

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені О.О. Богомольця

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Яновицька Марія Олександрівна

УДК: 616-006.6-091.8

ДИСЕРТАЦІЯ
ТРИЧІ НЕГАТИВНИЙ РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ: ВИКОРИСТАННЯ
ГІСТОЛОГІЧНИХ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ДЛЯ
ПРОГНОЗУВАННЯ КЛІНІЧНОГО ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ

14.03.02 – патологічна анатомія

22 «Охорона здоров'я»

222 «Медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Яновицька М.О.

Науковий керівник:

д.м.н., професор

Захарцева Любов Михайлівна

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Яновицька М.О. Тричі негативний рак молочної залози: використання гістологічних та імуногістохімічних показників для прогнозування клінічного перебігу захворювання. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія (222 «Медицина»). – Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ, 2021.

Рак молочної залози займає перше місце у світі серед усіх злоякісних пухлин жінок як по захворюваності, так і по смертності. Поділ карцином молочної залози на молекулярні підтипи значно покращив прогноз хворих, оскільки для люмінальних підтипів, які мають рецептори до естрогену та прогестерону, доступна опція гормонотерапії, а для HER2/neu-позитивних карцином є можливість застосування таргетної терапії. В той же час, тричі негативні карциноми, які отримали свою назву внаслідок того, що не мають рецепторів до естрогену, прогестерону та ампліфікації HER2/neu, мають обмежені опції лікування та найгірші показники виживаності. Невизначеність щодо лікування, питання щодо агресивного, а іноді і індолентного перебігу даних пухлин, а також у більшості випадків високий рівень мутаційного навантаження залишають цю групу пухлин осторонь від люмінальних та HER2-позитивних підтипів та ставлять багато питань до науковців і клініцистів-онкологів.

Дане дослідження направлене на вирішення цих питань шляхом удосконалення діагностики тричі негативних карцином та визначення актуальних прогностичних та предиктивних факторів.

Вирішення даної проблеми та обґрунтування результатів дослідження було досягнуто через застосування комплексу сучасних методів дослідження тричі негативних карцином молочної залози: гістологічних, імуногістохімічних і статистичної обробки даних.

Для вирішення завдань дослідження та досягнення поставленої мети проведено гістологічний аналіз 455 пухлин молочної залози та оцінку експресії імуногістохімічних маркерів.

Перша частина дослідження являє собою ретроспективно-проспективний аналіз гістологічних препаратів біопсійного та операційного матеріалу та історій хвороби пацієнтів (n=343) з діагнозом «тричі негативний рак молочної залози», що не має рецепторів до естрогену (ER), прогестерону (PR) та ампліфікації HER2/neu, які проходили лікування на базі Київського міського клінічного онкологічного центру протягом 2009-2017, для встановлення частоти, структури, вікового розподілу захворюваності, оцінки загальної та безрецидивної виживаності, а також визначення морфологічних особливостей пухлин (ретроспективний архівний матеріал та проспективний матеріал від пацієнтів, що проходили лікування у 2017 році).

Для дослідження прогностичного та предиктивного значення в гістологічних препаратах фарбованих гематоксилін-еозином визначено кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (операційний та біопсійний матеріал) та пухлино-стромальне співвідношення (операційний матеріал). Також на гістологічних зрізах проведено 313 імуногістохімічних дослідження експресії андрогену, TOP2A, PD-L1. У 44 випадках дослідження експресії PD-L1 проведено як на матеріалі передопераційної біопсії, так і на матеріалі операції після неoadьювантної хіміотерапії з подальшим порівнянням її експресії.

У другій частині дослідження окремо проаналізовано 112 пацієнтів з діагнозом «рак молочної залози» (27 пацієнтів люмінальної А групи, 26 пацієнтів люмінальної В групи, 29 пацієнтів HER2-позитивної групи та 30 пацієнтів тричі негативної групи) для оцінки експресії PD-L1 (проспективно) з подальшим порівнянням результатів для тричі негативних та інших молекулярних підгруп РМЗ.

За результатами дослідження архівного матеріалу та статистичних даних питома частка тричі негативних раку (ТНР) серед усіх злоякісних пухлин молочної залози склала $11\% \pm 0,88\%$.

5-річна виживаність пацієток з тричі негативними карциномами молочної залози з 1 стадією хвороби склала $76,7\% \pm 6,9\%$, з 2 і 3 стадіями захворювання $75,7\% \pm 4,1\%$ і $51,4\% \pm 6,19\%$, відповідно.

За ретроспективним аналізом гістологічного матеріалу (343 пухлини) було виявлено, що більшість з них представлена інвазивними неспецифічними (протоковими) карциномами, які тяжіють до низького ступеню диференціювання та мають високий рівень проліферативної активності.

За результатами ретроспективного аналізу операційного матеріалу (232 гістологічні зразки) пухлино-стромальне співвідношення (ПСС) є вагомим незалежним прогностичним маркером для тричі негативних карцином молочної залози з гіршими показниками загальної та безрецидивної виживаності для пухлин, що мають більший відсоток стромального компоненту. При побудові кривих Каплана-Мейєра було виявлено, що трирічна загальна виживаність для пухлин з низьким ПСС склала $86,9 \pm 2,60\%$, в той час як для пухлин з високим ПСС цей показник склав $75,3 \pm 3,92\%$. Трирічна безрецидивна виживаність для пухлин з низьким і високим ПСС склала $75,6 \pm 3,32\%$ та $61,3 \pm 4,54\%$, відповідно. При побудові одно- та багатофакторної моделі Кокса також було встановлено, що пухлини із високим ПСС мали статистично достовірно гірші показники загальної виживаності (КР 1,89; 95% ДІ 1,18-3,03, $p = 0,008$) та безрецидивної виживаності (КР 1,55; 95% ДІ 1,05-2,28, $p = 0,027$).

За результатами оцінки біопсійного та операційного матеріалу (321 зразок) наявність інтенсивного лімфоцитарного інфільтрату у тричі негативних пухлинах (41% і вище) є незалежним прогностичним фактором для загальної (КР 0,42, 95% ДІ 0,19-0,91, $p=0,029$) і безрецидивної (КР 0,50, 95% ДІ 0,26-0,95, $p=0,036$) виживаності і вказує на більш сприятливий прогноз. Загальна трирічна виживаність пацієнтів для групи з високою (41% і вище) кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПЛ) склала $89,4 \pm 3,032\%$, для групи з середньою кількістю ПЛ (10-40%) - $80,5 \pm 3,199\%$, для групи з низькою кількістю ПЛ (менше 10%) - $73,6 \pm 7,58\%$ ($p = 0,001$). Для безрецидивної виживаності дані показники склали,

відповідно, $77,6 \pm 4,112\%$, $69,9 \pm 3,764\%$, $57,9 \pm 8,58\%$ ($p = 0,03$). За побудованими кривими виживаності Каплана-Мейєра різниця у загальній та безрецидивній виживаності для пацієнтів трьох груп є статистично достовірною. Коефіцієнт Каппа склав 0,79, що вказує на високий рівень узгодженості між двома патологами, що оцінювали препарати.

За результатами проведених імуногістохімічних досліджень з антитілами до андрогену (AR) ($n=117$ реакцій), питома вага позитивних випадків експресії AR серед тричі негативних карцином молочної залози склала 29%. Прогностичного значення експресії андрогену (AR) виявлено не було (КР 0,49, 95% ДІ 0,12-2,01, $p=0,32$), проте було встановлено, що експресія AR має обернений кореляційний зв'язок з індексом проліферативної активності Ki-67 ($p=0,009$), (що частково пояснює хіміорезистентність цих пухлин).

За результатами імуногістохімічних досліджень (40 реакцій) з антитілами до Топоізомерази2А (TOP2A) 60% пухлин мали позитивну експресію даного білка. Статистично достовірного значення TOP2A у якості предиктивного маркера для призначення хіміотерапії з препаратами антрациклінового ряду виявлено не було. Позитивна експресія TOP2A має прямий кореляційний зв'язок з індексом проліферативної активності Ki-67 ($p=0,009$), (що вказує на можливість його використання як альтернативного маркера для дослідження проліферативної активності), а також з кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів ($p=0,05$).

У 44 випадках дослідження експресії PD-L1, яке було проведено як на матеріалі передопераційної біопсії, так і на матеріалі операції після неoad'ювантної хіміотерапії (парні випадки від одного і того ж пацієнта) з подальшим порівнянням її експресії, було виявлено низький рівень узгодженості між біопсійним та операційним матеріалом. Через це доцільно рекомендувати проведення оцінки PD-L1 безпосередньо перед застосуванням імунотерапії. При дослідженні зв'язку експресії PD-L1 у пухлинних клітинах з іншими клініко-морфологічними факторами було виявлено, що вона асоціюється з експресією PD-L1 у імунних клітинах ($p = 0,009$) та кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів ($p = 0,011$).

За результатами проспективного дослідження, у якому було проведено імуногістохімічні реакції (n=112) з білком PD-L1 для порівняння його експресії у різних молекулярних підгрупах раку молочної залози, було встановлено, що експресія білка PD-L1 як у імунному інфільтраті, так і в клітинах пухлини асоційована з молекулярним підтипом (p=0,0006 і p=0,002, відповідно) і є найвищою у групі тричі негативних карцином молочної залози (ТНР). Прогностичного значення даного маркера виявлено не було, проте доцільність його використання обумовлена застосуванням імунотерапії як третьої лінії терапії для ТНР.

При сукупній оцінці всіх прогностичних факторів для тричі негативних карцином, статистично достовірно було виявлено, що найбільш значущими є розмір пухлини, наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах та пухлино-стромальне співвідношення, а також кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. Імуногістохімічну оцінку експресії білків андрогену та PD-L1 необхідно проводити за умови розгляду відповідної опції терапії (як предиктивних маркерів).

Наукова новизна. Вперше проведена комплексна оцінка тричі негативних карцином з урахуванням мікрооточення цих пухлин. Визначено, що стромальний компонент та імунний інфільтрат навколо ТНР суттєво відрізняється. На підставі виконаних досліджень встановлено, що однакові за гістологічною будовою та ступенем диференціювання пухлини можуть суттєво відрізнятися за прогнозом в залежності від пухлино-стромального співвідношення та кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів.

Визначена частота експресії білків андрогену, PD-L1 та Topoisomerase II α . Встановлено обернений зв'язок між експресією андрогену та проліферативною активністю пухлин, що частково пояснює хіміорезистентність AR-позитивних пухлин. В той же час пухлини з позитивною експресією TOP2A, які вважаються більш сприйнятливими до хіміотерапії, асоційовані з вищим рівнем проліферативної активності.

Визначено, що експресія PD-L1 статистично відрізняється в залежності від молекулярної підгрупи РМЗ і є найвищою у групі тричі негативних карцином.

Встановлено, що експресія PD-L1 у клітинах пухлини асоційована з експресією PD-L1 у імунному інфільтраті та кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. На підставі цих досліджень можна зробити припущення, що тричі негативні пухлини з високою кількістю імунного інфільтрату є тим пулом карцином, де дослідження експресії PD-L1 є найбільш виправданим.

Поглиблена комплексна оцінка всіх вищезазначених параметрів має велике значення для поглибленого розуміння канцерогенезу і прогнозування перебігу тричі негативних карцином молочної залози.

Практичне значення. Отримані результати дозволяють підвищити якість діагностики тричі негативного раку молочної залози та розробити і впровадити рекомендації щодо прогнозування перебігу даного захворювання. Гістологічне визначення пухлино-стромального співвідношення та кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів не потребує додаткових затрат, і може бути легко впроваджено в рутинну практику патологоанатомів, що в свою чергу, дозволяє розділити когорту тричі негативних карцином на такі, що мають сприятливий і несприятливий прогноз. Імуногістохімічне дослідження з білками андрогену може бути використане для розгляду додаткової опції гормонотерапії пухлин, а експресія PD-L1 має важливе значення для призначення таргетної терапії для окремої групи пацієнтів з ТНР. Білок TOP2A може бути використаний в якості альтернативного показника проліферативної активності пухлини. Уточнення прогнозу захворювання надасть змогу найбільш оптимально підібрати протокол лікування, і таким чином, покращити показники виживаності для даної групи пацієнтів.

Ключові слова: рак молочно залози, тричі негативний рак молочної залози, мікрооточення пухлини, пухлино-інфільтруючі лімфоцити, пухлино-стромальне співвідношення, імуногістохімічне дослідження, прогноз перебігу.

ABSTRACT

Yanovytska M.O. **Triple negative breast cancer: application of histological and immunohistochemical characteristics for prognostication of the clinical course of the disease.** Qualifying scientific work as a manuscript.

The thesis for the degree of philosophy doctor of medical sciences, specialty 14.03.02-Pathological Anatomy (222 - Medicine) – National Medical Bogomotels University, Ministry of Health of Ukraine, 2021.

Breast cancer takes the leading place both in morbidity and mortality in the world among all malignant tumors in women. The subdivision of breast cancer into molecular subtypes significantly improved the prognosis of patients, because hormone therapy became available for luminal types that have estrogen and progesterone receptors, as well as targeted therapy appeared for HER2/neu-positive cancer. However, triple negative breast cancer which was named so because it lacks estrogen and progesterone receptors as well as HER2/neu amplification, have limited treatment options and the worst morbidity rates. Uncertainty about treatment, questions about the aggressive and sometimes favorable course of these tumors and high levels of mutational load in most cases leave group of triple negative cancer aside from luminal and HER2-positive tumors and cause questions to scientists and oncologists.

This study aims to solve these issues by improving the diagnostics of triple negative carcinomas and identifying current prognostic and predictive factors.

The solution of this problem and obtaining of the study results was achieved through the use of a set of modern research methods for triple negative breast cancer: histological, immunohistochemical and statistical data processing.

Histological analysis of 455 breast tumors and evaluation of immunohistochemical markers expression was performed to provide the necessary research.

The first part of the study is a retrospective-prospective analysis of histological biopsy and operation material specimens and case histories of patients (n = 343) diagnosed with "triple negative breast cancer" without estrogen receptors (ER), progesterone (PR) and amplification of HER2/neu treated at the Kyiv City Clinical Oncology Center during

2009-2017 (retrospective archival material and prospective material from patients treated in 2017). Frequency of disease, structure, age distribution, assessment of overall and recurrence-free survival, and morphological features of tumors were established and analyzed.

Also the number of tumor-infiltrating lymphocytes (surgical and biopsy material) and tumor stroma ratio (surgical material) were determined to evaluate their prognostic and predictive value for triple negative breast cancer in histological specimens stained with hematoxylin-eosin. Also 313 immunohistochemical reactions with androgen, TOP2A, PD-L1 were performed. In 44 cases, the study of PD-L1 expression was performed both on the material of preoperative biopsy and on the material of surgery after neoadjuvant chemotherapy with subsequent comparison of its expression.

In the second part of the prospective study, 112 patients diagnosed with breast cancer (27 in luminal A group, 26 in luminal B group, 29 in HER2-positive group and 30 in triple negative group) were separately analyzed to assess PD-L1 expression. The comparison of the results for different breast cancer molecular subgroups was also established.

According to the results of archival material and statistical data investigation, the specific share of triple negative carcinomas among all breast cancer is $11\% \pm 0.88\%$.

5-year survival of patients with triple negative carcinomas (1 stage) is $76,7\% \pm 6,9\%$, for 2 and 3 stage it is $75,7\% \pm 4,1\%$ and $51,4\% \pm 6,19\%$, respectively.

A retrospective analysis of histological material (343 tumors) revealed that most of them are invasive nonspecific (ductal) carcinomas that tend to a low degree of differentiation and high level of proliferative activity.

According to the results of retrospective analysis of surgical material (232 histological samples), the tumor stroma ratio is a significant independent prognostic marker for triple negative breast cancer with worse overall and recurrence-free survival for tumors with a higher percentage of stromal component. When constructing Kaplan-Meier curves, it was found that the three-year overall survival for tumors with low tumor stroma

ratio was $86.9 \pm 2.60\%$, while for tumors with high tumor stroma ratio this figure was $75.3 \pm 3.92\%$. The three-year recurrence-free survival for tumors with low and high tumor stroma ratio was $75.6 \pm 3.32\%$ and $61.3 \pm 4.54\%$, respectively. When constructing a single- and multifactorial Cox model, it was also found that tumors with high tumor stroma ratio had statistically significantly worse overall survival (HR 1.89; 95% CI 1.18-3.03, $p = 0.008$) and recurrence-free survival (HR 1.55; 95% CI 1.05-2.28, $p = 0.027$).

According to the results of biopsy and surgical material evaluation (321 samples), the presence of intense lymphocytic infiltrate in triple negative tumors (41% and more) is an independent prognostic factor for the overall (HR 0.42, 95% CI 0.19-0.91, $p = 0.029$) and recurrence-free (HR 0.50, 95% CI 0.26-0.95, $p = 0.036$) survival and indicates a more favorable prognosis. The overall three-year survival of patients for the group with a high (41% and above) number of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) was $89.4 \pm 3.032\%$, for the group with a medium number of TILs (10-40%) it was $80.5 \pm 3.199\%$, for the group with a low number of TILs (less than 10%) it was $73.6 \pm 7.58\%$ ($p = 0.001$). For recurrence-free survival, these indicators were, respectively, $77.6 \pm 4.112\%$, $69.9 \pm 3.764\%$ and $57.9 \pm 8.58\%$ ($p = 0.03$). According to the constructed Kaplan-Meier survival curves, the difference in overall and recurrence-free survival for patients in the three groups is statistically significant. The Kappa ratio was 0.79, indicating a high level of consistency between the two pathologists evaluating the slides.

According to the results of immunohistochemical studies with antibodies to androgen (AR) ($n = 117$ reactions), the proportion of positive cases of AR expression among triple negative breast cancer was 29%. The prognostic value of androgen (AR) expression was not detected (HR 0.49, 95% CI 0.12-2.01, $p = 0.32$), but it was found that AR expression has an inverse correlation with the proliferative index Ki-67 activity ($p = 0.009$), (which partly explains the chemoresistance of these tumors).

According to the results of immunohistochemical studies (40 reactions) with antibodies to Topoisomerase2A (TOP2A), 60% of tumors had a positive expression of this marker. There was no statistically significant value of TOP2A as a predictive marker for the appointment of chemotherapy with anthracycline drugs. Positive expression of

TOP2A has a direct correlation with the index of proliferative activity of Ki-67 ($p = 0.009$), (indicating the possibility of its use as an alternative marker for the investigation of proliferative activity), as well as the number of tumor-infiltrating lymphocytes ($p = 0,05$).

In study with 44 cases of PD-L1 expression performed on both preoperative biopsy and postoperative chemotherapy (paired cases from the same patient) followed by a comparison of its expression, a low level of consistency between biopsy and surgery was found. Therefore, it is advisable to evaluate PD-L1 immediately before immunotherapy. PD-L1 expression in tumor cells was found to be associated with PD-L1 expression in immune cells ($p = 0.009$) and the number of tumor-infiltrating lymphocytes ($p = 0.011$).

According to the results of a prospective study where immunohistochemical reactions ($n = 112$) with PD-L1 protein were performed to compare its expression in different breast cancer molecular subgroups, it was found that the expression of PD-L1 protein in both the immune infiltrate and in tumor cells is associated with a molecular subtype ($p = 0.0006$ and $p = 0.002$, respectively) and are the highest in the group of triple negative breast cancer. The prognostic value of this marker was not found, but the feasibility of its use is due to the use of immunotherapy as a third line of therapy for triple negative cancer.

Primary tumor size, regional lymph node metastases, tumor stroma ratio and number of tumor-infiltrating lymphocytes appeared to be the most statistically valuable prognostic factors among others in the combined assessment of prognostic factors for triple negative breast cancer. While androgen and PD-L1 expression can be optionally evaluated as predictive markers if appropriate treatment option can be chosen.

Scientific novelty

For the first time, a comprehensive assessment of triple negative carcinomas was performed taking into account both tumor and its microenvironment. It was determined that the stromal component and the immune infiltrate around the tumor can differ significantly. Based on the performed studies, it was found that the tumor of the same

histological type and degree of differentiation can differ tremendously in prognosis depending on the tumor stroma ratio and the number of tumor-infiltrating lymphocytes.

The expression frequency of androgen proteins, PD-L1 and Topoisomerase IIa was determined. An inverse relationship has been established between androgen expression and tumor proliferative activity, which partly explains the chemoresistance of AR-positive tumors. At the same time, tumors with positive expression of TOP2A, which are considered more susceptible to chemotherapy, are associated with higher levels of proliferative activity.

It was determined that expression of PD-L1 is statistically different depending on the molecular breast cancer subgroup and is the highest in the group of triple negative cancer. PD-L1 expression in tumor cells was found to be associated with PD-L1 expression in the immune infiltrate and the number of tumor-infiltrating lymphocytes. Based on these studies, it can be assumed that triple negative tumors with a high amount of immune infiltrate are the pool of carcinomas where the study of PD-L1 expression is most justified.

Comprehensive assessment of all mentioned above parameters is of great importance for deeper understanding of carcinogenesis and prediction of the course of triple negative breast cancer.

Practical meaning

The obtained results allow improving the quality of diagnosis of triple negative breast cancer and developing and implementation of recommendations for predicting the course of this disease. Histological determination of the tumor stroma ratio and the number of tumor-infiltrating lymphocytes does not require additional costs, and can be easily introduced into the routine practice of pathologists, which in turn allows dividing the cohort of triple negative carcinomas into those with favorable and unfavorable prognosis. Immunohistochemical study with androgen protein can be used to consider an additional option for tumor hormone therapy, and the expression of PD-L1 is important for the appointment of targeted therapy for a particular group of patients with triple negative breast cancer. TOP2A protein can be used as an alternative indicator of tumor proliferative

activity. Clarification of the prognosis will allow the most optimal treatment protocol, and thus improve survival rates for this group of patients.

Key words: breast cancer, triple negative breast cancer, tumor microenvironment, tumor-infiltrating lymphocytes, tumor stroma ratio, immunohistochemical study, prognosis.

Список публікацій аспіранта за темою дисертації:

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Статті у фахових журналах, рекомендованих ДАК України та включені до наукометричних баз:

1. Zakhartseva L.M., Yanovytska M.O. Пухлиноінфільтруючі лімфоцити при тричі негативних карциномах молочної залози. Патологія, 3, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.14739/2310-1237.2020.3.221722> (Web of Science). (Дисертант провела збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).
2. Захарцева Л.М., Яновицька М.О., Голобородько О.К., Шатрова К.М. Тричі-негативний рак молочної залози: молекулярно-генетичні особливості та прогностичні фактори (огляд літератури та аналіз власних даних).-Art of Medicine.-2018.-№3(7)-С.59-62. (Дисертант провела аналіз літератури, збір матеріалу, разом зі співавторами узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).
3. Zakhartseva L.M., Yanovytska M.O. Tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer: correlative analyses of own data and literature review. Ukrainian Scientific Medical Youth Journal. 2(110) (Jun. 2019), 31-41. DOI:[https://doi.org/10.32345/USMYJ.2\(110\).2019.31-41](https://doi.org/10.32345/USMYJ.2(110).2019.31-41). (Дисертант провела збір матеріалу, провела гістологічне та статистичне дослідження, разом зі співавторами узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).

Стаття в іноземному виданні:

4. Zakhartseva L., Yanovytska M. Prognostic value of tumor stroma ratio in triple negative breast cancer. Wiadomosci Lekarskie. - Vol. 74, Issue 3(2), March 2021, 565-571. (Дисертант провела збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. Zakhartseva L., Yanovytska M., Nekrasova L., Plodienko M. Expression of topoisomerase II alpha: correlation analysis with different molecular breast cancer subtypes, proliferative index and age of patient // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», 4-5 лютого 2019 р., м. Київ. – С. 82. (Дисертант провела аналіз літератури, збір матеріалу, разом зі співатворами узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала тези до друку).
6. Zakhartseva L., Yanovytska M., Zakhartsev Y., Plodienko M. The prognostic value of topoisomerase II- α for chemotherapy response and survival in breast cancer // 31st European Congress of Pathology in Nice, Nice, France 7–11 September, 2019. P. 93. (Дисертант провела аналіз літератури, разом зі співатворами узагальнила та проаналізувала одержані дані, розглянула проблемні питання, сформулювала висновки та підготувала тези до друку).

ЗМІСТ

Стор.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ТРИЧІ НЕГАТИВНИЙ РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ: КЛАСИФІКАЦІЯ, МОРФОЛОГІЯ, ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ПРОГНОЗ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	25
1.1 Сучасна класифікація раку молочної залози, поняття та класифікація тричі негативних карцином.....	25
1.2 Динаміка захворюваності на рак молочної залози та тричі негативні карциноми протягом останнього десятиріччя, епідеміологія.....	30
1.3 Гістологічна характеристика тричі негативних карцином молочної залози, фактори ризику та прекурсори.....	36
1.4 Гістологічні прогностичні та предиктивні фактори для тричі негативних карцином	41
1.5 Імуногістохімічні прогностичні та предиктивні маркери для тричі негативних карцином	47
1.6 Значення підтипів тричі негативних карцином молочної залози для протокольної терапії	50
ВИСНОВКИ	
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	55
2.1 Загальна характеристика матеріалів.....	55
2.2 Методи і методика дослідження	58
2.3 Статистична обробка результатів	61
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	62
3.1 Частота різних гістологічних варіантів, структура та віковий розподіл тричі негативних карцином молочної залози (результати дослідження архівного матеріалу за 2009-2017 рр.)	62

3.2 Динаміка захворюваності на рак молочної залози та тричі негативні карциноми протягом 2008-2019 рр. (за даними Київського міського клінічного онкологічного центру).....	65
3.3 Гістологічна характеристика тричі негативних карцином молочної залози (за результатами дослідження архівного матеріалу).....	69
3.4 Аналіз гістологічних прогностичних та предиктивних факторів для тричі негативних карцином.....	83
3.4.1 Пухлино-стромальне співвідношення як прогностичний фактор для тричі негативних карцином молочної залози.....	83
3.4.2 Пухлино-інфільтруючі лімфоцити як прогностичний фактор для тричі негативних карцином молочної залози.....	94
3.5 Аналіз імуногістохімічних прогностичних та предиктивних маркерів для тричі негативних карцином.....	106
3.5.1 Експресія андрогену у тричі негативних карциномах, її значення.....	106
3.5.2 Експресія TOP2A у тричі негативних карциномах, її значення ...	111
3.5.3 Експресія PD-L1 у тричі негативних карциномах, її значення	115
3.5.3.1 Дослідження експресії PD-L1 у різних молекулярних підгрупах раку молочної залози.....	115
3.5.3.2 Порівняння експресії PD-L1 у біопсіях та операційному матеріалі у тричі негативних карциномах молочної залози.....	119
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	127
ВИСНОВКИ.....	136
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	138

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	139
ДОДАТОК А Відомості про апробацію дисертації.....	161
ДОДАТОК Б Наукові праці, опубліковані за темою дисертації	162

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ

ER-естроген

HER2/neu – людський епідермальний фактор росту

LAR підтип – люмінальний андроген-позитивний підтип

PD-L1 – ліганд запрограмованої загибелі – 1

PR – прогестерон

TOP2A – топоізомераза 2 альфа

AMGA – атипичний мікрогландулярний аденоз

ДІ – довірчий інтервал

КР – відношення ризиків (коефіцієнт ризику)

МГА – мікрогландулярний аденоз

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

МСП – мікросередовище пухлини

ПА-МСК – пухлино-асоційовані мезенхімальні стовбурові клітини

ПАФ – пухлино-асоційовані фібробласти

ПЛІ – пухлино-інфільтруючі лімфоцити

РМЗ – рак молочної залози

ПСС- пухлино-стромальне співвідношення

ТНР – тричі негативний рак

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Показники захворюваності на рак молочної залози (РМЗ) найвищі серед усіх онкологічних захворювань жінок у світі (за виключенням раку шкіри). Щороку у світі понад 1,6 мільйона жінок захворюють на РМЗ і більше ніж 500 тис. з них помирають від цієї пухлини [1]. За даними Національного канцер-реєстру №18 за 2018-2019 рр. в Україні питома вага раку молочної залози в структурі захворюваності на злоякісні новоутворення складає 20,6% (перше місце серед жінок). Аналогічний показник (20,5%) мають злоякісні новоутворення молочної залози в структурі смертності від злоякісних новоутворень [32]. За даними Національного інституту раку США, у близько 12% жінок серед загальної популяції розвинеться рак молочної залози протягом життя [68].

Результати лікування РМЗ залежать від різноманітних факторів. Прогрес у лікуванні РМЗ пов'язують з верифікацією пухлини не тільки на гістологічному, а і на молекулярно-біологічному рівні. Класифікація лише за формальними морфологічними ознаками, яка використовувалась ще декілька десятиліть тому назад, залишала багато запитань для клініцистів.

Справжнім проривом в лікуванні РМЗ стала робота Пероу [3], яка дозволила класифікувати рак молочної залози (РМЗ) за допомогою профілювання експресії генів. Таким чином було виділено 4 основні на сьогодні молекулярні підгрупи РМЗ: люмінальний А, люмінальний В, з ампліфікацією HER2/neu та базальноподібний.

Протоколи лікування для даних підгруп стали більш індивідуалізованими і ефективними. Проте остання, базальноподібна підгрупа, відрізняється найгіршим прогнозом і найбільш обмеженими опціями лікування до сих пір. За імуногістохімічним профілем більшість базальноподібних карцином є тричі негативними, тобто такими, що не мають рецепторів до естрогену (ER), прогестерону (PR) та ампліфікації HER2/neu, звідки вони і отримали свою назву.

Невизначеність щодо лікування, питання щодо агресивного, а іноді і індолентного перебігу даних пухлин, а також у більшості випадків високий рівень

мутаційного навантаження залишають цю групу пухлин осторонь від люмінальних та HER2-позитивних підтипів та ставлять багато питань до науковців і клініцистів-онкологів. Дане дослідження направлене на вирішення цих питань шляхом покращення діагностики тричі негативних карцином та визначення актуальних прогностичних та предиктивних факторів.

Мета дослідження: визначити прогностичні і предиктивні гістологічні та імуногістохімічні фактори для тричі негативного раку молочної залози.

Завдання дослідження:

1. Дослідити показники захворюваності, клініко-гістологічні особливості тричі негативного раку молочної залози, їх питому частку серед РМЗ.
2. Оцінити кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів для тричі негативних карцином.
3. Оцінити відсоток стромального компоненту для тричі негативних карцином.
4. Провести імуногістохімічне дослідження експресії рецептора гормону андрогену, білка TOP2A.
5. Провести імуногістохімічне дослідження з білком PD-L1, порівняти його експресію у різних молекулярних підгрупах раку молочної залози, порівняти експресію PD-L1 у біопсійному та операційному матеріалі.
6. Оцінити прогностичне та предиктивне значення вищезазначених гістологічних та імуногістохімічних параметрів, виділити найбільш значущі для вибору лікування та прогнозування перебігу.

Об'єкт дослідження – тричі негативні карциноми молочної залози, що не мають рецепторів до естрогену (ER), прогестерону (PR) та ампліфікації HER2/neu.

Предмет – гістологічні та імуногістохімічні особливості тричі негативного раку молочної залози та прогнозування їх перебігу.

Методи дослідження: Для досягнення поставленої мети були використані загальноклінічні методи дослідження (ретроспективний та проспективний аналіз історій хвороб пацієнтів з метою встановлення стадії, особливостей лікування, показників виживаності), гістологічні (оцінка пухлино-стромального співвідношення, пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, гістологічних варіантів

пухлин, ступіню диференціювання, наявності некрозів та карциноми *in situ*), імуногістохімічні (оцінка імуногістохімічних реакцій з естрогеном, прогестероном, HER2/new, Ki-67, оцінка експресії андрогену, PD-L1, TOP2A), статистичне опрацювання отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше проведена комплексна оцінка тричі негативних карцином з урахуванням мікрооточення цих пухлин. Визначено, що стромальний компонент та імунний інфільтрат навколо ТНР суттєво відрізняється. На підставі виконаних досліджень встановлено, що однакові за гістологічною будовою та ступенем диференціювання пухлини можуть суттєво відрізнятися за прогнозом в залежності від пухлино-стромального співвідношення та кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів.

Визначена частота експресії білків андрогену, PD-L1 та Topoisomerase II α . Встановлено обернений зв'язок між експресією андрогену та проліферативною активністю пухлин, що частково пояснює хіміорезистентність AR-позитивних пухлин. В той же час пухлини з позитивною експресією TOP2A, які вважаються більш сприйнятливими до хіміотерапії, асоційовані з вищим рівнем проліферативної активності.

Визначено, що експресія PD-L1 статистично відрізняється в залежності від молекулярної підгрупи РМЗ і є найвищою у групі тричі негативних карцином. Встановлено, що експресія PD-L1 у клітинах пухлини асоційована з експресією PD-L1 у імунному інфільтраті та кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. На підставі цих досліджень можна зробити припущення, що тричі негативні пухлини з високою кількістю імунного інфільтрату є тим пулом карцином, де дослідження експресії PD-L1 є найбільш виправданим.

Поглиблена комплексна оцінка всіх вищезазначених параметрів має велике значення для поглибленого розуміння канцерогенезу і прогнозування перебігу тричі негативних карцином молочної залози.

Практичне значення

Результати, що випливають з дисертаційної роботи, дозволяють підвищити якість діагностики тричі негативного раку молочної залози та розробити і впровадити рекомендації щодо прогнозування перебігу даного захворювання. Гістологічне визначення пухлино-стромального співвідношення та кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів дозволяє розділити когорту тричі негативних карцином на такі, що мають сприятливий і несприятливий прогноз. Імуногістохімічне дослідження з білками андрогену може бути використане для розгляду додаткової опції гормонотерапії пухлин, а експресія PD-L1 має важливе значення для призначення імунотерапії для окремої групи пацієнтів з тричі негативним раком молочної залози. Білок TOP2A може бути використаний в якості альтернативного показника проліферативної активності пухлини. Уточнення прогнозу захворювання дає змогу найбільш оптимально підібрати протокол лікування, і таким чином, покращити показники виживаності для даної групи пацієнтів.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням автора. Спільно з науковим керівником визначена тема дослідження, мета та завдання, сформовано групи для досліджень. Дисертантом проведений інформаційний пошук, збір, обробка матеріалу, виконані гістологічні дослідження, зроблено статистичну обробку матеріалів, на підставі яких сформульовано висновки щодо можливості використання додаткових прогностичних та предиктивних факторів для тричі негативних карцином. Автором самостійно написані всі розділи дисертації. У наукових роботах, надрукованих дисертантом у співавторстві, йому належить фактичний матеріал, його участь є визначальною. Права співавторів публікацій порушені не були, конфлікти інтересів відсутні. Матеріали даної роботи не були використані в інших дисертаціях.

Апробація результатів дослідження

Основні положення та результати роботи оприлюднені на X Конгресі патологів України (Яремче, 16-18 вересня, 2018), науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, 4-5 лютого, 2019), XXXI Конгресі Європейської асоціації патологів (Ніцца, Франція, 7-11 вересня, 2019).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри патологічної анатомії №1 Національного університету ім. О.О. Богомольця «Розробка гістологічних і молекулярно-біологічних критеріїв диференційної діагностики пухлин та передпухлинних змін в органах і їх прогностичне значення», № державної реєстрації 0119U101131; термін виконання 2019-2021 роки. Дисертант є співвиконавцем зазначеної науково-дослідної роботи. Тема дисертації затверджена вченою радою медичного факультету №2 НМУ ім. О.О.Богомольця (протокол № 5 від 11 січня 2018 року).

Публікації

Результати дисертації опубліковані у 6 наукових працях, з них 4 - наукові статті (в тому числі 1 у періодичному науковому виданні Польщі, що індексується Scopus, 1 - у фаховому виданні України, що індексується Web of Science, 2 – у фахових виданнях України).

Структура і обсяг дисертації

Загальний обсяг дисертації складає 163 сторінки машинописного тексту. Дисертація викладена українською мовою та складається з анотацій українською та англійською мовами, переліку публікацій здобувача, вступу, огляду літератури (1 розділ), матеріалів та методів дослідження (2 розділ), власного дослідження (3 розділ), аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та додатків. Список джерел включає 147 праць. Робота ілюстрована 38 малюнками та 20 таблицями.

РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ТРИЧІ НЕГАТИВНИЙ РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ: КЛАСИФІКАЦІЯ, МОРФОЛОГІЯ, ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ПРОГНОЗ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Сучасна класифікація раку молочної залози, поняття та класифікація тричі негативних карцином

Сучасна класифікація раку молочної залози, яка використовується в щоденній практиці лікарів-онкологів передбачає розподіл на 4 основні підгрупи: люмінальний А, люмінальний В, з ампліфікацією HER2/neu та тричі негативний рак. Класифікувати РМЗ можливо на основі імуногістохімічних реакцій з рецепторами до ER, PR, білка HER2 та індекса проліферативної активності Ki-67.

Підгрупа тричі негативних карцином молочної залози - це гетерогенна група пухлин, яка становить приблизно 10-15% від усіх карцином молочної залози і має найгірші показники виживаності. За імуногістохімічним профілем вона не має рецепторів до естрогену (ER), прогестерону (PR) та ампліфікації HER2/neu. Дослідження останніх років остаточно довели, що РМЗ – це гетерогенне захворювання, що може суттєво відрізнятися за генетичним профілем, клініко-морфологічними параметрами, лікуванням та прогнозом. І найбільш фундаментально відрізняються між собою естроген-позитивні пухлини та тричі негативні пухлини. В той час, як ER-позитивні пухлини експресують гени, що характерні для люмінальних клітин, більшість тричі негативних пухлин експресують гени, характерні для міоепітеліальних клітин [5]. Терапевтичні можливості для цієї групи пухлин молочної залози також є обмеженими. Якщо для естроген, прогестерон-позитивних пухлин активно застосовується гормонотерапія, а для пухлин з ампліфікацією HER2/neu застосовується таргетна терапія, то для тричі негативних карцином основною і майже єдиною опцією на сьогодні залишається застосування хіміотерапії, протоколи якої не завжди чітко прописані [6].

За даними національного дослідження, проведеного у США, різниця в ризику смерті для тричі негативного та інших підтипів РМЗ найбільш відрізняється протягом перших 2 років після встановлення діагнозу [7]. Ризик рецидиву для тричі негативних карцином є найвищим у перші три роки захворювання. Показники виживаності для цієї групи залишаються практично на сталому рівні протягом останніх десятиріч [8]. Медіана загальної виживаності для пацієнтів з тричі негативним раком молочної залози з урахуванням всіх доступних терапевтичних опцій для тих, у кого розвинулася метастатична хвороба, складає 13-18 міс [9].

Клональна еволюція пухлин передбачає взаємодію драйверних порушень, нейтральних (так званих «пасажирських») порушень та мутаторних порушень, що збільшують рівень інших генетичних змін, а також зміни у мікрооточенні. Більшість мутацій у пухлинах вважаються «пасажирськими», і лише невелика кількість є «драйверами» [10].

У дослідженні METABRIC шляхом інтегративного аналізу було оцінено геном близько 2000 пухлин та запропоновано класифікацію РМЗ, що базується на генах «драйверах». Дослідження запропонувало 10 молекулярних підтипів РМЗ, що мають відмінний клінічний перебіг захворювання [11]. Можна припустити, що в майбутньому, у епоху розвитку таргетної терапії, така класифікація може стати концептуальною. Але хоча завдяки таким дослідженням очевидним стала гетерогенність раку молочної залози в цілому, клінічна валідність такої класифікації залишається на сьогодні під питанням. Щодо тричі негативних карцином, то для них особливо характерний складний паттерн зі збільшенням або втратами копій у геномі.

У дослідженні S.Shah та ін. [12] на прикладі 104 тричі негативних карцином молочної залози було показано, що на момент діагнозу ці пухлини мають широкий спектр геномної еволюції. Одні пухлини мають лише невелику кількість соматичних аберацій у декількох шляхах, в той час як інші мають сотні аберацій із залученням різноманітних шляхів. І хоча p53 та PIK3CA/PTEN соматичні мутації частіше були домінантними порівняно з іншими шляхами, у деяких пухлинах ці мутації не мали домінантний статус. Рівень мутаційного навантаження був високим. Таким чином,

результати цього дослідження вказують на те, що майбутні спроби розпізнати біологію та оптимальні терапевтичні заходи для тричі негативних карцином молочної залози потребують їх більш індивідуалізованого підходу. Підібрати єдину цільову терапію та знайти «драйверну» мутацію для цієї групи карцином неможливо [13]. А з іншого, можливо, це дає розуміння необхідності пошуку додаткових прогностичних факторів в інших площинах, окрім геному пухлин. Таким, наприклад, може бути дослідження мікрооточення пухлини, стромального компонента тощо, мова про які йтиме далі.

Оскільки гетерогенність тричі негативних карцином не викликає сумнівів, з метою розробки більш поглибленої їх класифікації також було проведено декілька досліджень за допомогою профілювання експресії генів.

Найпершими це зробили у 2011 р. науковці Lehmann та ін. [14] на матеріалі 587 пухлин з певним уточненням результатів у 2016 році [15] (оскільки дотупним став метод лазерної мікродиссекції, що дозволив більш точно аналізувати пухлину без залучення оточуючих тканин). У 2015 році Burstein та інші зробили ще одну спробу субкласифікувати тричі-негативний РМЗ на 198 зразках, виділивши такі 4 підваріанти пухлин як люмінальний андроген-позитивний, мезенхімальний, базальноподібний з імуносупресією та базальноподібний з активацією імунної системи. У цій роботі, на відміну від попередньої, було також проведено аналіз прогностичного значення цих підгруп та виявлено, що базальноподібний з імуносупресією має найгірші показники виживаності, а базальноподібний з активацією імунної системи, відповідно, найкращі [16].

Науковці з Франції провели власне дослідження із використанням профілювання експресії генів для визначення підгруп тричі-негативного РМЗ на матеріалі 194 зразків пухлин [17]. Подальші дослідження підваріантів ТНР показали, що найбільш нестабільний геном має базальноподібний варіант 1 типу [18].

Узагальнені дані щодо спроб класифікації ТНР на основі профілювання експресії генів представлені в табл.1.1

Таблиця 1.1

Підтипи тричі негативного раку молочної залози на основі аналізу експресії генів

Підтипи тричі негативних карцином (Lehman et al.) [14,15]	Підтипи тричі негативних карцином (Burstein et al.) [16]	Підтипи тричі негативних карцином (Jézéquel P.) [17]
Базальноподібний типу 1	Базальноподібний імунною супресією 3	Базальноподібний з низькою імунною відповіддю та великою кількістю M2-подібних макрофагів 3
Базальноподібний типу 2	Базальноподібний активацією імунної системи 3	Базальноподібний з високою імунною відповіддю та низькою кількістю M2-макрофагів 3
Мезенхімальний	Мезенхімальний	
Люмінальний андроген позитивний	Люмінальний андроген позитивний	Люмінальний андроген позитивний

В цілому, результати даних досліджень співпали. У всіх вищезазначених класифікаціях наявні люмінальний андроген-позитивний варіант та базальноподібний варіанти. Проте значення цих класифікацій на сьогодні мають обмежене значення для практичної діяльності клініцистів.

Тричі негативний рак часто ототожнюється з базальноподібним раком молочної залози, проте ці поняття не тотожні. Основна різниця між цими поняттями, перш за все, полягає у методі діагностики, оскільки базальноподібний РМЗ визначається за допомогою профілювання експресії генів, а тричі негативний рак – за допомогою імуногістохімічного методу [19].

Але оскільки для проведення профілювання експресії генів необхідно мати свіжий або заморожений зразок тканини, що не пройшов через гістологічну проводку (а в багатьох випадках це важно забезпечити) і цей аналіз є коштовним, на сьогодні існує декілька сурогатних імуногістохімічних панелей для визначення базальноподібного підваріанту РМЗ [20].

Один з варіантів визначення базальноподібного підтипу передбачає позитивну реакцію з CK5/6 або EGFR за наявності тричі-негативного статусу, при цьому будь-яка реакція з цими маркерами вважається позитивним результатом. Інший передбачає позитивну реакцію з CK14 та 34bE12 (включає CK1,4,10,14) та EGFR. Деякі автори також рекомендують визначати 1 базальний цитокератин (CK5/6), EGFR або c-Kit (CD117). Проте єдиної загальноприйнятої панелі до сих пір не розроблено [21].

Ототожнювати поняття тричі негативного та базальноподібного раку не слід. Дослідження показали, що приблизно 70-80% тричі-негативних пухлин є базальноподібними (за генетичним профілюванням вони відносяться до так званих normal-breast like, claudin-low, апокринових пухлин) в той же час як за різними даними 15-45% базальноподібних карцином не є тричі-негативними [22, 23].

Тричі-негативні пухлини, які вважаються базальноподібними, мають тенденцію до більш низького диференціювання, частіше виникають у пацієток молодшого віку (до 40 років), мають нижчі показники 10-річної загальної виживаності та асоційовані з ранніми рецидивами [24]. Проте деякі автори свідчать на користь того, що питома частка базальноподібних пухлини мають більш сприятливий прогноз, ніж прийнято вважати (зокрема, такі морфологічні підтипи як секреторна, аденокістозна карциноми молочної залози) [19]. В даному випадку особливий морфологічний підтип буде мати більшу прогностичну цінність, ніж визначення базальноподібного підтипу.

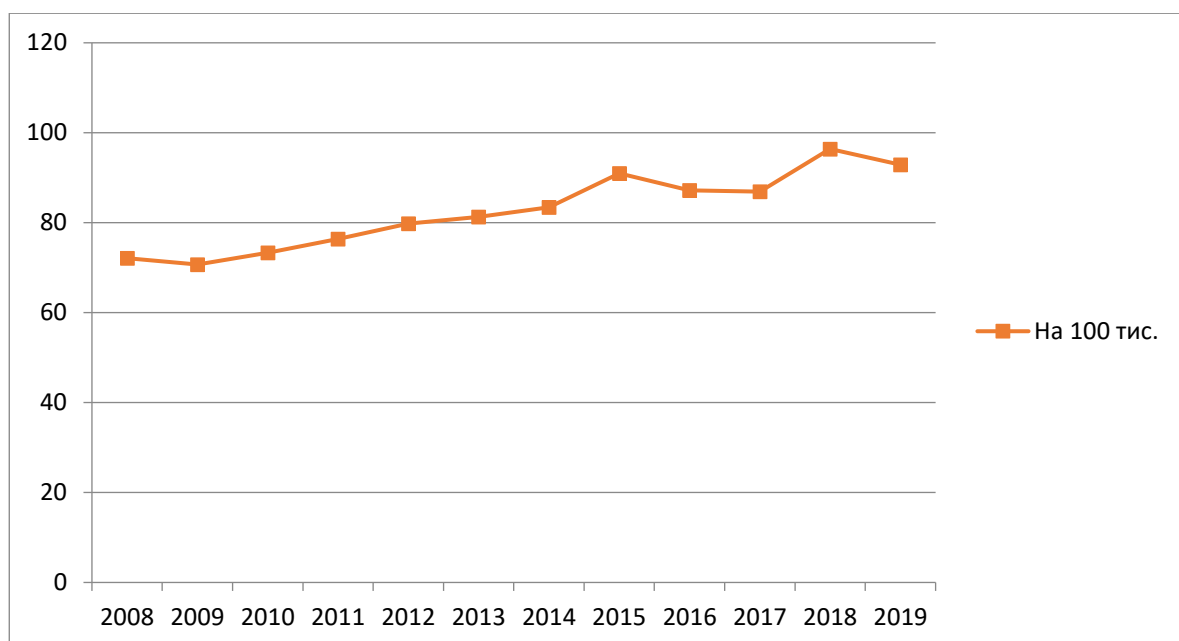
Проте імуногістохімічні дослідження тричі негативних карцином (зокрема, дослідження van de Rijn, Perou [25]), що мають експресію антитіл до цитокератинів базального типу (CK5\6, 17) статистично достовірно вказують на несприятливий прогноз .

1.2 Динаміка захворюваності на рак молочної залози та тричі негативні карциноми протягом останнього десятиріччя, епідеміологія

Показники захворюваності на рак молочної залози найвищі серед усіх онкологічних захворювань жінок у світі (за виключенням раку шкіри). Згідно з даними Американської онкологічної асоціації [26] 5-річна виживаність для локалізованого РМЗ (розповсюдження тільки в межах молочної залози) становить 99%, а для локалізованого тричі негативного РМЗ – 91%. Для РМЗ, який має розповсюдження за межами молочної залози (в найближчі ділянки або регіональні лімфатичні вузли) 5-річна виживаність становить 86% для всіх підтипів РМЗ, а для тричі негативних – лише 65%. 5-річна виживаність для ТНР при наявності дистальних метастазів складає 12%.

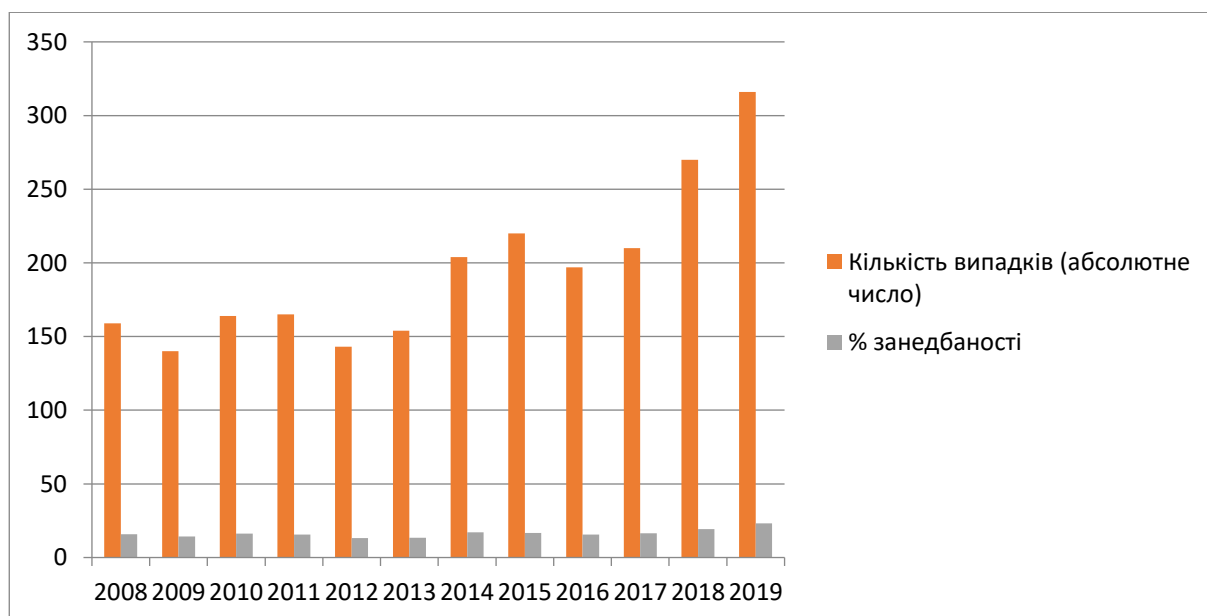
За даними Національного канцер-реєстру України [2] протягом останніх п'яти років РМЗ посідає перше місце за питомою вагою серед усіх онкологічних нозологій як по захворюваності (в межах 19-20%) так і по показникам смерності (аналогічними в межах 19-20%). Причому показник захворюваності на 100 тис. населення для міста Києва є найвищим порівняно з іншими областями.

З графіка, що представлений на мал. 1, видно, що захворюваність на рак молочної залози у місті Києві протягом останнього десятиріччя зростає (мал.1)



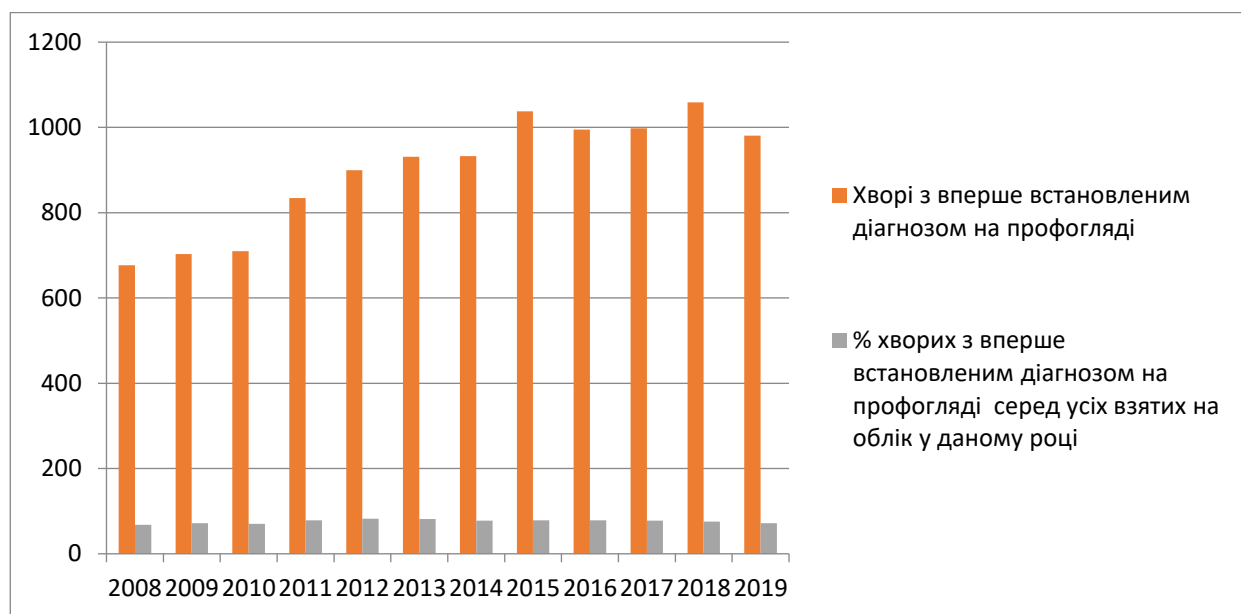
Мал. 1.1 Захворюваність на рак молочної залози у місті Києві на 100 тис. населення протягом 2008-2019 рр.

Показник занедбаності, який вказує скільки випадків раку молочної залози було діагностовано на стадії 3В або IV (з загальної кількості вперше діагностованих випадків), також зростає протягом останніх років (з 15,9% у 2008 році до 23,1 у 2019 році).

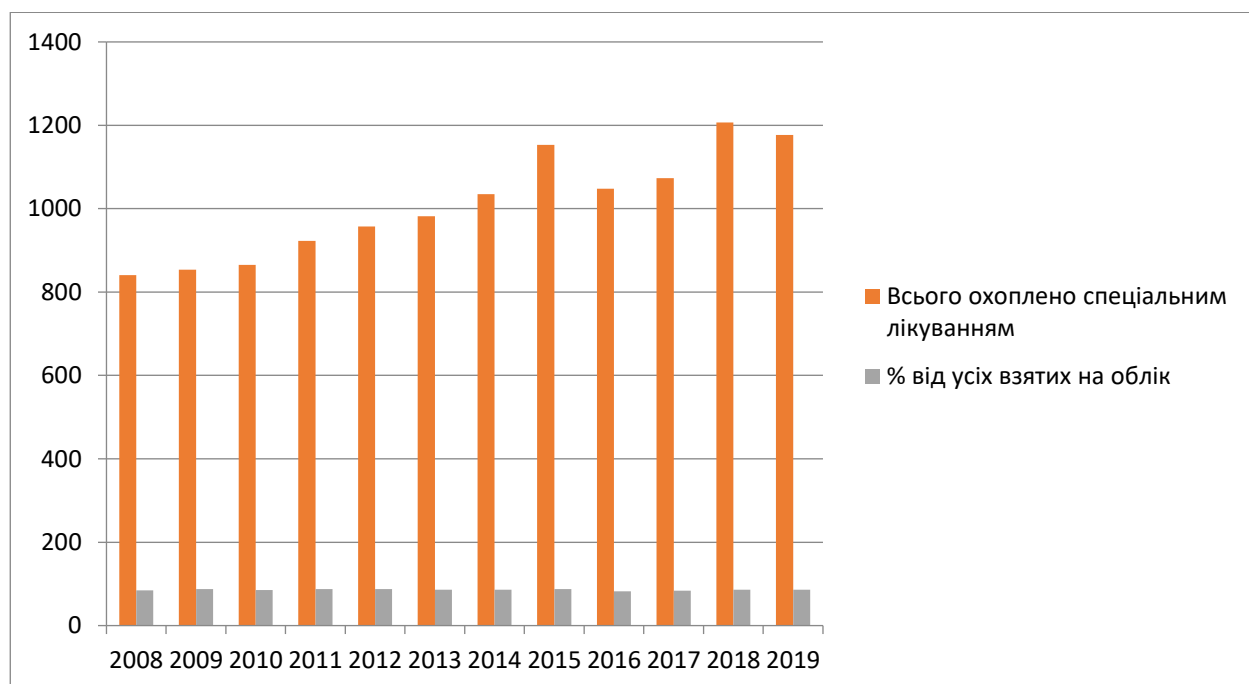


Мал. 1.2 Показник занедбаності для раку молочної залози у місті Києві протягом 2008-2019 рр.

Абсолютна кількість хворих з вперше встановленим діагнозом на профогляді також зростає протягом останнього десятиріччя, але відсоткове значення цього показника від усіх взятих на облік з діагнозом раку молочної залози у даному році залишається стабільним (мал.1.3) Аналогічні зміни прослідковуються з показником охоплення хворих на рак молочної залози спеціальним лікуванням (мал.1.4).

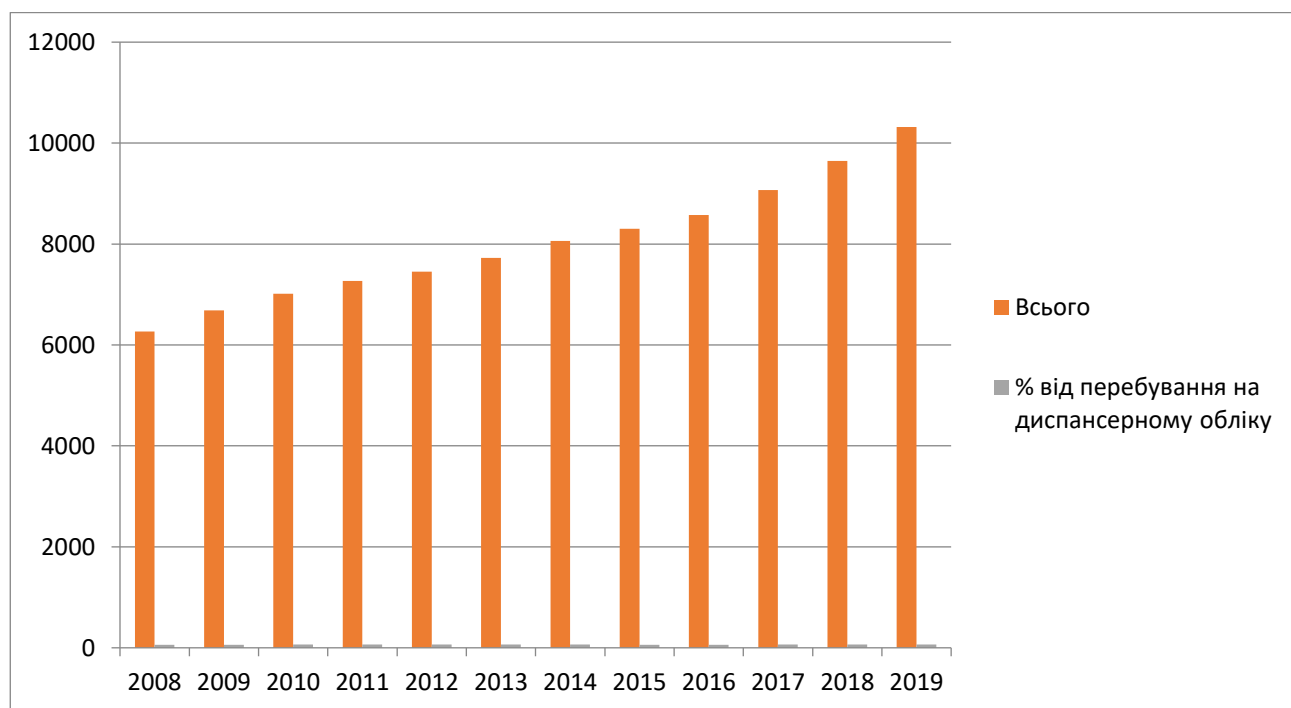


Мал. 1.3. Кількість та відсоток хворих, яким вперше було встановлено діагноз раку молочної залози на профогляді протягом 2008-2019 у місті Києві.



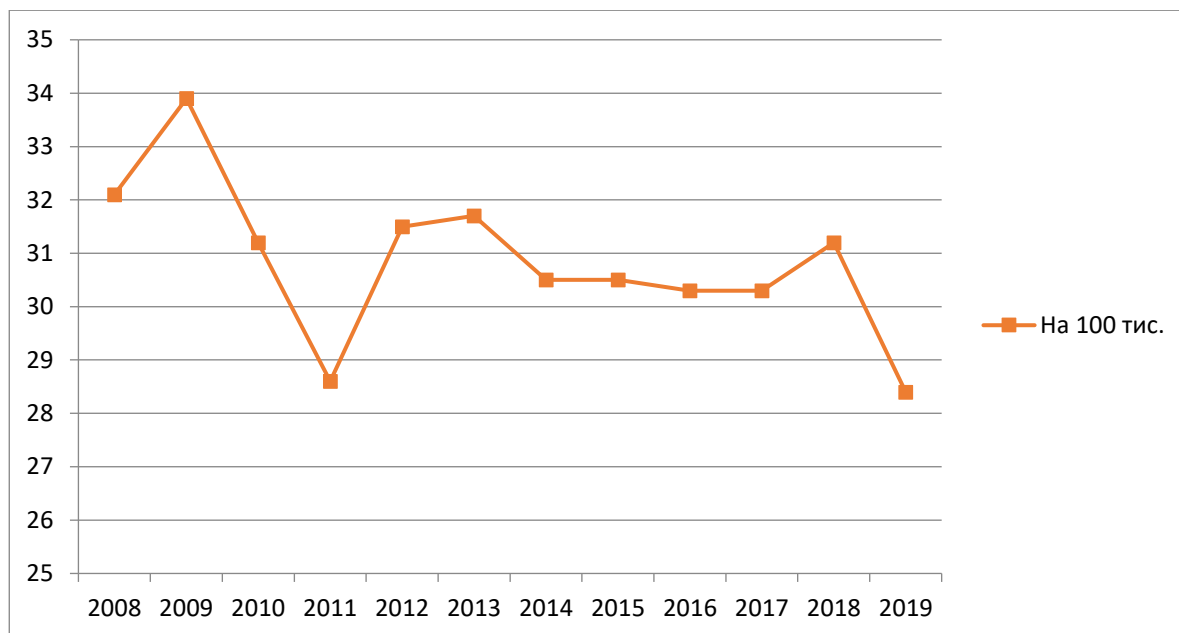
Мал. 1.4 Кількість та відсоток хворих на рак молочної залози, яких охоплено спеціальним лікуванням протягом 2008-2019 рр. у місті Києві.

Кількість хворих, що перебувають на обліку протягом 5 і більше років у місті Києві, у абсолютному значенні зростає (6269 хворих у 2008 році і 10318 хворих у 2019 році). Відсотковий показник (від загальної кількості хворих, що перебувають на диспансерному обліку) також має тенденцію до зростання (від 59,9% у 2008 році до 63,4% у 2019 році) (мал.1.5).



Мал. 1.5 Перебування хворих на рак молочної залози на обліку протягом 5 і більше років у місті Києві протягом 2008-2019 рр.

Показники смертності від раку молочної залози у перерахунку на 100 тис. населення протягом останнього десятиліття мають тенденцію до зниження (мал.1.6). Відсоток дорожчої летальності для хворих з раком молочної залози, яким вперше встановили діагноз, залишається приблизно сталим протягом останнього десятиріччя.



Мал. 1.6. Смертність хворих на рак молочної залози у місті Києві на 100 тис. населення протягом 2008-2019 рр.

Таким чином, показники захворюваності на рак молочної залози є високими і продовжують зростати. Показники смертності мають тенденцію до покращення, але в першу чергу, за рахунок люмінальних підтипів, які мають рецептори до естрогену та прогестерону, а тому мають опцію гормонального лікування, а також HER2-позитивних пухлин, таргетна терапія для яких значно покращила показники виживаності даної підгрупи. Показники виживаності для тричі негативних карцином залишаються на найнижчому рівні [27], при цьому жінки молодого віку (20-39 років) статистично достовірно хворіють частіше на ТНР ніж жінки старшого віку (50-64 років). А оскільки тричі негативний рак складає 10-20% від загальної кількості всіх випадків раку молочної залози, дане захворювання має великий і негативний соціальний вклад.

Численні дослідження показали епідеміологічні особливості тричі-негативного РМЗ. Наприклад, у когортному дослідженні, де приймало участь 1601 хвора на рак молочної залози (з них 180 – тричі негативні пухлини), було виявлено, що середній вік пацієток з тричі негативними карцинами нижчий, ніж у загальній групі (53 і 58 років відповідно) [28]. Інше дослідження (2230 пацієток) показало, що тричі негативні пухлини частіше зустрічаються у афро-американських жінок (20,8% і

10,4% відповідно) [29]. У дослідженні Carolina Breast Cancer Study було встановлено, що тричі негативний статус пухлини на 10% частіше трапляється у афроамериканських жінок (26% і 16% відповідно, і частіше зустрічається в передменопаузі (24%) аніж в постменопаузі (15%) [30]. Аналогічне заключення про більший відсоток тричі негативних карцином серед афроамериканок (незалежно від соціального статусу та інших факторів) зробили і в інших дослідженнях [31, 32]. Також тричі негативні пухлини частіше зустрічаються серед популяції латиноамериканок [33].

1.3 Гістологічна характеристика тричі негативних карцином молочної залози, фактори ризику та прекурсори

Тричі негативний рак молочної залози має свої морфологічні особливості, що включають підвищену мітотичну активність та ядерну атипію, наявність більшої кількості атипичних мітотичних фігур, клітинний плеоморфізм, високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення, невелику кількість стромального компоненту, наявність центральних некрозів (так званих «географічних» некрозів), часто також спостерігається виражена лімфоцитарна інфільтрація навколо пухлинного вогнища. Ступінь диференціювання РМЗ за Ноттінгемською модифікацією, тяжіє для тричі негативних карцином до низького (G3).

Індекс проліферативної активності для тричі негативних карцином, як правило, високий [34, 35]. Важливо зауважити, що тричі негативні пухлини відрізняються значним різноманіттям на гістологічному рівні (що є логічним, враховуючи його молекулярно-біологічну гетерогенність).

Класифікація ВООЗ інвазивного раку молочної залози [5], яка наразі використовується патологами по всьому світу, базується на гістологічному та імуногістохімічному аналізі. Вона передбачає наявність специфічних гістологічних підтипів, які складають до 25% всіх карцином молочної залози, але переважна більшість тричі негативних пухлин (50-80%), відносяться до так званих неспецифічних інвазивних карцином молочної залози (NOS) (в минулому, інвазивних протокових карцином). Необхідно зазначити, що неспецифічна інвазивна карцинома молочної залози, це, скоріше, діагноз-виключення, оскільки він вказує, що пухлина не відноситься до жодного з «специфічних» гістологічних підтипів, більшість яких мають тричі негативний статус і можуть прогностично відрізнятися від неспецифічних карцином, тому їх необхідно виділяти. До таких форм належать, наприклад, секреторна та метапластична карциноми (яка теж має свої підвиди, зокрема аденосквамозна карцинома низького ступеню, карцинома подібна до фіброматозу тощо), аденоїд-кістозна карцинома.

Також в останньому виданні класифікації ВООЗ описана ще одна рідка форма РМЗ, яка частіше буває тричі негативною - висококлітинний варіант папілярної карциноми молочної залози (tall cell variant of papillary breast carcinoma), раніше описана окремими авторами як пухлина молочної залози, що нагадує висококлітинний варіант папілярної карциноми щитовидної залози [36, 5]. Але оскільки геномне дослідження показало, що вона не має нічого спільного зі схожою карциномою у щитовидній залозі, нагадування про цю «схожість» було ліквідовано з назви. Даний гістологічний підтип був включений до останньої класифікації пухлин молочної залози ВООЗ, оскільки дослідження його геному та особливості морфологічної будови свідчать на користь того, що це окремий гістологічний підтип РМЗ.

З приводу деяких гістологічних форм, як, наприклад, апокринова та медулярна, вчені до сих пір ведуть дебати, чи справді вони виступають вони в ролі самостійних гістологічних форм. Саме тому в нову класифікацію апокринова карцинома увійшла вже як карцинома з апокриновим диференціюванням, хоча використання терміну «апокринова» є допустимим. Самостійна у попередньому виданні медулярна форма карцином також увійшла в нову 5-у класифікацію ВООЗ як карцинома з медулярним паттерном, тому що не дивлячись на більш сприятливий перебіг, на генетичному рівні вона не відрізняється від неспецифічних ТНР. Чітко окреслені межі, синтиціальний характер росту пухлини та інтенсивний лімфоцитарний інфільтрат є специфічними рисами даного типу карцином, а відносно сприятливий прогноз цих пухлин може бути результатом наявності великої кількості лімфоцитарного інфільтрату [37].

Як і для карциноми з медулярним паттерном, так і для інших більш рідких гістологічних підвидів ТНР відмічається низький рівень погодження між патологами. Все вищезазначене призвело до того, що гістологічна класифікація на сьогодні офіційно не включена у клінічні протоколи лікування РМЗ.

Проте виділяти дані гістологічні варіанти карцином вкрай важливо. Карциноми з апокриновими ознаками, для яких характерні великі клітини з рясною

еозинофільною цитоплазмою, велике ядро з вираженими ядерцями і які нагадують апокриннові потові залози, найімовірніше будуть експресувати рецептор андрогену та GCDFP-15, а також демонструвати молекулярний профіль експресії гена LAR. Таким чином, їх ідентифікація може свідчити про потенційну чутливість до антиандрогенних препаратів [38]. І хоча антиандрогенна терапія при РМЗ ще не входить до протокольного лікування, окремі дослідження вказують на її можливу ефективність в даному підвиді пухлин [39].

Окремої уваги заслуговує питання прекурсорів тричі негативного РМЗ. Завдяки дослідженню генетичних профайлів пухлин, стало відомим, що існує група доброякісних уражень молочної залози (до яких входить мікрогландулярний аденоз (МГА) і атипичний мікрогландулярний аденоз (АМГА)), які містять ідентичний до низькодиференційованих неспецифічних тричі негативних карцином молочної залози складний геномний ландшафт [40]. Тому вони наразі вважаються прекурсорами ТНР і можуть перерости у агресивну карциному. Аналогічно, карцинома з ацинових клітин (acinic cell carcinoma) має геномний ландшафт, що співпадає з низькодиференційованими неспецифічними ТНР, тому, не дивлячись на її сприятливий прогноз, вона може бути прекурсором більш агресивних варіантів пухлин. Саме тому надважливо для патологоів діагностувати ці форми та виділяти їх в окремі нозології.

Залишається відкритим питання, чи ТНР, що пов'язаний з МГА, АМГА та карциномою з ацинових клітин відрізняються за перебігом у порівнянні з іншими ТНР. Проте як незалежні нозологічні форми, МГА, АМГА та карцинома з ацинових клітин, мають сприятливий перебіг, і відповідно потребують відповідного ведення пацієнтів. Тим не менш, Geyer FC та ін. рекомендують повне висічення даних утворень, оскільки ймовірність та швидкість їх «перетікання» в злоякісні НТР залишається невідомою [41]. Ці автори також вказують, що у поєднаних з попередніх досліджень 4 когортах з МГА та 1 когорти з карциномами з ацинових клітин, серед 51 випадку захворювання у 24 (47%) та 7 (14%) пацієнтів були виявлені конкурентні інвазивні ТНР або карциноми *in situ*. Дослідники Guerini-

Rosso E та ін. припускають, що адекватне функціонування гену p53 може бути обмежувальним фактором для переходу МГА до АМГА та ТНР, і рекомендують обстеження на ген TP53 або визначення експресії p53 імуногістохімічним методом для пацієнтів з класичним та поширеним МГА [42].

Також окремим стовпом серед тричі негативних пухлин необхідно виділити ті, які мають простий генетичний ландшафт та мають визначені патогномічні (специфічні) генетичні альтерації. Це так звана група карцином, подібних за морфологією до карцином слинних залоз. Сюди відноситься секреторна карцинома з мутацією ETV6–NTRK3 та аденоїд кістозна карцинома з MYB–NFIB мутацією. Необхідно зазначити, що ці рідкі форми карцином також можуть перейти у неспецифічний ТНР, проте генетично вони будуть зберігати аберації, що мали їх попередники і не будуть відрізнятися складним генетичним ландшафтом, на відміну від класичних агресивних низькодиференційованих форм ТНР [38].

Як тричі-негативні, так і базальноклітинні карциноми молочної залози пов'язані з великим розміром пухлини, нижчою 5-річною виживаністю та збільшенням вірогідності віддалених метастазів [43]. Дослідження, що було проведено в рамках національної мамографічної скринінгової програми виявило [44], що пухлини, які вперше виявлялися у жінок, що регулярно проходять медогляд (пухлини з коротким інтервалом появи), частіше мали тричі негативний статус, що свідчить про швидкий ріст таких карцином. Крім того тричі негативні карциноми мають більший метастатичний потенціал щодо внутрішніх органів (особливо легені та мозок), проте з меншою ймовірністю метастазують у кістки у порівнянні з іншими формами раку молочної залози [45].

Доведено, що факторами ризику для РМЗ є раннє менархе, відсутність пологів та грудного вигодовування, пізній вік менопаузи. Високі рівні естрогену та прогестерону мають прямий кореляційний зв'язок з розвитком РМЖ у постменопаузальному віці, проте найбільше ці фактори пов'язані з естроген-позитивними пухлинами [5]. В свою чергу фактори ризику для тричі негативного РМЗ також мають свої особливості. Вони, навпаки, включають велику кількість

пологів та ранній вік перших пологів. Крім того, коротка тривалість грудного вигодовування, раннє менархе та ожиріння також є факторами ризику для тричі негативного РМЗ [34, 35, 8].

1.4 Гістологічні прогностичні та предиктивні фактори для тричі негативних карцином

Для прогнозування перебігу раку молочної залози, в тому числі і тричі негативного, на сьогодні найбільш широко використовується розповсюджена система класифікації раку молочної залози, що включає розподіл за морфологічними особливостями, TNM класифікацію (оцінює розмір пухлини (T), ураження лімфатичних вузлів (N) та наявність віддалених метастазів (M) та оцінку ступеня злоякісності пухлини за Ноттінгемською модифікацією системи Скарфа-Блума-Річардсона. Остання передбачає оцінку у 3-бальній шкалі наступних параметрів: формування гландулярних структур, ядерний плеоморфізм та наявність мітозів. Залежно від суми балів, пухлина має статус високо-(G1), помірно-(G2) та низькодиференційованої (G3) пухлини. Необхідно зазначити, що ця система оцінки ступеня злоякісності піддається критиці через її недосконалість [46]. Наприклад, часточковий рак, що не формує гландулярних структур (3 бали за системою Блума-Річардсона), має виражений ядерний атипізм (т.зв. плеоморфний варіант) (також 3 бали), проте не має виражених мітотичних структур (1 бал) формально підпадає під G2 (3+3+1), проте майже завжди перебіг такого плеоморфного варіанту часточкової карциноми молочної залози є більш агресивним. Окрім того, на визначення рівня диференціювання впливає різний рівень погодження між патологами.

Також для отримання повноцінної інформації щодо прогнозу захворювання та обрання необхідного протоколу лікування визначення імуногістохімічного профілю та, за необхідності, генетичне дослідження, стали майже рутинною практикою сьогодення. Комерційні молекулярні тести, такі як MammaPrint (Нідерланди), що включає дослідження 70 генів, та Oncotype DX (США), що включає панель з 21 генів, покращили результати вибору тактики лікування деяких груп пацієнтів, зокрема з естроген-позитивними та HER2-негативними пухлинами [47, 48]. Проте не дивлячись на прогрес у пошуку додаткових прогностичних та предиктивних факторів для РМЗ, багато питань щодо тричі негативних карцином для клініцистів залишається відкритими.

Невелика частина пацієнтів з тричі негативним статусом пухлини після неoad'ювантної хіміотерапії мають четвертий ступінь лікувального патоморфозу (що характеризується відсутністю інвазивної карциноми у молочній залозі та лімфатичних вузлах - ypT0 / ypN0) [49]. Дослідження вказують, що четвертий ступінь лікувального патоморфозу виступає сприятливим прогностичним фактором і прогноз для таких хворих кращий, порівняно з тими, хто має нижчий ступінь лікувального патоморфозу [50].

У дослідженні за участю 255 пацієнтів, які отримували стандартні схеми неoad'ювантної хіміотерапії (антрациклін або антрациклін з таксанами), кількість тричі негативних пухлин, що мали четвертий ступінь лікувального патоморфозу була вищою, ніж для інших підтипів карцином молочної залози (22% проти 11%, $P = 0,034$) [45]. У двох подібних дослідженнях, де порівнювали показники лікувального патоморфозу тричі негативних пухлин та люмінальних підтипів РМЗ, результати були ще більш показовими (25-45% проти 6-7%) [51,52]. Отже, такі пацієнти мають кращий прогноз, проте для більшості пацієнтів (які мають залишкову хворобу після проведення неoad'ювантної хіміотерапії) прогноз залишається несприятливим.

Мікросередовище пухлини (МСП), яке складається з пухлино-асоційованих фібробластів (ПАФ), ендотеліальних клітин, перицитів та імунного інфільтрату, суттєво впливає на інвазивні якості пухлини та темпи метастазування [53] і відіграє важливу роль у прогресії пухлин [54]. Тому особливо актуальними останнім часом стали дослідження таких факторів як, наприклад, пухлино-інфільтруючі лімфоцити (ПЛ), які є складовою імунного інфільтрату.

Півищена кількість ПЛ характерна для тричі негативних карцином [55], і в цьому контексті імунотерапія також є актуальною темою досліджень як можлива додаткова опція лікування даних пухлин [56].

Пухлиноінфільтруючі лімфоцити, як основна складова імунного інфільтрату, виступають у якості прогностичного фактора для тричі негативних карцином молочної залози за даними багатьох досліджень [57, 58] з вищими показниками виживаності для пухлин, багатих на лімфоцитарний інфільтрат. Ohtani та ін. [59],

зокрема, ввів поняття раку молочної залози з переважанням лімфоцитів у стромі, продемонструвавши, що такі пухлини мають кращу безрецидивну виживаність, ніж контрольна група.

За даними Criscitiello et al., ПЛІ також має значення як незалежний предиктивний маркер для відповіді на неoad'ювантну хіміотерапію для всіх молекулярних підгруп молочної залози [60], проте найбільш виражений зв'язок спостерігається саме для тричі негативних та HER2 позитивних пухлин. Це підтверджують і інші дослідження [61].

Необхідно зауважити, що більшість досліджень імунного інфільтрату пов'язані з дослідженням саме їх імуногістохімічного профілю [62,63,64], залишаючи морфологічне дослідження дещо на другорядному плані. Частково це можна пояснити розвитком комерційних програм на кшталт Immunoscope (яка підраховує інтенсивність специфічного лімфоцитарного інфільтрату, зокрема CD3+ та CD8+, використовуючи при цьому комп'ютеризовані програми[65]; наразі вона використовується для раку товстої кишки[66]). Хоча саме простота і легкість дослідження ПЛІ на гематоксилін-еозиновому скельці і надає данному показнику переваг.

Окрім імунного інфільтрату, мікросередовище пухлини включає в себе інші складові, такі як пухлино-асоційовані фібробласти (ПАФ), ендотеліальні клітини, мезенхімальні стовбурові клітини, перицити тощо.

Кілька досліджень показують, що біологія ПАФ відрізняється від звичайних фібробластів. Зокрема, фібробласти, знайдені в стромі пухлини (через це і названі асоційованими з пухлиною), відрізняються від нормальних за своїм «активованим фенотипом» з посиленою продукцією колагену та факторами росту [67]. Вони характеризуються вищим рівнем проліферації і можуть сприяти інвазії та підвищувати проліферацію безпосередньо раку молочної залози [68]. Вони також мають інший, порівняно зі звичайними фібробластами, фенотип. Відповідно до зворотного ефекту Варбурга, описаного Pavlidis et al. [69], ПАФ проходять міофібробластичну диференціацію та виділяють лактат та піруват. Епітеліальні

ракові клітини можуть поглинати ці багаті енергією метаболіти і використовувати їх у циклі Кребса, сприяючи тим самим ефективному виробництву енергії, що в результаті знову ж таки підвищує проліферативну здатність.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), які мігрують у строму пухлини, також можуть змінювати свої функції залежно від потреб пухлини. Вони стають частиною МСП (звідки отримали назву так званих пухлино-асоційованих мезенхімальних стовбурових клітин – ПА-МСК) і сприяють прогресуванню пухлини шляхом різної взаємодії з її клітинами. Така взаємодія збільшує метастатичний потенціал та сприяє епітеліально-мезенхіальному переходу пухлини [70]. Раніше повідомлялося, що МСК мають протипухлинну захисну функцію, а саме пригнічення ангіогенезу, індукцію апоптозу клітин пухлини та посилення імунної відповіді, але ці ефекти спостерігаються лише тоді, коли співвідношення МСК та пухлинних клітин переважає на користь перших. Функція цих клітин залежить від тканини, «на яку вони працюють», і наївні МСК з протипухлинними ефектами можуть перерости в ПА-МСК з пропухлиногенною функцією [71].

Не дивлячись на різноманітність функцій клітин, що поєднує у собі строма пухлини, саме по собі пухлинно-стромальне співвідношення (ПСС) стає актуальною темою досліджень через своє цілком можливе прогностичне та предиктивне значення. ПСС вже досліджувалось у карциномах різної локалізації, зокрема пухлинах шлунково-кишкового тракту [72, 73] та інших локалізацій [74, 75] завдяки чому стало очевидним, що кількість строми є незалежним прогностичним фактором для багатьох видів пухлин.

Строма як частина МСП може також бути відповідальна за хіміорезистентність та відсутність відповіді при інших видах терапії, а також сама може виступати в якості об'єкта лікування [76, 77]. На думку Mierke та співавт. [78] вплив строми пухлини на прогресування раку суперечливий, оскільки строма поєднує в собі два різні та протилежні ефекти. З одного боку, вона може сприяти та посилювати проліферацію, виживання та міграцію ракових клітин в результаті ущільнення строми. З іншого боку, строма виступає як "стерична перешкода" для

рухливості ракових клітин у щільному тривимірному позаклітинному просторі, де розмір пори менший за ядро клітини.

Декілька дослідницьких робіт вказують, що ПСС є незалежним прогностичним маркером раку молочної залози [79, 80], включаючи тричі негативний рак [81]. Gujam та ін. [82] виявили, що високий стромальний коефіцієнт також статистично достовірно асоціюється з низьким ступенем диференціювання пухлини, позитивними лімфатичними вузлами, низьким інфільтратом CD68-макрофагів та гіршими показниками виживаності. Однак ці ж дослідники заявили, що ПСС не є незалежним прогностичним фактором ТНР. Крамер та співавт. [83] опублікували огляд літератури щодо прогностичного значення ПСС у хворих на рак молочної залози, в якому спостерігається загальна тенденція гірших показників виживаності для пухлин з високим коефіцієнтом строми з більш показовими коефіцієнтами ризику для тричі негативних карцином. Vangangel та ін. також показали, що ПСС як прогностичний фактор був найбільш вираженим для ТНР, а також для пухлин з низьким ступенем диференціювання (G-3), порівняно з G-2 та G-1. Коефіцієнти ризику для ПСС не змінювались залежно від віку, розміру пухлини, гістології, статусу ER,PR та HER2 та стану лімфатичних вузлів, що рекомендує ПСС як потенційний прогностичний фактор [84].

Враховуюючи все вищезазначене, можна припустити, що пухлини з високим показником ПЛЛ та низьким ПСС і пухлини з низькою кількістю ПЛЛ і високим ПСС при однаковій стадії та ступені диференціації можуть мати прогноз, що суттєво відрізняється.

У кількох дослідженнях зроблена спроба поєднання параметрів стромально-пухлинного співвідношення та імунного інфільтрату. Дані є суперечливими. Vangangel та ін. [85] встановили, що виявлена значна різниця у прогнозі пухлин з великим та малим ПСС лише для пухлин з низьким рівнем імунного інфільтрату. Zhang та ін. [86, 87] запропонували оцінку так званого об'єму лімфоцитів, що інфільтрують пухлину (Tumor Infiltrative Lymphocyte Volume, скорочено TIVL), що також є комбінованою оцінкою лімфоцитів, що інфільтрують строму пухлини, та

стромально-пухлинного співвідношення. Їх формула передбачає, що $TILV = \% \text{ стромати в пухлині} * \% \text{ стромальних ТЛ}$. Ця формула є простою у своїй відтворюваності та оцінці. Але формула передбачає множення параметрів ПСС і ПЛ, тоді як загальна тенденція показує, що ці параметри мають протилежний вплив на прогноз. Більше того, якщо один із цих параметрів дорівнює нулю, він повністю нівелює значення іншого параметра. Таким чином, комбінована оцінка цих факторів (за даною формулою) може істотно знизити їх прогностичне значення. Проте уособлено вони можуть доповнювати один одного як прогностичні фактори.

1.5. Імуногістохімічні та генетичні прогностичні та предиктивні маркери для тричі негативних карцином

В даному розділі нами було розглянуто маркери, які в першу чергу пов'язані з додактовими терапевтичними опціями, і які можуть мати, згідно з даними літератури, потенційне прогностичне або предиктивне значення. В першу чергу, це білки андрогену, PD-L1, TOP2A та ген BRCA-1.

Андрогенові рецептори (AR) беруть участь у регуляції проліферації клітин. Їх ядерна локалізація свідчить про активний транскрипційний статус. Велика кількість публікацій вказує на те, що вони відіграють важливу роль у патогенезі раку молочної залози, і вплив на них може дати вагомий терапевтичний ефект [88, 89, 90, 91]. Особливо актуальним це є в контексті тричі негативного раку, для якого гормонотерапія антагоністами естрогену (як для люмінальних ER-, PR-позитивних підтипів) неможлива. За даними літератури, експресія андрогену спостерігається, більш ніж у третині тричі негативних карцином [92,93] і має зворотню кореляцію з високим мітотичним індексом, пізньою клінічною стадією, низьким ступенем диференціювання. Статистично достовірно менше AR-позитивних пухлин спостерігається у групі базальноподібних карцином, порівняно з усією когортою тричі негативного раку [93].

Дані щодо прогностичного значення експресії андрогену у ТНР є контроверсійними [94], хоча деякі автори стверджують, що експресія AR може бути вагомим фактором при визначенні прогнозу тричі негативного РМЗ [95]. У дослідженні Thike A. et al (вибірка 699 пацієнтів) встановлено, що серед усіх тричі-негативних пухлин, ті, що є AR- позитивними, мають менший ризик розвитку рецидиву протягом перших п'яти років після встановлення діагнозу (КР 0,704; 95% ДІ 0,498-0,994; $p=0,0464$), а безрецидивна виживаність краща у групі AR-позитивних тричі негативних карцином молочної залози; аналогічна тенденція спостерігається з показником загальної виживаності. Це вказує на те, що втрата рецепторів андрогену може бути негативним прогностичним фактором [89]. Також AR-позитивні пухлини вважаються більш хіміорезистентними [96]. Мова про опції лікування для даного

підвиду пухлин та сучасні дослідження в цій області піде нижче, у розділі щодо протокольного лікування ТНР.

Програмований білок клітинної смерті 1 (PD-1) є другим імунним чекпоінт-рецептором, який обмежує ефекторну функцію Т-клітин. PD-1 має два відомі ліганди, PD-L1 і PD-L2, які мають чіткі профілі експресії [97]. PD-L1 експресується на декількох типах пухлин, включаючи РМЗ. За даними з Атласу по геномному секвенуванню пухлин, експресія гену PD-L1 зустрічається набагато частіше у тричі негативному РМЗ, ніж у інших молекулярних підгрупах ТНР ($P < 0.001$) [98]. Інші дослідження також підтверджують ці дані [99].

За результатами досліджень декількох мета-аналізів [100, 101] експресія PD-L1 асоціюється з метастазами у регіональні лімфатичні вузли, низьким ступенем диференціювання пухлини, відсутністю рецепторів до естрогену та тричі негативним статусом пухлини. Деякі дослідження також оцінювали прогностичне значення експресії PD-L1, але результати виявились суперечливими. За даними Wang та ін., Muenst та ін., PD-L1 вважається незалежним прогностичним фактором, що погіршує прогноз для раку молочної залози та тричі негативних карцином, зокрема [102, 103], але в той же час деякі дослідження показують протилежні результати [104, 105]. Veskers та ін. провели дослідження, де виявили, що PD-L1 не є незалежним прогностичним фактором, однак його прогностичне значення було вищим у цитоплазматичному компартменті клітинних пухлин, яке зазвичай не оцінюється для PD-L1 [106]. Але не дивлячись на це, PD-L1 залишається необхідним предиктивним маркером при розгляді опції імунної терапії, мова про яку йтиме нижче.

Тричі негативні карциноми молочної залози часто асоційовані з порушенням експресії білка BRCA-1, який відіграє значну роль в процесі життєдіяльності клітин, таких як контроль клітинного циклу, транскрипція, відновлення зруйнованого ДНК, убіквітинація білків [107]. Експресія білка BRCA-1 може бути порушена не тільки в спадкових, а і в спорадичних РМЗ. Встановлено, що карциноми молочної залози з мутацією BRCA-1 краще відповідають на неoad'ювантну хіміотерапію, але мають

гірші показники виживаності [108, 109], а також асоційовані з підвищеним ризиком розвитку метастазів у головний мозок [110]. Наявність BRCA-1 за даними декількох досліджень вважається негативним прогностичним фактором [111, 112].

Ще один фактор, який цікавий своїм предиктивним значенням, є фермент топоізомераза II α (TOP2A). Згідно з дослідженням Romero та ін. [113], статус даного гену може мати вплив на чутливість хворих на РМЗ до препаратів антрациклінового ряду, які активно застосовуються у групі тричі негативних карцином. Оскільки дана група хіміопрепаратів має суттєві побічні ефекти (в першу чергу, кардіотоксичність та різноманітні дисфункції кісткового мозгу), питання їх доцільності повинно розглядатися в кожному конкретному випадку. Прогностичне та предиктивне значення безпосередньо для тричі негативних карцином залишається контроверсійним. Декілька досліджень вказують, що TOP2A виступає як прогностичний фактор лише для люмінальних підгруп РМЗ [114, 115].

Серед інших прогностичних факторів необхідно зазначити ген-супресор пухлин p53, мутація якого корелює з нижчими показниками загальної та безрецидивної виживаності, а також нижчим ступенем диференціювання тричі-негативних пухлин [116].

1.6. Значення підтипів тричі негативних карцином молочної залози для протокольної терапії

Вибір раціональної терапії для групи тричі негативних карцином залишається досить обмеженим порівняно з іншими молекулярними підгрупами РМЗ. Основною і майже єдиною опцією на сьогодні залишається застосування хіміотерапії, протоколи якої не завжди чітко прописані [117], проте нові опції все ж таки поступово з'являються. З'явилися деякі таргетні препарати як третя лінія терапії, мова про які йтиме далі.

Велику кількість клінічних досліджень щодо додаткових опцій лікування тричі негативного раку вже проведено. Частина з них не виявила позитивного ефекту. Зокрема, великі сподівання були пов'язані з анти- EGFR терапією, оскільки EGFR фактор часто гіперекспресується у тричі негативних карциномах. Два типи інгібіторів EGFR вже використовуються для таких пухлин, як недрібноклітинний рак легенів і колоректальний рак. Проте для раку молочної залози клінічні випробування інгібіторів EGFR виявилися невдалими через занадто низький рівень відповіді на терапію [118].

Проте є більш обіцяючі дослідження. Як вже було зазначено вище, тричі негативний рак є гетерогенним захворюванням з найвищою експресією рецепторів андрогену у молекулярному люмінальному андроген-позитивному варіанті [14]. Згідно з висновками Lehmann та ін., лише приблизно одна третина пацієнтів з ТНР відповідає на неоад'ювантну та адювантну терапію, а андроген позитивні пухлини мають ще менше шансів отримати користь від сучасних схем хіміотерапії і вважаються більш хіміорезистентними [119], в той час як цільова антиандрогенна терапія показала багатообіцяючі прелімінарні результати при ТНР.

Також варто зазначити, що експресія андрогену також виявляється в клітинних лініях, що представляють базальноподібні та мезенхімальні молекулярні підтипи, і це дало можливість розглядати антиандрогенну терапію як опцію в цих підгрупах також. Тому у дослідженні Barton et al [91] застосували антиандрогенну терапію (ензалутамід) для вище зазначених молекулярних підгруп ТНР і

продемонстрували, що вони також залежать від білка андрогену. Інгібування андрогену значно знизило проліферацію та інвазію, збільшило апоптоз у чотирьох клітинних культурах ТНРМЗ, що представляли мезенхімальний та базальноподібний молекулярні підтипи. Це дає підстави припускати, що антиандрогенна терапія може внести не тільки у лікування андроген-позитивного ТНР, але і інших молекулярних підгруп.

Також велике значення має визначення AR-асоційованих сигнальних шляхів. Доклінічні та клінічні дослідження показали, що сигнальні шляхи AR тісно взаємодіють з мережею інших шляхів, включаючи PI3K / AKT / mTOR [120]. Ці знання в майбутньому можуть сприяти подоланню резистентності деяких пухлин до антиандрогенної терапії. Наразі тривають дослідження з вивчення комбінованої антиандрогенної терапії з інгібуванням CDK4 / 6, PI3K, хіміотерапією та імунотерапією [121]. Відповідно, клінічна інтерпретація біологічних взаємодій, пов'язаних з AR, спрямована на комбіновану блокаду сигнальних шляхів, може відкрити нову еру для гормонотерапії при лікуванні тричі негативних карцином молочної залози.

На сьогодні для пацієнтів з ТНР також розглядається як третя лінія терапії опція імунотерапії. В даному випадку, оцінка експресії PD-L1 у імунному інфільтраті пухлини має першочергове значення.

У дослідженні, де взяли участь 902 пацієнти з метастатичним тричі негативним раком молочної залози, було досліджено комбіноване лікування - окрім стандартної хіміотерапії (паклітаксел) пацієнти отримували також імунотерапію (атезолізумаб), який блокує протеїн PD-L1. Загальна виживаність становила 21,3 місяці в групі комбінованого лікування у порівнянні з 17,6 місяцями у жінок, які отримували лише хіміотерапію. Серед пацієток, де імуногістохімічним методом було встановлено експресію PD-L1 у пухлинах, та які отримували імунотерапію, загальна виживаність становила 25 місяців у порівнянні з 15,5 місяцями для тих, хто одержував тільки хіміотерапію [122].

Також є особливості терапевтичного підходу для групи BRCA-1-асоційованих пухлин. Дослідження встановили, що дана підгрупа може отримати більше переваг від хіміотерапії з платиновими агентами [123] та інгібіторами ПАРП [24, 124]. Проте особливо актуальною діагностикою мутації BRCA-1 стала у світі того, що нещодавно для карцином молочної залози з BRCA-1 мутацією було затверджено один з так званих ПАРП-інгібіторів (таргетних препаратів) – олапаріб [125].

Все вищезазначене вказує на необхідність проведення додаткових діагностичних тестів для оптимального вибору протокольного лікування ТНР.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ

Враховуючи все вищезазначене, можна зробити наступні висновки до даного розділу:

1. Тричі негативний рак молочної залози – це гетерогенна група пухлин на молекулярному рівні, для якої, з одного боку, неможливо підібрати універсальну цільову терапію та знайти єдину «драйверну» мутацію, але в той же час ця група потребує індивідуалізації лікування та пошуку нових прогностичних факторів. Спроби класифікацій тричі негативного РМЗ на основі профілювання експресії генів поки що не мають клінічного значення.
2. Показники захворюваності на рак молочної залози є високими і продовжують зростати. Показники смертності мають тенденцію до покращення, але в першу чергу, за рахунок люмінальних підтипів. Тричі негативні карциноми молочної залози мають найгірші показники виживаності, а також ряд епідеміологічних особливостей.
3. ТНР мають специфічні морфологічні характеристики, зокрема підвищену мітотичну активність та ядерну атипію, клітинний плеоморфізм, високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення, невелику кількість стромального компоненту, наявність центральних некрозів, виражену лімфоцитарну інфільтрацію. Ступінь диференціювання тяжіє до низького (G3).
4. Фактори ризику для тричі негативних карцином відрізняються від інших молекулярних підгруп РМЗ, а такі доброякісні ураження молочної залози як мікрогландулярний аденоз і атипичний мікрогландулярний аденоз наразі розглядаються як факультативні прекурсори ТНР.
5. Певні гістологічні параметри, зокрема ступінь лікувального патоморфозу, виступають як прогностичні фактори для ТНР. Прогностичний та предиктивний потенціал можуть також мати такі показники, як рівень пухлинно-стромального співвідношення та кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів.
6. Для індивідуалізації лікування та пошуку можливого прогностичного/предиктивного значення актуальним є проведення

імуногістохімічних реакцій з рецепторами андрогену, білком PD-L1 та ферментом TOR2A.

7. Подальші дослідження в даній області необхідні.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Загальна характеристика матеріалів

Проведено ретроспективно-проспективний аналіз гістологічних препаратів біопсійного та операційного матеріалу та історій хвороби пацієнтів (n=343) з діагнозом «тричі негативний рак молочної залози», що не має рецепторів до естрогену (ER), прогестерону (PR) та ампліфікації HER2/neu, які проходили лікування на базі Київського міського клінічного онкологічного центру протягом 2009-2017, для встановлення частоти, структури, вікового розподілу захворюваності, оцінки загальної та безрецидивної виживаності, а також визначення морфологічних особливостей пухлин (ретроспективний архівний матеріал та проспективний матеріал від пацієнтів, що проходили лікування у 2017 році). Пацієнти з 4 стадією не були включені в дослідження.

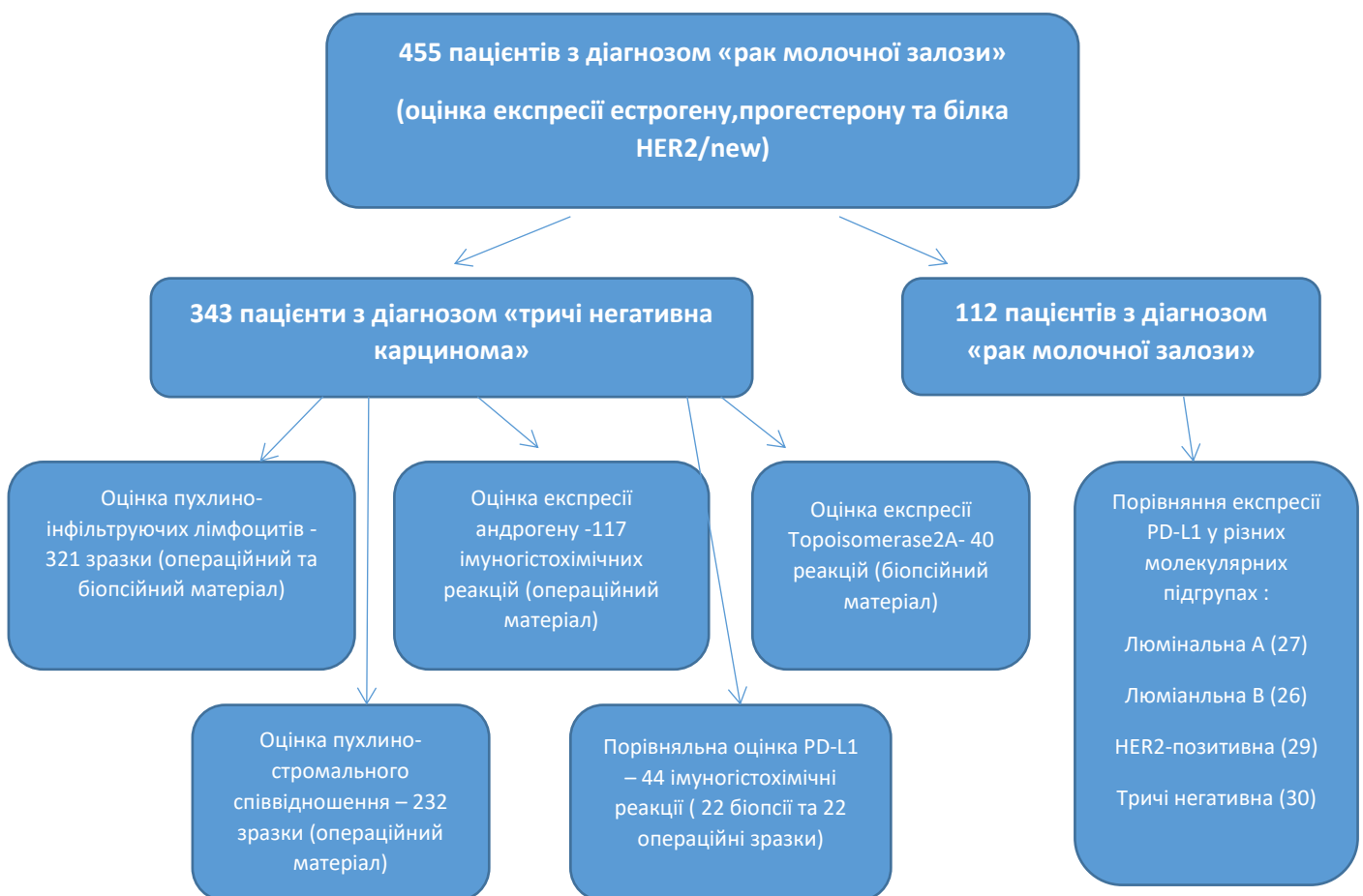
З 343 пацієнтів, що були взяті у дослідження, 116 пацієнтів (33,8%) мали рецидив захворювання, 90 хворих (26,2%) померли. 37 пацієнтів (10,7%) з різних причин (відмова, супутня патологія) не отримали ад'ювантну хіміотерапію. 74 пацієнти (21,6%) отримали неoad'ювантну хіміотерапію.

За розподілом за стадією захворювання кількість пацієнтів з I стадією склала 80 хворих (23,3%), з II стадією – 183 хворих (53,4%), з III стадією – 80 хворих (23,3%). За віком кількість пацієнток до 40 років (включно) -39 (12,4%), від 40 до 60 – 159 (46,4%), більше 60 (включно) – 145 хворих (42,3%).

Для дослідження прогностичного та предиктивного значення в гістологічних препаратах фарбованих гематоксилін-еозином від вищезазначених пацієнтів визначено кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (операційний та біопсійний матеріал) та пухлино-стромальне співвідношення (операційний матеріал). Також на гістологічних зрізах проведено 313 імуногістохімічних дослідження експресії андрогену, TOP2A, PD-L1. У 44 випадках дослідження експресії PD-L1 проведено

як на матеріалі передопераційної біопсії, так і на матеріалі операції після неoadьювантної хіміотерапії з подальшим порівнянням її експресії.

У 112 пацієнтів з діагнозом «рак молочної залози» (27 пацієнтів люмінальної А групи, 26 пацієнтів люмінальної В групи, 29 пацієнтів HER2-позитивної групи та 30 пацієнтів тричі негативної групи) було проведено проспективне дослідження експресії PD-L1 з подальшим порівнянням результатів для тричі негативних та інших молекулярних підгруп РМЗ. Схематичне зображення всіх проведених досліджень представлено на мал. 2.1.



Мал.2.1. Схематичне зображення проведених досліджень.

Була визначена асоціація імуногістохімічних параметрів з іншими клініко-морфологічними параметрами (стадія, гістологічний підтип, TNM – класифікація, ступінь диференціювання пухлини, кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів,

пухлино-стромальне співвідношення, вік, проведення хіміотерапевтичного лікування, показники загальної та безрецидивної виживаності).

Таким чином, всього досліджено 455 пацієнтів з діагнозом «рак молочної залози» та проведено 313 імуногістохімічних досліджень.

2.2. Методи і методики дослідження

Для вирішення завдань дослідження та досягнення поставленої мети використано загальноклінічні, гістологічні, імуногістохімічні методи дослідження та статистичний аналіз даних.

Гістологічні зразки, пофарбовані гематоксилін-еозином, оцінювались після фіксації у 10% розчині формаліну та проведення стандартної процедури проводки. Стадія встановлена відповідно до 7-о видання TNM класифікації злоякісних пухлин [126]. Розподіл пухлин за гістологічним підтипом проведено на основі 5-го видання ВООЗ класифікації пухлин молочної залози [5].

Рак молочної залози був визначений як тричі негативний при відсутності імуногістохімічної експресії рецепторів естрогену (Clone ER1, DAKO, USA), рецепторів прогестерону (Clone PgR 636, Dako, USA) та HER2 (Clone SP3, ThermoScientific, USA). Гістологічна оцінка проведена лише для біопсій та операційного матеріалу пацієнтів, які не отримували попередньо специфічного лікування (за виключенням досліджень для оцінки експресії білка TOP2A та PD-L1, де були відібрані біопсійні зразки без попереднього лікування та операційні зразки після неoad'ювантної хіміотерапії).

Пухлино-стромальне співвідношення (ПСС) оцінено згідно з протоколом, запропонованим Мескер та співавт. для встановлення ПСС для раку товстої кишки [127]. Відібрано найбільш інвазивну частину пухлини. 50x збільшення було використано для пошуку ділянки, яка містить найбільшу кількість строми. Цю область було збільшено за допомогою 100x збільшення і знову вибрано область з найбільшою кількістю строми. Клітини пухлини були представлені з усіх боків даної області. У вибраній ділянці кількість строми була оцінена з покроковим проміжком у 10%. Відповідно до результатів усі зразки були класифіковані на групу з низьким відсотком строми ($\leq 50\%$) та групу з високим відсотком строми ($> 50\%$).

Пухлино-інфільтруючі лімфоцити (ПЛ) оцінено відповідно до рекомендацій, розроблених Міжнародною робочою групою з питань ПЛ [128]. Оцінено лише стромальні ПЛ в області інвазивної пухлини і лише у вигляді одноядерного інфільтрату, гранулоцити не оцінювались. Зони некрозу були виключені з оцінки. Кількість стромальних ПЛ визначено у відсотках відносно площі стромального компоненту. Він був оцінений як безперервний параметр з приростом 5% та поділений на групи А (0-9%), В (10-40%) та С (41-100%) відповідно. Бралися до уваги середні значення стромальних ПЛ без зосередження на «гарячих точках».

Усі зразки проаналізовані двома патологами. Додаткові гістопатологічні параметри, які було оцінено, включали ступінь диференціювання, гістологічний підтип, наявність некрозу, наявність дуктальної або лобулярної карциноми *in situ* (DCIS або LCIS), оцінку індекса проліферативної активності (Ki-67).

Окремо проаналізовано (на основі вивчення історії хвороб та даних з статистичного відділу Київського міського клінічного онкологічного центру) клінічні дані пацієнтів, загальну та безрецидивну виживаність, особливості лікування. На основі проаналізованих клінічних та гістологічних параметрів сформована база даних.

Загальна виживаність (ЗВ) визначена як період від дати встановлення діагнозу до смерті пацієнта від раку молочної залози або дати останнього спостереження. Безрецидивна виживаність (БВ) визначена як тривалість часу від дати встановлення діагнозу до появи місцевого (локального) або віддаленого рецидиву.

Всі імуногістохімічні реакції проведені з використанням Dako EnVision FLEX системи візуалізації.

Для визначення експресії андрогену проведена імуногістохімічна реакція з антитілом до андрогенових рецепторів Clone AR441 (Dako, USA). Фарбування було визначене як позитивне у випадку ядерного фарбування клітин пухлини (будь-якої інтенсивності) у більш ніж 1% середовища пухлини.

Для визначення експресії Топоізомерази 2А проведена імуногістохімічна реакція з антитілом Topoisomerase II alpha Clone EP93 (Epitomics, France). Фарбування було визначене як позитивне у випадку ядерного фарбування клітин пухлини (будь-якої інтенсивності) у більш ніж 35% середовища пухлини.

Для визначення експресії PD-L1 проведена імуногістохімічна реакція з антитілом PD-L1 Clone 22C3 (Dako, USA). Експресію PD-L1 оцінювали як в пухлинних клітинах (ПК), так і у клітинах імунного інфільтрату (ІК) у перитуморальному оточенні. Визначали область пухлини та оцінювали всі пухлинні клітини та клітини імунного інфільтрату, які є життєздатними. Експресія PD-L1 оцінювалась, якщо кількість життєздатних клітин була більше 100 для ПК і ІК . Вогнища карциноми *in situ*, а також ділянки некрозу були виключені. Якщо пухлина складалась з розсіяних вогнищ, оцінювалась загальна середня кількість. Доброякісна тканина та запальна інфільтрація, яка не пов'язана з пухлиною, була виключена. Лімфоцити в просвіті судин були виключені. Фарбування PD-L1 пухлинних та імунних клітин було визначено як позитивне у разі мембранозного, лінійного або точкового/гранулярного, повного та неповного фарбування будь-якої інтенсивності у більш ніж 1% середовища пухлини або імунних клітин відповідно. Позитивне забарвлення ПК було поділено на 3 підгрупи відповідно до площі відсотка експресії (1-5%, 6-50%, > 50%).

Протокол дослідження відповідав Гельсінській декларації та був затверджений комісією з питань біоетичної експертизи при НМУ імені О.О. Богомольця (№5 \ 24.01.2018).

2.3 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз було проведено за допомогою програмного пакету EZR 1,35 (R statistical software version 3.4.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [14] та статистичного пакету Medstat.

Для дослідження прогностичного значення гістологічних та імуногістохімічних факторів було побудовано модель пропорційних ризиків Кокса. За даною моделлю було обчислено одноваріантні та багатоваріантні коефіцієнти ризику (HR) для параметрів з довірчим інтервалом (CI) 95%. Інформаційний критерій Акаїке (ІКА) був використаний для відбору мінімального набору параметрів для багатофакторного аналізу. Р-значення менше 0,05 вважали значущими.

Для побудови кривих виживаності було використано метод Каплана – Мейєра з логранговим тестом.

Коефіцієнт Каппа Коена був використаний для обчислення узгодженості між патологами.

Для встановлення кореляційного зв'язку між показниками проводили ранговий кореляційний аналіз Спірмена. Оскільки даний метод є непараметричним, оцінка на нормальність розподілу в даному випадку не проводилась. Рівень статистичної достовірності був прийнятий на рівні 0,05.

Критерій Фішера був використаний для визначення асоціативних зв'язків між експресією імуногістохімічних маркерів та іншими клініко-морфологічними параметрами.

Для порівняння експресії PD-L1 у біопсійному та операційному матеріалах був використаний коефіцієнт конкордації (за шкалою МакБрайда). Для порівняння експресії PD-L1 у різних молекулярних підгрупах використовувався критерій Фішера з урахуванням поправки Бенферонні.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Частота різних гістологічних варіантів, структура та віковий розподіл тричі негативних карцином молочної залози (результати дослідження архівного матеріалу за 2009-2017 рр.)

Серед 343 досліджених тричі негативних карцином молочної залози за гістологічним варіантом найбільша частка припала на інвазивні (протокові) карциноми неспецифічного типу – 310 зразків (90,4%), з них 10 (2,9%) – інвазивні неспецифічні карциноми з медулярним патерном (який в останньому виданні ВООЗ не виділяється як окремий гістологічний підтип). 15 пухлин (4,4%) склали інвазивні часточкові пухлини, 11 пухлин (3,2%) було класифіковано як папілярні. Карцинома з апокриновим диференціюванням, секреторна, аденокістозна та мікропапілярна карцинома були представлені в одному екземплярі. Метапластичні карциноми склали 0,87% (3 пухлини). Дані представлені в табл.3.1.

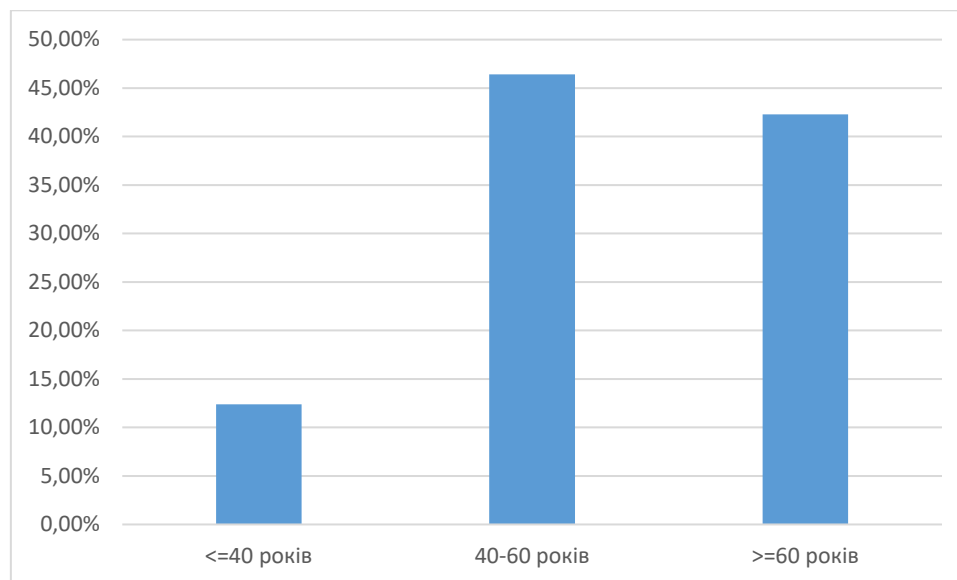
Табл. 3.1.

Розподіл тричі негативних карцином за гістологічним варіантом

Гістологічний варіант	Абс. дані	%
Неспецифічна (протокова) карцинома	310	90,4
• З них з медулярним патерном	10	2,9
Часточкова карцинома	15	4,4
Папілярна карцинома	11	3,2
Карцинома з апокриновим диференціюванням	1	0,29
Секреторна	1	0,29

Аденокістозна	1	0,29
Метапластична карцинома	3	0,87

За віковим розподілом частка тричі негативних карцином у пацієток до 40 років (включно) склала 12,4% (39 пухлин), у пацієнтів від 40 до 60 років – 46,4% (159 пухлин), у пацієнтів віком більше 60 (включно) – 42,3% (145 пухлин) (мал.3.1.)



Мал. 3.1. Розподіл пацієнтів з тричі негативними карциномами за віком.

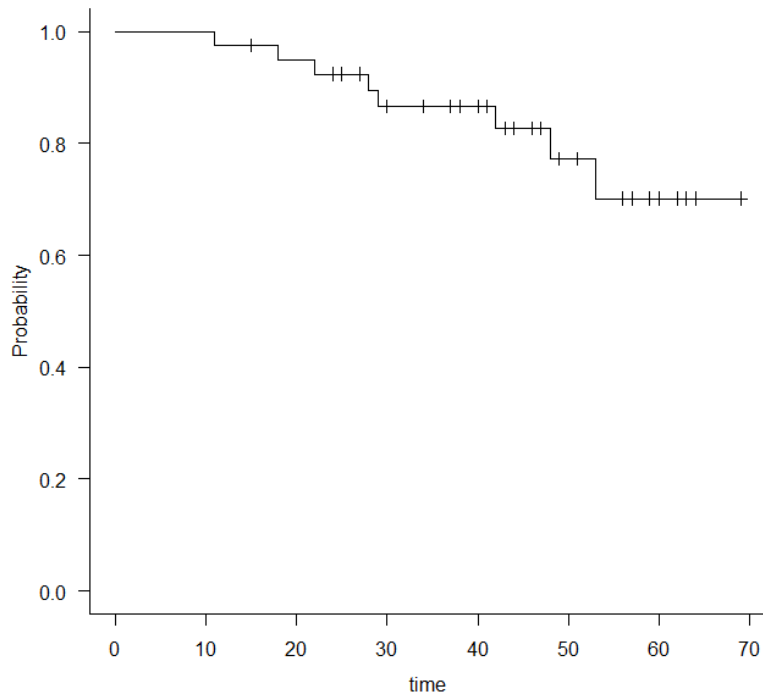
Середній термін спостереження за пацієнтами склав 3,8 років (46,64 місяців).

З 343 пацієнтів, що були взяті у дослідження, 116 пацієнтів (33,8%) мали рецидив захворювання, 90 хворих (26,2%) померли. 37 пацієнтів (10,7%) з різних причин (відмова, супутня патологія) не отримали ад'ювантну хіміотерапію. 74 пацієнти (21,6%) отримали неoad'ювантну хіміотерапію.

За розподілом за стадією захворювання кількість пацієнтів з I стадією склала 80 хворих (23,3%), з II стадією – 183 (53,4%), з III стадією – 80 (23,3%). Пацієнти з IV стадією (як зазначено у розділі про методологію дослідження) були виключені з дослідження.

При побудові кривої виживаності за Каплан-Мейером (мал. 3.2) 1-річна виживаність пацієнтів склала $97,5\% \pm 2,5\%$, 3-річна виживаність склала $86,6\% \pm 5,6\%$,

5-річна виживаність склала $70,1\% \pm 9,9\%$. Зокрема, 3-річна виживаність пацієнтів з 1 стадією склала $86,9\% \pm 4,2\%$, 5-річна виживаність $76,7\% \pm 6,9\%$, 3-річна виживаність пацієнтів з 2 стадією захворювання склала $83,7\% \pm 2,8\%$, 5-річна виживаність склала $75,7\% \pm 4,1\%$, 3-річна виживаність пацієнтів з 3 стадією склала $64,7\% \pm 5,1\%$, 5-річна виживаність склала $51,4\% \pm 6,19\%$.



Мал.3.2. Крива виживаності для хворих з тричі негативними карциномами, що були взяті у дослідження (I-III стадія).

3.2 Динаміка захворюваності на рак молочної залози та тричі негативні карциноми протягом 2008-2019 рр. (за даними Київського міського клінічного онкологічного центру)

Оскільки статистичні дані по захворюваності на рак молочної залози не передбачають розподіл карцином на молекулярні підтипи, виявити питому частку тричі негативних карцином на їх основі неможливо. Проте ми отримали ці дані опосередковано через аналіз інформації щодо проведених імуногістохімічних реакцій протягом 2008-2019 рр. на базі Київського міського клінічного онкологічного центру (КМКОЦ).

Кількість імуногістохімічних реакцій, що проводиться у КМКОЦ, включає безпосередньо пацієнтів, що проходять лікування у даному закладі та консультативний матеріал. Тому в даній таблиці (табл.3.2.) представлені зведені дані щодо всіх пацієнтів з діагнозом раку молочної залози, які отримали імуногістохімічне заключення у патологоанатомічному відділенні КМКОЦ за 2008-2019 роки.

Таблиця 3.2.

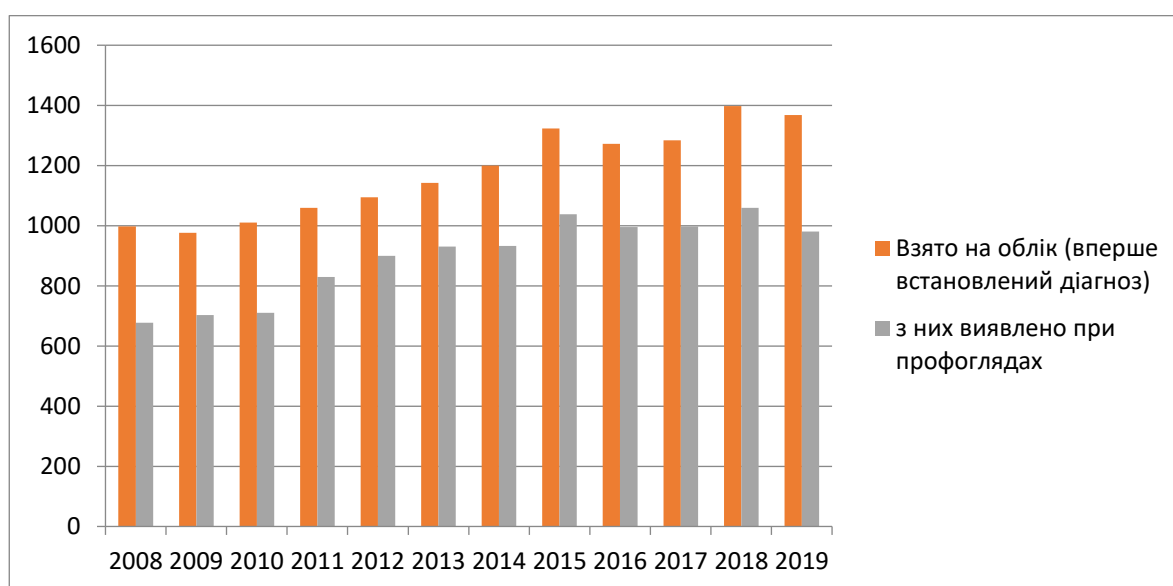
Кількість пацієнтів, для яких було проведено імуногістохімічні реакції у КМКОЦ протягом 2008-2019 рр для діагностики раку молочної залози

Рік	Кількість пацієнтів з діагнозом «Рак молочної залози»	Кількість пацієнтів з тричі негативним раком молочної залози	Питома вага пацієнтів з тричі негативним раком молочної залози
2008	1817	225	12,4%
2009	1821	209	11,5%
2010	3175	416	13,1%
2011	2492	254	10,2%
2012	2468	236	10,9%

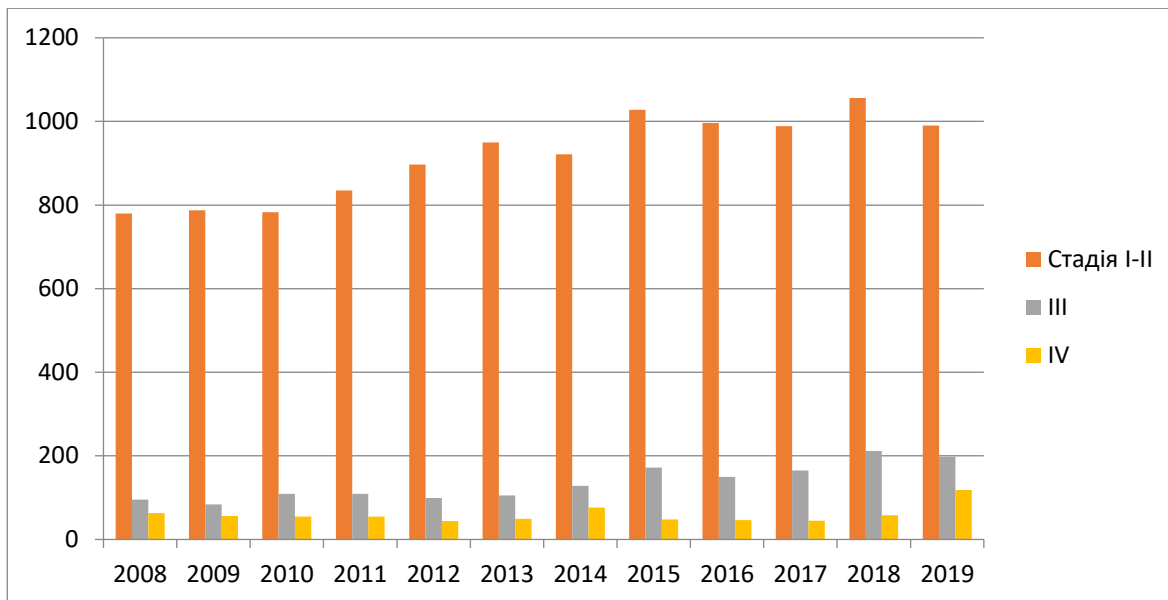
2013	2272	235	10,3%
2014	2369	248	10,5%
2015	2659	320	12 %
2016	2191	295	11,4%
2017	2591	298	11,5%
2018	3446	372	10,8%
2019	3222	390	12,1%

Таким чином, за даними Київського міського клінічного онкологічного центру (КМКОЦ) питома частка тричі негативних карцином протягом 2008-2019 рр. склала $11,39 \pm 0,088\%$.

Кількість хворих, яких було взято на облік з вперше встановленим діагнозом рак молочної залози у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2008-2019 рр. поступово зростає (від 998 хворих у 2008 році до 1368 у 2019 році). Аналогічно збільшився показник виявлених хворих на профоглядах (677 у 2008 році та 981 у 2019 році ,відповідно) (мал.3.3.). Більша частина хворих з вперше виявлених має I-II стадію захворювання (мал.3.4.)

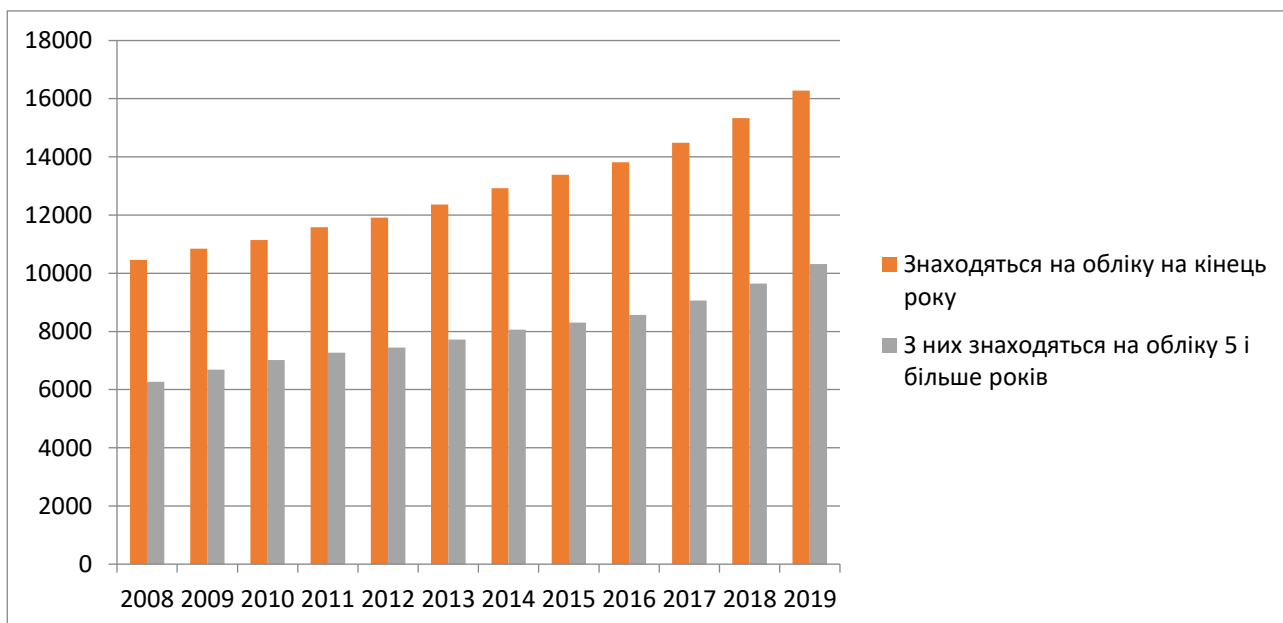


Мал. 3.3. Хворі, які взяті на облік з вперше встановленим діагнозом рак молочної залози у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2008-2019 рр.



Мал. 3.4. Розподіл хворих за стадією захворювання з вперше встановленим діагнозом раку молочної залози (згідно TNM-класифікації)

Кількість хворих з діагнозом рак молочної залози, що знаходяться на обліку у КМКОЦ на кінець року, також зростає (10463 у 2008 році проти 16274 у 2019 році). Частка пацієнтів, що знаходиться на обліку 5 років і більше, також зростає (6269 і 10318 хворих у 2008 і 2019 рр., відповідно) (мал.3.5.)



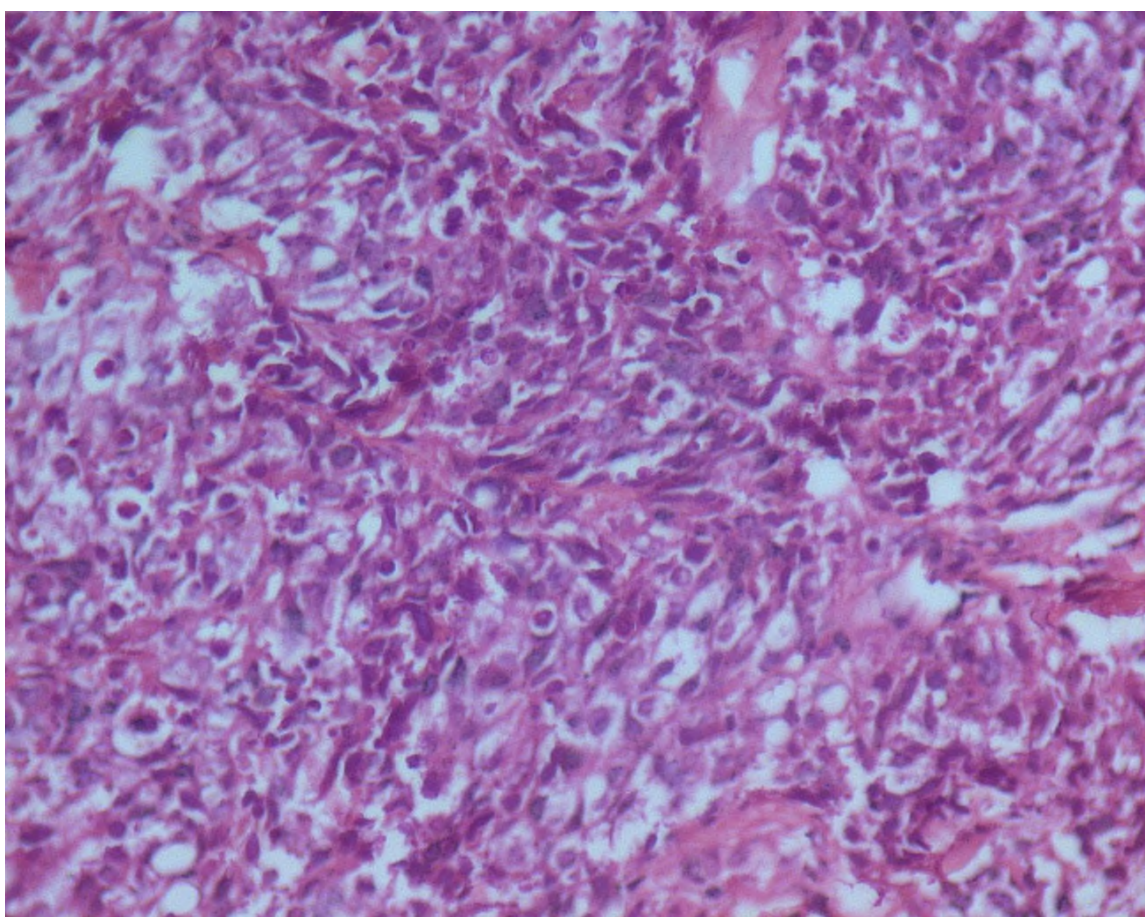
Мал.3.5. Кількість хворих з діагнозом рак молочної залози, що знаходяться на обліку у Київському міському клінічному онкологічному центрі на кінець року

Таким чином, питома частка тричі негативних карцином серед усього РМЗ залишається сталою і складає $11,39 \pm 0,088\%$. Кількість хворих з діагнозом раку молочної залози (як вперше діагностованих, так і пацієнтів, що знаходяться на обліку) протягом останнього десятиріччя зростає (що співпадає з показниками захворюваності на РМЗ у місті Києві, що представлені у 1 розділі). Переважна більшість вперше виявлених хворих мають I-II стадію захворювання.

3.3 Гістологічна характеристика тричі негативних карцином молочної залози (за результатами дослідження архівного матеріалу)

В даному розділі представлені дані щодо гістологічних особливостей досліджених тричі негативних пухлин.

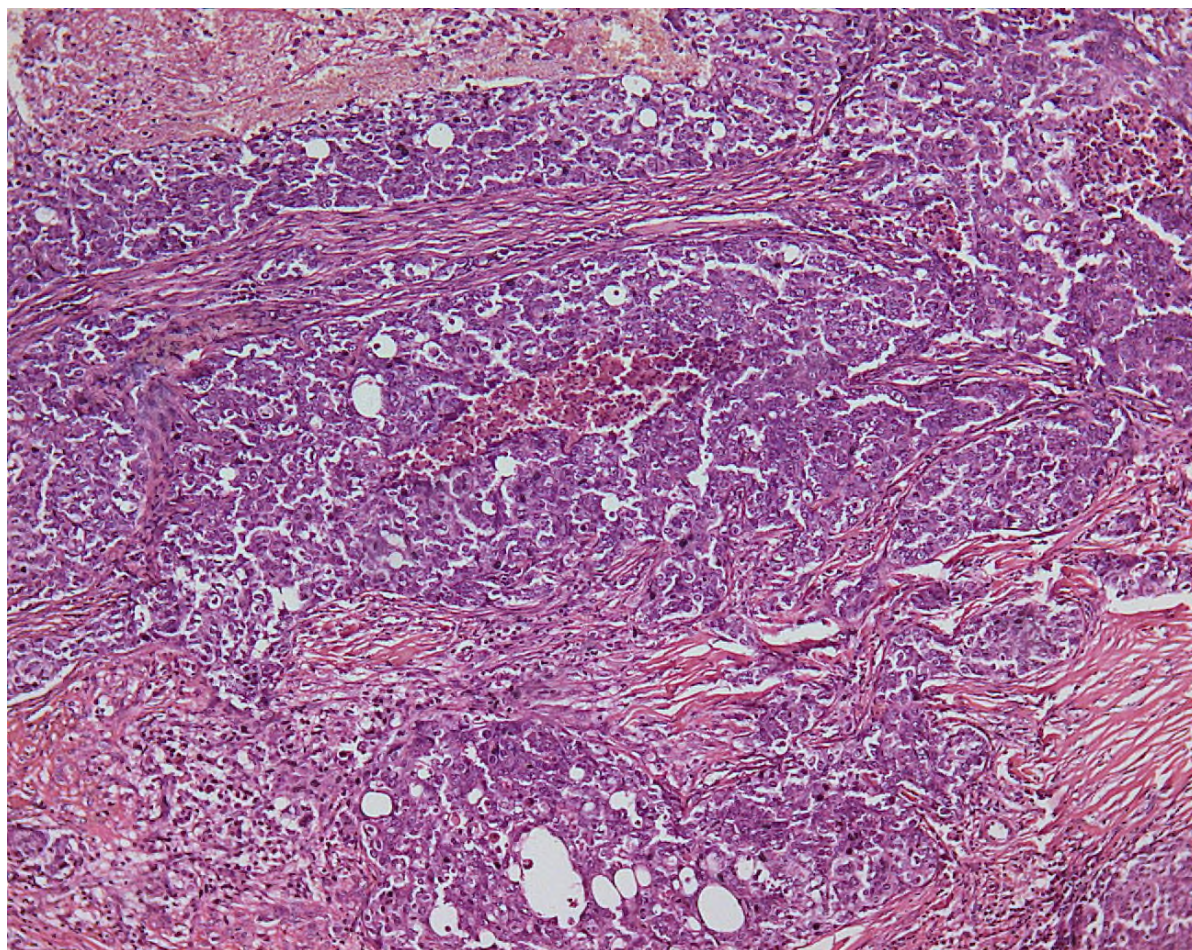
Як було зазначено вище, більшість цих пухлин було представлено інвазивними неспецифічними (протоковими) карциномами (90,4%), які часто відрізнялися підвищеним рівнем мітозів та ядерного плеоморфізму (мал.3.6).



Мал. 3.6. Інвазивна неспецифічна карцинома молочної залози, GIII, з вираженим ядерним плеоморфізмом. Фарбування гематоксилін-еозином, x400.

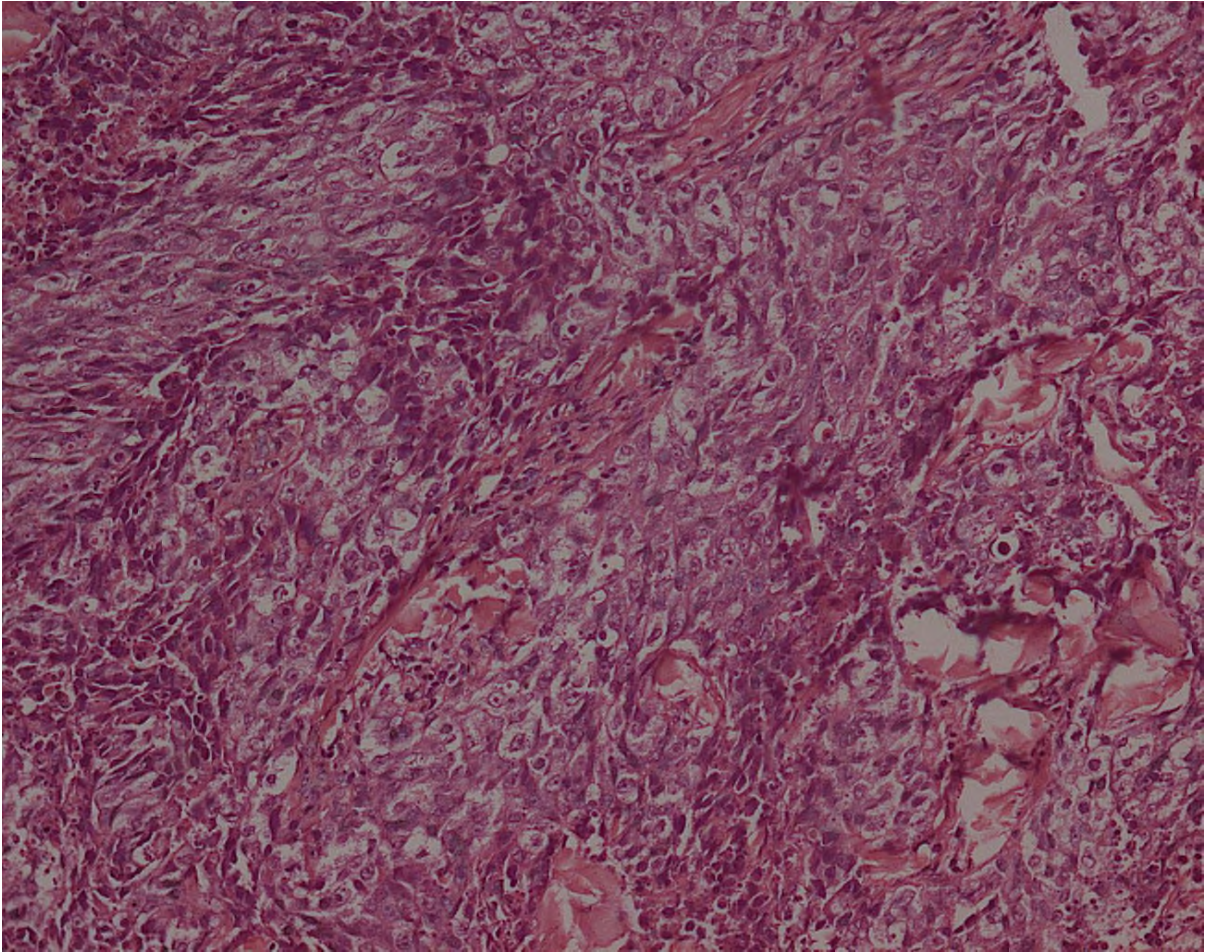
Більшість з цих неспецифічних (протокових) карцином (60,9%) тяжіє до низького ступеню диференціювання (G3) (мал. 3.7) . 60% пухлин мають високий індекс проліферативної активності (>30%). Кількість пухлин з наявністю

некротичних змін сягає 40%. Це підтверджує дані літератури щодо особливостей ТНР порівняно з люмінальними підтипами РМЗ [129].



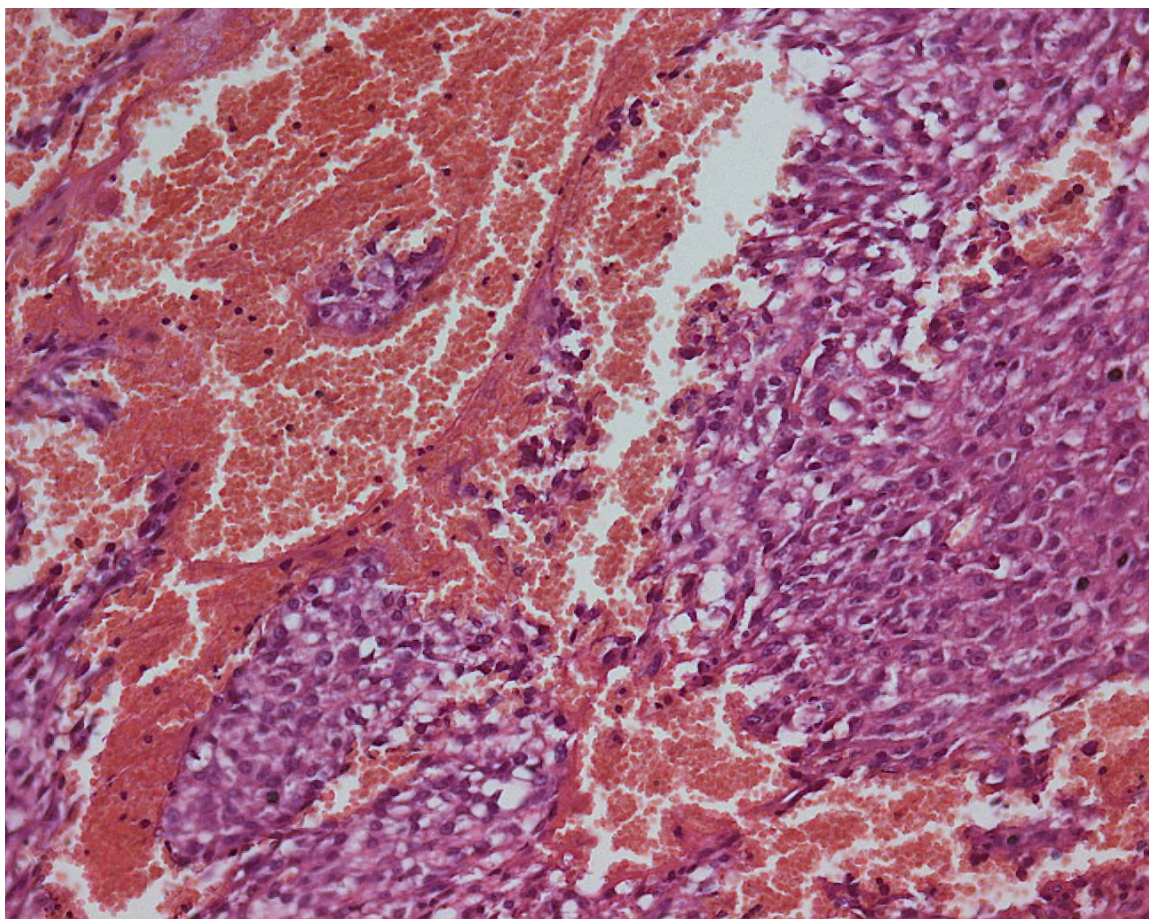
Мал. 3.7. Інвазивна неспецифічна карцинома молочної залози, GIII. Фарбування гематоксилін-еозином, x100.

Інколи клітини в таких пухлинах тяжіють до веретеноподібної форми (мал.3.8).



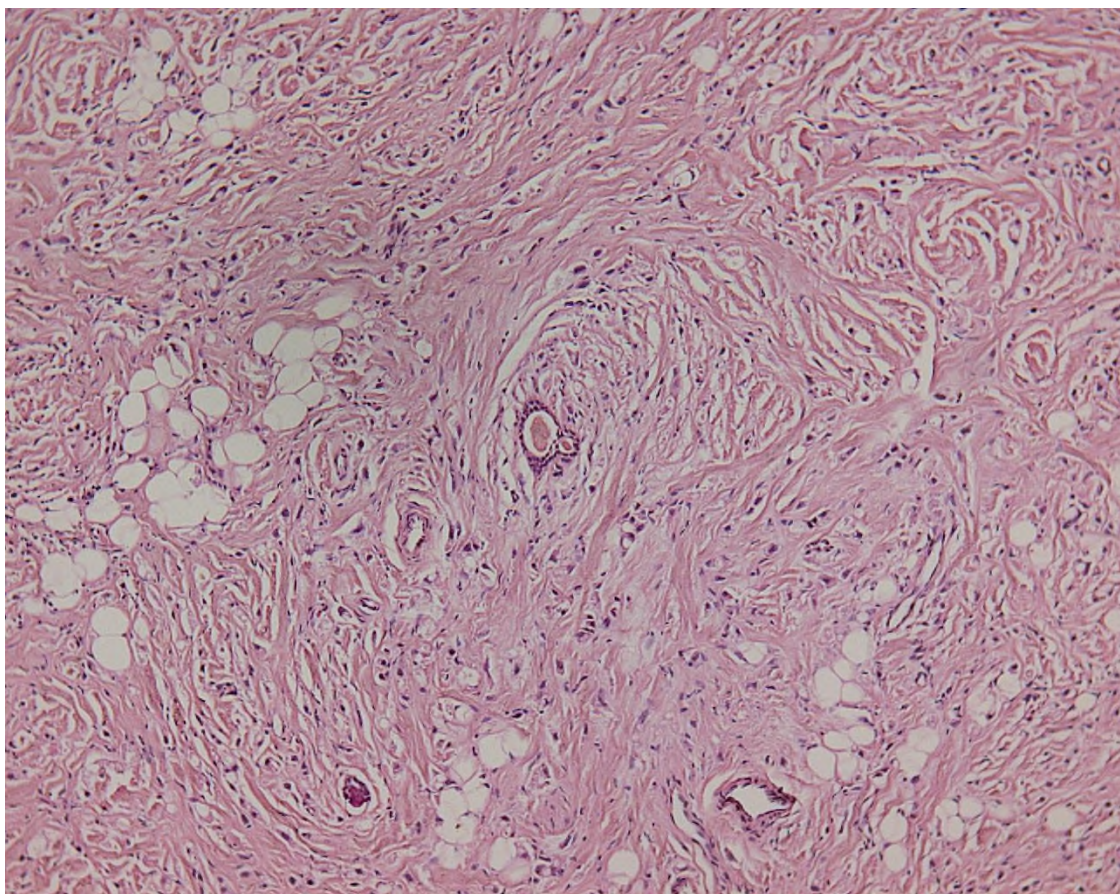
Мал. 3.8. Інвазивна неспецифічна карцинома молочних залози, GIII, з наявністю веретеноподібних клітин. Фарбування гематоксилін-еозином, x200.

В деяких випадках при низькому диференціюванні пухлин гістологічна картина може імітувати саркому (мал. 3.9).



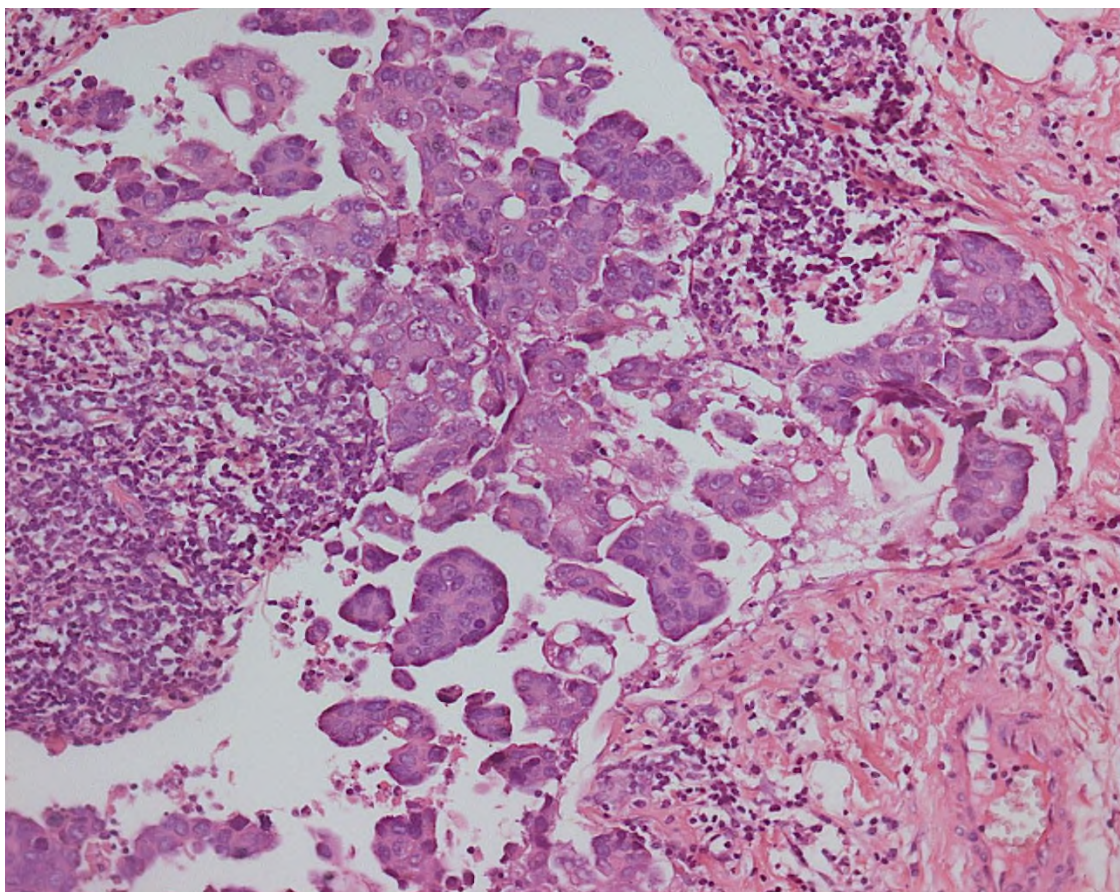
Мал. 3.9. Інвазивна неспецифічна карцинома молочних залоз, GIII. Велика кількість крововиливів, наявність веретеновидних клітин нагадує картину ангіосаркоми. Фарбування гематоксилін-еозином, x200.

Часточкові пухлини (для яких тричі негативний фенотип не є характерним), що представлені у кількості 15 пухлин (4,4%), відрізнялись більшою кількістю стромального компоненту, більшість пухлин (13) мала помірний ступінь диференціювання (мал.3.10).



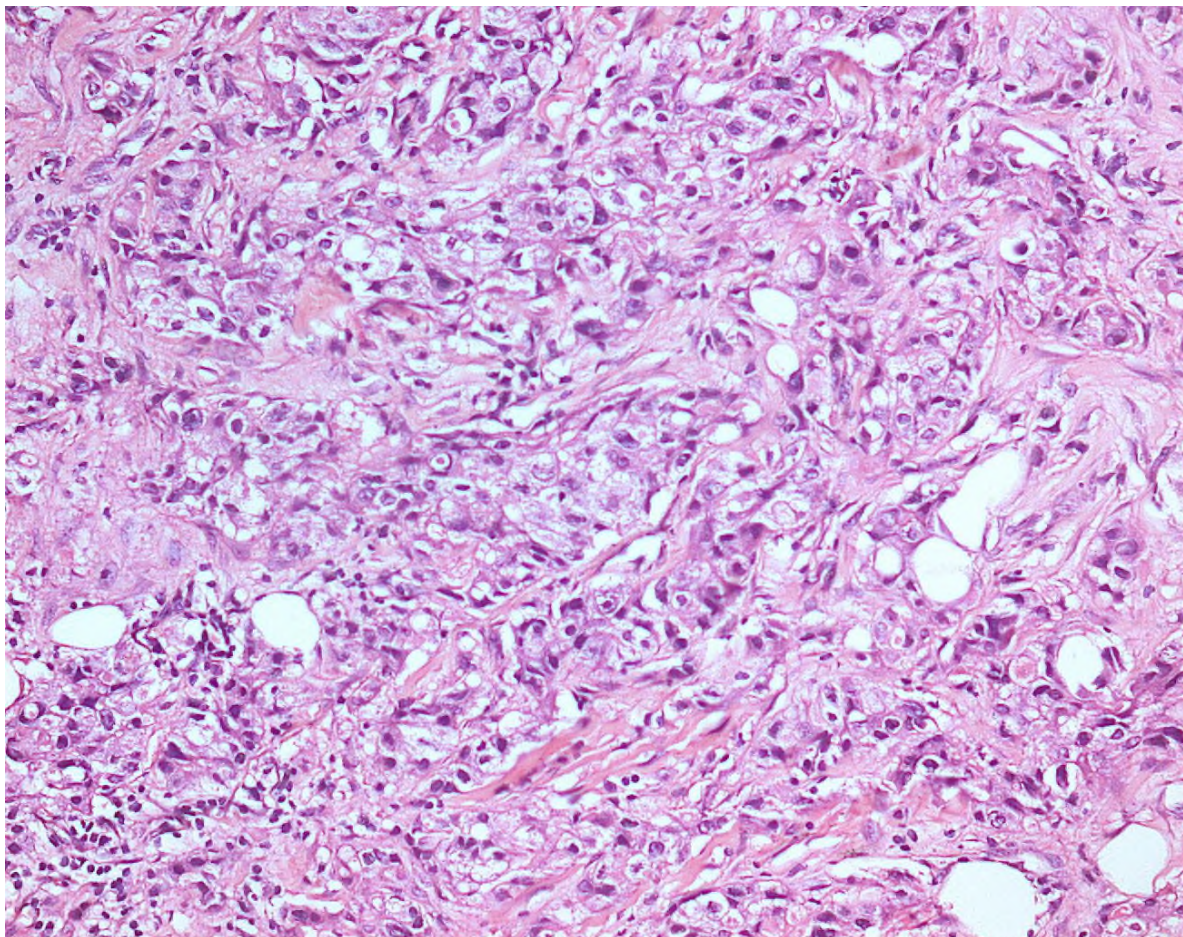
Мал. 3.10. Часточкова карцинома молочних залози, представлена дизкогезивними пухлинними клітинами на фоні гіалінізованої строми. Фарбування гематоксилін-еозином, x100.

З 11 пухлин (3,2%), які було класифіковано як папілярні, 5 представлено інкапсульованими папілярними карциномами з інвазією, 4 – солідними папілярними карциномами та 2 - інвазивними папілярними карциномами (мал. 3.11).



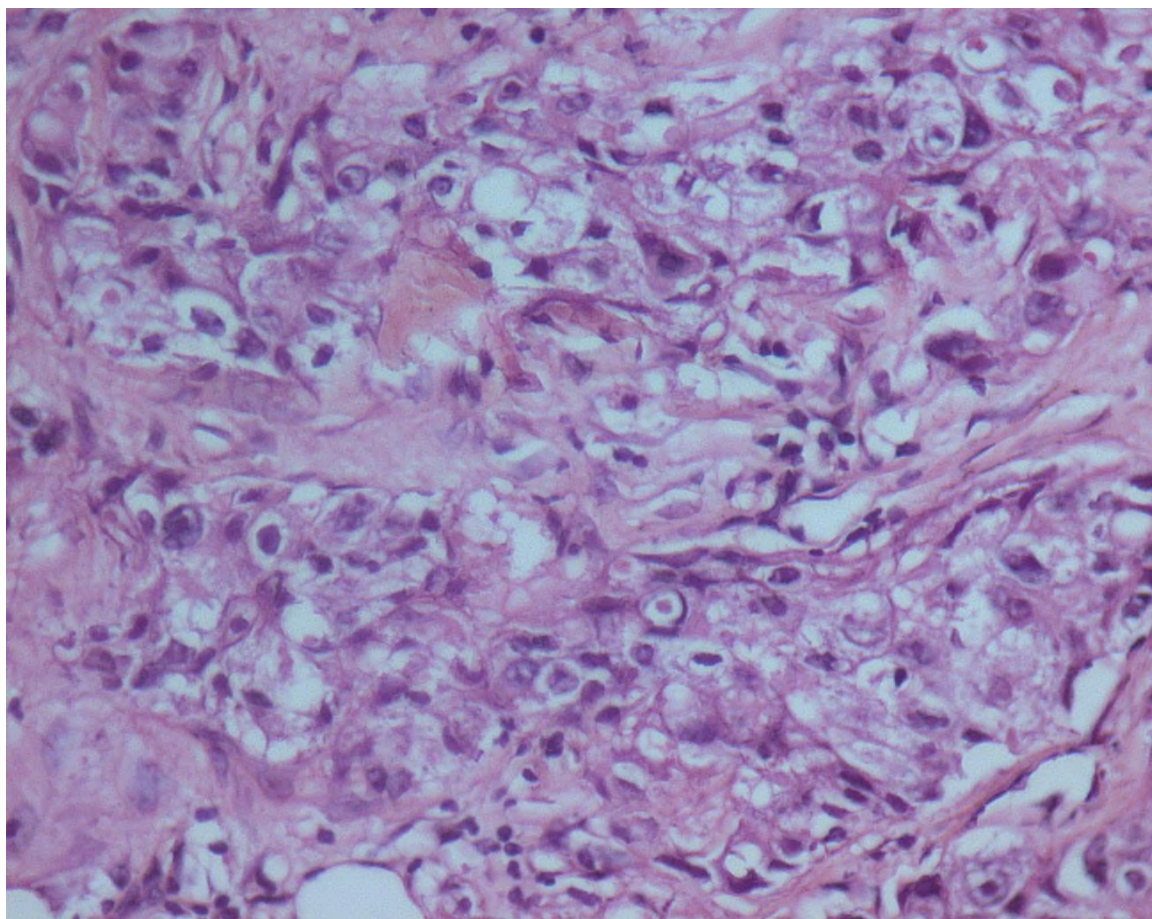
Мал. 3.11. Інвазивна папілярна карцинома молочної залози. Фарбування гематоксилін-еозином, x200.

Карцинома з апокриновим диференціюванням, яка є дуже рідким гістологічним підтипом, відрізнялася наявністю великих пухлиних клітин з гранулярною еозинофільною цитоплазмою з наявністю чітких ядерць (мал.3.12,мал.3.13).



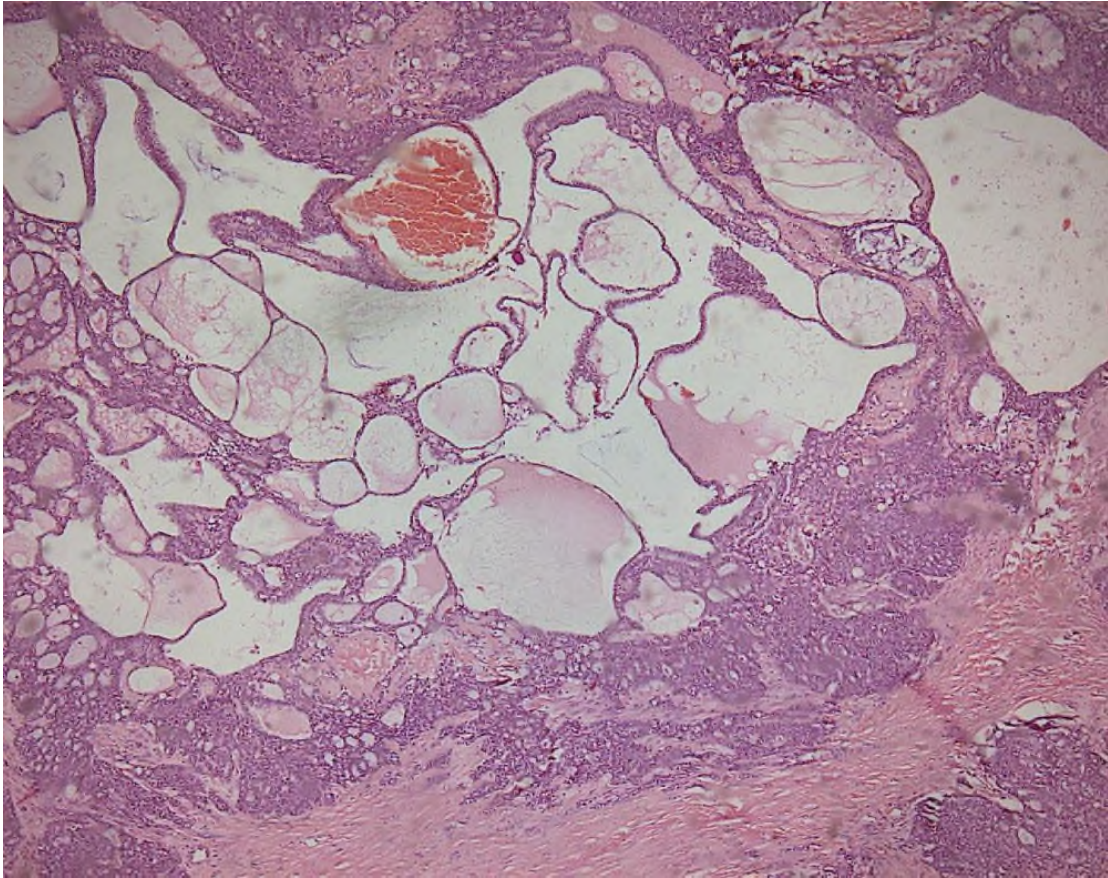
Мал. 3.12. Карцинома з апокриновим диференціюванням, наявність чітких ядерць та гранулярної цитоплазми у клітинах. Фарбування гематоксилін-еозином, x50.

За даними літератури [130], секреторна карцинома асоційована з експресією андрогену. В нашому дослідженні вона також мала високий рівень експресії андрогену (60%, 3+).



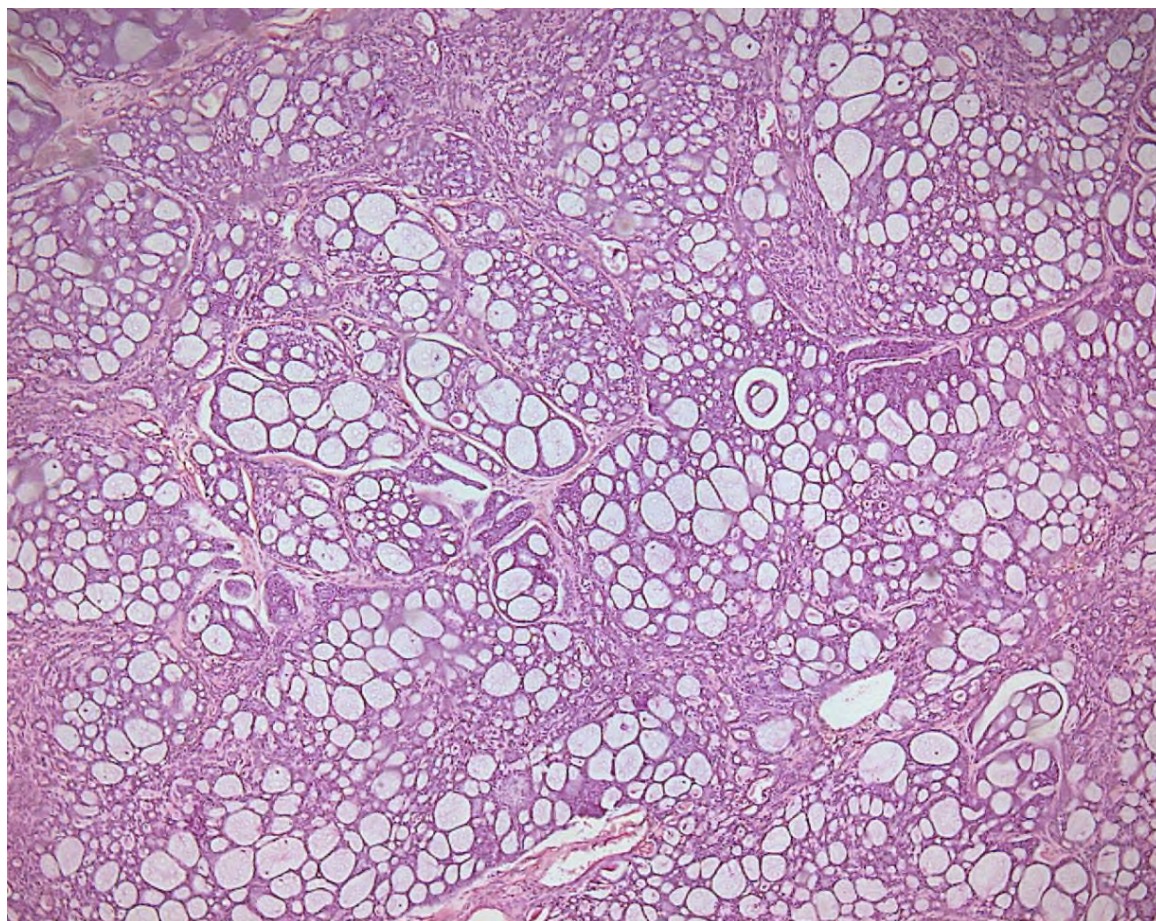
Мал. 3.13. Карцинома з апокриновим диференціюванням, при більшому збільшенні чітко видна гранулярна еозинофільна цитоплазма клітин. Фарбування гематоксилін-еозином, х400.

Аденокістозна карцинома, яка теж є рідким гістологічним підтипом і відрізняється від загального пулу тричі негативних карцином асоціацією з мутації MYB-NFIB [131], була представлена в єдиному екземплярі (мал.3.14).



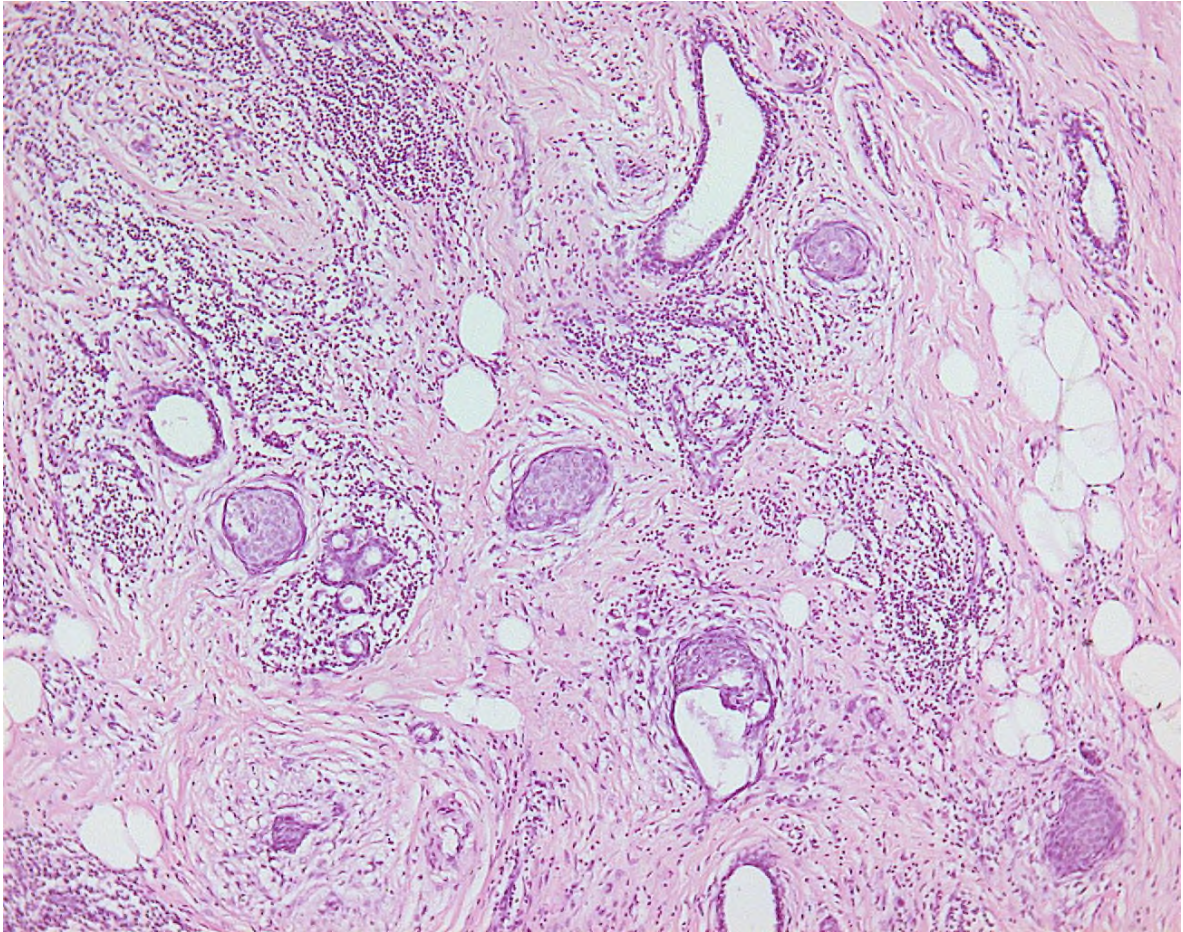
Мал. 3.14. Аденокістозна карцинома, формування кістозних та солідних структур, з наявністю секрету та крововиливів. Фарбування гематоксилін-еозином, х50.

Вона була представлена у вигляді тубулярних, солідних та крібриформних структур, частково кістозних структур з наявним секретом всередині (мал. 3.15).



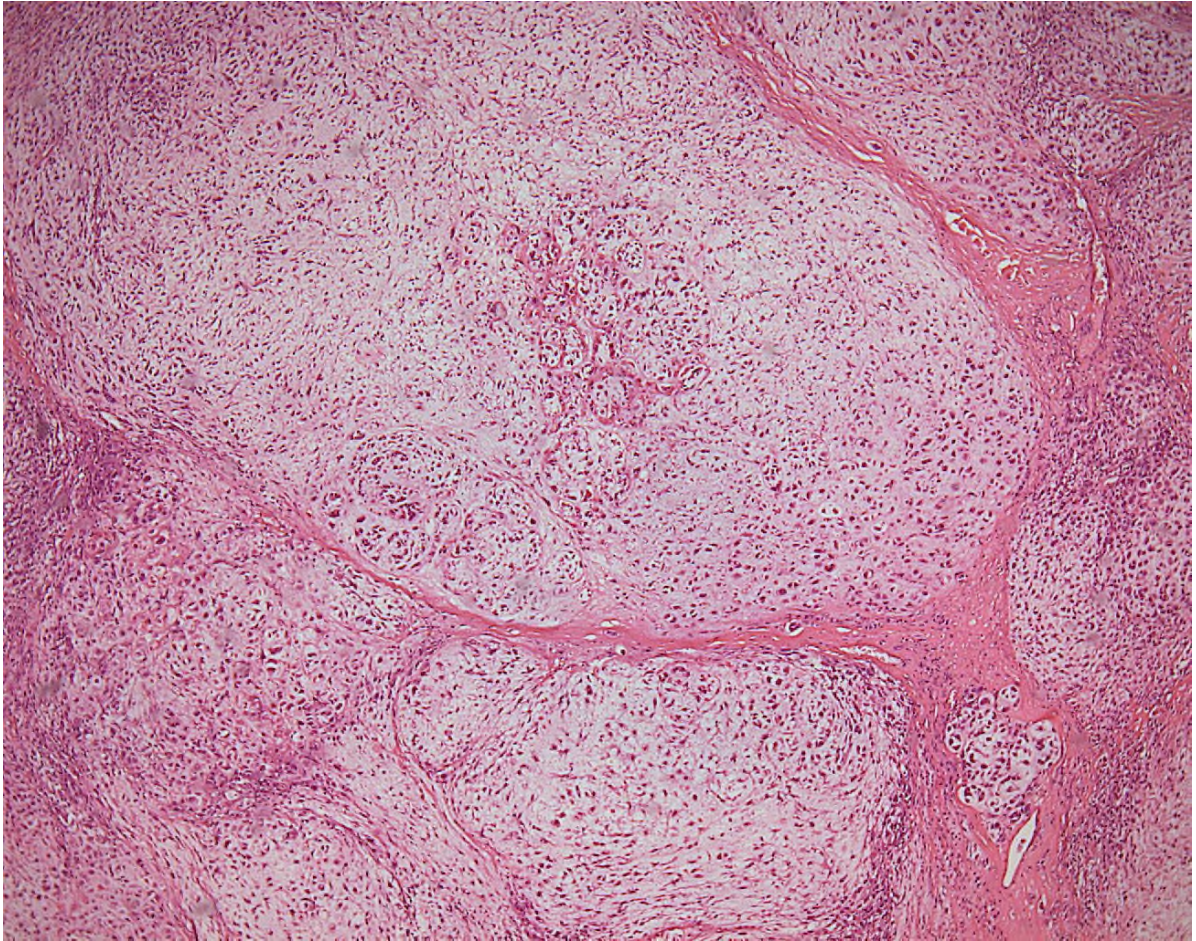
Мал. 3.15. Аденокістозна карцинома, тубулярні та солідні структури. Фарбування гематоксилін-еозином, х50.

Метапластичні карциноми склали 0,87% (3 пухлини), одна з яких була представлена аденосквामозною карциномою з низьким ступенем злоякісності (low grade) (мал. 3.16), одна класифікована як змішана метапластична пухлина (70% - остеїдний, хондрїдний компоненти, 30% - веретенклітинний компонент) (мал.3.17), 1 – як метапластична карцинома з гетерогенним мезенхімальним диференціюванням (представлена остеїдним та хондрїдним компонентами) (мал.3.18).



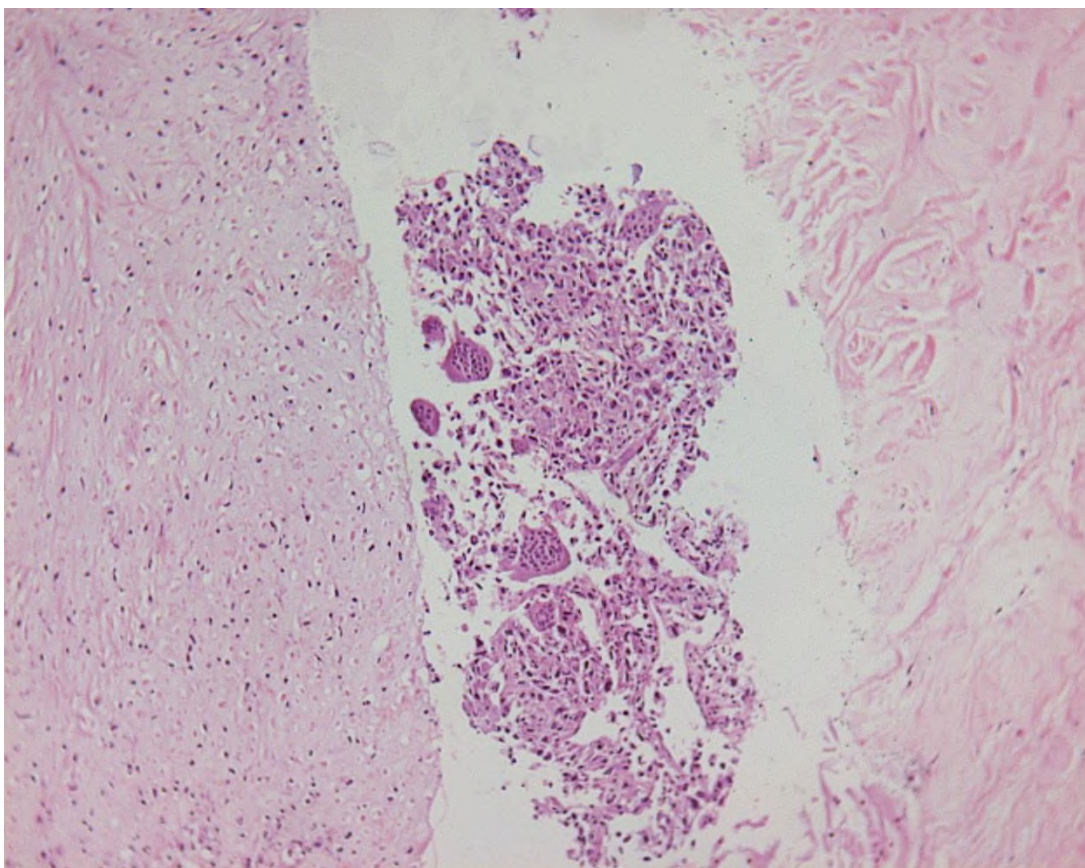
Мал. 3.16 Аденоквамозна карцинома низького ступеню злоякисності, тубулярні структури з наявністю вогнищ плоскоклітинного диференціювання. Фарбування гематоксилін-еозином, x100.

У аденоквамозній карциномі низького ступеню злоякисності на фоні інфільтративних залоз спостерігались вогнища плоскоклітинного диференціювання, були присутні лімфоїдні агрегати. Оскільки ця пухлина відрізняється сприятливим прогнозом [132], надважливо діагностувати цей підтип.



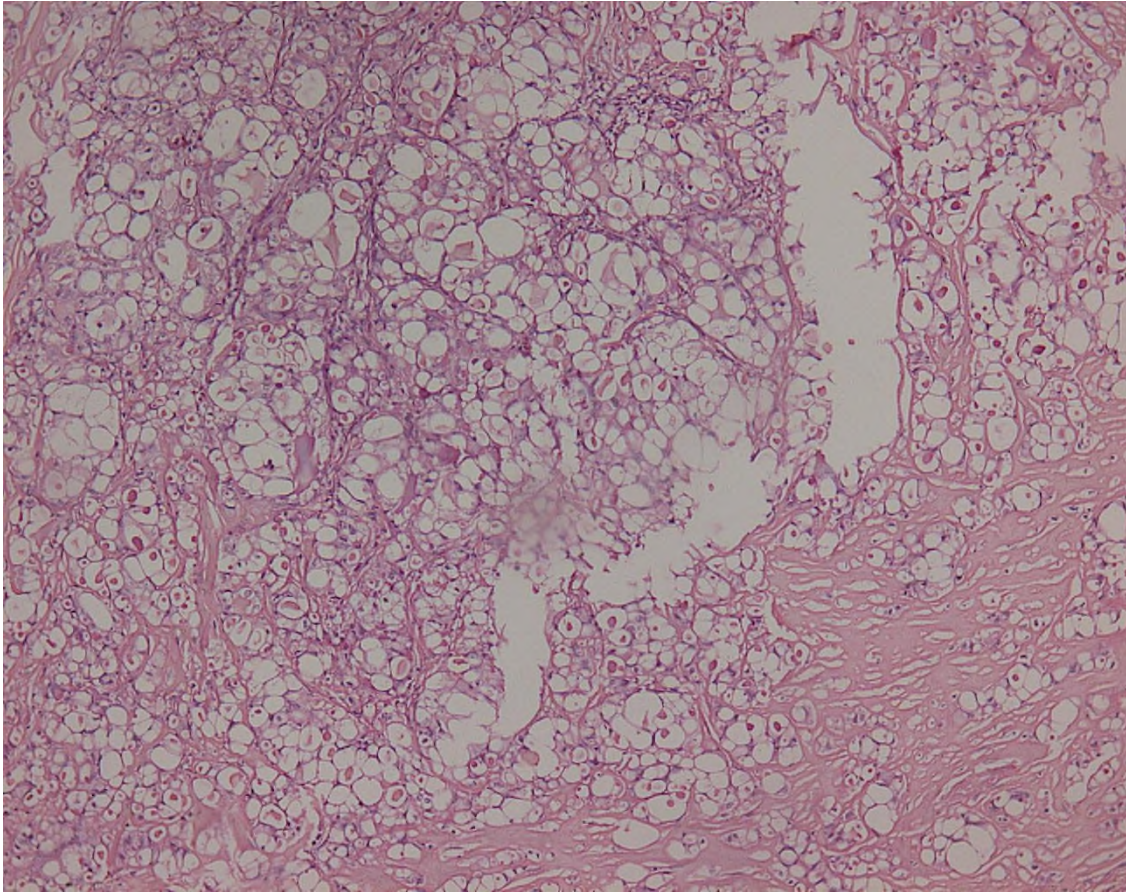
Мал. 3.17. Метапластична карцинома, хондроїдний компонент (операційний матеріал). Фарбування гематоксилін-еозином, х50.

Метапластичні карциноми з гетерогенним мезенхімальним компонентом гірше відповідають на хіміотерапію та мають несприятливий прогноз порівняно з іншими гістологічними підтипами тричі негативних карцином [133].



Мал. 3.18. Метапластична карцинома, що має остеοїдний та хондрοїдний компоненти (біопсійний матеріал). На фото показаний остеοїдний компонент, наявні багатоядерні остеокласти. Фарбування гематоксилін-еозином, x100.

Секреторна карцинома, яка часто асоційована зі злиттям генів ETV6-NNRK3 [134], була представлена в нашому дослідженні в єдиному екземплярі і складалась з епітеліальних клітин, що містили інтрацитоплазматичні секреторні вакуолі та частково позаклітинний секрет (мал.3.19).



Мал. 3.19. Секреторна карцинома (мікрокістозний паттерн, може нагадувати фолікули щитовидної залози). Фарбування гематоксилін-еозином, x50.

Виділення гістологічних підваріантів тричі негативних карцином має першочергове значення для прогнозування перебігу даного захворювання, оскільки не дивлячись на те, що ТНР мають гірші показники виживаності ніж інші молекулярні підгрупи РМЗ, деякі гістологічні підваріанти відрізняються кращим прогнозом. Обізнаність патолога щодо особливостей рідких гістологічних форм РМЗ є важливою умовою правильної діагностики.

3.4 АНАЛІЗ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРОГНОСТИЧНИХ ТА ПРЕДИКТИВНИХ ФАКТОРІВ ДЛЯ ТРИЧІ НЕГАТИВНИХ КАРЦИНОМ

3.4.1 Пухлино-стромальне співвідношення як прогностичний фактор для тричі негативних карцином молочної залози

Оцінка пухлино-стромального співвідношення передбачає визначення кількості стромального компонента пухлини у відсотках. Аналіз даного показника є простим та не потребує великих витрат часу та додаткових гістологічних зрізів. Тому його використання можна легко впровадити у рутинну щоденну практику патоморфолога.

В даному розділі представлені результати оцінки прогностичного значення даного показника. Для оцінки ПСС було вибрано лише операційний матеріал пацієнтів з первинно встановленим діагнозом тричі негативної карциноми молочної залози, що не отримували попередньо хіміотерапію. З загальної кількості (n=343) пухлин були виключені первинний біопсійний матеріал та пухлини після лікування (n=89). Біопсійний матеріал було виключено через те, що стромальний компонент розподіляється не завжди рівномірно (на відміну від пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, які є більш рівномірними за своїм розподілом) і його визначення на невеликому об'ємі пухлини може викривити результат. Хіміотерапія також може вплинути на відсоток стромального компонента, тому у дослідження було включено матеріал без попереднього лікування. Також частина зразків була виключена через те, що містила занадто мало інвазивного компонента або бракувало клінічної інформації (n = 29). Таким чином, у дослідження було включено всього 232 пацієнти. З них помер 51 пацієнт, 72 пацієнти мали рецидив захворювання. Середній період спостереження склав 3,8 року (діапазон від 0,3 до 9,3) для загальної виживаності та 3,2 (діапазон від 0,2 до 9,3) для безрецидивної виживаності. Всі дані щодо гістологічних та клінічних параметрів представлені в таблиці 3.2.

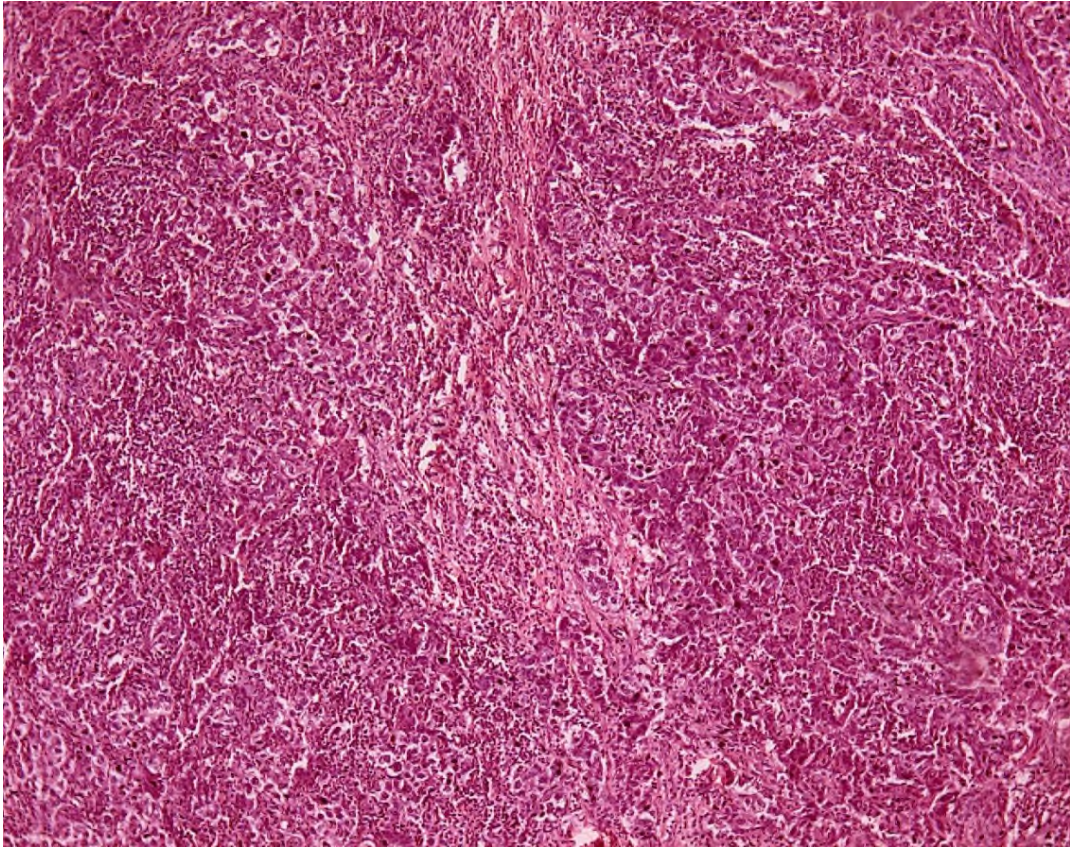
Таблиця 3.2.

Загальна характеристика пацієнтів та лікувальних процедур, гістологічні особливості пухлин, що взяті у дослідження пухлино-стромального співвідношення

Параметр	Кількість	
	N (232)	%
Вік		
≤40	22	9.5
>40<60	114	49.1
>60	96	41.4
Стадія		
I	76	32.8
II	124	53.4
III	32	13.8
pT (Пухлина)		
pT1	91	39.2
pT2	129	55.6
pT3	5	2.2
pT4	7	3.0
pN (Лімфатичні вузли)		
pN0	173	74.6
pN1	34	14.6
pN2	15	6.5
pN3	10	4.3
Гістологічний тип		
NST (Неспецифічний тип)	197	84.9
Часточковий	9	3.9
Папілярний	10	4.3
З медулярним паттерном	9	3.9
Мікропапілярний	1	0.4
Секреторний	1	0.4
Метапластичний	3	1.3
Аденокістозний	1	0.4
З апокриновим диференціюванням	1	0.4
Ступінь диференціювання		
G1	1	0.4
G2	75	32.3

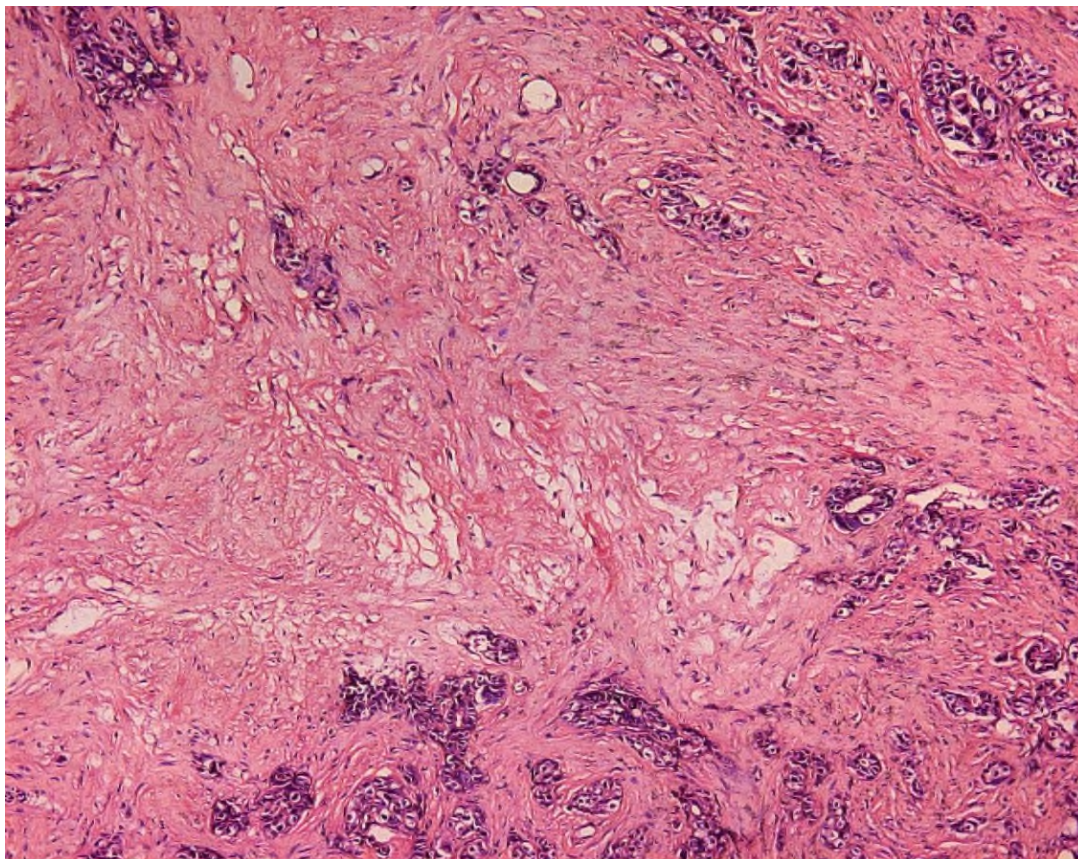
G3	145	62.5
Не визначено	11	4.7
ПСС (пухлинно-стромальне співвідношення)		
Стромальний компонент >50%	100	43.1
Стромальний компонент <=50%	132	56.9
Кі-67		
=<15%	12	5.2
>16% -=<30%	39	16.8
>30%	130	56
Не визначено	51	22
Некроз		
Так	85	36.6
Ні	147	63.4
Карцинома in situ		
Так	14	6.1
Ні	218	93.9
Оперативне втручання		
Органозберігаюча операція	141	60.8
Мастектомія	91	39.2
Ад'ювантна хіміотерапія		
Так	207	89.2
Ні	25	10.8
Променева терапія		
Так	203	87.5
Ні	29	12.5

Після оцінки ПСС було виявлено, що кількість пухлин з низьким відсотком стромального компонента (<50%) склала 132 (56,9%) (Мал. 3.20).



Мал. 3.20. Карцинома молочної залози з низьким пухлино-стромальним співвідношенням (10% стромального компоненту). Фарбування гематоксилін-еозином, x100.

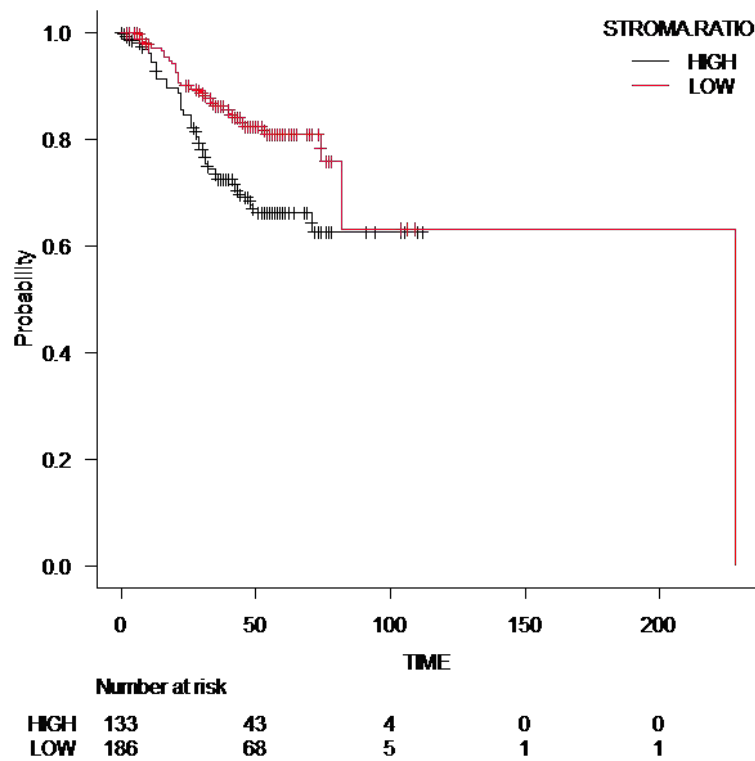
Кількість пухлин, які мають високий відсоток стромального компоненту ($\geq 50\%$) складає 100 (43,1%) (мал.3.21).



Мал. 3.21. Карцинома молочної залози з високим пухлино-стромальним співвідношенням (80% стромального компоненту). Фарбування гематоксилін-еозином, $\times 100$.

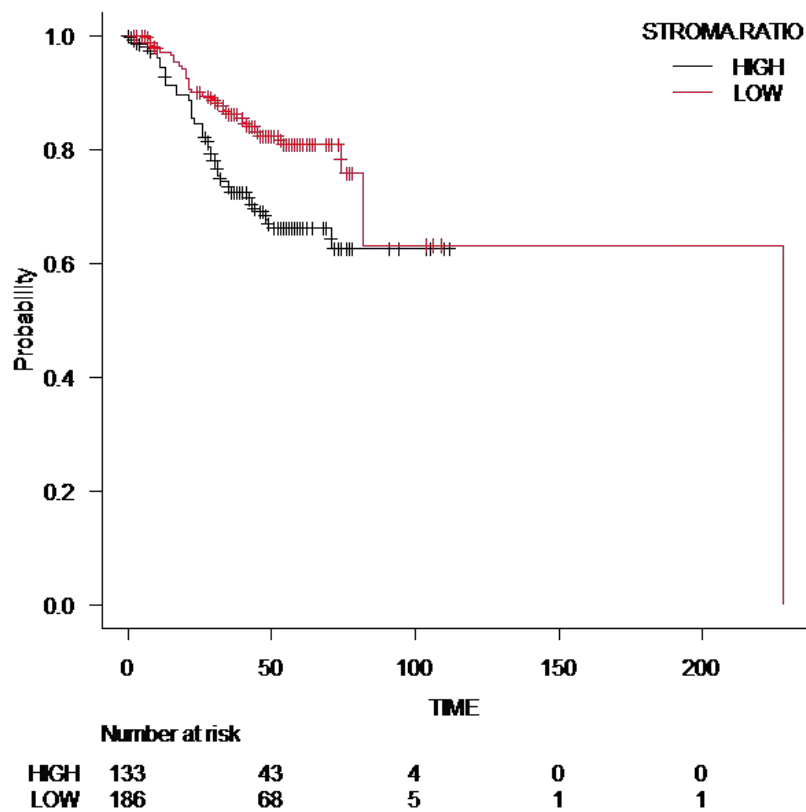
ПСС оцінювався двома патологами, між якими були розходження у 25 випадках (7,8%) при первинному оцінюванні пухлин. Коефіцієнт каппа склав 0.84, що вказує на відмінний рівень погодженості.

Трирічна загальна виживаність для пухлин з низьким ПСС склала $86,9 \pm 2,60\%$, в той час як для пухлин з високим ПСС цей показник склав $75,3 \pm 3,92\%$. Побудована крива виживаності Каплана-Мейера статистично достовірно показала взаємозв'язок між ПСС та загальною виживаністю ($P < 0,05$) (Мал. 3.22).



Мал. 3.22. Крива Каплана-Мейєра; загальна виживаність пацієнтів з тричі негативним раком молочної залози, стратифікована за пухлино-стромальним співвідношенням. $P=0,008$.

Трирічна безрецидивна виживаність для пухлин з низьким і високим ПСС склала $75,6 \pm 3,32\%$ та $61,3 \pm 4,54\%$ відповідно. Побудована крива виживаності Каплана-Мейєра статистично достовірно показала взаємозв'язок між ПСС та безрецидивною виживаністю ($P<0,05$) (мал. 3.23).



Мал. 3.23. Крива Каплана-Мейєра; безрецидивна виживаність пацієнтів з тричі негативним раком молочної залози, стратифікована за пухлино-стромальним співвідношенням. $P = 0,003$.

При побудові однофакторної моделі Кокса було визначено, що пухлини із високим ПСС мали статистично достовірно гірші показники загальної виживаності (КР 1,89; 95% ДІ 1,18-3,03, $p = 0,008$) та безрецидивної виживаності (КР 1,55; 95% ДІ 1,05-2,28, $p = 0,027$) (таблиця 3.3).

Таблиця 3.3

Одноваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичного значення пухлино-стромального співвідношення для загальної виживаності для тричі негативного раку молочної залози

Параметр	Одноваріантний аналіз (загальна виживаність)		
	Коефіцієнт ризику	Довірчий інтервал	P-значення
Вік			0.580
<40			
40-60	1.2	0.47-3.04	0.705
60>	1.47	0.57-3.75	0.425
Ступінь диференціювання			
III			
II	1.09	0.66- 1.81	0.738
Гістологічний підтип			0.321
Долькова карцинома			
Неспецифічна	0.517	0.22-1.2	0.124
З медулярним паттерном	0.000	0.000	0.995
Папілярна карцинома	1.049	0.26-4.2	0.946
Інші	1.219	0.25- 6.06	0.808
Первинна пухлина			0.0006*
T1			
T2	1.48	0.73-2.37	0.179
T3	4.4	2.04-11.36	0.0006
T4	3.4	3.26-7.44	0.002
Регіонарні лімфатичні вузли			0.003*
N0			
N1	1.68	0.96-2.92	0.066
N2	2.9	1.6-5.27	0.0004
N3	3.038	1.33-6.93	0.008
Пухлино-стромальне співвідношення			
Низьке (<50%)			
Високе (>=50%)	1.89	1.18-3.03	0.008*

Примітка: *р-значення <0,05

Таблиця 3.4

Одноваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичного значення пухлино-стромального співвідношення для безрецидивної виживаності для тричі негативного раку молочної залози

Параметр	Одноваріантний аналіз (безрецидивна виживаність)		
	Коефіцієнт ризику	Довірчий інтервал	P-значення
Вік			0.097
<40			
40-60	0.9	0.38-2.14	0.827
60>	1.41	0.61-3.28	0.428
Ступінь диференціювання			
III			
II	0.98	0.65- 1.47	0.916
Гістологічний підтип			0.637
Долькова карцинома			
Неспецифічна	0.613	0.28- 1.33	0.213
З медулярним паттерном	0.000	0.000	0.994
Папілярна карцинома	1.049	0.26-4.2	0.732
Інші	1.102	0.28- 4.26	0.888
Первинна пухлина			0.000*
T1			
T2	1.14	0.71-1.82	0.591
T3	5.75	2.93-11.3	0.000
T4	2.28	1.12-4.64	0.023
Регіонарні лімфатичні вузли			0.000*
N0			
N1	1.62	1.00-2.61	0.049
N2	2.43	1.41-4.18	0.001
N3	2.39	1.10-5.00	0.026
Пухлино-стромальне співвідношення			
Низьке (<50%)			
Високе (>=50%)	1.55	1.05-2.28	0.027*

Примітка: *p-значення <0,05

При багатофакторному аналізі при використанні інформаційного критерію Акаїке для відбору найбільш значущих прогностичних ознак розмір пухлини (pT), регіональні лімфатичні вузли (pN) та пухлино-стромальне співвідношення було відібрано як параметри, що статистично достовірно пов'язані з загальною та безрецидивною виживаністю. Інші параметри (вік, ступінь диференціювання пухлин та гістологічний підтип) не були включені як прогностичні фактори після поетапного відбору параметрів (таб.3.5, 3.6).

Таблиця 3.5

Мультиваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичного значення пухлино-стромального співвідношення для загальної виживаності з поетапним відбором параметрів за інформаційним критерієм Акаїке

Параметр	Мультиваріантний аналіз (загальна виживаність)		
	Коефіцієнт ризику	Довірчий інтервал	P – значення
Первинна пухлина			0.036
T1			
T2	1.24	0.68-2.27	0.292
T3	3.80	1.45-9.95	0.006
T4	2.09	0.83-5.24	0.113
Регіонарні лімфатичні вузли			0.035
N0			
N1	1.24	0.64-2.39	0.064
N2	2.16	1.05-4.45	0.058
N3	3.47	1.46-8.23	0.002
Пухлино-стромальне співвідношення			
Низьке (<50%)			
Високе (>=50%)	2.11	1.29-3.43	0.002

Таблиця 3.6

Мультиваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичного значення пухлино-стромального співвідношення для безрецидивної виживаності з поетапним відбором параметрів за інформаційним критерієм Акаїке

Параметр	Мультиваріантний аналіз (безрецидивна виживаність)		
	Коефіцієнт ризику	Довірчий інтервал	P-значення
Первинна пухлина			0.000
T1			
T2	1.002	0.62-1.64	0.986
T3	4.63	2.15-10.03	0.000
T4	1.05	0.44-2.48	0.915
Регіонарні лімфатичні вузли			0.003
N0			
N1	1.31	0.76-2.26	0.331
N2	2.32	1.25-4.32	0.007
N3	2.82	1.28-6.20	0.010
Пухлино-стромальне співвідношення			
Низьке (<50%)			
Високе (>=50%)	1.83	1.22-2.78	0.004

Таким чином, пухлино-стромальне співвідношення статистично достовірно є незалежним прогностичним фактором для загальної та безрецидивної виживаності.

3.4.2 Пухлино-інфільтруючі лімфоцити як прогностичний фактор для тричі негативних карцином молочної залози

У дослідження було включено 343 пацієнти. В деяких випадках ($n = 29$) було занадто мало інвазивного компонента або була недостатня кількість клінічної інформації, тому вони були виключені. В результаті 321 пацієнти було включено. 71 пацієнт з досліджених помер, 102 пацієнти мали рецидив захворювання. Середній період спостереження склав 3,8 років (діапазон від 0,3 до 9,3) для загальної виживаності та 3,2 (діапазон від 0,2 до 9,3) для безрецидивної виживаності.

На відміну від вищепредставленого дослідження щодо стромального компонента, в даному випадку в аналіз були включені як біопсійний, так і операційний матеріал, оскільки за рекомендаціями міжнародної групи з оцінки ПЛ, біопсійний матеріал є достатньо репрезентативним для оцінки даного параметру.

Загальні дані щодо пухлин, що були досліджені, представлені в таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

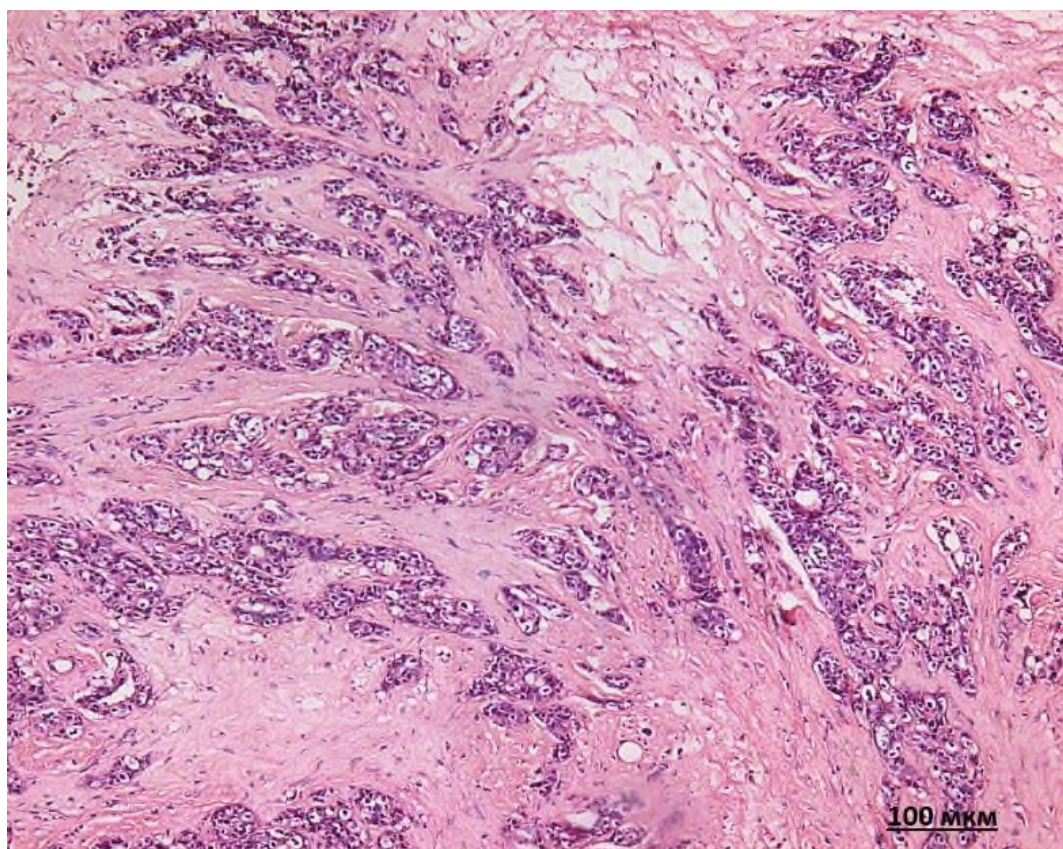
Характеристика гістологічних параметрів та лікувальних маніпуляцій пухлин, що взяті у дослідження пухлино-інфільтруючих лімфоцитів

Параметр	Кількість	
	N (321)	%
Вік		
≤40	30	9.4
>40<60	159	49.5
>60	132	41.1
Стадія		
I	78	24.3
II	163	50.8
III	80	24.9
pT (Пухлина)		
pT1	97	30.2
pT2	183	57.0
pT3	17	5.3

pT4	24	7.5
pN (Лімфатичні вузли)		
pN0	178	55.5
pN1	81	25.2
pN2	40	12.5
pN3	17	5.2
pNx	5	1.6
Гістологічний тип		
NST (Неспецифічний тип)	282	87.9
Дольковий	14	4.4
Папілярний	9	2.8
З медулярним паттерном	9	2.8
Інші	7	2.1
Ступінь диференціювання		
G1	1	0.3
G2	114	35.59
G3	189	58.9
Не визначено	17	5.3
Ki-67		
≤15%	15	4.7
>16% - ≤30%	65	20.2
>30%	190	59.2
Не визначено	51	15.9
Некроз		
Так	118	36.8
Ні	203	63.2
ПЛ		
A (0-10%)	38	11.8
B (10-40%)	169	52.6
C (40-100%)	114	35.5
DCIS (LCIS)		
Так	20	6.2
Ні	301	93.8
Неoadjuvantна хімотерапія		
Так	136	42.4
Ні	185	57.6
Оперативне втручання		

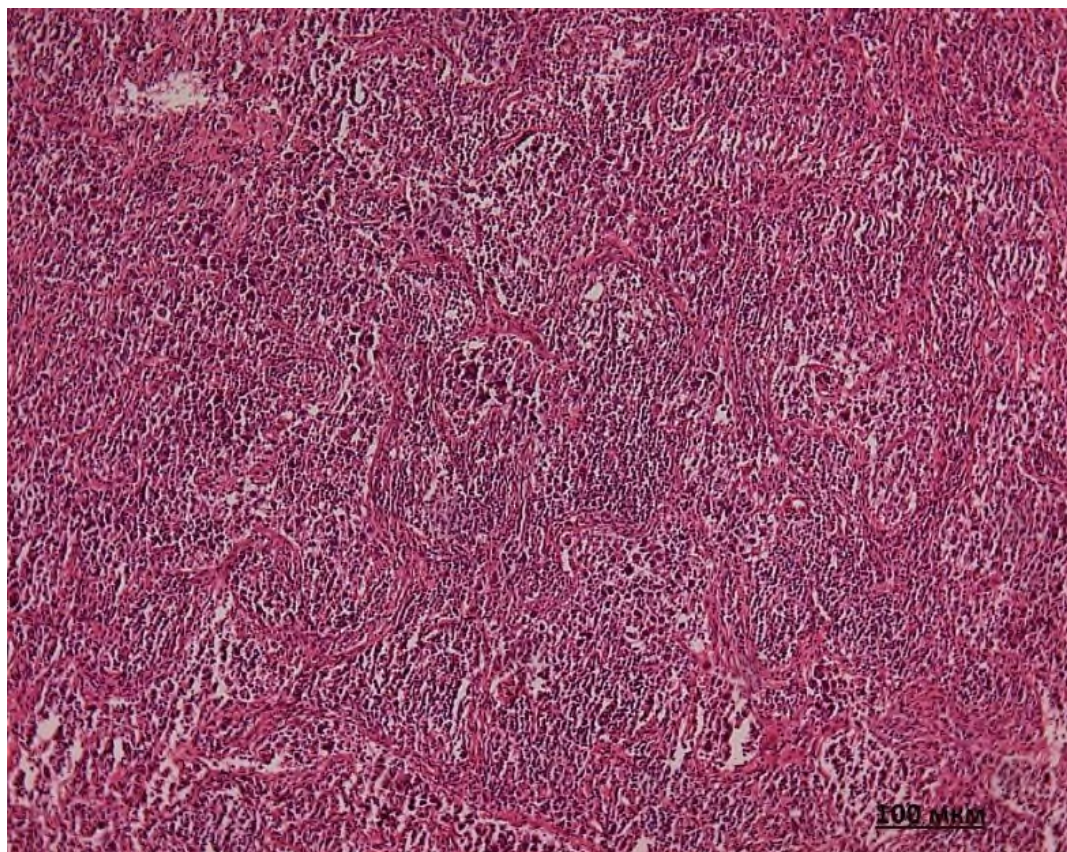
Органозберігаюча операція	168	52.3
Мастектомія	153	47.7
Ад'ювантна хіміотерапія		
Так	296	92.2
Ні	25	7.8
Променева терапія		
Так	292	91
Ні	29	9

В результаті дослідження за кількістю пухлиноінфільтруючих лімфоцитів пухлини були розподілені на групу А (відсутні або невелика кількість ПЛЛ), В (середня кількість ПЛЛ) та С (висока кількість ПЛЛ) (Мал.3.23-3.25). До групи А увійшло 38 пухлин (мал.3.23).



Мал. 3.23. Інвазивна карцинома молочної залози, неспецифічна (протокова), група А (0-10%) за кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. Фарбування гематоксилін-еозином, x100.

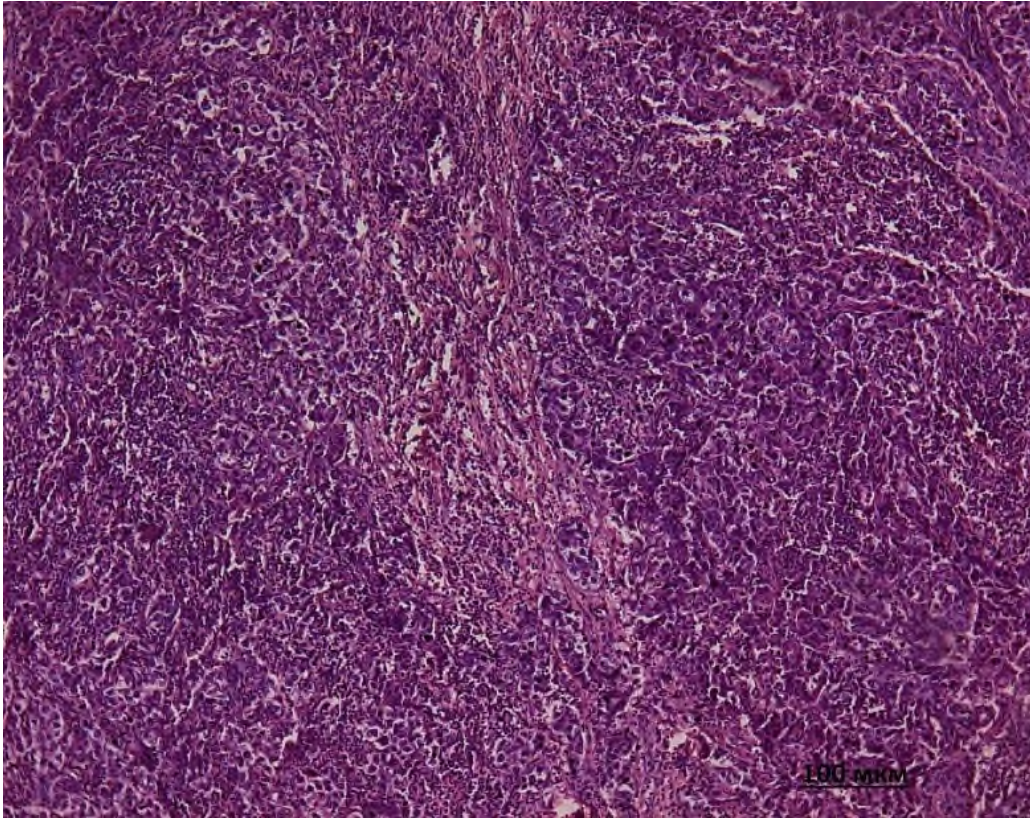
Найбільша кількість пухлин (169) увійшла до групи В з середньою кількістю лімфоцитарного інфільтрату (мал.3.24).



Мал. 3.24. Інвазивна карцинома молочної залози, неспецифічна (протокова), група В (10-40%) за кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. Фарбування гематоксилін-еозином, x100.

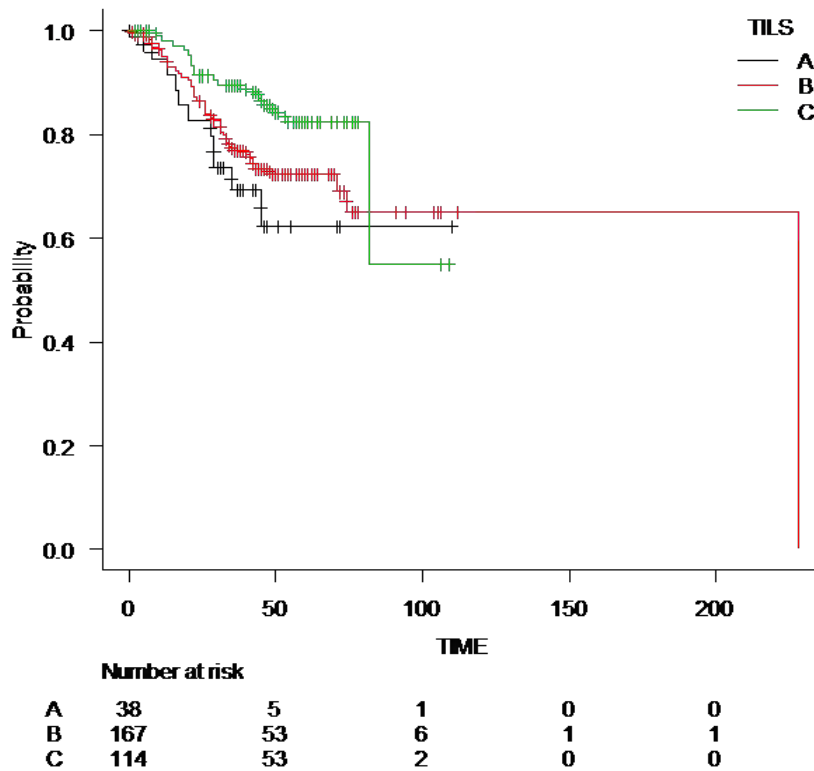
114 пухлин увійшло до групи С з вираженим лімфоцитарним інфільтратом (мал.3.25).

Коефіцієнт Каппа склав 0,79, що вказує на високий рівень узгодженості між двома патологами, що оцінювали препарати.



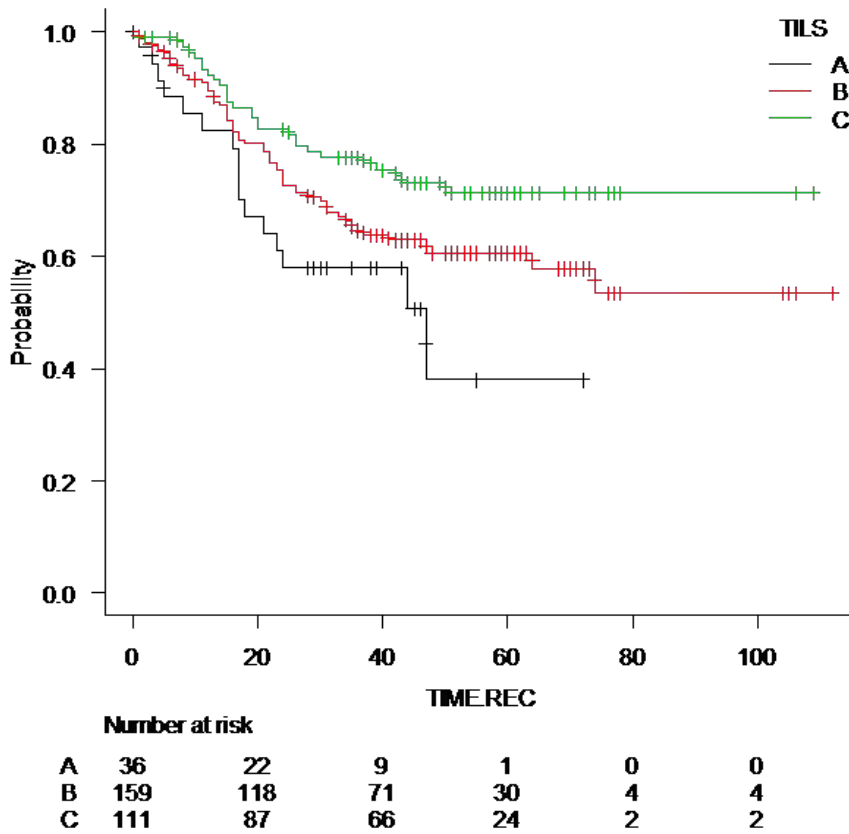
Мал. 3.25. Інвазивна карцинома молочної залози, неспецифічна, група С (40-100%) за кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. Фарбування гематоксилін-еозином, $\times 100$.

Загальна трирічна виживаність пацієнтів для групи С склала $89,4 \pm 3,032\%$, для групи В - $80,5 \pm 3,199\%$, для групи А - $73,6 \pm 7,58\%$ ($p = 0,001$) (мал. 3.26).



Мал. 3.26. Крива Каплана-Мейера (загальна виживаність), стратифікована за групою ПЛ. $P = 0,03$.

Безрецидивна трирічна виживаність для групи С склала $77,6 \pm 4,112\%$, для групи В - $69,9 \pm 3,764\%$, для А групи - $57,9 \pm 8,58\%$ ($p = 0,03$) (мал. 3.27). За побудованими кривими виживаності Каплана-Мейєра різниця у загальній та безрецидивній виживаності для пацієнтів групи А, В та С є статистично достовірною.



Мал 3.27. Крива Каплана-Мейєра (безрецидивна виживаність), стратифікована за групою ПЛ. $P = 0,01$.

У одноваріантному регресійному аналізі за моделлю Кокса високий показник ПЛ (40-100%, С група) мав статистично достовірно прогностичне значення з кращими показниками загальної (ВР 0.4, 95% ДІ 0.19-0.86, $p=0.019$) та безрецидивної виживаності (ВР 0.42, 95% ДІ 0.22-0.78, $p=0.005$). Однак група В (з кількістю ПЛ 10-40%) не показала статистично достовірних значень як прогностичний фактор для загальної (ВР 0.74, 95% ДІ 0.38-1.44, $p=0.370$) та безрецидивної виживаності (ВР 0.65, 95% ДІ 0.38-1.15, $p=0.140$) відповідно (табл. 3.7, табл.3.8).

Таблиця 3.7

Одноваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичного значення ПЛЛ для загальної виживаності для тричі негативного раку молочної залози

Параметр	Загальна виживаність		
	Коефіцієнт ризику	95% довірчий інтервал	P –значення
Вік			0,097
<40			
40-60	1,2	0,38-2,14	0,827
60>	1,47	0,61-3,28	0,428
Ступінь диференціювання			
III			
II	1,09	0,65- 1,47	0,916
Гістологічний підтип			0,637
Долькова карцинома			
Неспецифічна	0,517	0,28- 1,33	0,213
З медулярним паттерном	0,000	0,000	0,994
Папілярна карцинома	1,049	0,26-4,2	0,732
Інші	1,219	0,28- 4,26	0,888
Первинна пухлина			0,000*
T1			
T2	1,48	0,71-1,82	0,591
T3	4,4	2,93-11,3	0,000
T4	3,4	1,12-4,64	0,023
Регіонарні лімфатичні вузли			0,000*
N0			
N1	1,68	1,00-2,61	0,049
N2	2,9	1,41-4,18	0,001
N3	3,038	1,10-5,00	0,026
Пухлино-інфільтруючі лімфоцити			0,017*
A (0-9%)			
B (10-40%)	0,74	0,38-1,15	0,140
C (41-100%)	0,4	0,22-0,78	0,005

Примітка: *р-значення <0,05

Таблиця 3.8

Одноваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичного значення ПІЛ для безрецидивної виживаності для тричі негативного раку молочної залози

Параметр	Безрецидивна виживаність		
	Коефіцієнт ризику	95% довірчий інтервал	P -значення
Вік			0,580
<40			
40-60	0,9	0,47-3,04	0,705
60>	1,41	0,57-3,75	0,425
Ступінь диференціювання			
III			
II	0,98	0,66- 1,81	0,738
Гістологічний підтип			0,321
Долькова карцинома			
Неспецифічна	0,613	0,22-1,2	0,124
З медулярним паттерном	0,000	0,000	0,995
Папілярна карцинома	1,049	0,26-4,2	0,946
Інші	1,102	0,25- 6,06	0,808
Первинна пухлина			0,0006*
T1			
T2	1,14	0,73-2,37	0,179
T3	5,75	2,04-11,36	0,0006
T4	2,28	3,26-7,44	0,002
Регіонарні лімфатичні вузли			0,003*
N0			
N1	1,62	0,96-2,92	0,066
N2	2,43	1,6-5,27	0,0004
N3	2,39	1,33-6,93	0,008
Пухлино-інфільтруючі лімфоцити			0,038*
A (0-9%)			
B (10-40%)	0,65	0,38-1,44	0,370
C (41-100%)	0,42	0,19-0,86	0,019

Примітка: *p-значення <0,05

При багатофакторному аналізі при використанні інформаційного критерію Акаїке для відбору найбільш значущих прогностичних ознак розмір пухлини (pT), регіональні лімфатичні вузли (pN) та пухлино-інфільтруючі лімфоцити було відібрано як параметри, що статистично достовірно пов'язані з загальною та безрецидивною виживаністю. При чому ПЛІ не є статистично достовірно незалежним прогностичним фактором ($p=0,079$ для загальної та $0,083$ для безрецидивної виживаності), проте висока кількість ПЛІ (41% і вище) статистично достовірно мають кращі показники загальної (КР 0,42, 95% ДІ 0,19-0,91, $p=0,029$) та безрецидивної (КР 0,50, 95% ДІ 0,26-0,95, $p=0,036$) виживаності.

Пухлини групи В (з кількістю ПЛІ 10-40%) не показали статистично достовірних значень впливу ПЛІ як прогностичного фактору на загальну (КР 0,68, 95% ДІ 0,35-1,35, $p=0,275$) та безрецидивну виживаність (КР 0,75, 95% ДІ 0,42-1,33, $p=0,335$) порівняно з А групою, що і унеможливило виокремлення ПЛІ в цілому як незалежного прогностичного фактору.

Інші параметри (вік, ступінь диференціювання пухлин та гістологічний підтип) не були включені як прогностичні фактори після поетапного відбору параметрів (табл.3.9, 3.10).

Таблиця 3.9

Мультиваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичного значення ПЛІ для загальної виживаності з поетапним відбором параметрів за ІКА

Параметр	Загальна виживаність		
	Коефіцієнт ризику	95% довірчий інтервал	P-значення
Первинна пухлина			0,006
T1			
T2			
T3	1,18	0,65-0,17	0,574
T4	3,28	1,24-8,68	0,016
	2,08	0,77-4,98	0,155

Регіонарні лімфатичні вузли			0,035
N0			
N1			
N2	1,31	0,68-2,53	0,064
N3	2,09	1,01-4,34	0,045
	2,56	1,10-5,95	0,028
Пухлино- інфільтруючі лімфоцити			0,079
A (0-9%)			
B (10-40%)	0,68	0,35-1,35	0,275
C (41-100%)	0,42	0,19-0,91	0,029

Таблиця 3.10

Мультиваріантний регресійний аналіз за моделлю Кокса прогностичного значення
ПЛ для безрецидивної виживаності з поетапним відбором параметрів за ІКА

Параметр	Безрецидивна виживаність		
	Коефіцієнт ризик	95% довірчий інтервал	P-значення
Первинна пухлина			0,000
T1			
T2	0,96	0,65-2,17	0,888
T3	4,37	1,99-9,58	0,000
T4	1,06	0,45-2,49	0,896
Регіонарні лімфатичні вузли			0,006
N0			
N1	1,33	0,77-2,30	0,296
N2	2,09	1,12-3,88	0,018
N3	2,24	1,03-4,86	0,041
Пухлино- інфільтруючі лімфоцити			0,083
A (0-9%)			
B (10-40%)	0,75	0,42-1,33	0,335
C (41-100%)	0,50	0,26-0,95	0,036

Таким чином, наявність інтенсивного лімфоцитарного інфільтрату (група С - 41% і вище) є незалежним прогностичним фактором для загальної і безрецидивної виживаності і вказує на більш сприятливий прогноз.

3.5. Аналіз імуногістохімічних прогностичних та предиктивних маркерів для тричі негативних карцином

3.5.1 Експресія андрогену у тричі негативних карциномах, її значення

Антиандрогенна терапія досі не входить у клінічні протоколи лікування РМЗ. Проте дослідження, які тривають, мають обнадійливі результати для карцином, що мають експресію рецепторів андрогену [135]. В даному розділі представлені результати дослідження експресії андрогену у тричі негативних карциномах молочної залози.

Для дослідження прогностичного значення експресії андрогену у тричі негативних карциномах молочної залози було відібрано 117 операційних гістологічних зразків, для яких були доступні парафінові блоки з достатньою кількістю матеріалу. 88% пацієнтам було проведено ад'ювантну хіміотерапію, 40 хворих (34%) мали рецидив захворювання, з них 25 (21%) – померли. Середній період спостереження склав 3,4 роки (діапазон від 0,3 до 9,3) для загальної виживаності та 2,9 (діапазон від 0,2 до 9,3) для безрецидивної виживаності. Детальний аналіз клініко-гістологічних характеристик представлений в табл. 3.11.

Таблиця 3.11

Загальні характеристики пацієнтів з тричі негативним раком молочної залози, зв'язок з експресією андрогену

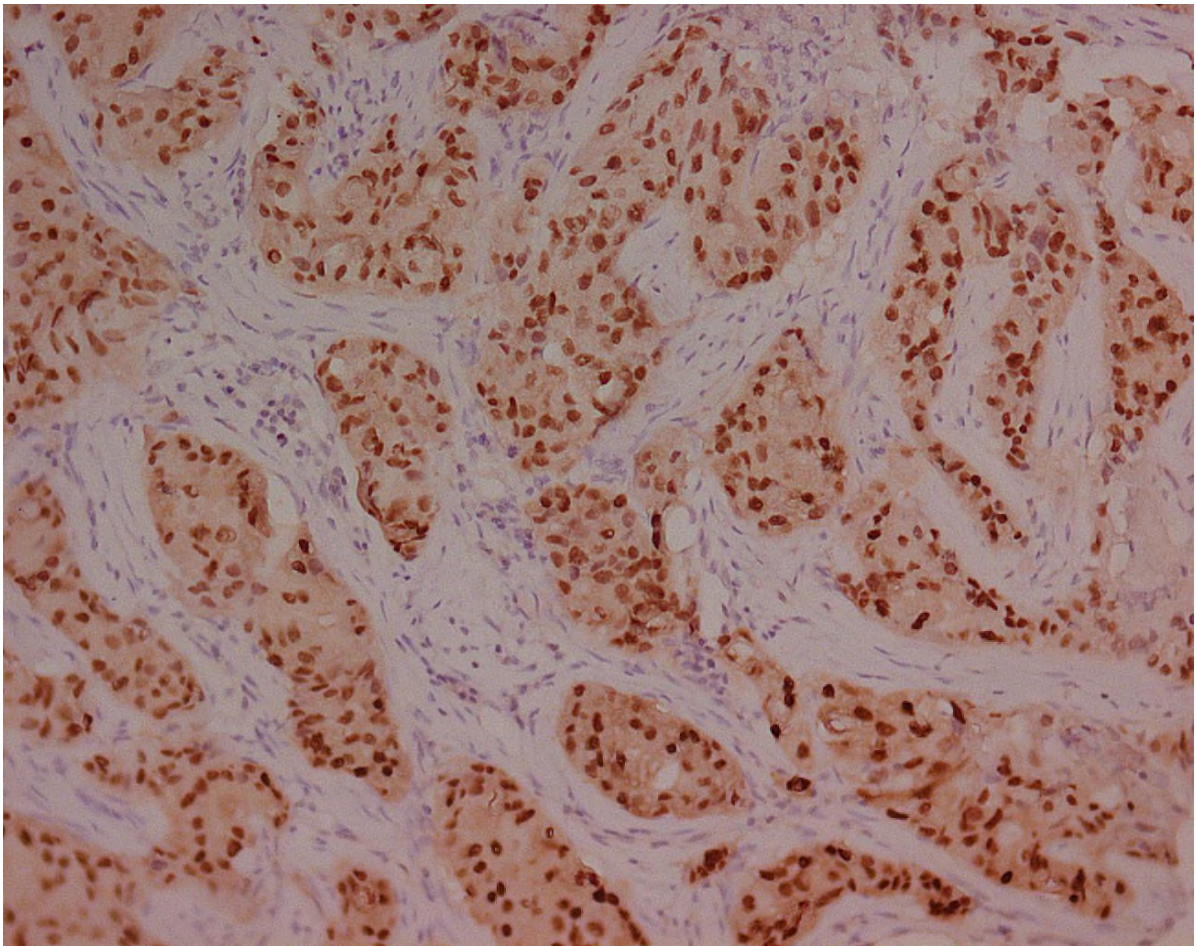
Параметр	Кількість		AR +		AR-		р-значення
	N	%		% (AR+)		% (AR-)	
Всього	117	100%	34	29	83	71	
Вік							0,14
=<40	15	12,8	2	13,3	13	86,7	
>40<60	62	53	16	25,8	46	74,2	
>60	40	34,2	16	40	24	60	

Стадія							0,74
I	26	22,2	8	30,8	18	69,2	
II	57	48,7	15	26,3	42	73,7	
III	34	29,1	11	32,4	23	67,6	
pT (Пухлина)							0,74
pT1	33	30,2	11	33,3	22	66,7	
pT2	65	57,0	17	26,2	48	73,8	
pT3	8	5,3	2	25	6	75	
pT4	11	7,5	4	36,4	7	63,6	
pN (Лімфатичні вузли)							0,18
pN0	52	44,4	13	25	39	75	
pN1	40	34,3	13	32,5	27	67,5	
pN2	17	14,5	6	35,3	11	74,7	
pN3	8	6,8	2	25	6	75	
Гістологічний тип							0,34
NST (Неспецифічний тип)	103	88	30	29,1	73	70,9	
Часточковий	5	4,2	3	60	2	40	
Папілярний	3	2,6	0	0	3	100	
З медулярним паттерном	4	3,4	0	0	4	100	
Апокриновий	1	0,9	1	100	0	0	
Метапластичний	1	0,9	0	0	1	100	
Ступінь диференціювання							0,11
G2	41	35	10	24,4	31	75,6	
G3	72	61,6	24	33,3	48	66,7	
Не визначено	4	3,4	0	0	4	100	
Ki-67							0,009*
=<30%	30	25,6	14	46,7	16	53,3	
>30%	81	69,2	17	21	64	79	
Не визначено	6	5,2	3	50	3	50	
Некроз							0,81
Так	29	24,8	13	44,8	16	55,2	
Ні	88	75,2	21	23,9	67	76,1	
ПЛ							0,41
A (0-10%)	14	12	5	35,7	9	64,3	
B (10-40%)	64	54,7	18	28,2	46	71,8	

С (40-100%)	39	33,3	11	28,2	28	71,8	
DCIS (LCIS)							0,43
Так	16	13,7	6	37,5	10	62,5	
Ні	101	86,3	28	27,7	73	72,3	
Оперативне втручання							0,32
Органозберігаюча операція	66	56,4	20	30,3	46	69,7	
Мастектомія	51	43,6	14	27,5	37	72,5	
Ад'ювантна хіміотерапія							0,53
Так	104	88,9	27	26	77	74	
Ні	13	11,1	7	53,9	6	46,1	
Рецидив							0,92
Так	40	34,2	12		28		
Ні	77	65,8	22		55		
Смерть							0,33
Так	25	21,4	5	20	20	80	
Ні	92	78,6	29	31,5	63	68,5	

Примітка: *р-значення <0,05

34 карциноми (29%) мали позитивну реакцію з антитілами до андрогену, 83 (71%) мали негативну реакцію. Приклад позитивної експресії андрогену наведений на мал. 3.28.



Мал. 3.28. Позитивна експресія андрогену (імуногістохімічна реакція) у ядрах пухлинних клітин (3+, 95%), x200.

За гістологічним розподілом 103 пухлини (88%) були класифіковані як неспецифічний протоковий підтип (NST), 5 карцином як часточкові, 3 – як папілярні карциноми, 4 – неспецифічні карциноми з медулярним патерном, 1 апокринова та 1 метастатична карциноми. Більшість неспецифічних карцином (70,9%) мали негативну реакцію з AR, жодна з папілярних карцином та карцином з медулярним патерном, а також метастатична карцинома аналогічно не мали експресії AR, в той час як апокринова карцинома та більша частка часточкових карцином (60%) мали позитивну експресію AR.

При аналізі зв'язку клініко-гістологічних параметрів з експресією андрогену було виявлено, що позитивна експресія андрогену має обернений кореляційний зв'язок з індексом проліферативної активності Ki-67 ($p=0,009$). Інших зв'язків експресії AR з віком, стадією захворювання, гістологічним підтипом, ступенем

диференціювання, кількістю імунного інфільтрату, некрозом, наявністю карциноми *in situ* виявлено не було (табл. 3.11).

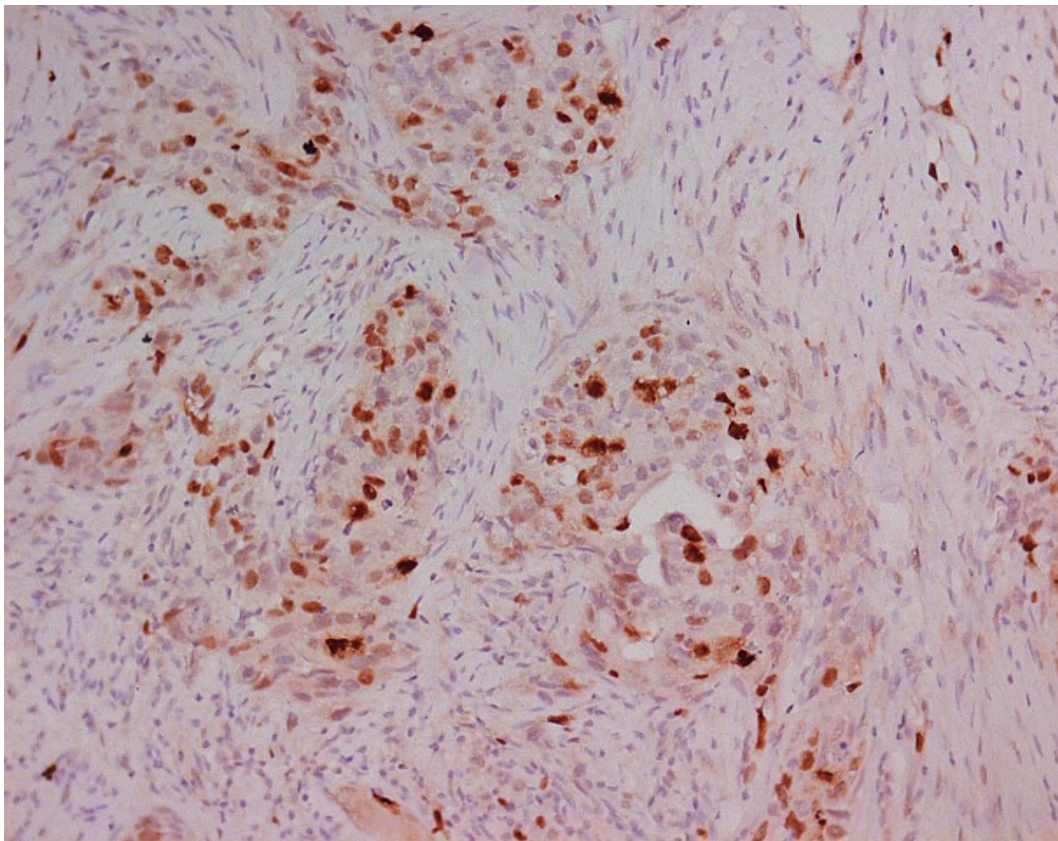
При побудові однофакторної моделі Кокса, що базується на експресії AR, не було виявлено її зв'язку ні з загальною виживаністю (КР 0,57, 95% ДІ 0,22-1,53, $p=0,27$), ні з безрецидивною виживаністю (КР 0,24, 95% ДІ 0,21-2,67, $p=0,24$).

3.5.2 Експресія TOP2A у тричі негативних карциномах, її значення

В даному розділі представлені результати дослідження експресії Топоізомерази2А (TOP2A) у тричі негативних карциномах молочної залози.

Оскільки фермент Топоізомераза2А цікавий в першу чергу своїм предиктивним значенням при проведенні хіміотерапії з застосуванням антрациклінів, для дослідження нами було відібрано біопсійні гістологічні зразки, де в подальшому було проведено хіміотерапію та встановлено ступінь лікувального патоморфозу у операційному матеріалі (для подальшого дослідження його зв'язку з експресією даного маркера).

З 40 досліджених пухлин 24 (60%) зразки мали позитивну експресію Топоізомерази 2А і 16 (40%) негативну. Приклад експресії TOP2A наведено на мал. 3.29.



Мал. 3.29. Позитивна ядерна експресія TOP2A у клітинах пухлини (імуногістохімічна реакція), 40% 3+, x200.

Часточковий рак, секреторна та мікропапілярна карциноми не мали експресії білка Топоізомерази 2А.

При аналізі зв'язку клініко-гістологічних параметрів з експресією Топоізомерази 2А було виявлено, що позитивна експресія TOP2A має прямий кореляційний зв'язок з індексом проліферативної активності Ki-67 ($p=0,009$), а також з кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів ($p=0,05$). Також був виявлений зв'язок експресії TOP2A з гістологічним підтипом. Інших зв'язків експресії TOP2A з віком, стадією захворювання, ступенем диференціювання, некрозом, наявністю карциноми *in situ*, а також ступенем лікувального патоморфозу, безрецидивною та загальною виживаністю виявлено не було (табл.3.12).

Таблиця 3.12

Загальні характеристики пацієнтів з тричі негативним раком молочної залози, зв'язок з експресією Топоізомерази2А

Параметр	Кількість		TOP2A позитивні		TOP2A негативні		р-значення
	N	%		%		%	
Всього	40	100%	24	60	16	40	
Вік							0,49
=<40	5	12,5	3	12,5	2	12,5	
>40<60	18	45	13	54,2	5	31,3	
>60	17	42,5	8	33,3	9	56,2	
Стадія							0,75
I	0						
II	21	52,5	12	50	9	56,3	
III	19	47,5	12	50	7	43,7	
рТ (Пухлина)							0,95
рТ1	2	5	1	4,2	1	6,25	
рТ2	28	70	17	70,8	11	68,75	
рТ3	4	10	2	8,3	2	12,5	
рТ4	6	15	4	16,7	2	12,5	

рN (Лімфатичні вузли)							0,79
рN0	8	20	4	16,7	4	25	
рN1	17	42,5	11	45,8	6	37,5	
рN2	12	30	7	29,2	5	31,25	
рN3	3	7,5	2	8,3	1	6,25	
Гістологічний тип							0,04*
NST (Неспецифічний тип)	37	92,5	24	100	13	81,25	
Часточковий	2	5	0	0	2	12,5	
Мікропапілярний	1	2,5	0	0	1	6,25	
Ступінь диференціювання							0,98
G2	12	30	7	29,2	5	31,25	
G3	28	70	17	70,8	11	68,75	
Кі-67							0,006*
=<30%	12	30	3	12,5	9	56,25	
>30%	27	67,5	20	83,3	7		
Не визначено	1	2,5	1	4,2	0		
Некроз							0,79
Так	6	15	4	16,7	2	12,5	
Ні	34	85	20	83,3	14	87,5	
ПЛ							0,05*
A (0-10%)	3	7,5	0	0	3	18,75	
B (10-40%)	18	45	13	32,5	5	31,25	
C (40-100%)	19	47,5	11	27,5	8	50	
Ступінь лікувального патоморфозу							0,44
1	8	20	4	16,7	4	25	
2	16	40	11	45,8	5	31,25	
3	9	22,5	4	16,7	5	31,25	
4	7	17,5	5	20,8	2	12,5	
DCIS (LCIS)							0,56
Так	7	17,5	2	8,3	5	31,25	
Ні	33	82,5	22	91,7	11	68,75	

Неoad'ювантна хіміотерапія							0,30
Так	37	92,5	24	100	13	81,25	
• Антрацикл ін-вмісна	29	72,5	19	79,2	10	62,5	
• Інші схеми	8	20	5	20,8	3	18,75	
Ні	3	7,5	0	0	3	18,75	
Оперативне втручання							0,62
Органозберігаюча операція	24	60	15	62,5	9	56,25	
Мастектомія	16	40	9	37,5	7	43,75	
Ад'ювантна хіміотерапія							0,29
Так	36	90	24	100	12	75	
Ні	4	10	0	0	4	25	
Рецидив							0,99
Так	14	35	8	33,3	6	37,5	
Ні	26	65	16	66,7	10	62,5	
Смерть							0,69
Так	8	20	4	16,7	4	25	
Ні	32	80	20	83,3	12	75	

При побудові однофакторної моделі Кокса, що базується на експресії TOP2A, не було виявлено її зв'язку ні з загальною виживаністю (КР 0,49, 95% ДІ 0,12-2,01, $p=0,32$), ні з безрецидивною виживаністю (КР 0,35, 95% ДІ 0,09-1,29, $p=0,12$).

При аналізі зв'язку експресії TOP2A та ступенем лікувального патоморфозу за методом Манна-Уїтні (що дозволяє оцінити відмінність у параметрах при невеликій вибірці), статистично достовірної різниці у відповіді на хіміотерапевтичне лікування для пухлин з позитивною та негативною експресією TOP2A не було ($p=0,715$).

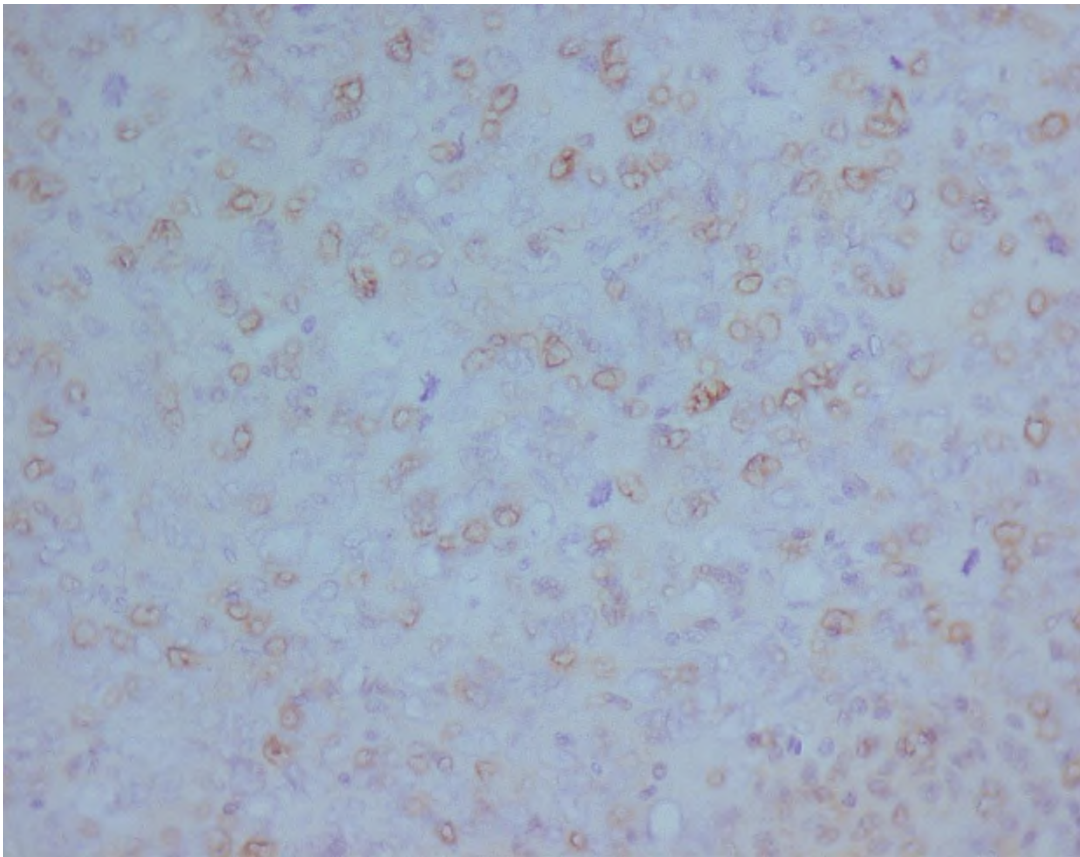
3.5.3 ЕКСПРЕСІЯ PD-L1 У ТРИЧІ НЕГАТИВНИХ КАРЦИНОМАХ, ЇЇ ЗНАЧЕННЯ

3.5.3.1 Дослідження експресії PD-L1 у різних молекулярних підгрупах раку молочної залози

Дослідження експресії PD-L1 для раку молочної залози набуло особливої актуальності через нову терапевтичну опцію імунотерапії, яка наразі розглядається як третя лінія терапії для тричі негативних карцином молочної залози (за умови позитивної експресії PD-L1 у імунному інфільтраті пухлини).

Незважаючи на загальний низький показник позитивної експресії PD-L1 у карциномах молочної залози за даними літератури (від 6% до 29% у імунному інфільтраті та від 1,7% до 21% у клітинах пухлини [136, 137]), у когорті тричі негативних пухлин спостерігається вищий рівень експресії з загальною кількістю позитивних реакцій - у приблизно 51% пухлин та експресією у імунному інфільтраті на рівні 31-61%, а у пухлинних клітинах на рівні 16-64% [138,139,140]. Потрібно зазначити, що така різниця у показниках у різних дослідженнях пояснюється використанням різних методів оцінки, а також різних антитіл, що може впливати на результати.

В даному розділі представлені результати проспективного дослідження експресії PD-L1 у різних молекулярних підгрупах РМЗ. І хоча терапевтичне значення для ТНР має саме експресія PD-L1 у імунному інфільтраті, в наукових інтересах нами було оцінено як імунний інфільтрат, так і експресію даного білка безпосередньо у клітинах пухлини (мал. 3.29).



Мал. 3.29 Приклад позитивної мембранної експресії PD-L1 у клітинах пухлини. Імуногістохімічна реакція, X400.

Всього було проведено 112 імуногістохімічних реакцій, з них 27 реакцій - для люмінальної А групи (яка має рецептори до естрогену, прогестерону, низький рівень проліферативної активності), 26 реакцій для люмінальної В групи (яка аналогічно має рецептори до естрогену і прогестерону, але має вищий рівень проліферативної активності), 29 реакцій для HER2/new-позитивних пухлин і 30 реакцій для тричі негативних пухлин.

В результаті дослідження експресії PD-L1 у імунному інфільтраті пухлин було виявлено, що у люмінальній А групі жодна пухлина не мала позитивної реакції (0%), у люмінальній В групі 2 пухлини (8,3%) мали позитивну експресію PD-L1, в HER2/new-позитивній групі 4 пухлини (13,8%) та 11 (36,7%) у тричі негативній підгрупі мали позитивну реакцію з PD-L1.

У клітинах пухлин експресія PD-L1 дещо відрізнялася: серед люмінальної А групи 1 пухлина (3,7%) мала позитивну реакцію з PD-L1, у люмінальній В групі – 3 пухлини (11,5%) мали позитивну реакцію, у HER2/new-позитивній та тричі негативній групах було 3 (10,3%) та 12 (40%) позитивних реакцій з PD-L1, відповідно. Дані представлено в табл. 3.13.

Таблиця 3.13

Результати оцінки експресії PD-L1 у імунному інфільтраті та клітинах пухлин у різних молекулярних підгрупах РМЗ

	Люмінальна А група	Люмінальна В група	HER2/new-позитивна група	Тричі негативна група
Позитивна реакція у клітинах пухлин	1 (3,7%)	3 (11,5%)	3 (10,3%)	12 (40%)
Негативна реакція у клітинах пухлин	26 (96,3%)	23 (88,5%)	23(79,3%)	18 (60%)
Позитивна реакція у імунному інфільтраті	0 (0%)	2 (8,3%)	4 (13,8%)	11 (36,7%)
Негативна реакція у імунному інфільтраті	27 (100%)	24(92,3%)	25 (86,2%)	19 (63,3%)

Статистично достовірно було встановлено, що експресія PD-L1 пов'язана з молекулярною групою РМЗ як в імунному інфільтраті ($p=0,0006$), так і в клітинах пухлини ($p=0,002$). Зв'язку між гістологічними підтипами (для всіх молекулярних підгруп) та експресією PD-L1 виявлено не було.

Експресія PD-L1 у тричі негативних карциномах статистично достовірно вища, ніж у люмінальних групах як і в імунному інфільтраті, так і в клітинах пухлини ($p=0,002$ і $p=0,07$, відповідно).

3.5.3.2. Порівняння експресії PD-L1 у біопсіях та операційному матеріалі у тричі негативних карциномах молочної залози

В даному розділі представлені результати дослідження, виконаного ретроспективно на архівному матеріалі з метою порівняння експресії PD-L1 у біопсіях та операційному матеріалі від одного і того ж пацієнта.

Нами було проаналізовано 44 гістологічні зразки, які представляють парні випадки (біопсія та операційний матеріал від кожного пацієнта, по 22 слайди відповідно) з діагнозом тричі негативної карциноми молочної залози. За гістологічним підтипом більшість пухлин була представлена неспецифічним (протоковим) підтипом (68,2%). Загальні характеристики пухлин та клініко-морфологічних параметрів представлені в табл. 3.14.

Таблиця 3.14

Загальна характеристика клініко-морфологічних параметрів пухлин

Параметр	Кількість	
	N=22 пацієнти (22 біопсії + 22 зразки операційного матеріалу)	%
Стадія		
II	15	68,2
III	7	31,8
pT (Первинна пухлина)		
pT1	3	13,6
pT2	15	68,2
pT3	1	4,6
pT4	3	13,6
pN (Регіонарні лімфатичні вузли)		
pN0	6	27,3
pN1	10	45,4
pN2	6	27,3
Гістологічний варіант		
Неспецифічний (протоковий) (NST)	15 1	68,2 4,6
Змішаний (NST+Муцинозний)	2	9,0

З медулярним патерном	1	4,6
Метапластичний	1	4,6
Апокриновий	1	4,6
Часточковий	1	4,6
Секреторний		
Ступінь диференціювання		
G1	1	4,6
G2	4	18,2
G3	17	77,2
Пухлино-стромальне співвідношення		
>50%	6	27,3
<=50%	16	72,7
Пухлино-інфільтруючі лімфоцити		
A (0-10%)	7	31,8
B (11-40%)	4	18,2
C (41-100%)	11	50
Метастази в регіонарні лімфатичні вузли		
Так	7	31,8
Ні	15	68,2
Рецидив/дистальні метастази		
Так	8	36,4
Ні	14	63,6
Смерть		
Ні	17	77,3
Так	5	22,7
	Середнє значення	Мін-Макс
Вік	56,9	33-74
Кі-67 (%)	36,86	15-80
Час спостереження (місяці)	42,68	11-68

Експресія білка PD-L1 в імунному інфільтраті (імунних клітинах, ІК) була позитивною в 11 біопсіях (50%). В оперативному матеріалі також було 11 (50%) позитивних випадків експресії PD-L1 в імунному інфільтраті, проте у 2-х випадках експресія PD-L1 зникла, а у двох, навпаки, була виявлена попри її відсутність у біопсії.

У пухлинних клітинах (ПК) позитивна експресія PD-L1 спостерігалася в 11 випадках (50%) біопсій та 11 випадках (50%) операційного матеріалу. І хоча в

даному випадку експресія у біопсійному та операційному матеріалі співпала, сам відсоток (рівень) експресії також був різним в деяких випадках.

Лише у 2 випадках біоптатів (9,1%) експресія PD-L1 у пухлинних клітинах становила більше 50%, 5 зразків біопсії мали експресію від 5 до 50% (22,7%), 4 біопсії мали експресію на рівні 1-5% (18,2%), тоді як 1 операційний зразок (4,5%) мав експресію PD-L1 більше 50%, 2 випадки мали експресію від 5 до 50% (9,1%) і 8 випадків (36,4%) мали експресію на рівні 1-5%.

Було 2 парних випадки із 22, які показали невідповідну (позитивну чи негативну) експресію PD-L1 при оцінці імунного інфільтрату, тоді як всі випадки експресії PD-L1 у пухлинах клітин співпали.

Всього було 10 випадків з біопсійного матеріалу із експресією PD-L1 як в імунному інфільтраті, так і у клітинах пухлини та 9 випадків із аналогічним «поєднанням» експресії PD-L1 в операційному матеріалі. Дані представлені в таблиці 3.15.

Таблиця 3.15

Експресія PD-L1 у клітинах пухлини та імунному інфільтраті у тричі негативних карциномах молочної залози (біопсійний та операційний матеріал)

	N			
	Біопсія		Операційний матеріал	
	N (22)	%	n (22)	%
Експресія PD-L1 у імунному інфільтраті (IC)				
Так	11	50	11	50
Ні	11	50	11	50
Експресія PD-L1 у клітинах пухлини (TC)				
0	11	50	11	50
1-5%	4	18,2	8	36,4
6-50%	5	22,7	2	9,1

>50%	2	9,1	1	4,5
Кількість випадків з позитивною експресією PD-L1 в ІС та ТС	10	45,5	9	40,9
Кількість випадків, де експресія PD-L1 відрізнялась у імунному інфільтраті	2			
Кількість випадків, де експресія PD-L1 відрізнялась у клітинах пухлини	0			

При порівнянні експресії PD-L1 у імунному інфільтраті в біопсіях та операційному матеріалі було виявлено, що коефіцієнт конкордації становить 0,81 (95% ДІ 0,61-0,92), що свідчить про низький рівень погодження за шкалою Макбрайда [11]. При аналогічному порівнянні у клітинах пухлин цей показник становив 1, що вказує на ідеальний рівень погодження, хоча рівень експресії все одно відрізнявся, як було зазначено вище.

При дослідженні зв'язку експресії PD-L1 з іншими клініко-морфологічними факторами у пухлинних клітинах було виявлено, що вона асоціюється з експресією PD-L1 у імунних клітинах ($p = 0,009$) та кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів ($p = 0,011$), що підтверджує результати інших досліджень [17,19]. Статистично значущого зв'язку експресії PD-L1 у імунному інфільтраті та клітинах пухлини з гістологічним ступенем, віком, індексом проліферативної активності Ki-67, ступенем диференціювання, TNM-стадіюванням, кількістю стромального компоненту та кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів виявлено не було (табл.3.16, 3.17).

Таблиця 3.16

Асоціація експресії PD-L1 у операційному матеріалі з клініко-морфологічними параметрами (оцінка імунного інфільтрату)

Параметр		позитивна експресія PD-L1 в імунному інфільтраті		Негативна експресія PD-L1 у імунному інфільтраті		р-значення
Середній рівень Ki-67		37,5		40		0,178
Середній вік		56,9		57,8		0,592
		n	%	n	%	
Гістологічний підтип	Неспецифічні	6	54,5	9	81,8	0,203
	Змішана(неспецифічна+муцинозна)	0	0	1	9,1	
	З медулярним патерном	2	18,2	0	0	
	Метапластична	1	9,1	0	0	
	Апокринова	1	9,1	0	0	
	Часточкова	0	0	1	9,1	
	Секреторна	1	9,1	0	0	
Ступінь диференціювання	1	1	9,1	0	0	0,311
	2	2	18,2	2	18,2	
	3	8	72,7	9	81,8	
Стадія	2	10	90,9	5	45,5	0,064
	3	1	9,1	6	54,5	
pT	T1	2	18,2	1	9,1	0,672
	T2	8	72,7	7	63,6	
	T3	0	0	1	9,1	
	T4	1	9,1	2	18,2	
pN	N0	4	36,4	2	18,2	0,263
	N1	6	54,5	4	36,4	
	N2	1	9,1	5	45,4	
Експресія PD-L1 у клітинах пухлини	Так	9	81,8	2	18,2	0,009*
	Ні	2	18,2	9	81,8	
Пухлино-інфільтруючі лімфоцити	A (0-10%)	5	45,4	2	18,2	0,098
	B (10-40%)	0	0	4	36,4	
	C (>41%)	6	54,5	5	45,4	
Пухлино-стромальне співвідношення	Високе (>50%)	3	27,3	3	27,3	0,307
	Низьке	8	72,7	8	72,7	

Таблиця 3.17

Асоціація експресії PD-L1 у операційному матеріалі з клініко-морфологічними параметрами (оцінка клітин пухлини)

Параметр		позитивна експресія PD-L1 в клітинах пухлини		Негативна експресія PD-L1 в клітинах пухлини		р-значення
		п	%	п	%	
Середній рівень Ki-67		37,77		34,55		0,595
Середній вік		56,6		57,8		0,854
Гістологічний підтип	Неспецифічні Змішана(неспецифічна+муцинозна) З медулярним патерном Метапластична Апокринова Часточкова Секреторна	6 1 2 1 1 0 0	54,5 9,1 18,2 9,1 9,1 0 0	9 0 0 0 0 1 1	81,8 0 0 0 0 9,1 9,1	0,203
Ступінь диференціювання	1 1 2 4 3 17	0 3 8	0 27,3 72,7	1 1 9	9,1 9,1 81,8	0,311
Стадія	2 3	8 3	72,7 27,3	7 4	63,6 36,4	1,00
pT	T1 T2 T3 T4	2 6 0 3	18,2 54,5 0 27,3	1 9 1 0	9,1 81,8 9,1 0	0,453
pN	N0 N1 N2	3 6 2	27,3 54,5 18,2	3 4 4	27,3 36,4 36,4	0,857
Експресія PD-L1 у клітинах пухлини	Так Ні	9 2	81,8 18,2	2 9	18,2 81,8	0,009*
Пухлино-інфільтруючі лімфоцити	A (0-10%) B (10-40%) C (>41%)	6 0 5	54,5 0 45,5	1 4 6	9,1 36,4 54,5	0,011*
Пухлино-стромальне співвідношення	Високе (>50%) Низьке	4 7	36,4 63,6	2 9	18,2 81,8	0,212

Примітка: *р-значення <0,05

Статистично достовірної різниці у показниках загальної та безрецидивної виживаності при позитивній чи негативній експресії PD-L1 як у біопсіях так і в операційному матеріалі виявлено не було.

Як і в попередньому дослідженні (при порівнянні експресії PD-L1 у різних молекулярних підгрупах), так і в даному випадку рівень експресії PD-L1 був високим для трічі негативних карцином (50% випадків). Проте дифузне фарбування (більше 50%) спостерігалось лише в 1 операційному матеріалі та 2 біопсіях, що свідчить про те, що переважна більшість позитивних випадків мають низький рівень експресії PD-L1.

Результати власних досліджень розділу 3 викладені в статтях [1,2,3] та апробовані на наукових форумах [4,5]:

1. Zakhartseva L.M., Yanovytska M.O. Пухлиноінфільтруючі лімфоцити при трічі негативних карциномах молочної залози. Патологія, 3, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.14739/2310-1237.2020.3.221722>.
7. Zakhartseva L.M., Yanovytska M.O. Tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer: correlative analyses of own data and literature review. Ukrainian Scientific Medical Youth Journal. 2(110) (Jun. 2019), 31-41. DOI:[https://doi.org/10.32345/USMYJ.2\(110\).2019.31-41](https://doi.org/10.32345/USMYJ.2(110).2019.31-41).
8. Zakhartseva L., Yanovytska M. Prognostic value of tumor stroma ratio in triple negative breast cancer. Accepted for publication in Wiadomosci Lekarskie
9. Zakhartseva L., Yanovytska M., Nekrasova L., Plodienko M. Expression of topoisomerase II alpha: correlation analysis with different molecular breast cancer subtypes, proliferative index and age of patient // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», 4-5 лютого 2019 р., м. Київ. – С. 82.
10. Zakhartseva L., Yanovytska M., Zakhartsev Y., Plodienko M. The prognostic value of topoisomerase II- α for chemotherapy response and survival in breast cancer //

31st European Congress of Pathology in Nice, Nice, France 7–11 September, 2019.
P. 93.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Рак молочної залози займає перше місце по захворюваності та смертності серед усіх злоякісних пухлин жінок у світі. У близько 12% жінок серед загальної популяції розвинеться рак молочної залози протягом життя [68]. Показники захворюваності в Україні (і в Києві, зокрема) продовжують зростати [3]. Показники смертності мають тенденцію до покращення, але в першу чергу, за рахунок люмінальних підтипів, які мають рецептори до естрогену та прогестерону, а тому мають опцію гормонального лікування, а також HER2-позитивних пухлин, таргетна терапія для яких значно покращила показники виживаності даної підгрупи. Показники виживаності для тричі негативних карцином залишаються на найнижчому рівні [27], при цьому жінки молодого віку (20-39 років) статистично достовірно хворіють частіше на ТНР ніж жінки старшого віку (50-64 років). А оскільки тричі негативний рак складає 10-20% від загальної кількості всіх випадків раку молочної залози, дане захворювання має великий і негативний соціальний вклад. При цьому група тричі негативних карцином є гетерогенною як на молекулярному рівні, так і гістологічно. З метою розробки їх молекулярної субкласифікації вже проведено декілька спроб розділити ТНР за допомогою профілювання експресії генів [14,15,16,17,18]. В результаті виділено різновиди базальноподібних підтипів, мезенхімальний та люмінальний андроген-позитивний варіанти тричі негативних карцином. Проте значення цих класифікацій на сьогодні мають обмежене значення для практичної діяльності клініцистів. Ефективне лікування та прогнозування перебігу ТНР потребує пошуку та використання додаткових прогностичних та предиктивних факторів.

Саме тому метою даного дослідження було визначення прогностичних та предиктивних патоморфологічних факторів для тричі негативних карцином молочної залози. Для досягнення даної мети поставлено завдання дослідити клініко-морфологічні особливості ТНР, оцінити мікрооточення цих пухлин, зокрема імунний інфільтрат та стромальний компонент, провести ряд імуногістохімічних досліджень (з білками андрогену, PD-L1, TOP2A) з порівнянням всіх оцінених

параметрів з показниками виживаності, іншими клініко-морфологічними параметрами для вивлення найбільш значущих для обрання необхідного протоколу лікування та прогнозування перебігу. Для реалізації поставлених задач використано ряд методів, зокрема гістологічний, імуногістохімічний та статистичну обробку даних.

Для вирішення завдань дослідження та досягнення поставленої мети було проведено аналіз 455 гістологічних препаратів та оцінку експресії імуногістохімічних маркерів у 313 реакціях.

Дослідження було проведено поетапно. Перша частина являє собою ретроспективно-проспективний аналіз гістологічних препаратів біопсійного та операційного матеріалу та історій хвороби пацієнтів (n=343) з діагнозом «тричі негативний рак молочної залози», що не має рецепторів до естрогену (ER), прогестерону (PR) та ампліфікації HER2/neu, які проходили лікування на базі Київського міського клінічного онкологічного центру протягом 2009-2017, для встановлення частоти, структури, вікового розподілу захворюваності, оцінки загальної та безрецидивної виживаності, а також визначення морфологічних особливостей пухлин (ретроспективний архівний матеріал та проспективний матеріал від пацієнтів, що проходили лікування у 2017 році).

Для дослідження прогностичного та предиктивного значення в гістологічних препаратах від вищезазначених пацієнтів визначено кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (операційний та біопсійний матеріал) та пухлино-стромальне співвідношення (операційний матеріал). Також на гістологічних зрізах проведено 313 імуногістохімічних дослідження експресії андрогену, TOP2A, PD-L1. У 44 випадках дослідження експресії PD-L1 проведено як на матеріалі передопераційної біопсії, так і на матеріалі операції після неoadьювантної хіміотерапії з подальшим порівнянням її експресії.

У другій частині дослідження окремо проаналізовано 112 пацієнтів з діагнозом «рак молочної залози» (27 пацієнтів люмінальної А групи, 26 пацієнтів люмінальної В групи, 29 пацієнтів HER2-позитивної групи та 30 пацієнтів тричі

негативної групи) для оцінки експресії PD-L1 (проспективно) з подальшим порівнянням результатів для тричі негативних та інших молекулярних підгруп РМЗ.

За результатами дослідження архівного матеріалу та статистичних даних питома частка тричі негативних раку (ТНР) серед усіх злоякісних пухлин молочної залози склала $11\% \pm 0,88\%$. (мал. 3.1.1) 5-річна виживаність пацієток з тричі негативними карциномами молочної залози з 1 стадією хвороби склала $76,7\% \pm 6,9\%$, з 2 і 3 стадіями захворювання $75,7\% \pm 4,1\%$ і $51,4\% \pm 6,19\%$, відповідно. За віковим розподілом найбільша кількість пацієнтів припала на вік від 40 до 60 років – 46,4%. Загальна кількість хворих з діагнозом раку молочної залози (як вперше діагностованих, так і пацієнтів, що знаходяться на обліку), що проходили лікування на базі Київського міського клінічного онкологічного центру протягом останнього десятиріччя невпинно зростає. Переважна більшість вперше виявлених хворих мають I-II стадію захворювання.

За результатами аналізу гістологічного матеріалу (343 пухлини) було виявлено, що більшість з них представлена інвазивними неспецифічними (протоковими) карциномами, які тяжіють до низького ступеню диференціювання та мають високий рівень проліферативної активності. 2,9% від усіх неспецифічних карцином було представлено пухлинами з медулярним патерном, які наразі не виділяються в окрему підгрупу [5]. Невелика частка тричі негативних карцином гістологічно представляють собою рідкі форми карцином, які можуть відрізнятися за рівнем мутаційного навантаження (який є вкрай високим для неспецифічних карцином, тому серед них майже неможливо виділити драйверну мутацію) та за перебігом, тому їх виділення є вкрай необхідним. Сюди належать аденосквамозна карцинома низького ступеню злоякісності (яка наразі відноситься до підвиду метаплатичних карцином [5]), аденокістозна карцинома, що пов'язана з мутацією MYB-NFIB [131], секреторна карцинома, яка часто асоційована зі злиттям генів ETV6-NNRK3 [134], аденокістозна карцинома. Карцинома з апокриновим диференціюванням також в більшості випадків матиме тричі негативний фенотип.

Також важливо зауважити, що мікрогландулярний аденоз і атипівий мікрогландулярний аденоз наразі розглядаються як факультативні прекурсори ТНР.

Після оцінки пухлино-стромального співвідношення (ПСС) [127] в операційному матеріалі з тричі негативними карциномами (за яким пухлини було поділено на такі, що мають низький відсоток строми ($\leq 50\%$) та високий відсоток строми ($> 50\%$)) було виявлено, що ПСС є вагомим незалежним прогностичним маркером для тричі негативних карцином молочної залози з гіршими показниками загальної та безрецидивної виживаності для пухлин, що мають більший відсоток стромального компоненту. При побудові кривих Каплана-Мейера було виявлено, що трирічна загальна виживаність для пухлин з низьким ПСС склала $86,9 \pm 2,60\%$, в той час як для пухлин з високим ПСС цей показник склав $75,3 \pm 3,92\%$. Трирічна безрецидивна виживаність для пухлин з низьким і високим ПСС склала $75,6 \pm 3,32\%$ та $61,3 \pm 4,54\%$, відповідно. При побудові одно- та багатофакторної моделі Кокса також було встановлено, що пухлини із високим ПСС мали статистично достовірно гірші показники загальної виживаності (КР 1,89; 95% ДІ 1,18-3,03, $p = 0,008$) та безрецидивної виживаності (КР 1,55; 95% ДІ 1,05-2,28, $p = 0,027$).

Очевидно, що високий відсоток строми у пухлині (раніше такі пухлини називали «скірозними») є продуктом, індукованим самою пухлиною, оскільки нормальна тканина молочної залози не містить такої кількості стромального компоненту. Гістологічно строма у пухлинах відрізняється більшою щільністю та «гіалінізацією». Не викликає сумнівів, що мікрооточення пухлини «підлаштовується» під саму пухлину, адже доказано, що фібробласти поруч зі злякисною пухлиною (які, власне і продукують строму) відрізняються від фібробластів у нормі. Вони посилено продукують фактори росту та колаген [67], виділяють лактат та піруват [69] (який може використовуватись як метаболіт самою пухлиною) і сприяє інвазивним властивостям РМЗ [68]. Аналогічно мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), які мігрують у строму пухлини, також можуть змінювати свої функції залежно від потреб пухлини [70]. Саме цим можна пояснити, чому строма є не менш важливим прогностичним фактором для тричі негативних

карцином ніж розмір пухлини та наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах, проте цей показник не враховується при стандартному гістологічному дослідженні.

Іншим важливим прогностичним маркером є імунний інфільтрат навколо пухлини. За результатами оцінки біопсійного та операційного матеріалу (321 зразок) наявність інтенсивного лімфоцитарного інфільтрату у тричі негативних пухлинах (41% і вище) є незалежним прогностичним фактором для загальної (КР 0,42, 95% ДІ 0,19-0,91, $p=0,029$) і безрецидивної (КР 0,50, 95% ДІ 0,26-0,95, $p=0,036$) виживаності і вказує на більш сприятливий прогноз. Загальна трирічна виживаність пацієнтів для групи з високою (41% і вище) кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (ПЛ) склала $89,4 \pm 3,032\%$, для групи з середньою кількістю ПЛ (10-40%) - $80,5 \pm 3,199\%$, для групи з низькою кількістю ПЛ (менше 10%) - $73,6 \pm 7,58\%$ ($p = 0,001$). Для безрецидивної виживаності дані показники склали, відповідно, $77,6 \pm 4,112\%$, $69,9 \pm 3,764\%$, $57,9 \pm 8,58\%$ ($p = 0,03$). За побудованими кривими виживаності Каплана-Мейєра різниця у загальній та безрецидивній виживаності для пацієнтів трьох груп є статистично достовірною. Коефіцієнт Каппа склав 0,79, що вказує на високий рівень узгодженості між двома патологами, що оцінювали препарати.

Велика кількість досліджень імунного інфільтрату пов'язані з дослідженням саме їх імуногістохімічного профілю [62, 63, 64], що є цікавим з наукової точки зору та може дати поштовх для розвитку імунотерапії, направленої саме на інфільтрат навколо пухлини, проте в рутинній практиці патолога саме загальна оцінка інфільтрату має неодмінну перевагу, оскільки може проводитись без додаткових імуногістохімічних досліджень та потребує обмаль часу, при цьому виступає в якості важливого прогностичного показника.

Таким чином, якщо до стандартного патогістологічного заключення для тричі негативних карцином додати інформацію про кількість стромального компоненту (низька чи висока), а також дані щодо кількості пухлино-інфільтруючих лімфоцитів (низький рівень – група А, середній – група В, високий – група С), то ми можемо

отримати набагато більше інформації від заключення патолога, аніж маємо зараз для прогнозування перебігу ТНР.

За результатами проведених імуногістохімічних досліджень з антитілами до андрогену (AR) (n=117 реакцій), питома вага позитивних випадків експресії AR серед тричі негативних карцином молочної залози склала 29%. Прогностичного значення експресії андрогену (AR) не виявлено (КР 0,49, 95% ДІ 0,12-2,01, p=0,32), проте встановлено, що експресія AR має обернений кореляційний зв'язок з індексом проліферативної активності Ki-67 (p=0,009). Це частково пояснює хіміорезистентність цих пухлин, оскільки андроген позитивний підтип ТНР вважається більш хіміорезистентним [96, 119]. Антиандрогенна терапія наразі досі не входить в стандарти лікування андроген-позитивних карцином молочної залози, проте багато клінічних досліджень з цього приводу ще тривають, деякі з них показують багатообіцяючі прелімінарні результати [144]. І хоча «золотим стандартом» визначення LAR-підтипу є генетичне дослідження, імуногістохімічне дослідження з білком андрогену має високий рівень погодженості [145] порівняно з РНК-секвенуванням і може виступати в якості дешевої, але надійної альтернативи.

За результатами імуногістохімічних досліджень (40 реакцій) з антитілами до Топоізомерази2А (TOP2A) 60% пухлин мали позитивну експресію даного білка. За даними літератури, TOP2A вважається предиктивним маркером, який вказує на чутливість пухлин молочної залози до препаратів антрациклінового ряду [113, 146], хоча є дослідження з протилежними результатами [147], тому дані контроверсійні. У нашому дослідженні статистично достовірного значення TOP2A у якості предиктивного маркера для призначення хіміотерапії з препаратами антрациклінового ряду не виявлено. Проте необхідно зауважити, що вибірка пацієнтів для аналізу TOP2A була обмежена у кількості, оскільки з усього пулу пацієнтів обрані були лише ті, хто проходив неoad'ювантну хіміотерапію з антрацикліновими препаратами.

При дослідженні зв'язків з іншими клініко-морфологічними факторами встановлено, що позитивна експресія TOP2A має прямий кореляційний зв'язок з

індексом проліферативної активності Ki-67 ($p=0,009$), а також з кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів ($p=0,05$). Високий рівень кореляції з Ki-67 вказує на можливість використання TOP2A як альтернативного маркера для дослідження проліферативної активності. Висока мітотична активність TOP2A-позитивних пухлин також частково пояснює, чому вони вважаються більш чутливими до хіміотерапевтичного лікування. В цілому, при наявності результатів експресії Ki-67 необхідність у додатковому дослідженні TOP2A є обмеженою.

За результатами дослідження експресії PD-L1 у 44 зразках (яке було проведено як на матеріалі передопераційної біопсії, так і на матеріалі операції після неoadьювантної хіміотерапії - парні випадки від одного і того ж пацієнта) з подальшим порівнянням її експресії було виявлено низький рівень узгодженості між біопсійним та операційним матеріалом. Таким чином, можна зробити висновок, що експресія PD-L1 у біопсійному та операційному матеріалі може відрізнятися. Через це доцільно рекомендувати проведення оцінки PD-L1 безпосередньо перед застосуванням імунотерапії. При дослідженні зв'язку експресії PD-L1 у пухлинних клітинах з іншими клініко-морфологічними факторами виявлено, що вона асоціюється з експресією PD-L1 у імунних клітинах ($p = 0,009$) та кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів ($p = 0,011$).

Yuan та ін. провели дослідження, де порівняли експресію PD-L1 у первинних пухлинах молочної залози та метастазах у регіональних лімфатичних вузлах, де було встановлено, що різниця у експресії PD-L1 є статистично достовірною у вищезазначених локалізаціях [143]. Тому ними була зроблена рекомендація досліджувати експресію PD-L1 як у первинній пухлині, так і у регіонарних лімфатичних вузлах. У нашому ж дослідженні вперше було порівняно експресію PD-L1 у первинній біопсії та операційному матеріалі. Враховуючи низький рівень погодженості у експресії даного маркера, постає декілька питань, зокрема, чи являє біопсія достатньо репрезентативний матеріал для оцінки PD-L1 і чи має неoadьювантна хіміотерапія вплив на експресію PD-L1. Подальші дослідження

необхідні в цьому напрямку, оскільки достовірне визначення експресії PD-L1 є запорукою успіху при призначенні імунотерапії.

Згідно з дослідженням Dogukan та ін. [142], рівень позитивної експресії PD-L1 був вищим у карциномах молочної залози з медулярними ознаками та у підгрупі метапластичних карцином порівняно з неспецифічною інвазивною карциномою молочної залози. Наше дослідження підтверджує це твердження, враховуючи, що всі карциноми з медулярними ознаками та метапластичні карциноми, які були залучені в наше дослідження (хоча їх кількість була обмеженою), були PD-L1 позитивними, і лише 40% випадків неспецифічних тричі негативних карцином також мали будь-який позитивний рівень експресії PD-L1.

За результатами проспективного дослідження, у якому було проведено імуногістохімічні реакції (n=112) з білком PD-L1 для порівняння його експресії у різних молекулярних підгрупах раку молочної залози, було встановлено, що експресія білка PD-L1 як у імунному інфільтраті, так і в клітинах пухлини асоційована з молекулярним підтипом ($p=0,0006$ і $p=0,002$, відповідно) і є найвищою у групі тричі негативних карцином молочної залози. Прогностичного значення даного маркера виявлено не було, проте доцільність його використання обумовлена застосуванням імунотерапії як третьої лінії терапії для ТНР. Також через зв'язок експресії білка PD-L1 та кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, можна передбачити, що тричі негативні карциноми з високою кількістю лімфоцитарного інфільтрату з найбільшою вірогідністю будуть PD-L1- позитивними серед усього пулу раку молочної залози.

Отже, за сукупною оцінкою всіх прогностичних факторів для тричі негативних карцином, статистично достовірно було виявлено, що найбільш значущими є розмір пухлини, наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах та пухлино-стромальне співвідношення, а також кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. В той час як предиктивне значення для призначення відповідного терапевтичного лікування мають експресія білків андрогену та PD-L1.

Їх імуногістохімічну оцінку необхідно проводити за умови розгляду відповідної опції терапії.

ВИСНОВКИ

1. Показники захворюваності на рак молочної залози є високими і продовжують зростати. Переважна більшість хворих має I-II стадію захворювання на момент встановлення діагнозу. Питома частка тричі негативного раку молочної залози складає $11\% \pm 0,88\%$ серед усіх карцином молочної залози.
2. 5-річна виживаність пацієнток з тричі негативними карциномами молочної залози з 1 стадією хвороби склала $76,7\% \pm 6,9\%$, з 2 і 3 стадіями захворювання $75,7\% \pm 4,1\%$ і $51,4\% \pm 6,19\%$, відповідно. За віковим розподілом найбільша кількість пацієнтів припала на вік від 40 до 60 років – 46,4%.
3. ТНР мають специфічні морфологічні характеристики, зокрема підвищену мітотичну активність та ядерну атипію, клітинний плеоморфізм, високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення, невелику кількість стромального компоненту, наявність центральних некрозів, виражену лімфоцитарну інфільтрацію. Ступінь диференціювання тяжіє до низького (G3).
4. Фактори ризику для тричі негативних карцином відрізняються від інших молекулярних підгруп РМЗ, а такі доброякісні ураження молочної залози як мікрогландулярний аденоз і атипичний мікрогландулярний аденоз наразі розглядаються як факультативні прекурсори ТНР.
5. За результатами дослідження архівного матеріалу питома частка тричі негативних карцином серед усіх злоякісних пухлин молочної залози складає 11%. Більшість з них представлена інвазивними неспецифічними (протоковими) карциномами, які тяжіють до низького ступеню диференціювання та мають високий рівень проліферативної активності.
6. Пухлино-стромальне співвідношення є вагомим незалежним прогностичним маркером для тричі негативних карцином молочної залози з гіршими показниками загальної та безрецидивної виживаності для пухлин, що мають більший відсоток стромального компоненту.
7. Наявність інтенсивного лімфоцитарного інфільтрату у тричі негативних пухлинах (41% і вище) є незалежним прогностичним фактором для загальної і безрецидивної виживаності і вказує на більш сприятливий прогноз.

8. Прогностичного значення експресії андрогену виявлено не було, проте вона має обернений кореляційний зв'язок з індексом проліферативної активності Ki-67, що частково пояснює хіміорезистентність цих пухлин. Доцільність використання даного маркера обумовлена призначенням антиандрогенної терапії.
9. Білок TOP2A, як предиктивний маркер для призначення хіміотерапії з препаратами антрациклінового ряду має обмежене значення. Позитивна експресія TOP2A має прямий кореляційний зв'язок з індексом проліферативної активності Ki-67, а також з кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів.
10. Експресія білка PD-L1 асоційована з молекулярним підтипом карцином молочної залози як в імунному інфільтраті, так і в клітинах пухлини і є достовірно вищою для тричі негативного раку. Прогностичного значення даного маркера виявлено не було, проте доцільність його використання обумовлена застосуванням імунотерапії як третьої лінії терапії для ТНР. Експресія PD-L1 може відрізнитися в біопсійному та операційному матеріалі. Її оцінку доцільно проводити безпосередньо перед застосуванням імунотерапії.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. При встановленні тричі негативного фенотипу карциноми молочної залози (шляхом імуногістохімічної оцінки рецепторів естрогену, прогестерону та білка HER/new) доцільно додатково оцінити на гістологічному зрізі пухлино-стромальне співвідношення та кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів для прогнозування перебігу захворювання. Дане дослідження вимагає мінімум часу, не потребує додаткових матеріальних затрат, але при цьому є інформативним та дозволяє визначити когорту пацієнтів зі сприятливим прогнозом.
2. Для всіх тричі негативних карцином молочної залози доцільно проводити імуногістохімічне дослідження з антитілом до андрогену, оскільки при виявленні позитивної експресії можна розглядати додаткову опцію гормонотерапії для цієї групи пацієнтів.
3. Для метастатичного тричі негативного раку молочної залози доцільно проводити оцінку експресії PD-L1 при розгляді опції імунотерапії (особливо високими є шанси позитивної експресії у тій когорті пухлин, де присутня висока кількість пухлино-інфільтруючих лімфоцитів).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., & Salehiniya, H. (2016). Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 17(S3), 43–46. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.s3.43>
2. Бюлетень Національного канцер-реєстру №21 – «Рак в Україні, 2018-2019».
3. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute, Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017
4. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
5. Breast Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 2. Edited by the WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2019
6. Katz, H., Alsharedi, M. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Med Oncol* 35, 13 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1071-6>
7. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network, *Cancer*, 2012. Nov 15;118(22):5463-72, doi: 10.1002/cncr.27581. Epub 2012 Apr 27.
8. Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*, 363(20), 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
9. André, F., & Zielinski, C. C. (2012). Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 23 Suppl 6, vi46–vi51. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds195>

10. Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer, *Nature*, 481(7381), 306–313. doi:10.1038/nature10762
11. Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Speed, D., Lynch, A. G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Gräf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., METABRIC Group, Langerød, A., Green, A., Provenzano, E., ... Aparicio, S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature10983>
12. Shah, S. P., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y., Turashvili, G., Ding, J., Tse, K., Haffari, G., Bashashati, A., Prentice, L. M., Khattra, J., Burleigh, A., Yap, D., Bernard, V., McPherson, A., Shumansky, K., Crisan, A., Giuliany, R., ... Aparicio, S. (2012). The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 486(7403), 395–399. <https://doi.org/10.1038/nature10933>
13. Ng, C. K., Schultheis, A. M., Bidard, F. C., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2015). Breast cancer genomics from microarrays to massively parallel sequencing: paradigms and new insights. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(5), djv015. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv015>
14. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
15. Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PloS one*, 11(6), e0157368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>
16. Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., Chang, J. C.,

- Mills, G. B., Lau, C. C., & Brown, P. H. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(7), 1688–1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>
17. Jézéquel, P., Loussouarn, D., Guérin-Charbonnel, C., Campion, L., Vanier, A., Gouraud, W., Lasla, H., Guette, C., Valo, I., Verrièle, V., & Campone, M. (2015). Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast cancer research : BCR*, 17, 43. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0550-y>
18. Santonja, A., Sánchez-Muñoz, A., Lluch, A., Chica-Parrado, M. R., Albanell, J., Chacón, J. I., Antolín, S., Jerez, J. M., de la Haba, J., de Luque, V., Fernández-De Sousa, C. E., Vicioso, L., Plata, Y., Ramírez-Tortosa, C. L., Álvarez, M., Llácer, C., Zarcos-Pedrinaci, I., Carrasco, E., Caballero, R., Martín, M., ... Alba, E. (2018). Triple negative breast cancer subtypes and pathologic complete response rate to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*, 9(41), 26406–26416. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25413>
19. Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P. H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., & Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(2), 157–167. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200>
20. Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H. J., & Panel members (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer

2013. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 24(9), 2206–2223. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt303>
21. *Diagnostic Pathology: Breast*, 2nd Edition / Lester S., Hicks D, // Elsevier, - 2016, –P. 324-326.
 22. Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology*, 5(1), 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
 23. Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*, 363(20), 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
 24. Papadimitriou, M., Mountzios, G., & Papadimitriou, C. A. (2018). The role of PARP inhibition in triple-negative breast cancer: Unraveling the wide spectrum of synthetic lethality. *Cancer treatment reviews*, 67, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.04.010>
 25. van de Rijn, M., Perou, C. M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, O., Kononen, J., Torhorst, J., Sauter, G., Zuber, M., Köchli, O. R., Mross, F., Dieterich, H., Seitz, R., Ross, D., Botstein, D., & Brown, P. (2002). Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *The American journal of pathology*, 161(6), 1991–1996. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64476-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64476-8)
 26. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer/triple-negative.html>
 27. Kulkarni, A., Stroup, A. M., Paddock, L. E., Hill, S. M., Plascak, J. J., & Llanos, A. (2019). Breast Cancer Incidence and Mortality by Molecular Subtype: Statewide Age and Racial/Ethnic Disparities in New Jersey. *Cancer health disparities*, 3, e1–e17. <https://doi.org/10.9777/chd.2019.1012>
 28. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer*

- Research, 13(15 Pt 1), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
29. Morris, G. J., Naidu, S., Topham, A. K., Guiles, F., Xu, Y., McCue, P., Schwartz, G. F., Park, P. K., Rosenberg, A. L., Brill, K., & Mitchell, E. P. (2007). Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*, 110(4), 876–884. <https://doi.org/10.1002/cncr.22836>
30. Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., & Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492–2502. <https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>
31. Amirikia, K. C., Mills, P., Bush, J., & Newman, L. A. (2011). Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women : Implications for breast cancer screening recommendations. *Cancer*, 117(12), 2747–2753. <https://doi.org/10.1002/cncr.25862>
32. Stead, L. A., Lash, T. L., Sobieraj, J. E., Chi, D. D., Westrup, J. L., Charlot, M., Blanchard, R. A., Lee, J. C., King, T. C., & Rosenberg, C. L. (2009). Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. *Breast cancer research: BCR*, 11(2), R18. <https://doi.org/10.1186/bcr2242>
33. Caglevic, C., Anabalón, J., Soza, C., Milla, E., Gaete, F., Carrasco, A. M., Panay, S., Gallardo, C., & Mahave, M. (2019). Triple-negative breast cancer: the reality in Chile and in Latin America. *Ecancermedicalscience*, 13, 893. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.893>

34. Dawson S.J., Provenzano E., Caldas C. (2009). Triple negative breast cancers: Clinical and prognostic implications. *European Journal of Cancer*: 45 (1), 27-40. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(09\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(09)70013-9).
35. William J., Irvin Jr., Lisa A., Carey (2008). What is triple-negative breast cancer? *European Journal of Cancer*, 44 (18), 2799–2805.
36. Bhargava, R., Florea, A. V., Pelmus, M., Jones, M. W., Bonaventura, M., Wald, A., & Nikiforova, M. (2017). Breast Tumor Resembling Tall Cell Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Solid Papillary Neoplasm With Characteristic Immunohistochemical Profile and Few Recurrent Mutations. *American journal of clinical pathology*, 147(4), 399–410. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqx016>
37. Huober, J., Gelber, S., Goldhirsch, A., Coates, A. S., Viale, G., Öhlschlegel, C., Price, K. N., Gelber, R. D., Regan, M. M., & Thürlimann, B. (2012). Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 23(11), 2843–2851. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds105>
38. Pareja, F., Geyer, F. C., Marchiò, C., Burke, K. A., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2016). Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ breast cancer*, 2, 16036. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2016.36>
39. Barton, V. N., Gordon, M. A., Richer, J. K., & Elias, A. (2016). Anti-androgen therapy in triple-negative breast cancer. *Therapeutic advances in medical oncology*, 8(4), 305–308. <https://doi.org/10.1177/1758834016646735>
40. Wen, Y. H., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2013). Microglandular adenosis: a non-obligate precursor of triple-negative breast cancer?. *Histology and histopathology*, 28(9), 1099–1108. <https://doi.org/10.14670/HH-28.1099>
41. Geyer, F. C., Pareja, F., Weigelt, B., Rakha, E., Ellis, I. O., Schnitt, S. J., & Reis-Filho, J. S. (2017). The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease: High- and Low-Grade Lesions. *The American journal of pathology*, 187(10), 2139–2151. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.016>

42. Guerini-Rocco, E., Piscuoglio, S., Ng, C. K., Geyer, F. C., De Filippo, M. R., Eberle, C. A., Akram, M., Fusco, N., Ichihara, S., Sakr, R. A., Yatabe, Y., Vincent-Salomon, A., Rakha, E. A., Ellis, I. O., Wen, Y. H., Weigelt, B., Schnitt, S. J., & Reis-Filho, J. S. (2016). Microglandular adenosis associated with triple-negative breast cancer is a neoplastic lesion of triple-negative phenotype harbouring TP53 somatic mutations. *The Journal of pathology*, 238(5), 677–688. <https://doi.org/10.1002/path.4691>
43. Da Silva, L., Clarke, C., & Lakhani, S. R. (2007). Demystifying basal-like breast carcinomas. *Journal of clinical pathology*, 60(12), 1328–1332. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.041731>
44. Collett, K., Stefansson, I. M., Eide, J., Braaten, A., Wang, H., Eide, G. E., Thoresen, S. Ø., Foulkes, W. D., & Akslen, L. A. (2005). A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(5), 1108–1112. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0394>
45. Dent, R., Hanna, W. M., Trudeau, M., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2009). Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 115(2), 423–428. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0086-2>
46. Ross, J. S., Hatzis, C., Symmans, W. F., Pusztai, L., & Hortobágyi, G. N. (2008). Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *The oncologist*, 13(5), 477–493. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2007-0248>
47. Cardoso F., van't Veer L.J., Bogaerts J., Slaets L., Viale G., Delaloge S. et al (2016). 70-gene signature as an aid to treatment decisions in early-stage breast cancer. *N Engl J Med*, 375(8):717–729.

48. Paik S., Shak S., Tang G., Kim C., Baker J., Cronin M. et al (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 351(27):2817–2826.
49. Bozza C., Osa E.O., Puglisi F. (2013). Primary therapy in breast cancer: what have we learned from landmark trials? *Womens Health (Lond Engl)*, 9(6):583-93.
50. Cortazar P., Zhang L., Untch M. et al (2012). Meta-analysis results from the Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer (CTNeoBC), *Cancer Res*, 72, 93–94.
51. Liedtke C., Mazouni C. et al (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer, *J Clin Oncol*, 26(8):1275.
52. Carey L.A., Dees E.C., Sawyer L. et al (2007). The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes, *Clin Cancer Res*, 13 (8):2329–2334.
53. Khamis Z.I., Sahab Z.J., Sang Q.X. (2012). Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis. *Int J Breast Cancer*, 574025. doi:10.1155/2012/574025
54. Soysal S. D., Tzankov A., Muenst S. E. (2016). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 82, №3-4: 142–152. <https://doi.org/10.1159/000430499>
55. Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B. I., Weber, K. E., Budczies, J., Huober, J., Klauschen, F., Furlanetto, J., Schmitt, W. D., Blohmer, J. U., Karn, T., Pfitzner, B. M., Kümmel, S., Engels, K., Schneeweiss, A., Hartmann, A., Noske, A., Fasching, P. A., ... Loibl, S. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet. Oncology*, 19(1), 40–50. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30904-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30904-X)

56. García-Tejido, P., Cabal, M. L., Fernández, I. P., & Pérez, Y. F. (2016). Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, 10(Suppl 1), 31–39. <https://doi.org/10.4137/CMO.S34540>
57. Galvez, M., Castaneda, C. A., Sanchez, J., Castillo, M., Rebaza, L. P., Calderon, G., Cruz, M., Cotrina, J. M., Abugattas, J., Dunstan, J., Guerra, H., Mejia, O., & Gomez, H. L. (2018). Clinicopathological predictors of long-term benefit in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *World journal of clinical oncology*, 9(2), 33–41. <https://doi.org/10.5306/wjco.v9.i2.33>
58. Hida, A. I., Sagara, Y., Yotsumoto, D., Kanemitsu, S., Kawano, J., Baba, S., Rai, Y., Oshiro, Y., Aogi, K., Sagara, Y., & Ohi, Y. (2016). Prognostic and predictive impacts of tumor-infiltrating lymphocytes differ between Triple-negative and HER2-positive breast cancers treated with standard systemic therapies. *Breast cancer research and treatment*, 158(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3848-2>
59. Ohtani, H., Mori-Shiraishi, K., Nakajima, M., & Ueki, H. (2015). Defining lymphocyte-predominant breast cancer by the proportion of lymphocyte-rich stroma and its significance in routine histopathological diagnosis. *Pathology international*, 65(12), 644–651. <https://doi.org/10.1111/pin.12355>
60. Criscitiello, C., Esposito, A., Trapani, D., & Curigliano, G. (2016). Prognostic and predictive value of tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. *Cancer treatment reviews*, 50, 205–207. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.09.019>
61. Ruan, M., Tian, T., Rao, J., Xu, X., Yu, B., Yang, W., & Shui, R. (2018). Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes to pathological complete response in neoadjuvant treated triple-negative breast cancers. *Diagnostic pathology*, 13(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0743-7>
62. Yeong, J., Thike, A. A., Lim, J. C., Lee, B., Li, H., Wong, S. C., Hue, S. S., Tan, P. H., & Iqbal, J. (2017). Higher densities of Foxp3⁺ regulatory T cells are associated with better prognosis in triple-negative breast cancer. *Breast cancer*

- research and treatment, 163(1), 21–35. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4161-4>
63. Althobiti, M., Aleskandarany, M. A., Joseph, C., Toss, M., Mongan, N., Diez-Rodriguez, M., Nolan, C. C., Ashankyty, I., Ellis, I. O., Green, A. R., & Rakha, E. A. (2018). Heterogeneity of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer and its prognostic significance. *Histopathology*, 73(6), 887–896. <https://doi.org/10.1111/his.13695>
64. Park, M. H., Kwon, S. Y., Choi, J. E., Gong, G., & Bae, Y. K. (2020). Intratumoral CD103-positive tumour-infiltrating lymphocytes are associated with favourable prognosis in patients with triple-negative breast cancer. *Histopathology*, 77(4), 560–569. <https://doi.org/10.1111/his.14126>
65. Angell, H. K., Bruni, D., Barrett, J. C., Herbst, R., & Galon, J. (2020). The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(2), 332–339. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1851>
66. Bibeau F., Galon J., Mlecnik B., et al. Validation of the immunoscore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: Results of a worldwide consortium-based analysis of 1.336 patients, 10 (3), 197-199. [doi:10.1007/s11725-016-0664-4](https://doi.org/10.1007/s11725-016-0664-4)
67. Raffaghello, L., & Dazzi, F. (2015). Classification and biology of tumour associated stromal cells. *Immunology letters*, 168(2), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.06.016>
68. Eiro, N., González, L., Martínez-Ordoñez, A., Fernandez-Garcia, B., González, L. O., Cid, S., Dominguez, F., Perez-Fernandez, R., & Vizoso, F. J. (2018). Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 41(4), 369–378. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0371-y>
69. Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., Casimiro, M. C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., Pestell, R. G., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., & Lisanti, M. P.

- (2009). The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(23), 3984–4001. <https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238>
70. Ahn S.Y. (2020). The Role of MSCs in the Tumor Microenvironment and Tumor Progression. *Anticancer Res*, 40(6):3039-3047. doi:10.21873/anticancer.14284
71. Nwabo Kamdje, A. H., Kanga, P. T., Simo, R. T., Vecchio, L., Seke Etet, P. F., Muller, J. M., Bassi, G., Lukong, E., Goel, R. K., Amvene, J. M., & Krampera, M. (2017). Mesenchymal stromal cells' role in tumor microenvironment: involvement of signaling pathways. *Cancer biology & medicine*, 14(2), 129–141. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0033>
72. Wang, K., Ma, W., Wang, J., Yu, L., Zhang, X., Wang, Z., Tan, B., Wang, N., Bai, B., Yang, S., Liu, H., Zhu, S., & Cheng, Y. (2012). Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(9), 1457–1461. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318260dfe8>
73. Mesker, W. E., Liefers, G. J., Junggeburst, J. M., van Pelt, G. W., Alberici, P., Kuppen, P. J., Miranda, N. F., van Leeuwen, K. A., Morreau, H., Szuhai, K., Tollenaar, R. A., & Tanke, H. J. (2009). Presence of a high amount of stroma and downregulation of SMAD4 predict for worse survival for stage I-II colon cancer patients. *Cellular oncology: the official journal of the International Society for Cellular Oncology*, 31(3), 169–178. <https://doi.org/10.3233/CLO-2009-0478>
74. Hale, M. D., Hayden, J. D., & Grabsch, H. I. (2013). Tumour-microenvironment interactions: role of tumour stroma and proteins produced by cancer-associated fibroblasts in chemotherapy response. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 36(2), 95–112. <https://doi.org/10.1007/s13402-013-0127-7>
75. Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D., & Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical

- barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, 21(3), 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>
76. Chen, X., & Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nature reviews. Drug discovery*, 18(2), 99–115. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1>
77. Plava, J., Cihova, M., Burikova, M. et al (2019). Recent advances in understanding tumor stroma-mediated chemoresistance in breast cancer. *Mol Cancer* 18, 67. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0960-z>
78. Mierke, C. T., Sauer, F., Grosser, S., Puder, S., Fischer, T., & Käs, J. A. (2018). The two faces of enhanced stroma: Stroma acts as a tumor promoter and a steric obstacle. *NMR in biomedicine*, 31(10), e3831. <https://doi.org/10.1002/nbm.3831>
79. Dekker, T. J., van de Velde, C. J., van Pelt, G. W., Kroep, J. R., Julien, J. P., Smit, V. T., Tollenaar, R. A., & Mesker, W. E. (2013). Prognostic significance of the tumor-stroma ratio: validation study in node-negative premenopausal breast cancer patients from the EORTC perioperative chemotherapy (POP) trial (10854). *Breast cancer research and treatment*, 139(2), 371–379. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2571-5>
80. Roeke, T., Sobral-Leite, M., Dekker, T., Wesseling, J., Smit, V., Tollenaar, R., Schmidt, M. K., & Mesker, W. E. (2017). The prognostic value of the tumour-stroma ratio in primary operable invasive cancer of the breast: a validation study. *Breast cancer research and treatment*, 166(2), 435–445. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4445-8>
81. Moorman, A. M., Vink, R., Heijmans, H. J., van der Palen, J., & Kouwenhoven, E. A. (2012). The prognostic value of tumour-stroma ratio in triple-negative breast cancer. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 38(4), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2012.01.002>
82. Gujam, F. J., Edwards, J., Mohammed, Z. M., Going, J. J., & McMillan, D. C. (2014). The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal

- breast cancer. *British journal of cancer*, 111(1), 157–165. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.279>
83. Kramer, C., Vangangelt, K., van Pelt, G. W., Dekker, T., Tollenaar, R., & Mesker, W. E. (2019). The prognostic value of tumour-stroma ratio in primary breast cancer with special attention to triple-negative tumours: a review. *Breast cancer research and treatment*, 173(1), 55–64. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4987-4>
84. Vangangelt, K., Green, A. R., Heemskerk, I., Cohen, D., van Pelt, G. W., Sobral-Leite, M., Schmidt, M. K., Putter, H., Rakha, E. A., Tollenaar, R., & Mesker, W. E. (2020). The prognostic value of the tumor-stroma ratio is most discriminative in patients with grade III or triple-negative breast cancer. *International journal of cancer*, 146(8), 2296–2304. <https://doi.org/10.1002/ijc.32857>
85. Vangangelt, K., van Pelt, G. W., Engels, C. C., Putter, H., Liefers, G. J., Smit, V., Tollenaar, R., Kuppen, P., & Mesker, W. E. (2018). Prognostic value of tumor-stroma ratio combined with the immune status of tumors in invasive breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*, 168(3), 601–612. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4617-6>
86. Zhang, L., Wang, X. I., & Zhang, S. (2018). Tumor-infiltrating lymphocyte volume is a better predictor of neoadjuvant therapy response and overall survival in triple-negative invasive breast cancer. *Human pathology*, 80, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.05.024>
87. Vaziri Fard, E., Ali, Y., Wang, X. I., Saluja, K., H Covinsky, M., Wang, L., & Zhang, S. (2019). Tumor-Infiltrating Lymphocyte Volume Is a Better Predictor of Disease-Free Survival Than Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Invasive Breast Carcinoma. *American journal of clinical pathology*, 152(5), 656–665. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz088>
88. Gucalp, A., Traina, T.A. (2017). The Androgen Receptor: Is It a Promising Target? *Ann Surg Oncol* 24, 2876–2880. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-5961-9>

89. Thike, A. A., Yong-Zheng Chong, L., Cheok, P. Y., Li, H. H., Wai-Cheong Yip, G., Huat Bay, B., Tse, G. M., Iqbal, J., & Tan, P. H. (2014). Loss of androgen receptor expression predicts early recurrence in triple-negative and basal-like breast cancer. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 27(3), 352–360. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.145>
90. Safarpour, D., Pakneshan, S., & Tavassoli, F. A. (2014). Androgen receptor (AR) expression in 400 breast carcinomas: is routine AR assessment justified? *American journal of cancer research*, 4(4), 353–368.
91. Barton, V. N., D'Amato, N. C., Gordon, M. A., Lind, H. T., Spoelstra, N. S., Babbs, B. L., Heinz, R. E., Elias, A., Jedlicka, P., Jacobsen, B. M., & Richer, J. K. (2015). Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Molecular cancer therapeutics*, 14(3), 769–778. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0926>
92. Collins, L. C., Cole, K. S., Marotti, J. D., Hu, R., Schnitt, S. J., & Tamimi, R. M. (2011). Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(7), 924–931. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.54>
93. Mrklič, I., Pogorelič, Z., Capkun, V., & Tomić, S. (2013). Expression of androgen receptors in triple negative breast carcinomas. *Acta histochemica*, 115(4), 344–348. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.09.006>
94. Choi, J. E., Kang, S. H., Lee, S. J., & Bae, Y. K. (2015). Androgen receptor expression predicts decreased survival in early stage triple-negative breast cancer. *Annals of surgical oncology*, 22(1), 82–89. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3984-z>
95. Peters, K. M., Edwards, S. L., Nair, S. S., French, J. D., Bailey, P. J., Salkield, K., Stein, S., Wagner, S., Francis, G. D., Clark, S. J., & Brown, M. A. (2012). Androgen receptor expression predicts breast cancer survival: the role of genetic

- and epigenetic events. *BMC cancer*, 12, 132. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-132>
96. Rampurwala, M., Wisinski, K. B., & O'Regan, R. (2016). Role of the androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O*, 14(3), 186–193.
 97. Dong, Y., Sun, Q., & Zhang, X. (2017). PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget*, 8(2), 2171–2186. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13895>
 98. Ghebeh, H., Mohammed, S., Al-Omair, A., Qattan, A., Lehe, C., Al-Qudaihi, G., Elkum, N., Alshabanah, M., Bin Amer, S., Tulbah, A., Ajarim, D., Al-Tweigeri, T., & Dermime, S. (2006). The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 8(3), 190–198. <https://doi.org/10.1593/neo.05733>
 99. Mittendorf, E. A., Philips, A. V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., Su, X., Wang, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Akcakanat, A., Chawla, A., Curran, M., Hwu, P., Sharma, P., Litton, J. K., Molldrem, J. J., & Alatrash, G. (2014). PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer immunology research*, 2(4), 361–370. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0127>
 100. Zhang, M., Sun, H., Zhao, S., Wang, Y., Pu, H., Wang, Y., & Zhang, Q. (2017). Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(19), 31347–31354. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15532>
 101. Kim, H. M., Lee, J., & Koo, J. S. (2017). Clinicopathological and prognostic significance of programmed death ligand-1 expression in breast cancer: a meta-analysis. *BMC cancer*, 17(1), 690. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3670-1>
 102. Wang, X., & Liu, Y. (2020). PD-L1 expression in tumor infiltrated lymphocytes predicts survival in triple-negative breast cancer. *Pathology, research and practice*, 216(3), 152802. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152802>

103. Muenst, S., Schaerli, A. R., Gao, F., Däster, S., Trella, E., Drosner, R. A., Muraro, M. G., Zajac, P., Zanetti, R., Gillanders, W. E., Weber, W. P., & Soysal, S. D. (2014). Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 146(1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2988-5>
104. Bae, S. B., Cho, H. D., Oh, M. H., Lee, J. H., Jang, S. H., Hong, S. A., Cho, J., Kim, S. Y., Han, S. W., Lee, J. E., Kim, H. J., & Lee, H. J. (2016). Expression of Programmed Death Receptor Ligand 1 with High Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Associated with Better Prognosis in Breast Cancer. *Journal of breast cancer*, 19(3), 242–251. <https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.3.242>
105. Li, X., Wetherilt, C. S., Krishnamurti, U., Yang, J., Ma, Y., Styblo, T. M., Meisel, J. L., Peng, L., Siddiqui, M. T., Cohen, C., & Aneja, R. (2016). Stromal PD-L1 Expression Is Associated With Better Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *American journal of clinical pathology*, 146(4), 496–502. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw134>
106. Beckers, R. K., Selinger, C. I., Vilain, R., Madore, J., Wilmott, J. S., Harvey, K., Holliday, A., Cooper, C. L., Robbins, E., Gillett, D., Kennedy, C. W., Gluch, L., Carmalt, H., Mak, C., Warriar, S., Gee, H. E., Chan, C., McLean, A., Walker, E., McNeil, C. M., ... O'Toole, S. A. (2016). Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology*, 69(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/his.12904>
107. Кропельницкий В.А., Захарцева Л.М., Чешук В.Е. (2014). Структура и функция белка BRCA1. Роль в процессах репарации ДНК. *Онкология*, 4:244-246.
108. Zhu, Y., Wu, J., Zhang, C., Sun, S., Zhang, J., Liu, W., Huang, J., & Zhang, Z. (2016). BRCA mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(43), 70113–70127. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12158>

109. Schmidt, M. K., van den Broek, A. J., Tollenaar, R. A., Smit, V. T., Westenend, P. J., Brinkhuis, M., Oosterhuis, W. J., Wesseling, J., Janssen-Heijnen, M. L., Jobsen, J. J., Jager, A., Voogd, A. C., van Leeuwen, F. E., & van 't Veer, L. J. (2017). Breast Cancer Survival of BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers in a Hospital-Based Cohort of Young Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(8), 10.1093/jnci/djw329. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw329>
110. Zavitsanos, P. J., Wazer, D. E., Hepel, J. T., Wang, Y., Singh, K., & Leonard, K. L. (2018). BRCA1 Mutations Associated With Increased Risk of Brain Metastases in Breast Cancer: A 1: 2 Matched-pair Analysis. *American journal of clinical oncology*, 41(12), 1252–1256. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000466>
111. Liu, L., Matsunaga, Y., Tsurutani, J. et al (2020). BRCAness as a prognostic indicator in patients with early breast cancer. *Sci Rep* 10, 21173. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78016-8>
112. Huszno, J., Kołosza, Z., & Grzybowska, E. (2019). BRCA1 mutation in breast cancer patients: Analysis of prognostic factors and survival. *Oncology letters*, 17(2), 1986–1995. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9770>
113. Romero A, Caldés T, Díaz-Rubio E, Martín M. Topoisomerase 2 alpha: a real predictor of anthracycline efficacy? *Clin Transl Oncol*. 2012 Mar;14(3):163-8. doi: 10.1007/s12094-012-0779-1. PMID: 22374418.
114. Fritz, P., Cabrera, C. M., Dippon, J., Gerteis, A., Simon, W., Aulitzky, W. E., & van der Kuip, H. (2005). c-erbB2 and topoisomerase IIalpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. *Breast cancer research: BCR*, 7(3), R374–R384. <https://doi.org/10.1186/bcr1012>
115. Rody, A., Karn, T., Ruckhäberle, E., Müller, V., Gehrman, M., Solbach, C., Ahr, A., Gätje, R., Holtrich, U., & Kaufmann, M. (2009). Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in

- estrogen receptor (ER) positive breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 113(3), 457–466. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9964-x>
116. Pan, Y., Yuan, Y., Liu, G., & Wei, Y. (2017). P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients. *PloS one*, 12(2), e0172324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172324>
117. Katz, H., & Alsharedi, M. (2017). Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 35(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1071-6>
118. Nakai, K., Hung, M. C., & Yamaguchi, H. (2016). A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *American journal of cancer research*, 6(8), 1609–1623.
119. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Schafer, J. M., Pendleton, C. S., Tang, L., Johnson, K. C., Chen, X., Balko, J. M., Gómez, H., Arteaga, C. L., Mills, G. B., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2014). PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast cancer research : BCR*, 16(4), 406. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0406-x>
120. Cuenca-López, M. D., Montero, J. C., Morales, J. C., Prat, A., Pandiella, A., & Ocana, A. (2014). Phospho-kinase profile of triple negative breast cancer and androgen receptor signaling. *BMC cancer*, 14, 302. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-302>
121. Shi, Y., Yang, F., Huang, D., & Guan, X. (2018). Androgen blockade based clinical trials landscape in triple negative breast cancer. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1870(2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.05.004>
122. Schmid P., Adams S., Rugo R.S. et al (2018). Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N.ENGL. J. MED*, 379:2108-2121. doi: 10.1056/NEJMoa1809615

123. Gerratana, L., Fanotto, V., Pelizzari, G., Agostinetti, E., & Puglisi, F. (2016). Do platinum salts fit all triple negative breast cancers? *Cancer treatment reviews*, 48, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.06.004>
124. Stover D., Bell C.F., Tolaney S.M. (2016). Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy Considerations for Triple-Negative Breast Cancer. *Amer. J. Hematol. Oncol*, 12(3).
125. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-olaparib-germline-brca-mutated-metastatic-breast-cancer>
126. Greene, F. L., & Sobin, L. H. (2009). A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC. *Journal of surgical oncology*, 99(5), 269–272. <https://doi.org/10.1002/jso.21237>
127. Mesker, W. E., Junggeburst, J. M., Szuhai, K., de Heer, P., Morreau, H., Tanke, H. J., & Tollenaar, R. A. (2007). The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cellular oncology: the official journal of the International Society for Cellular Oncology*, 29(5), 387–398. <https://doi.org/10.1155/2007/175276>
128. Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F. L., Penault-Llorca, F., Perez, E. A., Thompson, E. A., Symmans, W. F., Richardson, A. L., Brock, J., Criscitiello, C., Bailey, H., Ignatiadis, M., Floris, G., Sparano, J., ... International TILs Working Group 2014 (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(2), 259–271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>
129. Ishikawa, Y., Horiguchi, J., Toya, H., Nakajima, H., Hayashi, M., Tagaya, N., Takeyoshi, I., & Oyama, T. (2011). Triple-negative breast cancer: histological subtypes and immunohistochemical and clinicopathological features. *Cancer science*, 102(3), 656–662. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01858.x>

130. Mills, A. M., E Gottlieb, C., M Wendroth, S., M Brenin, C., & Atkins, K. A. (2016). Pure Apocrine Carcinomas Represent a Clinicopathologically Distinct Androgen Receptor-Positive Subset of Triple-Negative Breast Cancers. *The American journal of surgical pathology*, 40(8), 1109–1116. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000671>
131. Miyai, K., Schwartz, M. R., Divatia, M. K., Anton, R. C., Park, Y. W., Ayala, A. G., & Ro, J. Y. (2014). Adenoid cystic carcinoma of breast: Recent advances. *World journal of clinical cases*, 2(12), 732–741. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.732>
132. Tan QT, Chuwa EW, Chew SH, Lim-Tan SK, Lim SH. Low-grade adenosquamous carcinoma of the breast: A diagnostic and clinical challenge. *Int J Surg*. 2015 Jul;19:22-6. doi: 10.1016/j.ijso.2015.05.010. Epub 2015 May 15. PMID: 25986061.
133. Takala, S., Heikkilä, P., Nevanlinna, H., Blomqvist, C., & Mattson, J. (2019). Metaplastic carcinoma of the breast: Prognosis and response to systemic treatment in metastatic disease. *The breast journal*, 25(3), 418–424. <https://doi.org/10.1111/tbj.13234>
134. Arce, C., Cortes-Padilla, D., Huntsman, D. G., Miller, M. A., Dueñas-Gonzalez, A., Alvarado, A., Pérez, V., Gallardo-Rincón, D., & Lara-Medina, F. (2005). Secretory carcinoma of the breast containing the ETV6-NTRK3 fusion gene in a male: case report and review of the literature. *World journal of surgical oncology*, 3, 35. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-3-35>
135. Anestis, A., Zoi, I., Papavassiliou, A. G., & Karamouzis, M. V. (2020). Androgen Receptor in Breast Cancer-Clinical and Preclinical Research Insights. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(2), 358. <https://doi.org/10.3390/molecules25020358>
136. Ali, H. R., Glont, S. E., Blows, F. M., Provenzano, E., Dawson, S. J., Liu, B., Hiller, L., Dunn, J., Poole, C. J., Bowden, S., Earl, H. M., Pharoah, P. D., & Caldas, C. (2015). PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. *Annals of*

- oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 26(7), 1488–1493. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv192>
137. Cimino-Mathews, A., Thompson, E., Taube, J. M., Ye, X., Lu, Y., Meeker, A., Xu, H., Sharma, R., Lecksell, K., Cornish, T. C., Cuka, N., Argani, P., & Emens, L. A. (2016). PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Human pathology*, 47(1), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.003>
138. Dill, E. A., Gru, A. A., Atkins, K. A., Friedman, L. A., Moore, M. E., Bullock, T. N., Cross, J. V., Dillon, P. M., & Mills, A. M. (2017). PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across Breast Cancer Subtypes and Stages: An Assessment of 245 Primary and 40 Metastatic Tumors. *The American journal of surgical pathology*, 41(3), 334–342. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000780>
139. Guo, H., Ding, Q., Gong, Y., Gilcrease, M. Z., Zhao, M., Zhao, J., Sui, D., Wu, Y., Chen, H., Liu, H., Zhang, J., Resetkova, E., Moulder, S. L., Wang, W. L., & Huo, L. (2020). Comparison of three scoring methods using the FDA-approved 22C3 immunohistochemistry assay to evaluate PD-L1 expression in breast cancer and their association with clinicopathologic factors. *Breast cancer research : BCR*, 22(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01303-9>
140. Sabatier, R., Finetti, P., Mamessier, E., Adelaide, J., Chaffanet, M., Ali, H. R., Viens, P., Caldas, C., Birnbaum, D., & Bertucci, F. (2015). Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, 6(7), 5449–5464. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3216>
141. McBride GB (2005). A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's concordance correlation coefficient. NIWA client report, p62.
142. Doğukan, R., Uçak, R., Doğukan, F. M., Tank, C., Çitgez, B., & Kabukcuoğlu, F. (2019). Correlation between the Expression of PD-L1 and Clinicopathological Parameters in Triple Negative Breast Cancer Patients. *European journal of breast health*, 15(4), 235–241. <https://doi.org/10.5152/ejbh.2019.4912>

143. Yuan, C., Liu, Z., Yu, Q., Wang, X., Bian, M., Yu, Z., & Yu, J. (2019). Expression of PD-1/PD-L1 in primary breast tumours and metastatic axillary lymph nodes and its correlation with clinicopathological parameters. *Scientific reports*, 9(1), 14356. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50898-3>
144. Mina, A., Yoder, R., & Sharma, P. (2017). Targeting the androgen receptor in triple-negative breast cancer: current perspectives. *OncoTargets and therapy*, 10, 4675–4685. <https://doi.org/10.2147/OTT.S126051>
145. Zhao, S., Ma, D., Xiao, Y., Li, X. M., Ma, J. L., Zhang, H., Xu, X. L., Lv, H., Jiang, W. H., Yang, W. T., Jiang, Y. Z., Zhang, Q. Y., & Shao, Z. M. (2020). Molecular Subtyping of Triple-Negative Breast Cancers by Immunohistochemistry: Molecular Basis and Clinical Relevance. *The oncologist*, 25(10), e1481–e1491. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0982>
146. Z., Shao, Z., & Lu, J. (2011). The role of topoisomerase II α in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients: a meta-analysis of published literatures. *Breast cancer research and treatment*, 129(3), 839–848. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1694-9>
147. Nogi, H., Uchida, K., Kamio, M., Kato, K., Toriumi, Y., Akiba, T., Morikawa, T., Suzuki, M., Kobayashi, T., & Takeyama, H. (2016). Triple-negative breast cancer exhibits a favorable response to neoadjuvant chemotherapy independent of the expression of topoisomerase II α . *Molecular and clinical oncology*, 4(3), 383–389. <https://doi.org/10.3892/mco.2015.719>

ДОДАТОК А

Відомості про апробацію результатів дисертації

Основні положення та результати роботи оприлюднені на X Конгресі патологів України (Яремче, 16-18 вересня, 2018, публікація статті/усна доповідь), науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, 4-5 лютого, 2019, публікація тез/ усна доповідь), XXXI Конгресі Європейської асоціації патологів (Ніца, Франція, 7-11 вересня, 2019, публікація тез).

ДОДАТОК Б

Наукові праці опубліковані за темою дисертації

1. Zakhartseva L.M., Yanovytska M.O. Пухлиноінфільтруючі лімфоцити при тричі негативних карциномах молочної залози. Патологія, 3, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.14739/2310-1237.2020.3.221722> (Web of Science). (Дисертант провела збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).
2. Захарцева Л.М., Яновицька М.О., Голобородько О.К., Шатрова К.М. Тричі-негативний рак молочної залози: молекулярно-генетичні особливості та прогностичні фактори (огляд літератури та аналіз власних даних).-Art of Medicine.-2018.-№3(7)-С.59-62. (Дисертант провела аналіз літератури, збір матеріалу, разом зі співавторами узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).
3. Zakhartseva L.M., Yanovytska M.O. Tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer: correlative analyses of own data and literature review. Ukrainian Scientific Medical Youth Journal. 2(110) (Jun. 2019), 31-41. DOI:[https://doi.org/10.32345/USMYJ.2\(110\).2019.31-41](https://doi.org/10.32345/USMYJ.2(110).2019.31-41). (Дисертант провела збір матеріалу, провела гістологічне та статистичне дослідження, разом зі співавторами узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).
4. Zakhartseva L., Yanovytska M. Prognostic value of tumor stroma ratio in triple negative breast cancer. Wiadomosci Lekarskie. - Vol. 74, Issue 3(2), March 2021, 565-571. (Дисертант провела збір матеріалу, разом зі співавтором провела гістологічне дослідження, узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала статтю до друку).
5. Zakhartseva L., Yanovytska M., Nekrasova L., Plodienko M. Expression of topoisomerase II alpha: correlation analysis with different molecular breast cancer

- subtypes, proliferative index and age of patient // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», 4-5 лютого 2019 р., м. Київ. – С. 82. (Дисертант провела аналіз літератури, збір матеріалу, разом зі співатворами узагальнила та проаналізувала одержані дані, сформулювала висновки, підготувала тези до друку).
6. Zakhartseva L., Yanovytska M., Zakhartsev Y., Plodienko M. The prognostic value of topoisomerase II- α for chemotherapy response and survival in breast cancer // 31st European Congress of Pathology in Nice, Nice, France 7–11 September, 2019. P. 93. (Дисертант провела аналіз літератури, разом зі співатворами узагальнила та проаналізувала одержані дані, розглянула проблемні питання, сформулювала висновки та підготувала тези до друку).