален клиничен биомаркер. Тази промяна в парадигмата по отношение на значението на туморната строма е важна стъпка в разбирането на биологията на рака и към таргетирането и като терапевтична опция.

4.8. Проучване на характеристиките на ТНКГ по отношение на експресия на p53, Cyclin E1, Ki-67 и андрогенови рецептори

4.8.1. Проучване на експресията (акумулацията) на мутантния протеин на P53 гена

В резултат на приложената ИХХ реакция в групата на 71 случая на ТНКГ, селектирани за ИХХ изследване позитивност за имунооцветяване в ядрата на туморните клетки за p53 се намери в 40 случая (56.33%) (фиг.43).



Фиг.43. А- Негативно имунооцветяване на туморните клетки за p53. Демонстрирана е характерната морфология на ТНКГ-лентовидна архитектура, обширни зони на некроза. Б-Позитивно имунооцветяване за акумулация на мутантен протеин в ядрата на туморните клетки за p53, при тумор със сходна морфология. ИХХ увел. 100х.

Разпределението по групи е както следва-32 от групата на 45 те базалоидни (71.11%) и 8 в групата на 26 те небазалоидни (30,75%).

Установи се статистическа значима разлика в разпределението на имунопозитивността на мутантния протеин, определен с метода ИХХ в двете групи на ТНКГ-базалоидни и небазалоидни. По-честа акумулация за мутантния p53 протеин се установи в групата на базалоидните ТНКГ($\chi^2=12.731$, $p=0.0004$).

Негативната реакция на p53 е приемана за нормален статус на тумор-супресорния ген, като се имаше предвид вероятността някои делеции, водещи до липса на синтеза на белтък да бъдат тълкувани като нормален имунофенотип на тумор супресорния ген. В групата на ТНКГ

аккумуляцията на патологичен протеин в ядрата на туморните клетки за p 53 е често срещано явление в групата на базалните карциноми, определени с метода на ИХХ.

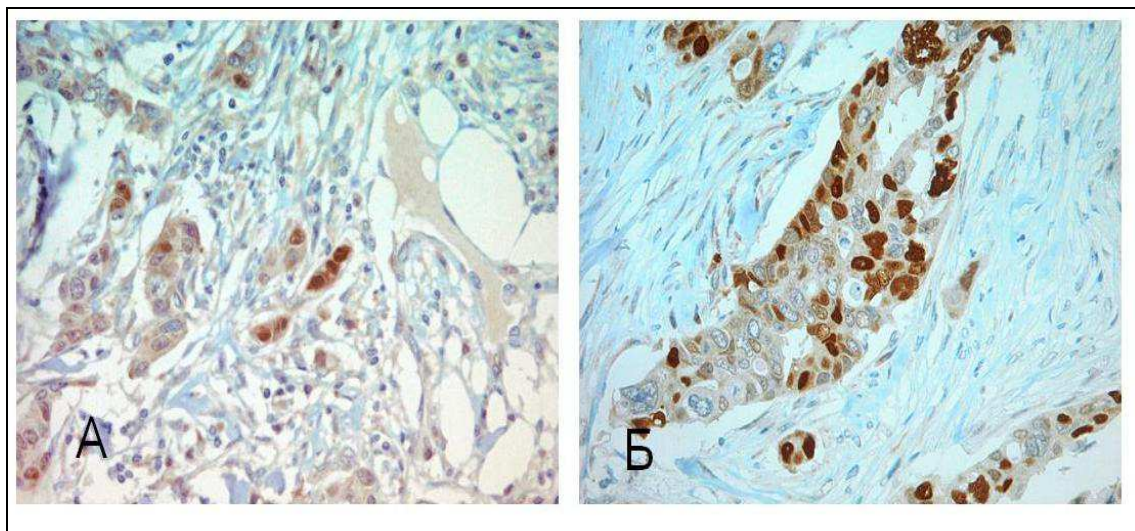
По литературни данни при базалоидния карцином на гърдата мутациите в TP 53 са често срещано събитие. Тумор супресорният ген TP53 притежава инхибираща функция спрямо клетъчната пролиферация, като по този начин потиска развитието на туморния процес. Отпадането на тази функция се наблюдава при много тумори, включително при ТНКГ. При нормални условия P53 сигналния път е неактивен, “в режим на готовност”. Активирането настъпва при клетъчно увреждане и се осъществява по различни регулаторни пътища.

Осъзнавайки недобрата корелация между мутационния статус и ИХХ находка на p53, е необходимо да се проучи значението на добавянето в ИХХ панел за базалоидни карциноми и p 53. Заслужава да се проучи и клиничното значение на обогатяването на панела с други биомаркери като HER 3, HER 4, ER β и AR.

4.8.2. Проучване нивото на експресия на Cyclin E 1 в групата на ТНКГ

В резултат от приложението на ИХХ метод с анти тяло, насочено срещу Cyclin E1 се получи умерено и интензивно по интензитет ядрено имунооцветяване предимно на туморните ядра и отчасти в цитоплазмата на туморните клетки - (фиг.44).

От всичките изследвани с метода на ИХХ 71 тумори, позитивни за Cyclin E1 се намериха 32 (45.07%), а негативни - 16 (22.53%).



Фиг. 44. А- Ниска имунопозитивност на туморните клетки за Cyclin E 1-под 50%.Б-Силно и над 50% оцветяване на туморните клетки за Cyclin E 1. ИХХ А-увел. 200x

Разпределението на експресията на Cyclin E по групи е показано на табл.7.

Табл. 7. Разпределение на експресията на Cyclin E1 по подгрупи на ТНКГ

Cyclin E1	Базални ТНКГ	Небазални ТНКГ
Негативен	16 (22.5%%)	23 (32.34%%)
Позитивен	29 (40.4%)	3 (4.22%)

Позитивни, с експресия над 50% за Cyclin E 1 са предимно карциномите с установен базален фенотип. Установи се статистически значима разлика в експресията на Cyclin E1 при изследваните групи.

Непараметричният тест χ^2 , с корекция на Yates' показва стойност $\chi^2 = 16.555$, Df=1, $p < 0.0001$. Според Fisher exact test, стойността на p е статистически значимо- $p < 0.0001$. Намери се и статистически значима корелация в експресията на Cyclin E1 и експресията на p53 (χ^2 – непараметричен тест) $\chi^2 = 8.265$, Df=1, $p = 0.004$.

При КГ нарушението на регулацията на Cyclin E–асоциираната киназна активност води до свръхекспресия на Cyclin E и загуба на циклин зависимата киназна инхибиция, по пътя на мутация на p53, която резултира до генетична нестабилност и клетъчна пролиферация на неоплазмите с тези генетични алтерации. По литературни данни свръхекспресията на Cyclin E 1 се асоциира с мутации на p53 гена, както установихме и в нашето проучване. Свръхекспресията на Cyclin E 1 се обяснява със загубата на контрола от мутантния p53.

Свръхекспресията на Cyclin E 1 и Ki-67 в генетични нестабилни тумори води до бърза клетъчна пролиферация на първичния тумор. Неговата свръхекспресия е и предиктор и за евентуални BRCA 1 мутации.

4.8.3. Проучване нивото на експресия на Ki-67 в групата на ТНКГ

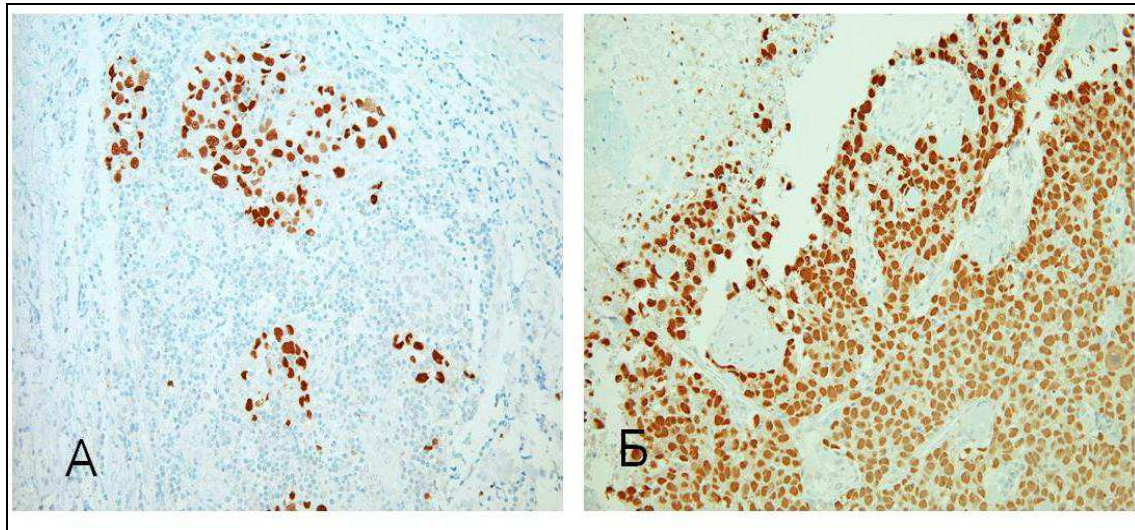
В резултат на приложението на ИХХ реакция се получи имунооцветяване в различен процент от ядрата на туморните клетки (фиг.45).

Преобладаваща част от ТНКГ показаха висока пролиферативна активност в първичния тумор (над 14% оцветеност на туморните ядра).

От проучените общо 71 случая на ТНКГ с метода на ИХХ, 49 случая се установиха с високи нива на пролиферация на тумора, определен с метода на изчисляване на пролиферативната активност за Ki-67 (69.01%).

Разпределението по групи е както следва-от 45 те случая на базални карциноми в 36 случая (80%) се намери висок пролиферативен индекс на Ki-67.

В половината случаи от небазалните карциноми - 13 от 26, се намериха данни за изразена пролиферативна активност на първичния тумор (50%). Установи се статистически значима разлика в пролиферативната активност между двете подгрупи на ТНКГ-базални и небазални.



Фиг.45. А-Под 15% имунопозитивност на туморните клетки за Ki-67. Б-Силно и дифузно 80% имунооцветяване на туморните клетки за Ki-67 I. ИХХ -увел. 200x

По-активни по отношение на пролиферацията се оказва групата на базалните ТНКГ.

Пролиферативният маркер Ki-67 е общоприет прогностичен и предиктивен фактор при ранен карцином на гърда. Високопролиферативните тумори отговарят добре на химиотерапия. Активацията на пролиферативните гени са показател за повишена чувствителност към цитостатици-антимитотични агенти, като paclitaxel и docetaxel. Този феномен е близък по биологически смисъл до парадокса на ТНКГ, според който ТНКГ имат лоша преживяемост, независимо от първоначално добрия отговор към лечение.

С методите на генното профилиране за базалните карциноми се установи характерната свръхекспресия на пролиферативни гени. Тази характеристика на ТНКГ се доказва и с метода на ИХХ с помощта на пролиферативния индекс. Може би високата пролиферация е причина този вид неоплазми да са хемочувствителни.

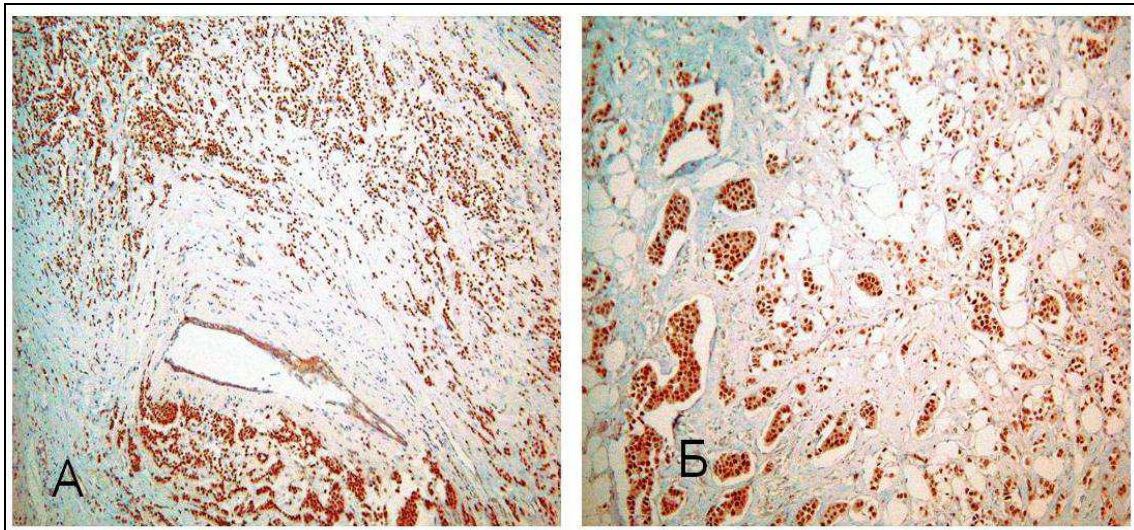
Важно е да се подчертае, че не всички ТНКГ показват висока степен на пролиферация за Ki-67. В групата на ТНКГ има нискостепенни тумори, както и такива с нисък пролиферативен потенциал. Това още веднъж демонстрира хетерогенността на ТНКГ.

Нивото на експресия на Ki-67 може да се разглежда като ценен биомаркер за предвиждане на рецидиви при пациенти с КГ, включително и в групата наТНКГ. По данни от съвременни проучване Ki-67 е и предиктор на пълен патологичен отговор за неoadювантна химиотерапия.

4.8.4. Проучване нивото на експресия на AR в групата на ТНКГ

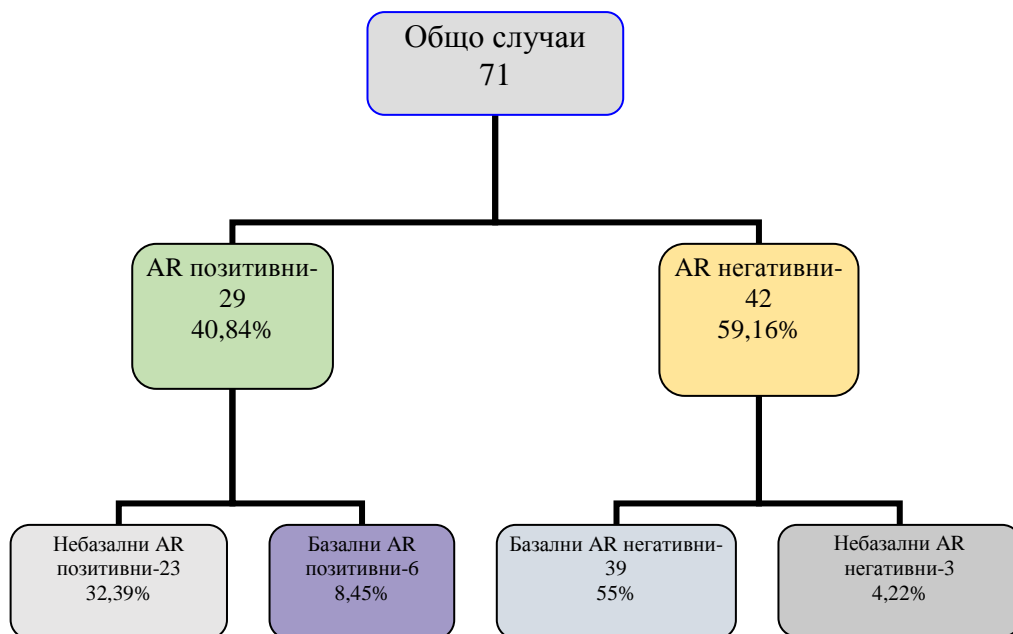
В голяма част от случаите КГ е изключително хормонално чувствителен тумор. В нашето проучване си поставихме за цел да проучим експресията на AR , които са свързани с естрогеновите, при тумори с липса на ER α и PgR.

В резултат от приложението на ИХХ реакция с приложение на антитяло, срещу AR се получи различна по интензивност имунна реакция в ядрата на туморните клетки и в нормални структури на гърдата-(фиг. 46).



Фиг.46. А,Б. ИХХ реакция с антитяло, насочено срещу AR, позитивна вътрешна контрола (А),увел 100х

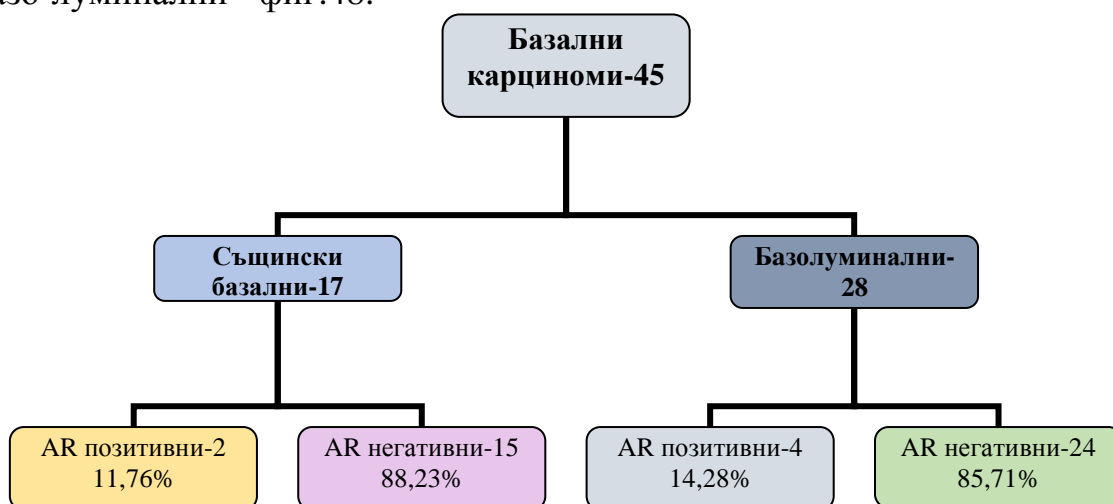
Позитивност за AR установихме общо в 29 от изследваните 71 случая (40.84%).Те са разпределени съответно - 23 позитивни тумори от небазалния фенотип и само 6 позитивни от групата на базалния карцином –(фиг.47).



Фиг. 47. Разпределение на случаите ТНКГ по ИХХ реакция за AR.

И трите случая с апокринна морфология на тумора се установиха позитивни за AR. Установи се статистически значима разлика в експресията на AR при изследваните групи. Значителна част от небазалните ТНКГ експресират AR-32.39%. Същевременно, само 8.4% от туморите с базален фенотип експресират андрогенови рецептори. AR се намери негативен в голяма част от базалните тумори - в 55% от и в 8.4% позитивен.

От 45 те базални карциноми на базата на типа експресия за базален цитокератин бяха определени 17 като същински базални и останалите 28- базо-луминални - фиг.48.



Фиг.48.Разпределение на случаите ТНКГ по ИХХ реакция за AR. в групата на базалните карциноми.

В групата на 17 те карцинома, определени като същински базален подтип разпределението на експресията на AR е както следва: само при два случая се намери позитивност (11.76% от същинските базални), а при останалите 15, AR показва негативно имунооцветяване (88.23% от същинските базални карциноми). От 28 те базолуминални карциноми, позитивен AR се намери в 4 случая (14.28% от базолуминални) и в 24 – негативен андроген-рецепторен статус (85.71% от базолуминални карциноми). Малко по-честа се намери експресията за AR при базолуминалните карциноми. Най-изразена позитивност за андрогенов рецептор се намери при небазалния фенотип - 32.39%. Само в 4.22% е установен негативен фенотип за AR. Истинските базални карциноми, показаха експресия и за AR само в единични случаи.

Разпределението на експресията на AR по подгрупи на ТНКГ е демонстрирано в табл.8 .

Табл. 8. Разпределение на експресията на AR по подгрупи на ТНКГ

AR	Базален фенотип ТНКГ	Небазален фенотип ТНКГ
Негативен	39 (55%)	3 (4.22%)
Позитивен	6 (8.4%)	23 (32.39%)

Методът на Fisher exact test, показва, че разликата е статистически значима; $p=0,0001$. χ^2 с корекция на Yate's. за $p=53$ $\chi^2 =35.448$, $Df=1$, $p<0,0001$.

Копозитивни за EGFR и AR от групата на ТНКГ се оказаха 9 случая (12.68%) от изследваните ТНКГ. Негативни за двата маркера са 18 случая, а останалите 44 случая са позитивни само за единия от двата изследвани биомаркера. При случаите с експресия на AR по-често се наблюдава липса на експресия на EGFR.

Открива се статистически значима връзка между експресията на EGFR и AR $\chi^2 =4,77$ $Df=1$, $p= 0,029$ (Fisher's exact test two – tailed - $p=0,033$) (табл.9).

Табл.9. Отношение на експресията на EGFR към експресията на AR.

AR	EGFR негативен	EGFR позитивен
негативен	18 (25,35%)	21 (29,58%)
позитивен	23 (32,39%)	9 (12,68%)

Експресията на ER е общоприет маркер в рутинната клинична практика като прогностичен и предиктивен фактор по отношение на ендокринната терапия. Значението на другите ендокринно-свързани сигнални пътища, като AR не са достатъчно проучени. Независимо от увеличаващите се доказателства за значението на AR като потенциален прогностичен и предиктивен фактор, механизмите на неговото действие и

взаимодействието му с другите гени и сигнални пътища не са точно идентифицирани.

AR се експресира във висок процент при ин ситу и инвазивните карциноми на гърдата - над 70% и се асоциира предимно с позитивност за ER, но в 10-15% се установява и при ТНКГ. Позитивността за AR се асоциира с по-напреднала възраст в момента на диагнозата, по-малък размер на тумора, по-добре диференциран тумор, по-ниска пролиферация и позитивност за хормонални рецептори. AR се съчетава често и със свръхекспресия на HER2.

Андрогеновият рецептор е благоприятен, независим прогностичен фактор за свободния от рецидиви период и по-добър отговор към ендокринна терапия при ER позитивните тумори.

В групата на апокринните тумори, дефинирани като ER негативни и позитивни за AR и HER2, се наблюдава тенденция към по-лоша прогноза. Данните в литературата относно значението на AR като прогностичен в групата на ТНКГ са противоречиви. Субразделяне на базалния карцином по отношение на експресията на AR се предлага от Agoff и кол., чийто проучвания показват, че експресията на AR в ER- негативните тумори се свързва с по-добра прогноза и преживяемост [Am J Clin Path 120, 5 (2003), 725–731]. Според някои автори имунофенотипът ER-AR+ при негативност за базални маркери, може да се приеме достатъчен за дефиниране на апокринен фенотип.

Съвременни клинични проучвания потвърждават рационалната идея за идентификация на ER-/PR-/AR+ туморите сред групата ТНКГ и приложение на таргетно хормонално лечение, което е с нисък токсичен профил.

ИХХ идентификация на AR протеина е добър сурогат на луминалния андрогенов рецепторен субтип и може да се използва като биомаркер за селекция на пациенти, подходящи за лечение с антагонисти на AR и PI3K. В редица проучвания се отчита висок процент на експресия-до 50% за AR при ТНКГ, което се доближава до процента на позитивност в нашето проучване

В повечето от проучванията на клетъчни линии андрогенът увеличава пролиферацията и AR антагонисти могат да подобрят прогнозата на ТНКГ експресиращи AR. Преобладаващи са данните, че експресията на AR е благоприятен прогностичен фактор при ТНКГ и се асоциира с ниска туморна пролиферация.

При ТНКГ AR си взаимодейства с другите алтерирани пътища като този на EGFR и въздействието му е комплексно и сложно.

V. ИЗВОДИ, ПРАКТИЧЕСКИ ПОСЛАНИЯ И ПРЕПОРЪКИ

ТНКГ се отличават с хетерогенност по отношение на морфологичната, молекулярната и генетичната си характеристика. Клинично се проявяват с ранни рецидиви, чести висцерални метастази, кратка обща преживяемост. КГ с тройно негативен фенотип се разделя на няколко субтипа със специфична ИХХ и генетична характеристика. Откриването на нови молекулярни маркери би подпомогнало задълбоченото му изучаване, определянето на по-точна прогноза на биологичния ход на болестта, отговора към терапия и селекция за вида на провежданото лечение.

От направеното проучване с установяване на характерните клинично-морфологични и фенотипни аспекти на ТНКГ, могат да се направят следните обобщени изводи:

1. ТНКГ са относително редки, инвазивни G3 карциноми, срещани се при по-млади пациентки, с по-голям размер на първичния тумор (Т категория), без той да корелира с позитивен нодален аксиларен статус.

2. Пациентки с ТНКГ показват тенденция за по-кратка средна обща преживяемост до петата година на проследяване, която се губи след този период.

3. ТНКГ са хетерогенни малигнени тумори, с преобладаващ морфологичен вариант неспециален инвазивен карцином със солидна морфология, зони на некроза, дезмоплазия и интратуморна лимфоцитна инфилтрация в стромата, последвани от карциноми с медуларни характеристики. Следващи по честота са метапластичните с преобладация на източено-клетъчен, високостепенен карцином. В групата на ТНКГ са и ниско-рискови типове като секреторен, сходен с папиларен на щитовидна жлеза, АКК и по-рядко нискостепенен метапластичен карцином. Лобуларният, апокринният и невроендокринният карцином също могат да показват тройно негативен фенотип и се срещат по-рядко или изолирано в групата на ТНКГ.

4. Преканцерозите при ТНКГ се срещат относително рядко и са представени от лезии като плоска епителна атипия, атипична дуктална хиперплазия и ДКИС. Микрогландуларната аденоза и атипичната микрогландуларна аденоза се наблюдават в съчетание с ТНКГ.

5. Най-честата находка в нетуморната тъкан при ТНКГ са лобулит и фиброза в стромата. Прогресията на ТНКГ включва висцерални метастази, които създават морфологични и имунофенотипни диференциално-диагностични проблеми при пациентки с ТНКГ.

6. Независимо от лошата прогноза, пациентите с ТНКГ имат намален риск за метастазиране в аксиларните л. в. Не се установяват и данни за увеличена лимфносъдова васкуларизация на перитуморно и интратуморно локализираните лимфни съдове при ТНКГ, сравнени с другите основни субтипове. Този резултат съвпада с липсата на корелация на по-голям размер на тумора и позитивност на аксиларните л в.

7. В зависимост от позитивността за базални цитокератини и маркери ТНКГ могат да бъдат разделени на базални и небазални. Позитивните за базалните маркери ТНКГ показват различни модели на експресия за СК 5 -хомогенен и хетерогенен модел на оцветяване, на базата на което могат да се стратифицират на „същински” базални и базолуминални субтипове.

- Чувствителни биомаркери за определяне на базален фенотип при ТНКГ се оказаха СК 5, p-cadherin, Caveolin-1 и EGFR

- В нашето проучване СК 14 и 17 показват по-често фокално имунооцветяване, което ги прави по-неподходящ базален биомаркер, особено при използване на техниката на тъканни микроцилиндри

- Амплификация за гена на EGFR се установи само в изолирани случаи и вероятно EGFR генната амплификация, не е механизъм за активация на свръхекспресията

- Полизомията за 7ма хромозома, в проучването се оказва често явление и вероятно е механизъм за свръхекспресия на EGFR протеиновия продукт.

- Едновременната експресия на базални и луминални маркери, c-kit, коекспресията на епителни и мезенхимни биомаркери и установената рядка миоепителна диференциация при ТНКГ прави произхода на тези неоплазми от базални клетки на гърдата малко вероятен. Тези факти подкрепят хипотезата за хистогенеза на тези тумори от прогениторни клетки в различен стадии на диференциация.

8. Групата на базалоидните ТНКГ са високопролиферативни тумори, свръхекспресиращи Cyclin E, характеризиращи се с акумулация на p53 протеин, определени с метода на ИХХ. От групата на ТНКГ AR е свръхекспресиран предимно в небазалните типове, като се открива статистически значима връзка между експресията на EGFR и AR.

Необходимо е да се прилага интегративен подход в диагностиката на ТНКГ-да се има предвид клиничното значение не само на тройно негативния фенотип, а комбинацията от екзактна морфология, точно определен грейд, стадии на заболяването и допълнително проучване на имунофенотипа с приложение на други методики и техники в диагностиката на ТНКГ.

В рутинна практическа дейност, макар и редки като находка, ТНКГ изправят патолога пред редица предизвикателства.

В тази връзка си позволяваме да формулираме следните **практически послания и препоръки:**

1. В хистопатологичен аспект ТНКГ са хетерогенна група тумори със „специална” и „неспециална” морфологична находка. Спазването на морфологичните критерии в процеса на изграждане на диагнозата са важен фактор за правилното им разпознаване и разграничаването на ниско от високостепенните ТНКГ. Стриктното прилагане на критериите за специалните типове ТНКГ, позволява тяхното точно определяне, което има значение за вида на последващото лечение.

2. Важно е познаването и спазването на критериите за диагностика на "специалните" тройно негативни видове, поради факта, че хистотипът на първичния тумор е прогностичен и предиктивен фактор и някои ТНКГ като специални нискостепенни тумори, не се нуждаят от последващо адювантно лечение.

3. Солидната и/или синцитиална туморна архитектура, изразеният ядрен полиморфизъм, обилната еозинофилна цитоплазма на туморните клетки, зони на т.нар. „географски некрози” или наличие на комедонекрози, както и тумор-инфилтриращите лимфоцити са характерни за базалния и наследствен ТНКГ карцином. Тази морфологична находка, съчетана с данни за възраст и семейна онкологична анамнеза, прави пациентките с такива тумори подходящи за провеждане на генетично изследване за BRCA1 гена.

4. Хистопатологичната находка в първичния тумор дава възможност за селектиране на пациенти за генетични изследвания и подбор на определен тип терапия. Комбинацията от високостепенен тумор със зони на централна некроза може с голяма вероятност да предвиди неговия имунофенотип като ER негативен, базалоиден тумор. ТНКГ, негативни за СК 8, при позитивност за СК 5 или друг базален маркер, като p-cadherin, съчетан с млада възраст на пациентката, фамилен анамнез, в комбинация с медуларна или подобна на медуларна морфология тумори, селектира пациентки за генетично изследване на BRCA гените.

5. Дефиницията за ТНКГ включва точното определяне на хормоналния рецепторен статус - под 1% за ER и PgR. При пълна липса на оцветяване на туморните ядра, се препоръчва негативността да се приема винаги в контекста на верифицирана позитивна вътрешна контрола, локализирана в нормалните структури на гърдата.

6. За прецизиране на HER 2 статуса, освен щателно изпълнен протокол за IXX техника при материал, без съмнения в обработката, се препоръчва прилагане на ISH за неясни и подозрителни случаи.

Необходимо е стриктно спазване на съвременните ръководства за работа и отчитане на HER 2 статуса.

7. При съмнения от страна на патолога в обработката на материала се препоръчва да се използва друга техника-смяна на платформата, използване на по-чувствително антитяло или избор на метод, при които вероятността от грешка да е минимална.

8. Високият процент на позитивност за AR позволява маркерът да се използва като специфичен, при подозрения за метастаза от ТНКГ, обогатяващ панела от маркери като Mammaglobin, GCDFP-15. Освен това, той може да се прилага в рамките на клинични проучвания и в бъдеще за селектиране на пациенти, подходящи за таргетна терапия.

Както вече беше подчертано в резултатите, ТНКГ се представят като овални маси с избутващ растеж, което налага ДД по отношение на образната диагностика с бенигнени лезии и подбор на по-чувствителни методи като ЯМР за предоперативна диагностика и стадиране на тумора. Морфологичните аспекти на ТНКГ имат специфика, поради което е уместно да се следва алгоритъм за морфологичната им диагностика.

Практически алгоритъм за морфологична диагностика на ТНКГ

При ТНКГ е необходимо е да се започне с йерархически модел на диагностика, които биха могли да се разделят на следните етапи:

1. Правилно сециран, описан и изработен макроскопски материал, гарантиращ качествена морфология, за точно дефиниране на морфологичния вариант на първичния тумор, правилно определяне на грейдинг, размер на тумора, стадии и неговото разпространение. Желателно е да се извърши и образно-морфологично съпоставяне на находката.

2. Активно търсене на преинвазивни лезии и състояние на резекционни граници, при органосъхраняващи операции. От особено значение е да се отбелязва състоянието на резекционните ръбове и отстоянието им до маркирани граници, близостта на процеси, приемани за преканцерози, като плоска атипия, карцином ин ситу или микрогландуларна аденоза.

3. Сигурно потвърждаване дали туморът е неендокринно отговарящ-т.е. негативен за хормонални рецептори и за HER 2. Неясните случаи се препоръчва да тестват с други методи (ISH за HER 2), а подозрителните негативни или позитивни се ретестват с по-чувствително антитяло (SP1 за ER) или с друга платформа.

4. Препоръчва се особено внимание при карциноми, които не би трябвало да са с тройно негативен фенотип-като инвазивен лобуларен

карцином например. Ако е класически ИЛК, G2 , той най-вероятно е фалшиво ER негативен и подлежи на ретестване. Ако се касае за плеоморфен ИЛК, той би могъл да е с тройно негативен фенотип.

5. Особено внимание трябва да се обръща на източноклетъчните злокачествени неоплазми с тройно негативен имунофенотип. Необходимо е да се прилага панел от цитокератини за правилната идентификация на принадлежността им към епителните неоплазми и ДД със стромални саркоми и други мезенхимни мамарни и метастатични неоплазми.

6. Да се има предвид и копозитивността на ТНКГ за цитокератини и Vimentin, като последния не трябва да се приема като белег на мезенхимна хистогенеза.

7. Следваща стъпка в алгоритъма за диагностика са прилагане на допълнителни изследвания за определяне на пролиферативен индекс, фенотип на тумора-базалоиден или небазалоиден, експресия на AR с цел идентифициране на случаи с по-неблагоприятна прогноза или такива, суспектни за наследствен карцином и селектиране на пациенти, подходящи за специфичен тип терапия (платина-базирани схеми, анти-андрогенова терапия или PARP инхибитори).

8. Тумор-инфилтриращите лимфоцити са важен прогностичен и предиктивен фактор при ТНКГ и се препоръчва тяхното наличие и количество да се отбелязва в описанието на биопсията.

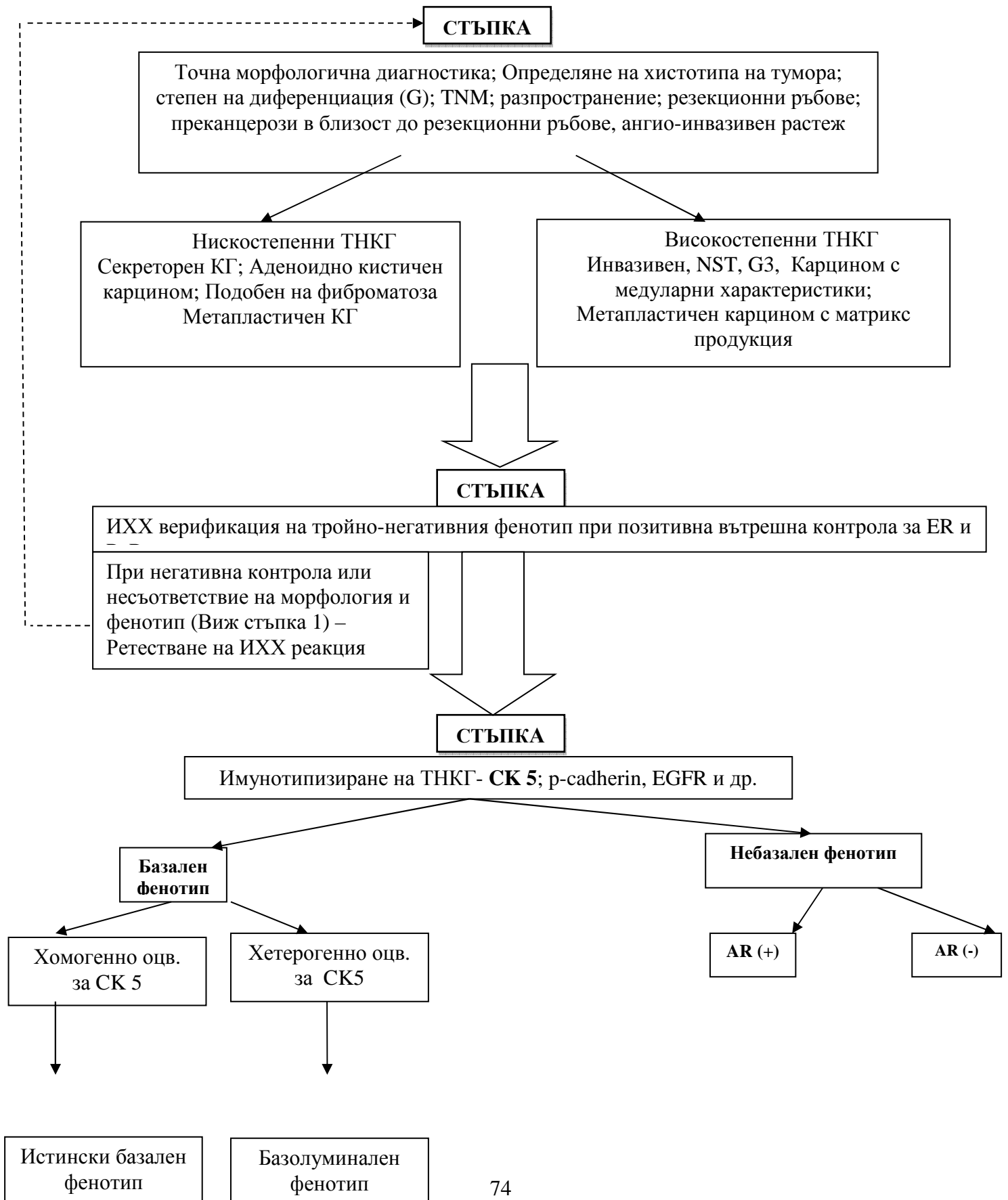
9. Генетично тестване се препоръчва за пациентки, които отговарят на определени критерии за фамилен карцином. Морфологичната находка има решаваща роля за селекция на пациентките, при които е уместно да се направи генетично консултиране и тестване за мутации.

10. Точното идентифициране на висцерални метастази от ТНКГ изисква мултидисциплинарен подход, надеждни анамнестични и образни данни и прилагане на панел от маркери, както и сравняване на първичния тумор с метастатичните лезии.

Схематично представяне на алгоритъма за морфологична диагностика на ТНКГ е показано в приложение 1.

Диагностичен алгоритъм за ТНКГ

Приложение 1



VI. Заключение

ТНКГ са хетерогенна група от неоплазми, които не могат да се лекуват с ендокринна терапия и анти-HER 2 агенти. По-често те се представят като карциноми, установени между профилактични прегледи, ако в страната има действаща система за скрининг.

Морфологично ТНКГ са спектър с представители с по-добра прогноза като секреторен и аденоидно-кистичен карцином, или нискостепенен метапластичен карцином, сходен с фиброматоза и в края на спектъра-други карциноми, показващи агресивен ход като метапластични и инвазивни G3, карциноми с медуларна характеристика. Имунофенотипно ТНКГ могат да се разделят на базалоидни (същински базални и базолуминални) и небазалоидни неоплазми. Двете групи са с различна клинична, биологична и морфологична характеристика и с различни възможни таргети за лечение. Базалният фенотип е чувствителен на cisplatin, EGFR агенти, мезенхимният на NVP-BEZ 235, PI3K/mTOR инхибитори, а луминалният андрогенов ТНКГ е чувствителен на bicalutamide. Поради тази причина пациентите от групата на ТНКГ трябва да се стратифицират на клинично значими групи.

Прогностичните сигнатури от първо поколение не намират място в определяне на прогнозата на ТНК. Поради това е важно патолозите добре да типизират и градират тези неоплазми, като внедрят в рутинна си практика и други стандартизирани предиктивни и прогностични показатели като туморна лимфоцитна инфилтрация, имунофенотип, пролиферативен индекс, наличие на AR и други, като загуба на експресия за Cav-1 в стромални фибробласти.

При ТНКГ, увеличената лимфоцитна инфилтрация се свързва с добра прогноза, даже при пациенти с позитивни лимфни възли и прави приложението на имуномодулаторния терапевтичен подход в тази група възможен.

ТНКГ е работен клиничен термин, който етиkira хетерогенна група карциноми с различна патогенеза, морфология и молекулярен профил, със свързваща характеристика – липса на хормонални рецептори и HER 2. Тези тумори не са толкова чести и засягат определен контингент-по-млади пациентки и такива с данни за наследствен карцином, поради мутация на BRCA 1 гена или алтерация на BRCA 1 пътя. Този тип неоплазма се диагностицира в напреднал стадий, поради изразена пролиферация на тумора и характеристиките на строежа и съотношение паренхим/строма, което определя особености при образната диагностика.

От морфологична гледна точка, независимо, че преобладаващите варианти са инвазивен, G3 карцином, при задълбочено проучване на серии от ТНКГ се намират и low grade карциноми, специални типове или по-високо диференцирани инвазивни карциноми, обикновено от небазален тип, експресиращи AR и с по-нисък пролиферативен Ki-67 индекс.

Специалните типове карциноми като медуларен, секреторен и аденоидно-кистичен, показват по-благоприятно биологично поведение и заслужават по-специално внимание в диагностичен и терапевтичен план.

Първоначално възприеман като синоним на базален КГ, ТНКГ се оказва хетерогенна група, съвпадаща в 56% с базалния карцином, в която могат да бъдат идентифицирани отделни субгрупи-базални, мезенхимоподобни, небазални, експресиращи преимуществено AR и карциноми при които морфологично се намира изразена възпалителна лимфоцитарна реакция.

ТНКГ като категория, базирана единствено на ИХХ находка, често води до неправилна класификация за определяне на субтип единствено по имунофенотипна характеристика, поради опасност от фалшиво позитивна или фалшиво негативна оценка на статуса на хормоналните рецептори и HER 2. Тази опасност съществува, особено ако се работи в условията на нестандартизирани или невалидирани методи и техники. Поради това е необходимо да се познава спецификата на морфологичната картина на ТНКГ, както и рационално да се използват ресурсите на различни методи, като ИХХ и допълващите ги и уточняващи ин ситу хибридизационни техники за HER 2 статуса. От друга страна, когато се получи неочакван резултат за негативен хормонален статус при low grade тумори, е необходимо да се повтори имунооцветяването, с цел да се търси фалшиво негативна реакция в условията на морфологично-ИХХ корелация.

Към настоящия момент няма международен, консенсусно приет панел, дефиниращ базалоиден фенотип с методите на ИХХ. В нашето проучване най-надежден, чувствителен маркер за определяне на базален фенотип се оказва СК 5. Необходимо е обогатяване на панела за определяне на този субтип ТНКГ с подобряване на чувствителността и специфичността на антителата, както и консенсус, относно границата за приемане на позитивност на ИХХ оцветяване. На базата на нашето проучване такива маркери биха могли да бъдат p-cadherin и Cav-1.

Патологът има активна и водеща роля в идентификацията на ТНКГ, тяхното точно диагностициране, стадиране, предикция и прогностикация, както и селекция на пациенти, подходящи за генетично тестване за наследствен карцином.

Приноси на разработката

Приноси с научно-теоретичен характер

1. Проучена е честотата на ТНКГ в сравнителен аспект-в регионален и национален мащаб, клиничко-патологичните характеристики и преживяемостта при пациентки с ТНКГ.

2. Задълбочено и цялостно се проучва морфологичната находка в подобрена група от ТНКГ с акценти на хистотипа на първичния тумор, архитектурните и цитологични особености на туморния паренхим, промените в стромата на тумора.

3. Проучва се вътрегрупово честотата на различните хистологични типове ТНКГ, като вариантите се разделят на ниско и високорискови типове с различна клинична значимост.

4. Проучена е честотата и видовете преканцерози, асоциирани с ТНКГ, както и находката в нетуморната тъкан.

5. Описани са модели на прогресия на ТНКГ, които създават ДД проблеми при пациентки с ТНКГ.

6. Проучено е метастазирането по лимфен път, като възможен механизъм на дисеминация при тези неоплазми с метод на изследване на лимфносъдова васкуларизация при ТНКГ, сравнени с другите основни субтипове от контролната група.

7. На цялостни срезове се проучва позитивността за базални цитокератини и базални маркери в група от ТНКГ и се стратифицират пациентките в зависимост от модела на експресия на тези биомаркери.

8. За пръв път в страната се проучва ролята на амплификацията на EGFR за свръхекспресия на протеиновия продукт.

9. Изградена е хипотеза за произход на ТНКГ от незрели прогениторни клетки, на база на установена коекспресия за базални и луминални маркери, честа експресия на c-kit, коекспресия на епителни и мезенхимни биомаркери и установена рядка миепителна диференциация при ТНКГ.

10. Системно е проучена е пролиферацията, експресията на Cyclin E, протеиновата експресия на мутантен тип p53 протеин, експресията на андрогенови рецептори, определени с метода на ИХХ.

11. Предлага се интегративен, мултидисциплинарен подход в диагностиката, предикцията и прогностикацията на ТНКГ с подчертаване на базисната роля на класическата морфология в диагностиката на ТНКГ.

Приноси с научно-практичен характер

1. Подробно се описва морфологичната находка и диагностичните критерии за така наречените специални типове ТНКГ, като се обсъждат диференциално диагностични трудности и аспекти.

2. Предлага се детайлизиран йерархически практически алгоритъм за диагностика на първични и метастатични ТНКГ.

3. Дефинирани са различни видове преканцерози при ТНКГ с препоръки за тяхното активно търсене и отбелязване в отговора на биопсията от патолога.

4. Разглеждат се примери от рутинна практика на метастази от ТНКГ, създаващи морфологични и имунофенотипни ДД проблеми, като се предлага практически алгоритъм и панел от полезни антители за диференциране на вторичен метакронен карцином и метастази във вътрешни органи, при пациентки с анамнеза за ТНКГ.

5. Дефинирани са чувствителни биомаркери за определяне на базален фенотип при ТНКГ.

6. Предлага се стратификация на ТНКГ въз основа на различната степен на пролиферация, експресия на Cyclin E и p53, както и позитивността за андрогенови рецептори, определени с метода на ИХХ.

7. Разработен е практически алгоритъм за морфологична диагностика на ТНКГ, като са изброени възможни грешки в диагностиката на ТНКГ, имунофенотипизирането и се предлагат препоръки за тяхното преодоляване.

8. Определена е активната роля на патолога в морфологичната предикция на наследствен карцином на гърдата и са посочени морфологични и имунохистохимични критерии за селекция на пациенти, подходящи за генетично тестване на BRCA 1 гена.

VIII. Списък на публикациите и съобщенията, свързани с дисертационния труд

Участие в написване на книги

1. **Поповска С.**, Иванов И. Аспекти на мамарната морфология и патология: основни правила и проблеми в клинично-морфологичната практика. Ред. С. Поповска, Т. Делийски. Плевен : ИЦ МУ-Плевен; **2012**.
2. Иванов И., **Поповска С.** Какво подобрява и какво влошава правилната формалинова фиксация при хистологичното изследване на карциномите на гърдата. В: *Рак на млечната жлеза - онкопластичен подход*. Ред. Дамян Дамянов, Ташко Делийски. [София] : Медарт; **2012**. с. 8-14.

3. Тончева Д., Гаврилов И., **Поповска С.** Оценка, консулт и редукция на риск за карцином на гърдата. В: *Поведение при карцином на гърдата: Клинично ръководство, основано на доказателства*. Варна : Национален експертен борд, **2013**. с. 17-19.
4. **Поповска С.**, Христова С. Предиктивни парадигми в патологичното субтипизиране на карцином на гърдата. В: *Клинично поведение при карцином на гърдата: учебна книга, текстове за продължаващо медицинско обучение*. Варна : Национален експертен борд, **2013**. с. 67-78.
5. **Поповска С.**, Динева Т., Иванов В. Ръководство за HER2-диагностика при рак на гърдата. София : Парадигма; **2014**.
6. Байчев Г., Михайлова Ж., Първанова В., Иванов И., **Поповска С.**, Инков И., Зиновиева Д., Гиндева И., Йорданов Д., Сергиева С., Михайлова И., Йорданов В., Цветанов Св., Кючуков Н., Даскалов В., Атанасова Е., Димитрова А., Кесов Г., Бадаров Т., Петкова-Нелова Д., Димитров Д., Гончаров А., Иванчева А., Петрова В., Мегданова В., Павлова Р., Адърска Е., Заболявания на млечната жлеза. В: *Неоплазми на млечна жлеза - Молекулярна патология на карцинома на гърдата*. Ред. Г.Байчев, *Второ преработено издание 2014 година*

- **В чуждестранни периодични издания**

1. Ruiz C., Seibt S., Al Kuraya K., Siraj A.K., Mirlacher M., Schraml P., Maurer R., Spichtin H., Torhorst J., **Popovska S.**, Simon R., Sauter G. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *International Journal of Cancer*. **2006**; 118 (9) : 2190-2194. DOI: 10.1002/ijc.21581 (IF = 4.693)
2. Ivanov I., **Popovska S.**, Betova T., Dineva T., Ivanova Zl. Vasculogenic mimicry as a potential antiangiogenic target in primary breast carcinoma: frequency and morphological characteristics. *Pharmacology on line*. **2011**; 3 : 421-434.
3. **Popovska S.**, Ivanov I. Lymphatic Vascularization in Primary Breast Cancer: HER2 overexpressing tumors contain more lymphatics than steroid receptor positive, triple-positive and triple negative breast carcinomas. *Turkish Journal of Pathology*. **2014**; 30 (20) : 124-132. (IF = 0.168)

- **В български списания и периодични сборници**

4. **Поповска С.**, Иванова Н., Бетова Т., Даскалова И. Проучване нивото на експресия на рецептора за епидермален растежен фактор (HER 1) при пациентки с локално авансирал рак на гърдата. *Военна медицина*. **2007**; 59 (4) : 18-23
5. Иванов И., **Поповска С.**, Бетова Т., Байчев Г. Произход на тумор-асоциираните лимфатици при рака на гърдата – морфологично проучване на туморната васкуларизация. *Военна медицина*. **2011**; 61 (4) : 27-33.
6. **Popovska S.**, Betova T., Ivanov I., Ooi A., Daskalova I. Triple-negative breast cancer - morphological and immunohistochemical study. *Trakia Journal of Sciences*. **2009**; 7 (supp.1) : 50-54.
7. **Popovska S.**, Ooi A., Ivanov I., Ivanova N., Dineva T. Triple-negative breast cancer does not fully overlap with “basal-like” molecular profile - morphological and immuno-histochemical study. *Journal of Biomedical & Clinical Research*. **2010**; 3 (1) : 45-50.

8. Иванов И., **Поповска С.**, Бетова Т., Байчев Г., Динева Т., Дикова Зл. Промени в прелимфатичната система и лимфните съдове на гърдата в зависимост от менструалния статус и наличието на инвазивен карциномен растеж. *Военна медицина*. **2011**; 63 (2) : 22-27.
9. Ivanov I., **Popovska S.**, Betova T., Dineva T., Karaivanov M., Ivanova Z. Double Antibody Cocktail (D2-40/ P63) : Protocol for identification of lymphatic vascular invasion in breast tissues: advantages of the protocol. *Journal of Biomedical & Clinical Research*. **2012**; 5 (1) : 36-42.
10. Kamburova Z., Kovacheva K., **Popovska S.**, Simeonova M. Genealogy of families with breast cancer – a tool to identify women at risk. *Journal of Biomedical & Clinical Research*. **2012**; 5 (2) : 139-147.
11. Kovacheva K., Kamburova Z., **Popovska S.**, Ivanov I., Simeonova M., Angelova P. Study of the carrier state for five BRCA₁/BRCA₂ deleterious mutations in Bulgarian women with breast cancer. *Journal of Biomedical & Clinical Research*. **2013**; 6 (2) : 100-105
12. **С.Поповска**, П.Дамянова, И.Иванов, Карцином, възникнал на фона на атипична и микрогландуларна аденоза – лезия с тройно негативен фенотип и негативно имунооцветяване за BRCA 1. *Военна медицина*. **2013**; 65 (3-4) : 72-77.
13. Иванов И., Динева Т., Дикова Зл., **Поповска С.** Изследване на приложимостта на chalkley шаблон за оценка на лимфната васкуларизация при карциномите на гърдата. В: 50 години от полета на първия човек в космоса: Сборник доклади от научна конференция. Национален военен университет «Васил Левски», Факултет Авиационен, **2011**. с. 168-175.
14. Иванов И., **Поповска С.** Какво подобрява и какво влошава правилната формалинова фиксация при хистологично изследване карциномите на гърдата? В: Дамянов Д., Делийски Т., ред. *Рак на млечната жлеза. Онкопластичен подход* : Материалите са преставени пред Националната конференция по хирургия, 10-12 май 2012, Плевен. София : Медарт; **2012**. с. 8-14.
15. Поповска С., Иванов И. Висцерални метастази от тройно негативни карциноми на гърдата - с принос на два случая и преглед на литературата. *Акушерство и Гинекология*, **2014**, (6) : 52-56.
16. Поповска С., Дамянова П., Томов С , Динева Т, Иванов И.: Случай на инкапсулиран, солиден, папиларен, тройно негативен карцином с базалоиден фенотип при бременна пациентка с преглед на литературата - Акушерство и Гинекология под печат.
17. Бетова Т., Петров К., Поповска С., Томов С., Йорданов Й., Дамянова П. Метастаза в гърдата от плоскоклетъчен карцином на маточната шийка - клиничен случай. *Акушерство и Гинекология* - под печат

Резюмета от участия в научни форуми

- **В чужбина**

1. Ivanov I., **Popovska S.**, Betova T., Baitchev G. Reasons for over- and underestimation of lymphatic vessel invasion in breast cancer. *European Breast Cancer Conference*; **2010** Mar.

24-24; Barcelona, Spain. *EJC Supplements*. **2010**; 8 (3) : 170-171. DOI: 10.1016/S1359-6349(10)70415-8 (IF = 9.386)

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 Archiv*. **2011**; 459 (Suppl. 1) : S74-S75. (IF = 1,237)
3. **Popovska S.**, Ivanov I., Betova T., Dineva T., Ivanova Z. The pre-lymphatic system and the lymphatic network of the breast in menstruating and in menopausal women: A comparative study. *Virchows Archiv*. **2012**; 461 (Suppl. 1) : S253. (IF = 1,237)
4. Foreid S., **Popovska S.**, Eusebi V. Breast tumours resembling Papillary Thyroid Carcinomas (PTC) : Report of 10 cases with long term follow up. *Virchows Archiv*. **2013**; 463 (2) : 103. (IF = 1,237)
5. **Popovska S.**, Ivanov I. Blood vessels inside lymphatic vessels in the human breast: An unrecognized morphological and functionally significant structure or an artificial phenomenon? *Virchows Archiv*. **2013**; 463 (2) : 249. (IF = 1,237)
6. Kovacheva K., Kamburova Z., **Popovska S.**, Ivanov I., Simeonova M., Lalchev S., Angelova P. Familial and histopathological characteristics of breast cancer in Bulgarian women. 10th Balkan congress of human genetics; 2nd Alpe Adria meeting of human genetics; **2013** Oct. 10-12; Bled, Slovenia.
7. **Popovska S.**, Ivanova V., Betova T., Baitchev G. Immunohistochemical methods for defining the estrogen and progesterone receptor status in breast cancer patients - oral presentation. *Second Medical Scientific Conference for students and young doctors*; **2003** May 15-17; Pleven, Bulgaria.
8. **Поповска С.**, Sauter G. In situ хибридизационни техники за определяне на HER 2 статуса при пациентки с рак на гърдата - постер. 30 години ВМИ-Плевен : Юбилейна научна конференция; **2004** окт. 15-17; Плевен.
9. Ivanov I., **Popovska S.**, Betova T., Baitchev G. Evaluation of lymphatic micro vessel characteristics in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples : Methods test on breast cancer specimens - постер. 19th national congress of anatomy with international participation; **2009** May 29-31; Pleven.
10. Ivanov I., **Popovska S.**, Betova T., Baitchev G. Evaluation of lymphatic vessel invasion by tumor cells in breast cancer - an evidence based algorithm – презентация. 7th Scientific Conference for Students and Young Doctors; **2009** Oct. 14-19; Pleven, Bulgaria
11. Ivanov I., Betova T., **Popovska S.**, Baitchev G. Light microscopy evaluation of the lymphatic capillaries morphology. How deep into the details can we see? – презентация. 7th Scientific Conference for Students and Young Doctors; **2009** Oct. 14-17; Pleven, Bulgaria.
12. Ivanov I., **Popovska S.**, Betova T., Baitchev G. Survival among patients with breast cancer may be improved by early diagnoses: conformation of a well known fact – презентация. International Congress of Medical Science for students and young doctors; **2011** May 12-15; Sofia, Bulgaria
13. Иванов И., **Поповска С.**, Бетова Т., Динева Т. Проблеми и решения свързани с перитуморната съдова инвазия при рака на гърдата - постер. 50 години катедра по Обща и клинична патология – Варна : Национална конференция на патолозите в България; **2011** окт. 7-9; Варна. с. 28

14. **Поповска С.**, Иванов И. Лимфангиогенеза при отделните подтипове на рак на гърдата - доклад. 8-ми национален конгрес по онкология с международно участие; **2011** ноем. 10-13; София. с. 82-83.
15. Kovacheva K., Kamburova Z., Petrova I., Dimitrov D., **Popovska S.**, Ivanov I., Simeonova M., Deliiski T., Dimitrova N., Gatsev O., Petrov C., Hadjieva E., Sabev I., Iordanov S. Clinical cases of familial breast cancer in Bulgarian patients. *Anniversary 10th Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors*; **2012** Oct 17-20; Pleven, Bulgaria. p. 152.
16. Ivanov I., **Popovska S.**, Kovacheva K., Kamburova Z. Histomorphological screening for breast cancer patients suitable for genetic testing for BRCA1. *Anniversary 10th Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors*; **2012** Oct 17-20; Pleven, Bulgaria. p.97
17. Kovacheva K., Kamburova Z., **Popovska S.**, Ivanov I., Simeonova M. Susceptibility gene mutations in breast cancer. *Anniversary 10th Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors*; **2012** Oct 17-20; Pleven, Bulgaria. p. 153.
18. **Поповска С.** Прогностични и предиктивни биомаркери при рак на гърдата : [Презентация]. *Молекулярна патология в онкологията : Първа национална конференция*; **2014** юни 6-7; София. с. 5
19. **Поповска С.** Какво онкологът трябва да научи от патолога?: Втора годишна научна конференция на БАМО; **2014** юни 13-14; София.
20. **Поповска С.** Многоликият ТНKG. *Постижения в диагностиката и лечението на солидни злокачествени тумори – новини от ASCO 2014 : Втора годишна научна конференция на БАМО*; **2014** юни 13-14; София
21. **Popovska S.**, Dineva T., Ivanov I., Betova T., Damyanova P., Petrov K., Bonchev R., Investigation of triple – negative breast cancers – morphological and immunophenotypic characteristics., Jubilee Scientific Conference "40 years Medical University – Pleven", 30 oct – 01 nov, 2014. Резюме в Journal of biomedical and clinical research Vol.7(1),2014, p.20

Участие в проекти, свързани с темата на дисертацията

- **Година на финансиране 2008**

1. Клинико-морфологична характеристика и проучване на фенотипа на негативните за HER2 и стероидни рецептори - т. нар. тройно негативни тумори на гърдата - водещ изследовател

- **Година на финансиране 2009**

2. Клинико-морфологични аспекти на тумор-асоцираните лимфатици при карцином на гърдата. – водещ изследовател
3. Проучване на имунофенотипа на т.нар. “тройно негативни” (негативни за HER2 и стероидни рецептори) тумори на гърдата. – водещ изследовател
4. Проучване върху честотата на носителството на генетични дефицити в BRCA1 и BRCA2 гените при фамилни случаи на рак на млечната жлеза. Методичен ръководител: доц. д-р Савелина Поповска, кат. Обща и клинична патология; Водещ изследовател: д-р Катя Ковачева – гл. ас. сектор Мед. генетика.
- 5.

• Година на финансиране 2013

6. Проучване върху честотата на големи геномни пренареждания в BRCA1 и BRCA2 гените сред пациентки с фамилен рак на млечната жлеза-методичен ръководител
7. Селекция на пациенти за мутации на BRCA1 гена, изследвани с метода на имунохистохимията при първични карциноми на млечната жлеза и аднекси на базата на морфологично базирани критерии-водещ изследовател.

IX. Списък на намерените цитирания на публикации, свързани с дисертационния труд

Ruiz C., Seibt S., Al Kuraya K., Siraj A.K., Mirlacher M., Schraml P., Maurer R., Spichtin H., Torhorst J., **Popovska S.**, Simon R., Sauter G. **Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer.** *International Journal of Cancer.* **2006**; 118 (9) : 2190-2194. DOI: 10.1002/ijc.21581 (IF = 4.693)

1. Burandt E., Bari Noubar T., Lebeau A. et al. Loss of ALCAM expression is linked to adverse phenotype and poor prognosis in breast cancer: A TMA-based immunohistochemical study on 2,197 breast cancer patients. *Oncology reports*, **2014**, 32 (6) : 2628-2634.
2. Clauditz, T.S., von Rheinbaben, K., Lebok, P. et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Pathology Research and Practice*, **2014**, 210 (10) :649-655.
3. Ekholm M., Beglerbegovic S., Grabau D. et al. Immunohistochemical assessment of Ki67 with antibodies SP6 and MIB1 in primary breast cancer: A comparison of prognostic value and reproducibility. *Histopathology*, **2014**, 65 (2) : 252-260. (IF₂₀₁₃ = 1.562)
4. Feeley L.P., Mulligan A.M., Pinnaduwa D. et al. Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Modern Pathology*, **2014**, 27 (4) : 554-561. (IF₂₀₁₃ = 6.364)
5. Hanken H., Groebe A., Cachovan G. et al. CCND1 amplification and cyclin D1 immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical Oral Investigations*, **2014**, 18 (1) : 269-276. (IF₂₀₁₃ = 2.285)
6. Knutsvik G., Stefansson I.M., Aziz S. et al. Evaluation of Ki67 expression across distinct categories of breast cancer specimens: a population-based study of matched surgical specimens, core needle biopsies and tissue microarrays. *PloS one*, **2014**, 9 (11): e112121.
7. Nagel B.M.A. Prävalenz und klinische Relevanz der TPD52 Gen-Amplifikation in humanen Mammakarzinomen : Promotion. Hamburg : Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, **2014**.
8. Park Y.H., Im S.-A., Cho E.Y. et al. Validation and comparison of CS-IHC4 scores with a nomogram to predict recurrence in hormone receptor-positive breast cancers. *Oncology (Switzerland)*, **2014**, 86 (5-6) : 279-288.
9. Plavetić N.D., Jakić-Razumović J., Kulić A. et al. Prognostic value of Ki-67 in breast carcinoma: tissue microarray method versus whole section analysis-potentials and pitfalls. *Pathology & Oncology Research*, **2014** : 1-10. DOI 10.10007/s12253-014-9823-5
10. Rashed A. Anwendung von MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) Imaging zur Identifikation von relevanten biologischen Veränderungen auf TMA

- (Tissue Microarrays) und Großschnitten : Dissertation. Hamburg : Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, **2014**.
11. Wan J., Zou S., Hu M. et al. Thoc1 inhibits cell growth via induction of cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, **2014**, 9 (6) : 2321-2327.
 12. Zhang P., Wu S.K., Wang Y. et al. p53, MDM2, eIF4E and EGFR expression in nasopharyngeal carcinoma and their correlation with clinicopathological characteristics and prognosis: A retrospective study. *Oncology Letters*, **2014** : 113-118. DOI: 10.3892/ol.2014.2631
 13. Agboola A.O., Banjo A.A., Anunobi C.C. et al. Cell proliferation (KI-67) expression is associated with poorer prognosis in Nigerian compared to British breast cancer women. *International Scholarly Research Notices*, **2013**. ID 675051
 14. Boos L.A., Dettmer M., Schmitt A. et al. Diagnostic and prognostic implications of the PAX8-PPAR gamma translocation in thyroid carcinomas-a TMA-based study of 226 cases. *Histopathology*, **2013**, 63 (2) : 234-241. (IF = 1.562)
 15. Burandt E., Jens G., Holst F. et al. Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **2013**, 137 (3) : 745-753.
 16. Groebe, A., Hanken H., Kluwe L. et al. Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **2013**, 42 (9) : 676-681.
 17. Kontzoglou K., Palla V., Karaolanis, G. et al. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology*, **2013**, 84 (4) : 219-225.
 18. Pinder S.E., Brown J.P., Gillett C. et al. The manufacture and assessment of tissue microarrays: suggestions and criteria for analysis, with breast cancer as an example. *Journal of Clinical Pathology*, **2013**, 66 (3) : 169-177.
 19. Plavetic N.D., Jakic-Razumovic J., Kulic A. et al. Prognostic value of proliferation markers expression in breast cancer. *Medical Oncology*, **2013**, 30 (2), Article Number: UNSP 523.
 20. Rakha E.A., Teoh T.K., Lee A. et al. Further evidence that E-cadherin is not a tumour suppressor gene in invasive ductal carcinoma of the breast: an immunohistochemical study. *Histopathology*, **2013**, 62 (5) : 695-701. (IF = 1.562)
 21. Schroeder C., Milde-Langosch K., Gebauer F. et al. Prognostic relevance of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) mRNA and protein expression in breast cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **2013**, 139 (10) : 1745-1755.
 22. Synnestvedt M., Borgen E., Russnes H. et al. Combined analysis of vascular invasion, grade, HER2 and Ki67 expression identifies early breast cancer patients with questionable benefit of systemic adjuvant therapy. *Acta Oncologica*, **2013**, 52 (1) : 91-101.
 23. Voss, M. A. An investigation into tetraspanin CD151 as novel prognostic markers in poor outcome endometrial cancer : Doctoral dissertation. Birmingham : University of Birmingham, **2013**.
 24. Wang J.-J., Sun X.-C., Hu Li et al. Endoglin (CD105) expression on microvessel endothelial cells in juvenile nasopharyngeal angiofibroma: Tissue microarray analysis and association with prognostic significance. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, **2013**, 35 (12) : 1719-1725.
 25. Zellweger T., Stürm S., Rey S. et al. Estrogen receptor β expression and androgen receptor phosphorylation correlate with a poor clinical outcome in hormone-naïve

- prostate cancer and are elevated in castration-resistant disease. *Endocrine-Related Cancer*, **2013**, 20 (3) : 403-413.
26. Ali H.R., Dawson S.-J., Blows F.M. et al. A Ki67/BCL2 index based on immunohistochemistry is highly prognostic in ER-positive breast cancer. *Journal of Pathology*, **2012**, 226 (1) : 97-107.
 27. Ali H.R., Dawson S.-J., Blows F.M. et al. Aurora kinase A outperforms Ki67 as a prognostic marker in ER-positive breast cancer. *British Journal of Cancer*, **2012**, 106 (11) : 1798-1806.
 28. Gnauck, B. Heterogenität des Y-Chromosomverlustes in Seminomen des Hodens : Dissertation. Hamburg : Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, **2012**.
 29. Holst F. ESR1-Amplifikationen in humanen gynäkologischen Tumoren : Dissertation. Hamburg : Universitätsklinikum Hamburg, **2012**.
 30. Kobierzycki C., Malinska A., Dziegiel, P. Application of tissue microarray technique (TMA) in neoplastic markers studies on breast cancers. *Postepy Biologii Komorki*, **2012**, 39 (3) : 519-530.
 31. Oeggerli M., Tian Y., Ruiz C. et al. Role of KCNMA1 in breast cancer. *Plos One*, **2012**, 7 (8), Article Number: e41664.
 32. Pinder S.E., Brown J.P., Gillett C. et al. The manufacture and assessment of tissue microarrays: suggestions and criteria for analysis, with breast cancer as an example. *Journal of Clinical Pathology*, **2012**, 0 : 1–9. jclinpath-2012. doi:10.1136/jclinpath-2012-201091
 33. Baker K., Lachapelle J., Zlobec, I. et al. Prognostic significance of CD8(+) T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. *Histopathology*, **2011**, 58 (7) : 1107-1116. (IF = 1.213)
 34. Choschzick M., Oosterwijk E., Mueller, V. et al. Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is an independent unfavorable prognostic marker in endometrioid ovarian cancer. *Virchows Archiv*, **2011**, 459 (2) : 193-200.
 35. Dekassian D.K. Stanzzyylinder Tissue Microarrays zur Identifikation prädiktiver Marker an Leberstanzbiopsien : Dissertation. Hamburg : Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, **2011**.
 36. Friderici Steinman E.G.F.M. Häufigkeit und prognostische Bedeutung von p53 und bcl-2 Alterationen bei menschlichen Weichgewebstumoren : Dissertation. Hamburg : Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, **2011**.
 37. Kim T.-J., Lee A., Lee S.-J. et al. Prognostic significance of amplification of the c-MYC gene in surgically treated stage IB-IIB cervical cancer. *Korean Journal of Pathology*, **2011**, 45 (6) : 596-603.
 38. Ruiz C., Holz D.R., Oeggerli M. et al. Amplification and overexpression of vinculin are associated with increased tumour cell proliferation and progression in advanced prostate cancer. *Journal of Pathology*, **2011**, 223 (4) : 543-552.
 39. Choschzick M., Lassen P., Lebeau A. et al. Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. *Modern Pathology*, **2010**, 23 (4) : 603-610. (IF = 4.176)
 40. Choschzick M., Heilenkoetter U., Lebeau A. et al. MDM2 amplification is an independent prognostic feature of node-negative, estrogen receptor-positive early-stage breast cancer. *Cancer Biomarkers*, **2010**, 8 (2) : 53-60.
 41. Choschzick M., Woelber L., Hess S. et al. Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) in vulvar cancer is associated with tumor progression and development of locoregional lymph node metastases. *Virchows Archiv*, **2010**, 456 (5) : 483-490.

42. Choschzick M., Lebeau A., Marx A. et al. Overexpression of cell division cycle 7 homolog is associated with gene amplification frequency in breast cancer. *Human Pathology*, **2010**, 41 (3) : 358-365.
43. Dancau A.-M., Wuth L., Waschow M. et al. PPFIA1 and CCND1 are frequently coamplified in breast cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*, **2010**, 49 (1) : 1-8.
44. Gromov P., Gromova I., Friis E. et al. Proteomic profiling of mammary carcinomas identifies C7orf24, a gamma-Glutamyl cyclotransferase, as a potential cancer biomarker. *Journal of Proteome Research*, **2010**, 9 (8) : 3941-3953.
45. Halama N., Zoernig I., Spille A. et al. Quantification of prognostic immune cell markers in colorectal cancer using whole slide imaging tumor maps. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, **2010**, 32 (6) : 333-340.
46. El Gammal A.T., Bruechmann M., Zustin J. et al. Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, **2010**, 16 (1) : 56-64.
47. Insabato L., Amelio I., Quarto M. et al. Elevated expression of the tyrosine phosphatase SHP-1 defines a subset of high-grade breast tumors. *Oncology*, **2010**, 77 (6) : 378-384.
48. Izycka-Swieszewska E., Wozniak A., Kot, J. et al. Prognostic significance of HER2 expression in neuroblastic tumors. *Modern Pathology*, **2010**, 23 (9) : 1261-1268. (IF = 4.176)
49. Klintman M., Bendahl P.-O., Grabau D. et al. The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. *Modern Pathology*, **2010**, 23 (2) : 251-259. (IF = 4.176)
50. Medunjanin S., Weinert S., Poitz D. et al. Transcriptional activation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit gene expression by oestrogen receptor-alpha. *EMBO Reports*, **2010**, 11 (30) : 208-213.
51. Mirlacher M., Simon R. Recipient block TMA technique. In: Simon, R. ed. Tissue microarrays : methods and protocols. New York, N.Y. : Humana Press, **2010**. p. 37-44.
52. Nagahara A., Nakayama M., Oka, D. et al. SERPINE2 is a possible candidate promotor for lymph node metastasis in testicular cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2010**, 391 (4) : 1641-1646.
53. Nalwoga H. Molecular markers in breast carcinoma. A study with focus on molecular phenotypes, angiogenesis and stem cells in an African population : Dissertation. Bergen, Norway : University of Bergen, **2010**.
54. Phipps A.I., Li C.I. Breast cancer biology and clinical characteristics. In: Li C.I. ed. Breast cancer epidemiology. New York : Springer, **2010**. p. 21-46.
55. Sauter G. Representativity of TMA studies. In: Simon, R. ed. Tissue microarrays : methods and protocols. New York, N.Y. : Humana Press, **2010**. p. 27-35.
56. Stein T., Cosimo E., Yu X. et al. Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis. *American Journal of Pathology*, **2010**, 177 (5) : 2323-2333.
57. Tennstedt, P., Sauter G. Quality aspects of TMA analysis. In: Simon, R. ed. Tissue microarrays : methods and protocols. New York, N.Y. : Humana Press, **2010**. p. 17-26.
58. Tsourlakis, M.C. Prävalenz von CCND1-Alterationen bei menschlichen Ösophaguskarzinomen : Dissertation. Hamburg : Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, **2010**.
59. Woods R., Ravdin P.M., Hayes M.M. et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncology*, **2010**, 11 (2).
60. Yerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M. et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncology*, **2010**, 11 (2) : 174-183.

61. Zhang Rui, Chen Hui-jiao, Wei Bing et al. Reproducibility of the Nottingham modification of the Scarff-Bloom-Richardson histological grading system and the complementary value of Ki-67 to this system. *Chinese Medical Journal*, **2010**, 123 (15) : 1976-1982.
62. Alkushi, A. Validation of tissue microarray biomarker expression of breast carcinomas in Saudi women. *Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy*, **2009**, 2 (3) : 394-398.
63. Brerner T. M., Jacquemier J., Charafe-Jauffret E. et al. Prognostic marker profile to assess risk in stage I-III hormone receptor-positive breast cancer patients. *International Journal of Cancer*, **2009**, 124 (4) : 896-904.
64. Fleischmann A., Schlomm T., Koellermann J. et al. Immunological microenvironment in prostate cancer: high mast cell densities are associated with favorable tumor characteristics and good prognosis. *Prostate*, **2009**, 69 (9) : 976-981.
65. Insabato L., Amelio I., Quarto M. et al. Elevated expression of the tyrosine phosphatase SHP-1 defines a subset of high-grade breast tumors. *Oncology*, **2009**, 77 (6) : 378-384.
66. Jarzabek K., Koda M., Kozlowski L. et al. The significance of the expression of ERR alpha as a potential biomarker in breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2009**, 113 (1-2) : 127-133.
67. Oelsner R. p53-Alterationen in Kolonadenomen: Beziehung zu Zellproliferation und Klinik : Dissertation. Hamburg : Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, **2009**.
68. Barginear M.F., Bradley T., Shapira I. et al. Implications of applied research for prognosis and therapy of breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **2008**, 65 (3) : 223-234.
69. Bertolo C., Guerrero D., Vicente F. et al. Differences and molecular immunohistochemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, **2008**, 130 (3) : 414-424.
70. Christgen M., Bruchhardt H., Ballmaier M. et al. KAI1/CD82 is a novel target of estrogen receptor-mediated gene repression and downregulated in primary human breast cancer. *International Journal of Cancer*, **2008**, 123 (10) : 2239-2246.
71. Mehta A.M., Jordanova E.S., Kenter G.G. et al. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **2008**, 57 (2) : 197-206.
72. Del Vecchio S., Zannetti A., Fonti R. et al. 99mTc-MIBI in the evaluation of breast cancer biology. *Breast Cancer: Nuclear Medicine in Diagnosis and Therapeutic Options*, **2008** : 71-81.
73. Wärnberg F., Amini R.-M., Goldman M. et al. Quality aspects of the tissue microarray technique in a population-based cohort with ductal carcinoma in situ of the breast. *Histopathology*, **2008**, 53 (6) : 642-649. (IF = 1.029)
74. Holst F., Stahl P.R., Ruiz C. et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nature Genetics*, **2007**, 39 (5) : 655-660.
75. Iakovlev V.V., Pintilie M., Morrison A. et al. Effect of distributional heterogeneity on the analysis of tumor hypoxia based on carbonic anhydrase IX. *Laboratory Investigation*, **2007**, 87 (12) : 1206-1217.
76. Keimer J.M. Matrix Metalloproteinase 14 (MMP14) Expression in menschlichen Neoplasien: Eine Gewebearray-Untersuchung an 3555 Tumoren : Dissertation. Hamburg : Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, **2007**.
77. Honrado E., Osorio A., Palacios J. et al. Pathology and gene expression of hereditary breast tumors associated with BRCA1, BRCA2 and CHEK2 gene mutations. *Oncogene*, **2006**, 25 (43) : 5837-5845.

78. McNeil C.M., Sergio C.M., Anderson L.R. et al. c-Myc overexpression and endocrine resistance in breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2006**, 102 (1-5 Spec. Iss.) : 147-155.
79. Riethdorf S., Reimers N., Assmann V. et al. High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *International Journal of Cancer*, **2006**, 119 (8) : 1800-1810.

Popovska S., Ooi A., Ivanov I., Ivanova N., Dineva T. Triple-negative breast cancer does not fully overlap with “basal-like” molecular profile - morphological and immuno-histochemical study. *Journal of Biomedical & Clinical Research*. **2010**; 3 (1) : 45-50.

80. Gannon L.M., Cotter M.B., Quinn C.M. The classification of invasive carcinoma of the breast. *Expert Review of Anticancer Therapy*, **2013**, 13 (8) : 941-954.
81. Rao C., Shetty J., Prasad K.H. (). Immunohistochemical profile and morphology in triple-negative breast cancers. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, **2013**, 7 (7) : 1361-1365.
82. Rao C., Shetty J., Kishan Prasad HL. Morphological profile and receptor status in breast carcinoma: An institutional study. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **2013**, 9 (1) : 44-49.
83. Abolins A., Strumfa I., Vanags A. et al. Histological and immunohistochemical evaluation of Cytokeratin 5/6 expressing breast cancer. *Acta Chirurgica Latviensis*, **2011**, 11 (1) : 28-33.

БЛАГОДАРНОСТИ

Научният труд е реализиран, благодарение на стипендия на Japan Society for Promotion of Science и научни проекти на МУ-Плевен. ИХХ и ин ситу хибридизационните изследвания са проведени в сектор „Молекулярна Патология” на Университета-Каназава, Япония.

Изказвам искрени благодарности на Проф. Акиши Оои, ръководител на сектор „Молекулярна Патология” на Университета-Каназава, Япония и специални благодарности на Винченцо Еузеби, един велик учител, споделил мъдростта и опита си в областта на мамарната патология.

Благодаря на всички колеги и приятели за колаборацията и съдействието, което ми оказаха през всички периоди на моята работа.

Благодаря на семейството за разбирането, подкрепата, толерантността и търпението през дългия период на подготовка, реализиране и оформяне на дисертационния труд.