

Anna Lewandowska

Mikrośrodowisko w potrójnie ujemnym raku piersi

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek



Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Serdeczne podziękowania dla

Prof. dr hab. n. med. Andrzeja Marszałka

za wszystkie cenne wskazówki merytoryczne,
poświęcony czas oraz okazane wsparcie na każdym
etapie pisania pracy

WYKAZ SKRÓTÓW	6
I. WSTĘP	8
1. Rak piersi	8
1.1 Epidemiologia raka piersi	8
1.2 Klasyfikacja raka piersi	8
1.2.1 Klasyfikacja histopatologiczna raka piersi	8
1.2.2 Klasyfikacja molekularna raka piersi	11
1.2.3 Klasyfikacja immunohistochemiczna raka piersi	11
1.3 Potrójnie ujemny rak piersi- definicja	14
1.4 Potrójnie ujemny rak piersi – charakterystyka	15
1.4.1 Przebieg kliniczny TNBC	15
1.4.2 Podtypy histologiczne TNBC	16
1.4.3 Podtypy molekularne TNBC	18
1.4.4 Leczenie TNBC	20
2. Mikrośrodowisko nowotworu – definicja	21
3. Elementy oceny histopatologicznej w raku piersi	23
3.1 Ocena stopnia dojrzałości histologicznej raka piersi	23
3.2 Ocena stopnia zaawansowania raka piersi	25
II. CELE PRACY	28
III. MATERIAŁ I METODY	29
1. Materiał	29
1.1 Materiał tkankowy	29
1.2 Grupa badana	29
2. Metody	32
2.1 Przygotowanie materiału	32
2.2 Badania immunohistochemiczne	33
2.2.1 Przygotowanie mikromacierzy	33
2.2.2 Reakcje immunohistochemiczne	33
3. Ocena immunohistochemiczna	35
4. Metody statystyczne	36
IV. WYNIKI	37
1. Zróżnicowanie budowy histologicznej guzów w grupie badanej	37

2. Wyniki oceny ekspresji wybranych antygenów w badaniach immunohistochemicznych..	42
2.1 CD4	43
2.2 CD8	44
2.3 FoxP3	45
2.4 CD68	46
2.5 CD163	47
2.6 CD19	48
2.7 CD56	49
2.8 CD138	50
2.9 CD1a	52
3. Ocena elementów mikrośrodowiska	57
3.1 Ocena elementów mikrośrodowiska względem stopnia dojrzałości histologicznej NHG	57
3.2 Ocena elementów mikrośrodowiska względem stopnia pT	59
3.3 Ocena elementów mikrośrodowiska względem obecności przerzutów w węzłach chłonnych	61
4. Ocena korelacji elementów mikrośrodowiska z danymi histopatologicznymi	62
5. Ocena korelacji danych histopatologicznych i klinicznych	66
V. DYSKUSJA	69
1. Potrójnie ujemny rak piersi	69
1.1. Charakterystyka TNBC.....	69
1.2 Zróżnicowanie histologiczne TNBC	70
2. Mikrośrodowisko	72
2.1 TILs	73
2.1.1 Komórki CD4+ oraz CD8+	73
2.1.2 Komórki FoxP3+	76
2.1.3 Komórki CD56+.....	79
2.1.4 Komórki CD19+.....	81
2.2 TAMs	82
2.3 CD138	87
2.4 CD1a	88
3. Korelacje między danymi histopatologicznymi oraz klinicznymi	89
VI. WNIOSKI	91
VII. STRESZCZENIE	92
VIII. ABSTRACT	94

IX. SPIS TABEL I RYCIN.....	96
Spis tabel.....	96
Spis rycin	98
X. PIŚMIENNICTWO	101
XI. AKTYWNOŚĆ NAUKOWA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O NADANIE STOPNIA DOKTORA	124

WYKAZ SKRÓTÓW

ACC	rak gruczołowo-torbielowaty (<i>ang. adenoid cystic carcinoma</i>)
BL	podtyp podstawnopodobny raka piersi (<i>ang. basal like</i>)
CCL2	białko chemotaktyczne dla monocytów (<i>ang. chemokine C-C motif ligand 2</i>)
CIK	indukowane cytokinami komórki zabójcy (<i>ang. cytokine induced killer</i>)
DCIS	rak przewodowy nieinwazyjny (<i>ang. ductal carcinoma in situ</i>)
ECM	macierz pozakomórkowa (<i>ang. extracellular matrix</i>)
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu (<i>ang. epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (<i>ang. epithelial-mesenchymal transition</i>)
ER	receptor estrogenowy (<i>ang. estrogen receptor</i>)
G-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (<i>ang. granulocyte colony-stimulating factor</i>)
HER-2	receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (<i>ang. human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HPF	duże pole widzenia mikroskopu (<i>ang. high power field</i>)
IHC	badania immunohistochemiczne (<i>ang. immunohistochemistry</i>)
IL-10	interleukina 10 (<i>ang. interleukin 10</i>)
IM	podtyp immunomodulujący raka piersi (<i>ang. immunomodulatory</i>)
IRS	skala oceny reakcji immunohistochemicznej (<i>ang. immunoreactive score</i>)
ISH	hybrydyzacja in situ (<i>ang. in situ hybridization</i>)
LAR	podtyp luminalny raka piersi z ekspresją receptora androgenowego (<i>ang. luminal androgen receptor</i>)
M	podtyp mezenchymalny raka piersi (<i>ang. mesenchymal</i>)
MBC	metaplastyczny rak piersi (<i>ang. metaplastic breast carcinoma</i>)
M-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (<i>ang. macrophage colony-stimulating factor</i>)
MMP9	metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (<i>ang. matrix metalloproteinase 9</i>)

MSL	mezenchymalny podtyp molekularny raka piersi typu „stem-like” (<i>ang. mesenchymal stem-like</i>)
NHG	stopień dojrzałości nowotworu według systemu Nottingham (<i>ang. Nottingham Histologic Grading</i>)
NOS	rak piersi nieokreślony inaczej (<i>ang. not otherwise specified</i>)
NST	rak piersi bez specjalnego podtypu (<i>ang. no special type</i>)
OS	ogólne przeżycie (<i>ang. overall survival</i>)
pCR	całkowita odpowiedź na chemioterapię stwierdzana w badaniu histopatologicznym (<i>ang. pathological complete response</i>)
PFS	przeżycie wolne od wznowy nowotworu (<i>ang. progression-free survival</i>)
PR	receptor progesteronowy (<i>ang. progesterone receptor</i>)
RD	choroba resztkowa (<i>ang. residual disease</i>)
TAMs	makrofagi związane z nowotworem (<i>ang. tumor-associated macrophages</i>)
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu beta (<i>ang. transforming growth factor β</i>)
TILs	limfocyty naciekające nowotwór (<i>ang. tumor infiltrating lymphocytes</i>)
TMA	mikromacierz tkankowa (<i>ang. tissue microarray</i>)
TME	mikrośrodowisko nowotworowe (<i>ang. tumor microenvironment</i>)
TNBC	potrójnie ujemny rak piersi (<i>ang. triple negative breast cancer</i>)
UNS	podtyp zmienny raka piersi (<i>ang. unstable</i>)
VEGF	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (<i>ang. vascular endothelial growth factor</i>)

I. WSTĘP

1. Rak piersi

1.1 Epidemiologia raka piersi

Rak piersi jest najczęstszym na świecie nowotworem złośliwym stwierdzanym u kobiet. Stanowi on również, drugą co do częstości przyczynę zgonów związanych z nowotworami u tej płci [1]. Podobna tendencja obserwowana jest w Polsce. W 2018 roku rak piersi był najczęściej zgłaszanym do Krajowego Rejestru Nowotworów nowotworem złośliwym kobiet. Stanowił on 22,5% wszystkich zgłoszonych przypadków oraz był przyczyną 15% zgonów związanych z nowotworami złośliwymi u kobiet. Odpowiadało to 18869 nowym zachorowaniom na raka piersi oraz 6895 zgonom z nim związanym [2]. W ostatnich latach, zarówno w Polsce jak i na świecie, obserwowana jest tendencja wzrostowa liczby zachorowań na raka piersi. W 2017 roku stwierdzono w Polsce 18529 nowych przypadków raka piersi i 6670 zgonów. Dla porównania w 2013 roku stwierdzono w Polsce 17142 nowe przypadki raka piersi oraz 5816 zgonów z nim związanych [2].

1.2 Klasyfikacja raka piersi

1.2.1 Klasyfikacja histopatologiczna raka piersi

Zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia rak piersi stanowi niezwykle heterogenną grupę nowotworów (Tab.1). Klasyfikacja WHO oparta jest głównie na cechach morfologicznych guzów piersi stwierdzanych w trakcie rutynowej diagnostyki mikroskopowej. Najnowsza klasyfikacja WHO dotycząca zmian w piersiach pochodzi z 2019 roku. Zgodnie z nią wśród raków piersi wyróżnia się kilkanaście podtypów specjalnych raka oraz tzw. raka bez specjalnego podtypu (*ang. no special type*, NST). Rak zostaje zaklasyfikowany do któregoś z podtypów specjalnych, gdy większość jego utkania ($\geq 90\%$) posiada charakterystyczne cechy mikroskopowe opisywane w klasyfikacji jako niezbędne do rozpoznania określonego

podtypu (np. utkanie cewkowe, śluzowe, zrazikowe czy mikrobrodawkowe). W piersi mogą również występować bardzo rzadkie raki podobne do nowotworów pochodzenia śliniankowego. Wśród nich najczęstszym jest rak gruczołowo-torbielowy (*ang. adenoid cystic carcinoma, ACC*) [3][4].

W przypadku gdy guz nie spełnia morfologicznych cech rozpoznania któregoś z podtypów specjalnych klasyfikowany jest jako rak NST. W najnowszej klasyfikacji WHO, dla raków piersi nie spełniających kryteriów rozpoznania któregoś z podtypów specjalnych wprowadzone zostało rozpoznanie raka typu NOS (*ang. no otherwise specified*, rak piersi nieokreślony inaczej). W komentarzu do klasyfikacji używane jest jednak dalej pojęcie raka typu NST [4], podobną zasadę zastosowano w poniższej pracy.

Raki typu NST stanowią zdecydowaną większość rozpoznawanych naciekających raków piersi. Ich budowa histologiczna jest bardzo zróżnicowana. W trakcie oceny mikroskopowej można w rakach typu NST stwierdzić zarówno obecność utkania cewkowego jak i lite pola czy gniazda komórek nowotworowych. Oba te komponenty mogą w tych guzach być „wymieszane” w różnych proporcjach i układach. Poza tym w części przypadków raków NST można stwierdzić utkanie histologiczne typowe dla któregoś z podtypów specjalnych. Gdy tego utkania jest względnie dużo (10-89%) raki takie klasyfikowane są jako raki mieszane. Poza tym raki typu NST mogą posiadać dodatkowe cechy morfologiczne, takie jak np. układy rdzeniaste (rozpychający typ wzrostu z obecnością układów syncytialnych oraz intensywnym naciekiem limfocytarnym) czy cechy różnicowania neuroendokrynnego. Ze względu na to, że stwierdzenie tych cech mikroskopowych nie ma przełożenia na rokowanie i postępowanie kliniczne ich obecność nie prowadzi do rozpoznania podtypu specjalnego raka piersi. W tych wypadkach dokumentowana jest jedynie obecność tych cech w raku typu NST [3-5].

Tabela 1. Klasyfikacja histologiczna raków piersi według WHO [3] i [4][5] (w tłumaczeniu własnym).

Invasive breast carcinoma of no special type (NST) - with medullary pattern - invasive carcinoma with neuroendocrine differentiation	Rak naciekający bez specjalnego podtypu (NST) - z układami rdzeniastymi - rak inwazyjny z różnicowaniem neuroendokrynnym
---	---

- carcinoma with osteoclast-like stromal giant cells - with pleomorphic pattern - with choriocarcinomatous pattern - with melanocytic pattern - with oncocytic pattern - with lipid-rich pattern - with glycogen-rich clear cell pattern - with sebaceous pattern	- rak z komórkami olbrzymimi kościogubno-podobnymi obecnymi w zrębie - z układami pleomorficznymi - z układami kosmówczakowymi - z układami melanocytarnymi - z układami onkocytarnymi - z komórkami bogatymi w tłuszcz - z komórkami jasnymi bogatymi w tłuszcz - z komórkami łojowymi
Special subtypes of invasive breast carcinoma Invasive lobular carcinoma Tubular carcinoma Cribiform carcinoma Mucinous carcinoma Mucinous cystadenocarcinoma Invasive micropapillary carcinoma Carcinoma with apocrine differentiation Metaplastic carcinoma - low-grade adenosquamous carcinoma - fibromatosis-like metaplastic carcinoma - spindle cell carcinoma - squamous cell carcinoma - metaplastic carcinoma with heterologous mesenchymal differentiation - mixed metaplastic carcinoma	Podtypy specjalne raka inwazyjnego piersi Inwazyjny rak zrazikowy Rak cewkowy Rak sitowaty Rak śluzowy Torbielakogruczolakorak śluzowy Rak inwazyjny mikrobrodawkowaty Rak z różnicowaniem apokrynowym Rak metaplastyczny - rak gruczołowo-płaskonabłonkowy o niskim stopniu złośliwości - rak metaplastyczny przypominający fibromatozę - rak wrzecionowatokomórkowy - rak płaskonabłonkowy - rak metaplastyczny z różnicowaniem mezenchymalnym heterologicznym - mieszany rak metaplastyczny
Rare and salivary gland- type tumours Acinar cell carcinoma Adenoid cystic carcinoma Secretory carcinoma Mucoepidermoid carcinoma Polymorphous adenocarcinoma Tall cell carcinoma with reversed polarity	Raki rzadkie i raki typu śliniankowego Rak zrazikowo-komórkowy Rak gruczołowo-torbielowaty Rak wydzielniczy Rak śluzowo-naskórkowy Gruczolakorak polimorficzny Rak z wysokich komórek o odwróconej biegunowości

Aktualnie coraz częściej podkreśla się fakt, że klasyfikacja histologiczna, ze szczególnym uwzględnieniem wszystkich podtypów, w tym tych rzadko występujących, ma znaczenie, ale jest to znaczenie głównie prognostyczne, nie zawsze mające przełożenie na rodzaj i przebieg zastosowanego leczenia [6].

1.2.2 Klasyfikacja molekularna raka piersi

W ostatnich latach wraz z rozwojem technik biologii molekularnej coraz częściej wskazuje się na rosnące znaczenie podtypów molekularnych nowotworów, w tym również raka piersi [7][8]. Początkowo wyodrębniono 5 podstawowych molekularnych podtypów raka piersi [9]. Do podtypów tych należały: podtypy luminałe A i B, podtyp z nadekspresją białka HER2 (*ang. human epidermal growth factor receptor 2*, receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2), podtyp podstawny, podtyp z ekspresją genów typowych dla komórek prawidłowego gruczołu piersiowego („normal breast-like”) [10]. Nieco później opisany został dodatkowy molekularny podtyp określany, jako „claudin-low”. Podtyp ten charakteryzuje się obniżoną ekspresją markerów różnicowania luminalnego oraz niską ekspresją białek (np. kładyny, e-kadheryny) odpowiadających za przyleganie komórek. W guzach należących do tej podgrupy stwierdza się wysoką ekspresję markerów związanych z przemianą nabłonkowo-mezenchymalną (*ang. epithelial-mesenchymal transition*, EMT). Raki te charakteryzują się dodatkowo obfitym naciekiem zapalnym w obrębie podścieliska nowotworu [11].

1.2.3 Klasyfikacja immunohistochemiczna raka piersi

Wprowadzenie do diagnostyki raka piersi rutynowego użycia technik biologii molekularnej wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Wynika to nie tylko z problemów natury finansowej, ale również technicznej i organizacyjnej. Potwierdzono, że ze względu na większą dostępność, doskonałym surogatem dla części metod

molekularnych, w standardowej diagnostyce onkologicznej, mogą być badania immunohistochemiczne (*ang. immunohistochemistry, IHC*) [12][13].

U pacjentów z rakiem piersi badania immunohistochemiczne są od wielu lat niezbędnym elementem diagnostyki patomorfologicznej [14][15]. Badania te obejmują ocenę w komórkach nowotworowych ekspresji receptora estrogenowego (*ang. estrogen receptor, ER*), receptora progesteronowego (*ang. progesterone receptor, PR*), ocenę nadekspresji białka HER-2 oraz ocenę ekspresji antygenu proliferacyjnego Ki-67. Wykonanie powyższych badań ma na celu określenie potencjalnych korzyści pacjenta z zastosowania hormonoterapii, chemioterapii oraz terapii ukierunkowanej przeciwko białku HER-2 [4].

Zgodnie z wytycznymi, potwierdzenie w badaniach immunohistochemicznych obecności receptorów estrogenowych i progesteronowych w komórkach raka (dodatni odczyn jądrowy) wymaga stwierdzenia reakcji dodatniej z zastosowanym przeciwciałem, ukierunkowanym przeciwko tym receptorom, w co najmniej 1% komórek nowotworowych [16].

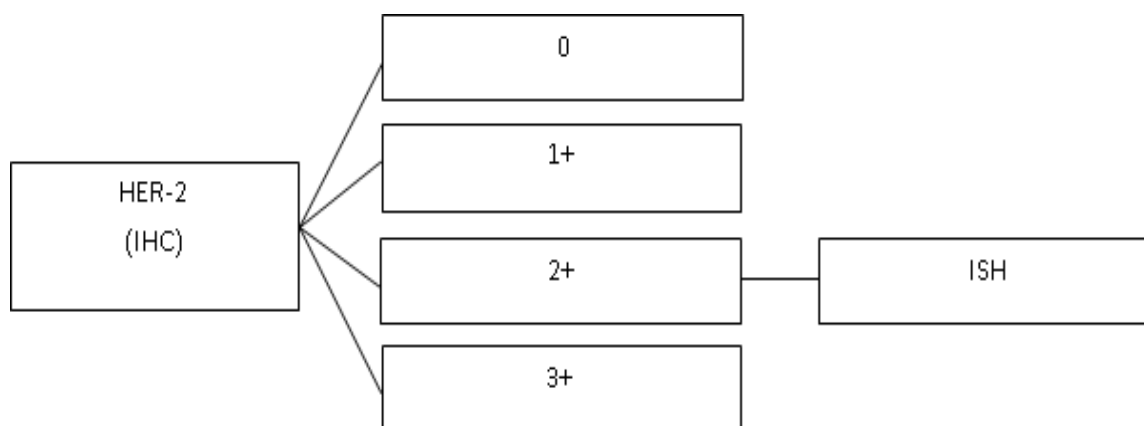
Ocena Ki-67 ma na celu określenie odsetka komórek nowotworowych będących w trakcie cyklu komórkowego. Podobnie jak w przypadku receptorów hormonalnych pod uwagę jest tu brany pozytywny odczyn jądrowy [17].

Ocena nadekspresji białka HER-2 przebiega według innych zasad. Białko HER-2 należy do rodziny receptorów naskórkowych czynników wzrostu (*ang. epidermal growth factor receptor, EGFR*) i posiada aktywność kinazy tyrozynowej. Aktywność ta jest związana z takimi cechami komórek jak proliferacja, migracja, dojrzewanie oraz apoptoza. W prawidłowych komórkach, na chromosomie 17 znajdują się dwie kopie genu *HER-2*. Nadekspresja tego genu związana jest ze zwiększeniem liczby jego kopii w komórkach nowotworowych. Efektem tego procesu jest zwiększenie ilości produkowanego przez gen *HER-2* białka znajdującego się na powierzchni komórek. Wpływa to na zwiększoną proliferację komórek oraz unikanie przez nie apoptozy oraz jest związane z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym nowotworu. Ocena ekspresji białka HER-2 na powierzchni komórek, a w wybranych przypadkach, zgodnie z opisanym poniżej algorytmem, ocena liczby kopii genu *HER-2* w komórkach raka, jest niezbędna do określenia potencjalnych korzyści z leczenia skierowanego przeciwko temu receptorowi. Status białka HER-2 jest zatem w raku piersi zarówno czynnikiem prognostycznym jak i predykcyjnym [18][19].

Pierwszym etapem oceny statusu białka HER-2 są badania immunohistochemiczne. Oceniana jest w nich obecność odczynu błonowego w komórkach raka. Pod uwagę brana jest zarówno intensywność reakcji, jak i procent wybarwionych dodatnio komórek. Zasady oceny immunohistochemicznej białka HER-2 przedstawiono w tabeli 2. W przypadku otrzymania wyniku niejednoznacznego (wynik określony jako 2+) istnieje konieczność zastosowania dodatkowo metod biologii molekularnej, do których należy ocena liczby kopii genu *HER-2* techniką hybrydyzacji in situ (*ang. in situ hybridization, ISH*) (Ryc. 1) [17][20].

Tabela 2. Zasady oceny ekspresji białka HER2 w badaniach immunohistochemicznych [17].

Wynik oceny HER2	Obserwowany obraz	Interpretacja
0	Brak reakcji lub reakcja błonowa nieciągła słaba lub ledwie widoczna i obecna w mniej lub równo 10% komórek nowotworowych	Wynik ujemny
1+	Reakcja błonowa nieciągła słaba lub ledwie widoczna i obecna w powyżej 10% komórek nowotworowych	Wynik ujemny
2+	Obecna ciągła błonowa reakcja o słabym lub o średnim nasileniu w więcej niż 10% komórek raka naciekającego	Wynik niejednoznaczny
3+	Silna ciągła reakcja błonowa w powyżej 10% komórek nowotworowych	Wynik dodatni



Rycina 1. Schemat postępowania po wykonanych badaniach immunohistochemicznych nadekspresji białka HER-2 w przypadku otrzymania wyniku określanego jako niejednoznaczny[17].

W zależności od otrzymanych wyników badań immunohistochemicznych i molekularnych wyodrębniono następujące biologiczne podtypy raka piersi: luminalny A, luminalny B, HER-2 dodatni, potrójnie ujemny (Tab.3) [4][21].

Tabela 3. Podtypy biologiczne raka piersi w oparciu o status receptora estrogenowego (ER), progesteronowego (PR) oraz ocenę ekspresji białka HER-2 [4][21].

Podtyp biologiczny	Status ER	Status PR	Nadekspresja HER-2
Luminalny A	+	+	-
Luminalny B (HER-2 ujemny)	+	+/-	-
Luminalny B (HER-2 dodatni)	+	+	+
HER-2 dodatni (neluminalny)	-	-	+
Potrójnie ujemny	-	-	-

1.3 Potrójnie ujemny rak piersi- definicja

Potrójnie ujemny rak piersi (*ang. triple negative breast cancer, TNBC*) to nowotwór piersi, w którym w trakcie diagnostyki immunohistochemicznej nie wykazano ekspresji receptora estrogenowego ani progesteronowego oraz żadną z metod nie wykazano nadekspresji białka HER-2 w komórkach raka [22][23]. Szacuje się, że TNBC stanowi od 12 do 24% wszystkich diagnozowanych raków piersi [24].

Początkowo termin potrójnie ujemny rak piersi stosowany był jako synonim raka piersi typu bazalnego [25][26]. Aktualnie podkreśla się, że tych dwóch pojęć nie należy używać zamiennie [27]. Rak piersi typu bazalnego jest podtypem raka rozpoznawanym na podstawie badań molekularnych (analiza ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy DNA). Natomiast TNBC jest podtypem raka definiowanym przy pomocy wyników badań immunohistochemicznych [28]. Stwierdzono, że nie wszystkie raki typu bazalnego, rozpoznane przy użyciu metod biologii molekularnej, mają immunohistochemiczny profil odpowiadający guzom typu TNBC [29-31]. Określa się, że TNBC stanowi w tej podgrupie raków piersi ponad 70% [32][33]. Podobnie, w większości przypadków TNBC stwierdza się histologicznie cechy fenotypu typu bazalnego [34][35]. Jednak w ok. 20-30%

przypadków tego raka, badanie molekularne nie potwierdza tzw. bazalnego charakteru nowotworu [31]. Szacuje się zatem, że współwystępowanie fenotypowych cech bazalnych, potrójnie ujemnego charakteru guza w badaniach immunohistochemicznych oraz bazalnego charakteru guza w badaniu molekularnym występuje w ok. 70-80% badanych nowotworów z tych grup [36][37].

Podsumowując termin TNBC jest zarezerwowany dla przypadków, w których podtyp raka został określony przy pomocy badań immunohistochemicznych, natomiast termin „basal-like carcinoma” powinien być używany w przypadkach zdefiniowania podtypu nowotworu przy użyciu badań z wykorzystaniem mikromacierzy DNA [38].

1.4 Potrójnie ujemny rak piersi – charakterystyka

1.4.1 Przebieg kliniczny TNBC

Odmienność biologiczna potrójnie ujemnego raka piersi znajduje odzwierciedlenie w przebiegu choroby nowotworowej u tych pacjentów. Z analizy wielu grup chorych na raka piersi wynika, że w chwili rozpoznania średni wiek pacjentów z rakami typu TNBC jest niższy, niż w przypadku pozostałych podtypów biologicznych raka piersi. Średnia wieku pacjentów z TNBC wynosi zazwyczaj poniżej 50 r.ż. [39]. Dla porównania, średnia wieku wszystkich pacjentów z rozpoznanym rakiem piersi w Stanach Zjednoczonych wynosi 62 lata [40]. Innymi cechami charakterystycznymi dla TNBC, względem innych podtypów biologicznych, są ponadto: niższy stopień dojrzewania histologicznego, większa średnica guza w momencie rozpoznania raka piersi oraz szybszy wzrost guza [41][42]. W potrójnie ujemnym raku piersi szczyt nawrotów obserwowany jest wcześniej, niż w innych podtypach biologicznych. Zazwyczaj ma to miejsce pomiędzy pierwszym a trzecim rokiem po rozpoznaniu choroby nowotworowej [43]. W tym okresie występuje również wyższe ryzyko zgonu [10]. W przypadku TNBC przerzuty odległe, jeśli są stwierdzane, to częściej niż w innych podtypach biologicznych dotyczą płuc i mózgu [44]. W tym podtypie raka piersi rzadziej występują przerzuty do kości [45]. W TNBC, częściej niż w pozostałych podtypach biologicznych, przerzuty odległe mogą być pierwszą oznaką nawrotu nowotworu (84% vs 61%) [46]. Ta różnica dotyczy przede wszystkim pierwszych pięciu lat po rozpoznaniu choroby nowotworowej [47]. Wśród pacjentów z TNBC

nie wykazano natomiast, w porównaniu do innych podtypów biologicznych, większej częstości występowania przerzutów do węzłów chłonnych [48].

Wspomniane wyżej cechy powodują, że choroba nowotworowa u pacjentów z TNBC często ma agresywniejszy przebieg, a pacjenci mają gorsze rokowanie, szczególnie w pierwszych latach po rozpoznaniu. Ze względu na brak ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz ze względu na brak nadekspresji białka HER-2 problemem są tu również ograniczone możliwości terapeutyczne [49][50].

1.4.2 Podtypy histologiczne TNBC

Pod względem budowy histologicznej potrójnie ujemny rak piersi charakteryzuje się podobną heterogennością jak cała grupa raków piersi. Najczęstszym morfologicznym podtypem stwierdzanym u pacjentów z TNBC jest rak inwazyjny typu NST [48]. Wśród raków typu NST TNBC stanowi natomiast ok. 10-14% [51]. Określenie w badaniach immunohistochemicznych raka NST jako raka potrójnie ujemnego związane jest z pogorszeniem prognozy dla pacjenta względem ogólnej prognozy w tym podtypie histologicznym raka [52][53]. Istotnym wariantem raka NST, występującym częściej w przypadku potrójnie ujemnego panelu badań immunohistochemicznych, jest rak NST z obecnością układów rdzeniastych (kiedyś klasyfikowany jako oddzielny podtyp specjalny raka piersi) [4].

Do częściej spotykanych w TNBC, niż w grupie ogólnej raków piersi, podtypów specjalnych należą: rak z cechami apokrynowymi, rak metaplastyczny, rak wydzielniczy oraz rzadkie podtypy raków o morfologii śliniankowej, takie jak np. rak śluzowo-naskórkowy czy ACC [4][54]. W raku metaplastycznym, raku z cechami apokrynowymi czy rakach o morfologii śliniankowej TNBC jest najczęściej stwierdzanym podtypem biologicznym raka piersi [55].

Procentowy odsetek TNBC w poszczególnych podtypach histologicznych raka piersi przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Odsetek przypadków TNBC w podtypach histologicznych raka piersi określonych zgodnie z klasyfikacją WHO [55].

Postać histologiczna raka piersi wg WHO	Odsetek przypadków TNBC
Rak NST	10
Rak zrazikowy	2
Rak NST z układami rdzeniastymi	Większość
Rak metaplastyczny	77-95
Rak z różnicowaniem apokrynowym	40-98
Rak gruczołowo-torbielowaty	91
Rak śluzowo-naskórkowy	ok. 100
Rak polimorficzny	ok. 100
Rak wydzielniczy	ok. 100
Rak bogaty w lipidy	30-98
Rak zrazikowo-komórkowy	ok. 100

Jak opisano wcześniej, raki TNBC jako grupa biologiczna charakteryzują się gorszym rokowaniem. Zróżnicowanie morfologiczne sprawia jednak, że poszczególne podtypy histologiczne mają również dodatkowe znaczenie rokownicze.

Potwierdzono, że obecność układów rdzeniastych [56][57] czy cech apokrynowych [58][59] może wskazywać na potencjalnie nieco lepsze rokowanie. Szczególnym podtypem TNBC o powolnym przebiegu jest rak gruczołowo-torbielowaty. Rak ten ma charakterystyczny wygląd mikroskopowy i swoją budową przypomina nowotwory występujące w rejonie głowy i szyi, szczególnie w obrębie ślinianek [60]. Pomimo, że w zdecydowanej większości przypadków ACC nie stwierdza się obecności ekspresji receptora estrogenowego i progesteronowego oraz nadekspresji białka HER-2, to zazwyczaj ten podtyp raka kojarzy się z bardzo dobrym rokowaniem [61][62].

Innymi rzadkimi podtypami histologicznymi TNBC, w których możemy obserwować nie tylko morfologię guza typu „low-grade”, ale również związany z nią powolny przebieg choroby nowotworowej oraz dobre rokowanie są: rak wydzielniczy oraz raki typu śliniankowego takie jak rak zrazikowo-komórkowy czy rak śluzowo-naskórkowy [63]. Te rzadkie podtypy stanowią jednak zdecydowaną mniejszość przypadków potrójnie ujemnego raka piersi [4][23].

Podtypami histologicznymi TNBC o ogólnym gorszym rokowaniu są natomiast: rak typu NST, rak zrazikowy oraz część podtypów raka metaplastycznego (*ang. metaplastic breast cancer, MBC*) [64-66]. Szczególnie zła prognoza kojarzona jest z częścią podtypów raka metaplastycznego (np. rakiem wrzecionowatokomórkowym czy rakiem metaplastycznym z obecnością elementów heterologicznych). W przypadku MBC udowodniono ogólne gorsze przeżycie, gorszą odpowiedź na chemioterapię, wyższy stopień zaawansowania klinicznego choroby w chwili rozpoznania raka oraz bardziej agresywny przebieg niż w innych podtypach TNBC [67-69]. Przerzuty odległe mogą być stwierdzone u pacjentów z rozpoznaniem rakiem metaplastycznym mimo braku obecności przerzutów w węzłach chłonnych. Dotyczą one szczególnie mózgu i płuc [4]. Wyjątek od tej niekorzystnej biologii nowotworu stanowią dwa rzadkie podtypy raka metaplastycznego, czyli rak gruczołowo-płaskonabłonkowy o niskim stopniu złośliwości oraz rak metaplastyczny przypominający fibromatozę [63].

Zaobserwowano, że niezależnie od podtypu histologicznego duża część przypadków TNBC wykazuje pewne wspólne cechy mikroskopowe, do których należą: wyraźny pleomorfizm jądrowy, wysoki indeks mitotyczny, rozpychający typ wzrostu, obfity naciek limfocytarny w podścielisku guza, centralne włóknienie oraz nieznaczne różnicowanie cewkowe [4][55][70]. Ten charakterystyczny obraz mikroskopowy kojarzony z rakami typu TNBC dotyczy przede wszystkim nisko dojrzałych raków typu NST, raków z różnicowaniem apokrynowym, raków z cechami rdzeniastymi oraz części raków metaplastycznych [63].

1.4.3 Podtypy molekularne TNBC

Zróżnicowanie TNBC nie odnosi się jedynie do podtypów histologicznych, ale również do podtypów molekularnych [71]. Na podstawie analizy wielu genów w 2011 roku wyodrębniono 6 molekularnych podtypów TNBC. Były to: dwa podtypy podstawne 1 i 2 (*ang. basal-like, BL1 i BL2*), podtyp immunomodulujący (*ang. immunomodulatory, IM*), mezenchymalny (*ang. mesenchymal, M*), mezenchymalny typu stem-like (*ang. mesenchymal stem-like, MSL*), luminalny z ekspresją receptora androgenowego (*ang. luminal androgen receptor, LAR*) oraz podtyp zmienny (*ang. unstable, UNS*) [72]. W 2016 roku w związku

z poszerzonymi badaniami oraz analizą odpowiedzi potrójnie ujemnych raków piersi na leczenie chemioterapią zaproponowano nowy podział na nowe 4 główne podtypy molekularne: BL1, BL2, M oraz LAR. Grupy te zostały wydzielone na bazie poprzednio istniejących podtypów molekularnych TNBC [73].

W każdym z podtypów molekularnych w powstawaniu i rozwoju nowotworu biorą udział odmienne geny i ścieżki sygnałowe [73]. Zestawienie dotychczasowych sześciu podtypów molekularnych TNBC wraz z występującymi w nich zaburzeniami procesów komórkowych przedstawiono w tabeli 5 [73].

Tabela 5. Podtypy molekularne TNBC wraz z zaburzeniami procesów komórkowych w nich występującymi [73].

Podtyp TNBC	Zaburzenia komórkowe
BL1	Zwiększona ekspresja genów związanych z cyklem komórkowym i odpowiedzią na uszkodzenia DNA
BL2	Związany z czynnikami wzrostu i markerami mioepitelialnymi
IM	Geny kodujące antygeny odpornościowe, cytokiny oraz ścieżki sygnałów związanych z odpornością
M	Podwyższona ekspresja genów związanych z przemianą nabłonkowo-mezenchymalną. Szlaki sygnałów wzrostu
MSL	Podwyższona ekspresja genów związanych z przemianą nabłonkowo-mezenchymalną. Ścieżki sygnałów wzrostu. Zmniejszona ekspresja genów związanych z proliferacją
LAR	Ekspresja genów luminalnych. Związek z receptorem androgenowym

Niezależnie od podtypów molekularnych wskazuje się, że w grupie raków typu TNBC istotne znaczenie może mieć obecność nadekspresji receptora kinazy tyrozynowej c-Met. Receptor ten jest związany ze szlakami sygnałowymi c-Met, które inicjują przemiany nabłonkowo-mezenchymalne. Przemiany te opisywane są jako kluczowe zdarzenie w procesie powstawania przerzutów nowotworowych. Opisane zjawisko wiąże się z zanikaniem połączeń międzykomórkowych i wynikającą z tego utratą kohezji komórkowej, co może zwiększać zdolność nowotworu do naciekania otaczających go tkanek [74]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że nadekspresja tego receptora może być obecna nawet w ponad 50% przypadków TNBC [75][76].

Kolejnym genem, który jest istotny w trakcie diagnostyki i leczenia pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi jest gen *BRCA1*. Jest to gen supresorowy

nowotworów, odpowiadający za naprawę DNA, biorący udział w tzw. punktach kontrolnych cyklu komórkowego oraz mający wpływ na regulację transkrypcji i apoptozy [77]. Szacuje się, że wśród pacjentek z TNBC mutacja genu *BRCA1* występuje w ok. 15-25% przypadków [78]. Natomiast nie stwierdzono by u pacjentek z mutacją genu *BRCA2* częstość występowanie potrójnie ujemnego raka piersi była wyższa niż w ogólnej populacji pacjentek z rakiem piersi [79]. Wśród pacjentek z potwierdzoną mutacją genu *BRCA1* około 60-80% pacjentek w trakcie badań immunohistochemicznych ma profil IHC odpowiadający TNBC [78].

Dodatkowo na podstawie innych przeprowadzonych badań wskazuje się, że raki TNBC stanowią większość molekularnego podtypu raka piersi określanego jako claudin-low, związanego ze wspomnianą wcześniej przemianą nabłonkowo-mezenchymalną [80].

1.4.4 Leczenie TNBC

Podstawową metodą leczenia TNBC, podobnie jak pozostałych raków piersi, jest leczenie chirurgiczne. Rozpoznanie w trakcie diagnostyki immunohistochemicznej potrójnie ujemnego raka piersi nie jest w piersi przeciwwskazaniem do leczenia oszczędzającego. Udowodniono, że kwadrantektomia nie jest, w przypadku rozpoznania TNBC, związana z większym ryzykiem wznowy miejscowej po operacji. Za gorszą prognozę u tych pacjentów odpowiada nie rodzaj przeprowadzonego zabiegu chirurgicznego a biologia raka [81].

Ze względu na brak ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz brak nadekspresji białka HER-2 w komórkach guza pacjenci z TNBC nie odnoszą korzyści z leczenia hormonalnego i leczenia blokującego receptor HER-2 [82].

Leczeniem uzupełniającym do leczenia operacyjnego w przypadku TNBC pozostaje chemioterapia. Jest ona obecnie stosowana przede wszystkim w formie terapii neoadiuwantowej [83]. TNBC charakteryzuje się wysokim odsetkiem pacjentów, u których po leczeniu neoadjuwantowym stwierdzana jest, w badaniu mikroskopowym, całkowita odpowiedź guza na chemioterapię (*ang. pathological complete response, pCR*) [84]. Występuje ona u 17-58% pacjentów leczonych tym sposobem terapii [85-87]. Pacjenci z TNBC, u których mimo leczenia przedoperacyjnego stwierdzana jest choroba resztkowa (*ang. residual disease, RD*),

mają zdecydowanie krótszy czas przeżycia, niż pacjenci z chorobą resztkową oraz ekspresją receptora ER, PR i/lub nadekspresją białka HER-2. Powoduje to, że głównymi celami poszukiwań nowych terapii w TNBC są leki mogące wpływać na zwiększenie odsetka przypadków pCR oraz leki poprawiające rokowanie u chorych z chorobą resztkową [88-90].

Niezwykle istotne jest zatem poszukiwanie nowych ścieżek terapeutycznych u tych chorych. Ważne jest nie tylko uwzględnienie heterogenności molekularnej w tej grupie, ale również heterogenności histologicznej. Obecnie jako jedna z możliwych, nowych ścieżek terapeutycznych wskazywane jest zastosowanie immunoterapii [91][92].

2. Mikrośrodowisko nowotworu – definicja

W skład masy nowotworu złośliwego wchodzi nie tylko komórki nowotworowe, ale również wszystkie komórki i struktury je otaczające. Elementy te, wraz z wydzielanymi przez siebie substancjami, tworzą mikrośrodowisko nowotworowe (*ang. tumor microenvironment, TME*). TME jest nienowotworowym komponentem guza o bardzo złożonym składzie. Należą do niego: macierz pozakomórkowa (*ang. extracellular matrix, ECM*), makrofagi związane z guzem (*ang. tumor-associated macrophages, TAMs*), limfocyty T naciekające guz (*tumor infiltrating lymphocytes, TILs*), neutrofile, komórki dendrytyczne, fibroblasty, komórki tłuszczowe, naczynia, komórki mięśniowe, komórki nabłonkowe, komórki śródbłónka naczyń [93][94]. Elementy mikrośrodowiska nie tylko wpływają na siebie nawzajem, ale również wchodzi w liczne interakcje z komórkami nowotworowymi [95].

Istnieją dowody, że komórki nowotworowe poprzez wydzielanie czynników wzrostu, chemokin i cytokin również mogą rekrutować w swoje otoczenie komórki podścieliska, komórki układu odpornościowego, śródbłónki naczyń czyli wszystkie elementy stanowiące opisane wyżej mikrośrodowisko. Część z tych komórek wydzielają „w zamian” sygnały promujące wzrost guza oraz może wydzielają metabolity, które mogą wpływać na przebudowę struktury podścieliska. Sytuacja ta może w efekcie doprowadzić do rozwoju guza oraz ułatwiać powstawanie przerzutów [96].

Istotnym elementem mikrośrodowiska są limfocyty naciekające guz. Szacuje się, że w niektórych przypadkach raków piersi nacieki z limfocytów T może

stanowić w guzie nawet do 45% jego masy [97]. TILs wchodzące w skład mikrośrodowiska nowotworowego są zróżnicowaną grupą. Warto zwrócić uwagę, że należą do nich nie tylko limfocyty T CD4+ lub CD8+, ale również inne komórki takie jak: limfocyty regulatorowe (CD4+, CD25+, FoxP3+), komórki NK oraz limfocyty B. Jednak zdecydowana większość TILs to komórki CD4+ lub CD8+ [98]. W raku piersi obfity nacieki złożony z TILs, a w szczególności z limfocytów CD8+ jest skojarzony z lepszym rokowaniem [99]. Wnioskiem z licznych badań nad znaczeniem TILs w obrębie TME jest pozytywny efekt ich obecności, jaki mogą wywierać na przeżycie wolne od wznowy (*ang. progression-free survival, PFS*) oraz przeżycie ogólne (*ang. overall survival, OS*) [100][101]. Obecność TILs kojarzona jest również z lepszą odpowiedzią na chemioterapię [102][103]. Istnieją nieliczne prace badawcze wskazujące na korzystne znaczenie rokownicze związane z obecnością limfocytów B [104].

Innym istotnym elementem TME są makrofagi związane z guzem. TAMs pochodzą z monocytów obecnych we krwi [105][106], które są rekrutowane do mikrośrodowiska nowotworowego poprzez wydzielane przez to mikrośrodowisko cytokiny oraz stan miejscowego niedokrwienia obecny w nowotworze [105][107]. Komórki nowotworowe i komórki mikrośrodowiska nowotworowego już na wczesnym etapie wydzielają liczne cząsteczki i substancje rekrutujące makrofagi do TME [108]. Wśród TAMs stwierdza się występowanie dwóch subpopulacji komórkowych. Są to makrofagi typu M1 i makrofagi typu M2. Makrofagi M1 i M2 mogą przechodzić w siebie w procesie zwanym polaryzacją. Oba podgrupom przypisuje się odmienną rolę. Populacja komórek typu M1 uczestniczy w procesach odpowiedzi immunologicznej i reakcjach przeciwnowotworowych [109]. Makrofagi M2 związane są głównie z supresją immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej [110][111]. Makrofagi obecne w mikrośrodowisku guza należą głównie do subpopulacji M2 [105]. Do głównych pronowotworowych funkcji TAMs należą: indukcja angiogenezy (na przykład poprzez wydzielanie VEGF (*ang. vascular endothelial growth factor*, czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń), produkcja czynników wzrostu, indukcja przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, immunosupresja hamująca odpowiedź przeciwnowotworową [112]. Obecność TAMs, a szczególnie makrofagów M2 jest skojarzona z większym ryzykiem wystąpienia przerzutów odległych [113][114]. Szczególnie istotne znaczenie wydaje się mieć jeden z podtypów makrofagów M2 czyli makrofagi M2c, których powstawanie jest stymulowane przez cytokiny

przeciwwzapalne takie jak IL-10 (*ang. interleukin 10*, interleukina 10) i TGF- β (*ang. transforming growth factor β* , transformujący czynnik wzrostu beta). Cytokiny te mogą być wydzielane między innymi przez makrofagi. Makrofagi M2c wydzielają między innymi MMPs (*ang. matrix metalloproteinases*, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej), które są związane z przebudową ECM [115].

Innym elementem mikrośrodowiska, który może wspierać wzrost guza oraz hamować odpowiedź układu odpornościowego przeciwko nowotworowi, jest podgrupa limfocytów CD4+, a mianowicie limfocyty T regulatorowe. Limfocyty te wykazują ekspresję markerów CD4, CD25 oraz dodatkowo ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3 [116]. Limfocyty regulatorowe hamują aktywację zarówno komórek CD4+ jak i CD8+, mogą przez to wpływać na zahamowanie przeciwnowotworowej odpowiedzi zapalnej i immunologicznej [117]. Duża liczba limfocytów regulatorowych w obrębie guza jest kojarzona z krótszym czasem wolnym od nawrotów choroby [118].

3. Elementy oceny histopatologicznej w raku piersi

W trakcie oceny histopatologicznej materiału operacyjnego pochodzącego od pacjentek z rakiem piersi, zarówno tej makroskopowej jak i mikroskopowej, należy uwzględnić wiele elementów. Do elementów tych należą: pomiar średnicy guza, ocena marginesów chirurgicznych, ocena podtypu histologicznego raka, ocena stopnia dojrzałości histologicznej raka, określenie statusu węzłów chłonnych, ocena współwystępowania ognisk raka przedinwazyjnego, ocena obecności inwazji naczyniowej, ocena obecności owrzodzenia skóry [119]. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi WHO dodatkowym istotnym elementem oceny histopatologicznej, szczególnie w TNBC, jest również ocena TILs [4].

3.1 Ocena stopnia dojrzałości histologicznej raka piersi

Obowiązującym aktualnie systemem stosowanym do oceny stopnia dojrzenia histologicznego wszystkich raków piersi, w tym również TNBC, jest skala NHG (*ang. Nottingham Histologic Grading*). Skala ta jest zmodyfikowaną przez Elstona-Ellisa, skalą Scarff-Bloom-Richardsona [120].

W skali NHG ocenie podlegają trzy parametry: zdolność komórek raka do formowania cewek i/lub gruczołów, polimorfizm jąder komórkowych oraz liczba mitoz liczona w 10 polach widzenia pod dużym powiększeniem mikroskopu (powiększenie obiektywu mikroskopu 40x) (*ang. high power field, HPF*). Każda ze wspomnianych cech może zostać oceniona na 1, 2 lub 3 punkty. Suma punktów otrzymanych z trzech ocenianych parametrów decyduje o stopniu dojrzałości histologicznej raka (Tab.6) [121][122].

Tabela 6. Skala NHG (w modyfikacji Elstona-Ellisa) służąca do oceny stopnia dojrzałości histologicznej raka piersi [121][122].

Tworzenie cewek		
	Punkty	
> 75% utkania guza	1	
10-75% utkania guza	2	
< 10% utkania guza	3	
Polimorfizm jąder komórkowych		
małe, regularne, jednokształtne	1	
średnia różnorodność wielkości i kształtu	2	
znaczne różnice wielkości i kształtu i/lub mnogie jąderka	3	
Aktywność mitotyczna (liczba mitoz/10HPF)		
(dla średnicy pola widzenia obiektywu mikroskopu 0,55 mm)		
≤8	1	
9-17	2	
≥18	3	
Ogólna liczba punktów	stopień dojrzałości	Stopień zróżnicowania raka
3-5	I	dobrze zróżnicowany
6-7	II	średnio zróżnicowany
8-9	III	nisko zróżnicowany

Liczne badania wskazują, że ocena dojrzałości histologicznej raka piersi oparta o skalę NHG stanowi ważny czynnik rokowniczy u pacjentów z tym nowotworem i powinna być stałym elementem oceny patomorfologicznej we wszystkich przypadkach raka piersi [120][123].

3.2 Ocena stopnia zaawansowania raka piersi

Do oceny rozległości choroby nowotworowej (stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu) służy skala TNM. Skala ta powstała w latach czterdziestych i pięćdziesiątych ubiegłego wieku [124]. W kolejnych latach powstawały nowsze wersje skali TNM. Najnowszą, stosowaną obecnie edycją, skali TNM jest wydanie ósme. Skala TNM służy do określenia zaawansowania choroby nowotworowej zarówno przez lekarzy klinicystów (wówczas obowiązuje zapis cTNM) jak i lekarzy patomorfologów (wówczas obowiązuje zapis pTNM). W skali tej ocenie podlegają trzy parametry, do których należą: cecha T (od angielskiego słowa tumor czyli guz) będąca wyrazem średnicy guza lub rozległości nacieku otaczających tkanek przez guz pierwotny, cecha N (od nodus czyli węzeł) opisująca obecność lub brak przerzutów raka do regionalnych węzłów chłonnych oraz cecha M (od metastases czyli przerzuty) związana z obecnością bądź brakiem przerzutów odległych. Skala TNM ma zastosowanie we wszystkich typach nowotworów. Skala TNM dla raka piersi została przedstawiona w tabelach 7-9 [125].

Tabela 7. Składowa pT skali pTNM określająca miejscowe zaawansowanie guza pierwotnego w raku piersi [125].

pT-guz pierwotny		
Tx		nie można ocenić guza pierwotnego
T0		nie stwierdza się guza pierwotnego
Tis		rak przedinwazyjny (in situ)
T1		guz nie większy niż 2 cm
	T1mi	guz nie większy niż 0,1 cm (mikrorak)
	T1a	guz większy niż 0,1 cm ale nie większy niż 0,5 cm
	T1b	guz większy niż 0,5 cm ale nie większy niż 1 cm
	T1c	guz większy niż 1 cm ale nie większy niż 2 cm
T2		guz większy niż 2 cm ale nie większy niż 5 cm
T3		guz większy niż 5 cm
T4		guz każdej wielkości naciekający ścianę klatki piersiowej i/lub skórę (owrzodzenie lub guzki satelitarne skóry)
	T4a	naciekanie ściany klatki piersiowej (żebra, mięśnie międzyżebrowe, mięsień zębaty przedni) lecz nie mięśni piersiowych
	T4b	owrzodzenie, guzki satelitarne lub obrzęk skóry (nie spełniające kryteriów raka zapalnego)
	T4c	T4a i T4b jednocześnie
	T4d	rak zapalny (carcinoma inflammatorium)

Tabela 8. Składowa pN skali pTNM określająca status węzłów chłonnych u pacjentów z rakiem piersi [125].

pN - status węzłów chłonnych		
pNx		nie ma możliwości oceny węzłów chłonnych
pN0		nie ma przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
pN1		mikroprzerzuty lub przerzuty w 1 do 3 pachowych węzłach chłonnych i/lub przerzuty w węzłach chłonnych piersiowych wewnętrznych
	pN1mi	mikroprzerzuty (większe niż 0,2 mm i/lub > 200 komórek, ale żaden nie większy niż 2mm)
	pN1a	przerzuty w 1–3 pachowych węzłach chłonnych (w tym w co najmniej jeden większy niż 2 mm)
	pN1b	przerzuty w węzłach chłonnych piersiowych wewnętrznych
	pN1c	przerzuty w 1–3 pachowych węzłach chłonnych i węzłach chłonnych piersiowych wewnętrznych
pN2		przerzuty w 4–9 pachowych węzłach chłonnych lub przerzuty w węzłach chłonnych piersiowych wewnętrznych przy braku przerzutów w pachowych węzłach chłonnych
	pN2a	przerzuty w 4–9 pachowych węzłach chłonnych (w tym w co najmniej jeden > 2 mm)
	pN2b	przerzuty w węzłach chłonnych piersiowych wewnętrznych przy braku przerzutów w pachowych węzłach chłonnych
pN3		przerzuty w 10 lub więcej pachowych węzłach chłonnych lub przerzuty w podobojczykowych węzłach chłonnych lub pN3b lub przerzuty w nadobojczykowych węzłach chłonnych
	pN3a	przerzuty w 10 lub więcej pachowych węzłach chłonnych, w tym w co najmniej jeden > 2 mm lub przerzuty w podobojczykowych węzłach chłonnych (III piętro dołu pachowego)
	pN3b	przerzuty wykryte klinicznie w węźle/węzłach chłonnych piersiowych wewnętrznych po stronie guza z obecnością przerzutów do węzła/węzłów chłonnych pachowych; lub przerzuty w więcej niż 3 węzłach chłonnych pachowych i w węzłach chłonnych piersiowych wewnętrznych (mikroprzerzuty lub makroprzerzuty) wykryte za pomocą biopsji węzła wartowniczego, bez klinicznych cech przerzutów
	pN3c	przerzuty w nadobojczykowych węzłach chłonnych

Tabela 9. Składowa pM skali pTNM określająca obecność lub brak przerzutów odległych u chorych z rakiem piersi [125].

pM – obecność przerzutów odległych	
M0	przerzut odległy nieobecny
M1	przerzut odległy obecny

II. CELE PRACY

Potrójnie ujemny rak piersi wiąże się z gorszym rokowaniem i agresywniejszym przebiegiem choroby nowotworowej. Z tym podtypem biologicznym nowotworu związane są ograniczone możliwości terapeutyczne. Mikrośrodowisko nowotworowe stanowi ważny element nowotworu. Ze względu na poszukiwanie nowych potencjalnych ścieżek terapii w potrójnie ujemnym raku piersi istotne jest poznanie związków jakie łączą komórki nowotworowe z elementami mikrośrodowiska.

1. Próba scharakteryzowania TNBC jako podtypu biologicznego.
2. Określenie elementów mikrośrodowiska w potrójnie ujemnym raku piersi.
3. Próba określenia zależności pomiędzy elementami mikrośrodowiska a cechami histopatologicznymi nowotworu.

III. MATERIAŁ I METODY

1. Materiał

1.1 Materiał tkankowy

Badaniem objęto zanonimizowany, archiwalny materiał tkankowy zgromadzony w latach 2011-2017 w formie bloczków parafinowych w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii. Źródłem materiału tkankowego były pooperacyjne preparaty chirurgiczne uzyskane drogą zabiegu częściowego (kwadrantektomia) lub całkowitego (mastektomia) usunięcia piersi. Do badania wybrano bloczki parafinowe zawierające reprezentatywny fragment guza piersi.

O zaplanowanych badaniach poinformowano Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Komisja Bioetyczna nie wyraziła sprzeciwu na przeprowadzenie badań.

1.2 Grupa badana

Kryterium włączenia pacjentów do grupy badanej było rozpoznanie potrójnie ujemnego raka piersi. Rozpoznanie to oparte było o ocenę histopatologiczną guza oraz wykonane badania immunohistochemiczne (określenie statusu receptora estrogenowego i progesteronowego oraz ocena ekspresji białka HER-2), a także w części przypadków o ocenę metodą FISH (*ang. fluorescent in situ hybridization*, fluorescencyjna hybrydyzacja in situ). W każdym przypadku, w trakcie oceny histopatologicznej, wykonano także barwienie immunohistochemiczne w celu oceny wartości Ki-67 (wartość Ki-67 określona została w komórkach raka w trakcie oceny mikroskopowej).

Zgromadzony materiał poddano weryfikacji przez dwóch lekarzy patomorfologów. Do grupy badanej nie kwalifikowano przypadków, w których miała miejsce przedoperacyjna chemioterapia. Wszystkie analizowane przypadki dotyczyły kobiet.

Grupa badana składała się z 312 przypadków. Początkowo do badania zakwalifikowano 337 przypadków, jednak ze względu na ubytek tkanek w trakcie przygotowania skrawków do barwień immunohistochemicznych wyłączono z dalszych badań 25 przypadków.

Grupę badaną scharakteryzowano ze względu na wiek pacjentek w chwili rozpoznania raka piersi, średnicę guza (maksymalny wymiar), podtyp histologiczny raka piersi, stopień dojrzałości nowotworu (oceniony w skali NHG), cechę T (określoną zgodnie ze skalą TNM), liczbę mitoz/10 HPF, wysokość Ki-67 (w komórkach raka, liczoną na 1000 komórek) oraz obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych (cecha N). Średnią wieku w chwili rozpoznania TNBC, średnią wartości Ki-67 oraz średnią liczby mitoz na 10 HPF zaokrąglono do całości.

Wiek pacjentek w badanej grupie wahał się między 24. a 88. rokiem życia (średnio wynosił 56 lat). 106 pacjentek miało 50 lat bądź mniej. Maksymalna średnica poszczególnych guzów nowotworowych wynosiła od 0,3 cm do 20,0 cm (średnio 2,8 cm).

U 93 pacjentek w chwili rozpoznania TNBC stwierdzono obecność przerzutów do węzłów chłonnych pachowych. Minimalna liczba zajętych węzłów chłonnych wynosiła 1, maksymalna zaś 22. Średnia liczba zajętych węzłów chłonnych u pacjentek z potwierdzonymi przerzutami wynosiła 4. W 219 przypadkach nie stwierdzono obecności przerzutów w węzłach chłonnych. Zatem zgodnie z klasyfikacją TNM, w 219 przypadkach status węzłów chłonnych określono jako pN0. W 58 przypadkach jako pN1, w 24 jako pN2, natomiast w 11 przypadkach jako pN3.

W każdym przypadku zmierzono maksymalną średnicę guza oraz na jej podstawie określono stopień pT nowotworu. W grupie badanej występowały stopnie: pT1a, pT1b, pT1c, pT2, pT3 oraz pT4. Liczba pacjentów w każdej z podgrup wynosiła odpowiednio: 4, 17, 96, 172, 15, 8.

Najczęstszym podtypem histologicznym raka piersi w badanej grupie był rak typu NST. Rozpoznano go w 266 przypadkach. W 19 przypadkach raka NST stwierdzono obecność układów rdzeniastych. W jednym przypadku raka NST stwierdzono obecność cech cewkowych. W jednym z guzów (typu NST) stwierdzono obecność różnicowania neuroendokrynnego. W 20 przypadkach rozpoznano raka inwazyjnego z obecnością różnicowania apokrynowego, w 6 przypadkach rozpoznano raka mikrobrodawkowego. U 14 pacjentek rozpoznano raka metaplastycznego, u 3 raka gruczołowo-torbielowatego, u 2 raka zrazikowego. U 1 pacjentki rozpoznano

raka brodawkowatego inwazyjnego. W 116 przypadkach oprócz raka inwazyjnego stwierdzono obecność zmian przedinwazyjnych typu przewodowego (*ang. ductal carcinoma in situ, DCIS*).

Wszystkie rozpoznane raki piersi typu TNBC oceniono zgodnie ze skalą NHG. W 8 przypadkach ustalono stopień dojrzałości guza jako NHG1, w 47 jako NHG2, najczęściej występował stopień NHG3, który stwierdzono w 257 przypadkach.

Średnia liczba mitoz na 10 HPF w całej grupie badanej wynosiła 30. W jednym przypadku w 10 dużych polach widzenia nie stwierdzono żadnej mitozy, w pozostałych przypadkach mitozy były obecne. Najmniejsza liczba mitoz na 10 HPF wynosiła 0, największa zaś 200. Średnia wartość Ki-67 w badanej grupie wynosiła 60%, najwyższa stwierdzona wartość wynosiła 100%, najniższa natomiast 1%.

W 30 przypadkach w trakcie oceny histopatologicznej stwierdzono obecność inwazji naczyń limfatycznych w okolicy guza.

Zebrane dane przedstawiono w tabeli 10 i 11. Rozkład podtypów histologicznych w badanej grupie przedstawiony został na rycinie 2.

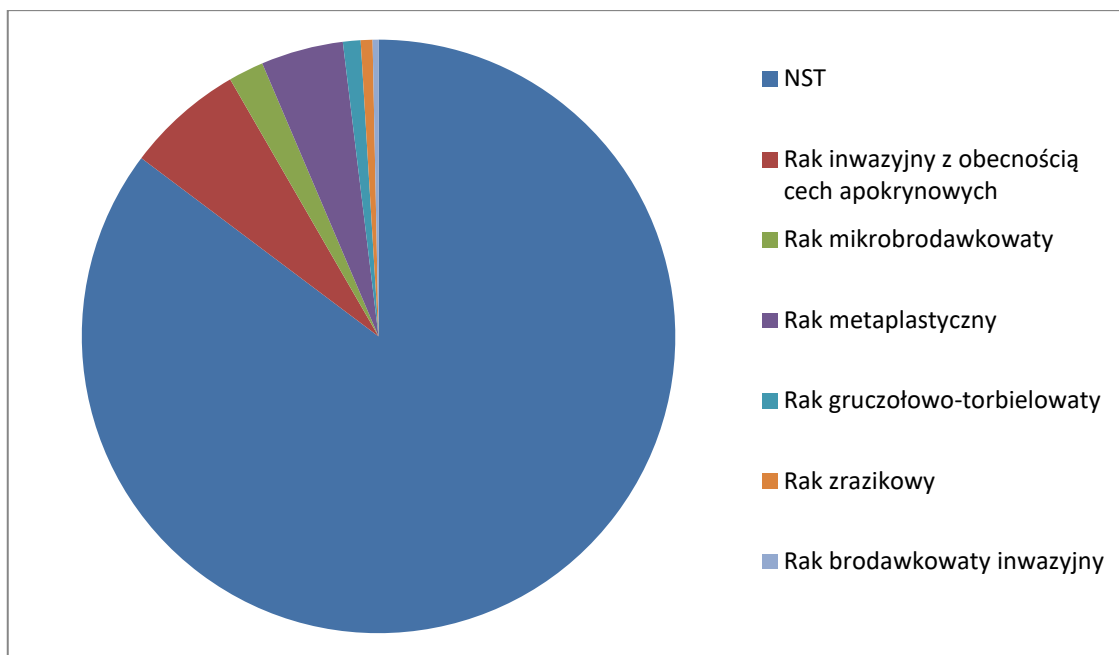
Tabela 10. Wartości minimalne, maksymalne oraz średnie dla: wieku pacjentek w chwili rozpoznania raka, średnicy guza, liczby mitoz/10HPF, wartości Ki-67 w grupie badanej.

	Minimum	Maksimum	Średnia
Wiek (w latach)	24	88	56*
Średnica guza (w cm)	0,3	20	2,8
Mitozy	0	200	30*
Ki-67	1	100	60*

*zaokrąglono do całości.

Tabela 11. Rozkład pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi w grupie badanej w zależności od stopnia pT, stopnia pN oraz stopnia dojrzałości nowotworu w skali NHG.

pT (liczba przypadków)	pN (liczba przypadków)	NHG (liczba przypadków)
pT1a- 4 pT1b-17 pT1c- 96 pT2-172 pT3- 15 pT4- 8	pN0- 219 pN1- 58 pN2- 24 pN3- 11	NHG 1-8 NHG 2-47 NHG 3-257



Rycina 2. Rozkład podtypów histologicznych raka piersi w badanej grupie.

2. Metody

2.1 Przygotowanie materiału

Materiał tkankowy stanowiły fragmenty guzów usuniętych w czasie rutynowych zabiegów mastektomii lub kwadrantektomii pochodzące od pacjentek z rozpoznaniem wcześniej histopatologicznie rakiem inwazyjnym piersi. Materiał pooperacyjny od tych pacjentek został utrwalony w 10% zbuforowanej formalinie. Po utrwaleniu w trakcie oceny makroskopowej pobrano reprezentatywne wycinki z guzów piersi. Pobrane wycinki zostały opracowane według standardowej procedury przy użyciu procesora tkankowego Pahos Delta (Milestone). W trakcie kolejnych etapów opracowywane wycinki zostały zatopione w parafinie i skrojone na mikrotomie na skrawki grubości 4 μm . Następnie umieszczono je na szkiełkach podstawowych Pathosolutions (Elektromed). Wszystkie przygotowane preparaty zostały zabarwione standardowym barwieniem hematoksyliną i eozyną przy użyciu aparatu ST 5020 (Leica).

2.2 Badania immunohistochemiczne

2.2.1 Przygotowanie mikromacierzy

W celu wykonania badań immunohistochemicznych wykonano mikromacierze tkankowe (*ang. tissue microarrays*, TMAs). W trakcie tworzenia TMAs z każdego guza zatopionego w parafinie pobrano trzy cylindryczne rdzenie tkankowe. Miejsca pobrania rdzeni tkankowych zostały określone wcześniej przez patomorfologa na podstawie preparatów mikroskopowych barwionych hematoksyliną i eozyną i zawierały fragmenty wewnątrznowotworowego podścieliska wraz z naciekającymi je komórkami mikrośrodowiska. Do pobrania rdzeni tkankowych użyto aparatu Minicore (Mitogen). Średnica każdego rdzenia wynosiła 0,15 cm. Następnie pobrane rdzenie tkankowe zostały umieszczone w uprzednio przygotowanym bloczku parafinowym. Przygotowano 7 mikromacierzy zawierających odpowiednio 50, 50, 50, 50, 50, 50 i 37 przypadków.

Z przygotowanych bloczków zawierających rdzenie tkankowe skrojono następnie na mikrotomie skrawki o grubości 4 μm . Skrawki umieszczono na szkiełkach podstawowych Superfrost (Menzel-Glaser). Ze względu na ubytki tkankowe, w trakcie przygotowania TMA, do ostatecznej analizy zakwalifikowano 312 przypadków.

2.2.2 Reakcje immunohistochemiczne

Na przygotowanych z mikromacierzy skrawkach przeprowadzono badania immunohistochemiczne w celu wykrycia antygenów: CD4, CD8, FoxP3, CD68, CD163, CD19, CD56, CD138, CD1a. W trakcie badań immunohistochemicznych użyto przeciwciał zestawionych w tabeli 12.

Tabela 12. Zestawienie przeciwciał zastosowanych w przeprowadzonych reakcjach immunohistochemicznych wraz z reakcjami kontrolnymi przeprowadzonymi dla poszczególnych przeciwciał.

Antygen	Klon	Rodzaj przeciwciała	Firma	Nr katalogowy	Rozcieńczenie	Kontrola
CD4	Clone4B12	Monoklonalne mysie	DAKO	IR 649	Gotowe do użycia	Migdałek
CD8	CloneC8/144 B	Monoklonalne mysie	DAKO	GA623	Gotowe do użycia	Migdałek
FoxP3	Clone236A/E7	Monoklonalne mysie	abcam	20034	1:100	Migdałek
CD68	CloneKP1L26	Monoklonalne mysie	DAKO	GA609	Gotowe do użycia	Migdałek
CD163	Clone MRQ-26	Monoklonalne mysie	Cell Marque	MRQ-26	Gotowe do użycia	Tkanka zapalna
CD19	CloneLE-CD19	Monoklonalne mysie	DAKO	IR 656	Gotowe do użycia	Migdałek
CD56	Clone123C3	Monoklonalne mysie	DAKO	IR 628	Gotowe do użycia	Wyrostek robaczkowy
CD138	CloneMI15	Monoklonalne mysie	DAKO	GA642	Gotowe do użycia	Migdałek
CD1a	CloneQ10	Monoklonalne mysie	DAKO	IR 069	Gotowe do użycia	Skóra

3. Ocena immunohistochemiczna

Ocenie immunohistochemicznej podlegała reakcja z przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom związanym z komórkami mogącymi wchodzić w skład mikrośrodowiska nowotworowego. Do antygenów tych należały: CD4, CD8, FoxP3, CD68, CD163, CD19, CD56, CD138, CD1a.

W celu oceny ekspresji antygenów związanych z elementami mikrośrodowiska w badanych tkankach zastosowano półilościową skalę IRS (*ang. immunoreactive score*) w modyfikacji według Remmele i Stegner (Tab.13) [126]. W trakcie oceny za pomocą skali IRS brane są pod uwagę dwa parametry: odsetek komórek wykazujących odczyn dodatni w reakcji z użytym przeciwciałem (A) oraz intensywność reakcji immunohistochemicznej (B). Odsetek komórek wykazujących odczyn dodatni oceniany jest od 0 do 4, natomiast intensywność reakcji oceniana jest od 0 do 3. Wartość końcową stanowi iloczyn tych dwóch cech, będący wartością z przedziału 0-12 punktów [126].

Tabela 13. Skala IRS (immunoreactive score) wg Remmele i Stegner. Ostateczny wynik stanowi iloczyn % komórek immunopozytywnych z intensywnością reakcji [126].

Skala IRS (0-12 punktów)	
A- Liczba komórek immunopozytywnych	B- Intensywność reakcji
0: brak komórek z pozytywną reakcją	0: brak reakcji barwnej
1: do 10% komórek z pozytywną reakcją	1: słabo nasilona reakcja barwna
2: 11 do 50% komórek z pozytywną reakcją	2: średnio nasilona reakcja barwna
3: 51 do 80% komórek z pozytywną reakcją	3: intensywna reakcja barwna
4: >80% komórek z pozytywną reakcją	
Iloczyn A x B	

W trakcie analizy brano pod uwagę reakcję dodatnią stwierdzoną w komórkach mikrośrodowiska guza obecnych w podścielisku nowotworu. Z oceny wykluczono komórki naciekające bezpośrednio gniazda komórek nowotworowych oraz obszary zawierające martwicę.

4. Metody statystyczne

Bazę danych opartą o informacje kliniczno-patomorfologiczne, oparte na niej wykresy oraz wyniki oceny poziomów ekspresji antygenów w przeprowadzonych reakcjach immunohistochemicznych przygotowano z pomocą programu Excel 2007 (Microsoft). Analizy statystyczne wykonano za pomocą programu Staristica wersja 9.1 (StatSoft).

Analizę porównawczą danych przeprowadzono za pomocą metod nieparametrycznych z wykorzystaniem testu U Manna-Whitneya oraz testu Kruskala-Wallisa. Za różnicę istotną statystycznie przyjęto wartości $p < 0,05$.

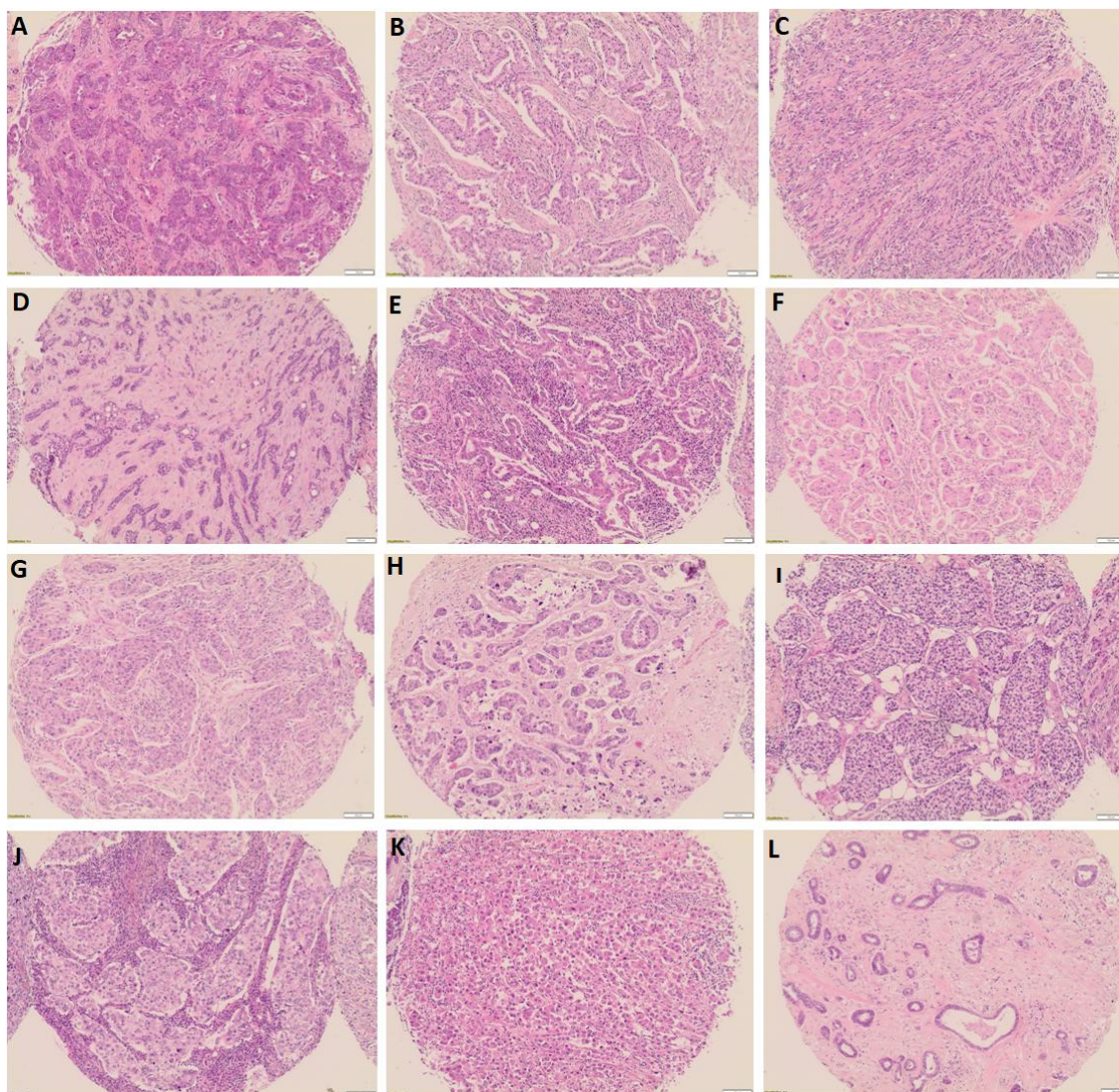
Standardową analizę korelacji danych przeprowadzono przy pomocy metod nieparametrycznych z wykorzystaniem testu korelacji porządku rang Spearmana.

IV. WYNIKI

1. Zróżnicowanie budowy histologicznej guzów w grupie badanej

We wszystkich przypadkach badanych potrójnie ujemnych raków piersi była obecna przynajmniej część z następujących cech budowy morfologicznej: wyraźny pleomorfizm jądrowy, lity, rozpychający typ wzrostu guza, liczne mitozy, wyraźne jąderka komórkowe. W części guzów obecne były ogniska martwicy nowotworowej. W podścielisku wielu guzów obecny był obfity naciek zapalny. Pomimo występowania tych wspólnych cech, w trakcie badania mikroskopowego wycinków guzów pochodzących od pacjentek z grupy badanej, stwierdzono duże zróżnicowanie budowy histologicznej analizowanych przypadków. Przykładowe mikrofotografie przedstawiające różnice budowy histologicznej pomiędzy poszczególnymi przypadkami w grupie badanej przedstawiono na rycinie 3.

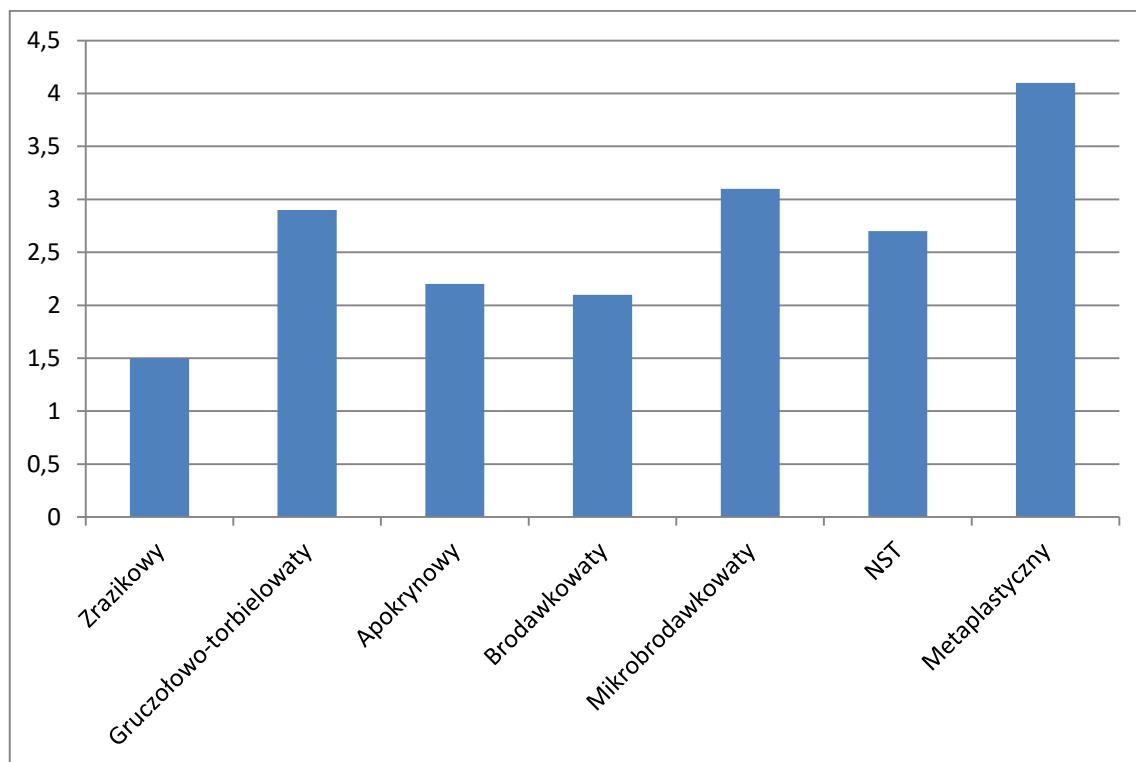
W trakcie analizy zebranych danych podjęto próbę zróżnicowania podtypów histologicznych TNBC w grupie badanej względem typu komórek wchodzących w skład ich mikrośrodowiska. Nie znaleziono żadnych związków pomiędzy obecnością w komórkach mikrośrodowiska badanych markerów a podtypem histologicznym nowotworu.



Rycina 3. Mikrofotografie przedstawiające zróżnicowanie budowy histologicznej potrójnie ujemnych raków piersi w obrębie grupy badanej (powiększenie obiektywu mikroskopu 5x). A., B., C., D., G., H., I., J. Rak typu NST, E. Rak brodawkowaty, F. Rak z obecnością różnicowania apokrynowego, K. Rak zrazikowy, L. Rak NST z obecnością cech cewkowych.

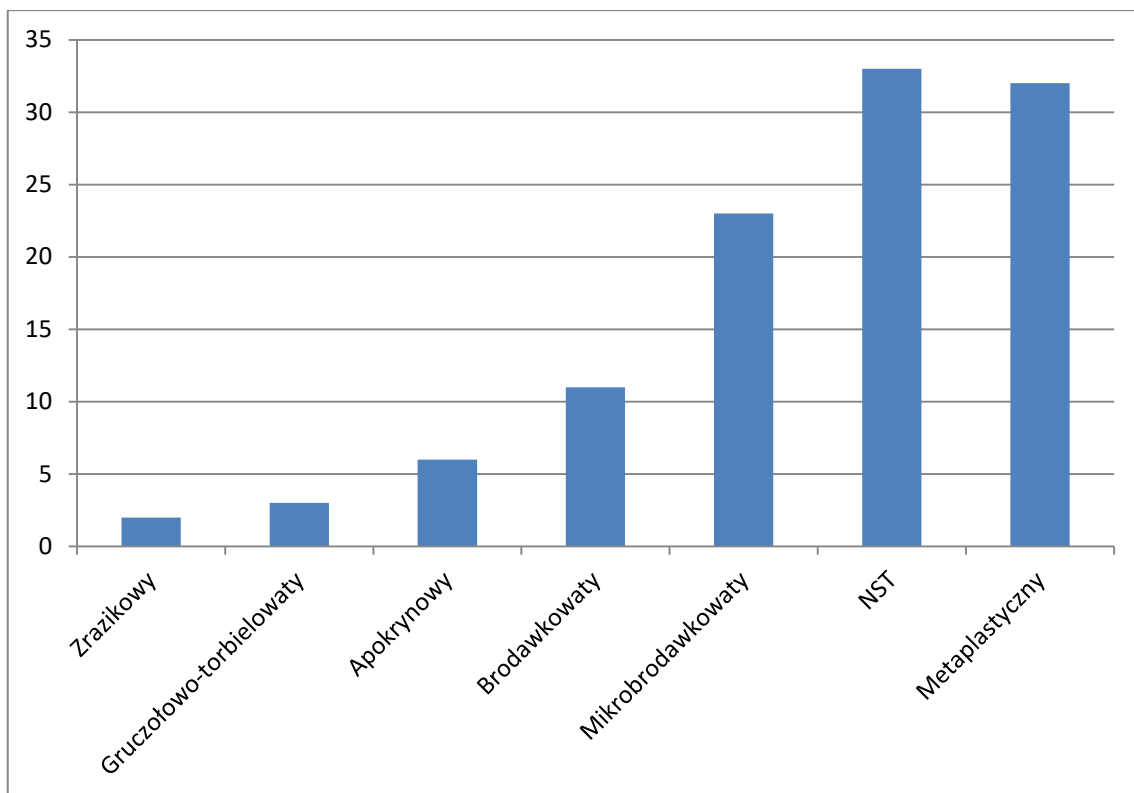
Dokonano analizy występowania zależności pomiędzy średnią średnicy guza, średnią liczby mitoz/10HPF, średnią wartości Ki-67 oraz średnią wieku w chwili rozpoznania raka piersi pacjentek z grupy badanej a podtypem histologicznym raka rozpoznany w trakcie badania histopatologicznego. Powyższe analizy wykonano dla wszystkich podtypów histologicznych raka stwierdzonych w grupie badanej. W związku z tym w badaniu analizowano dane dla raka typu NST, raka metaplastycznego, raka mikrobrodawkowatego, raka z różnicowaniem apokrynowym, raka brodawkowatego, raka gruczołowo-torbielowatego oraz raka zrazikowego.

Najwyższą średnią średnicy guza w badanej grupie stwierdzono w przypadku raka metaplastycznego, najniższą zaś w przypadku raka zrazikowego, wynosiła ona odpowiednio 4,1 i 1,5 cm. W pozostałych podgrupach średnia średnicy guza wynosiła odpowiednio 3,1 dla raka mikrobrodawkowatego, 2,9 dla raka gruczołowo-torbielowatego, 2,7 dla raka typu NST, 2,2 dla raka z różnicowaniem apokrynowym, 2,1 dla raka brodawkowatego (Ryc. 4).



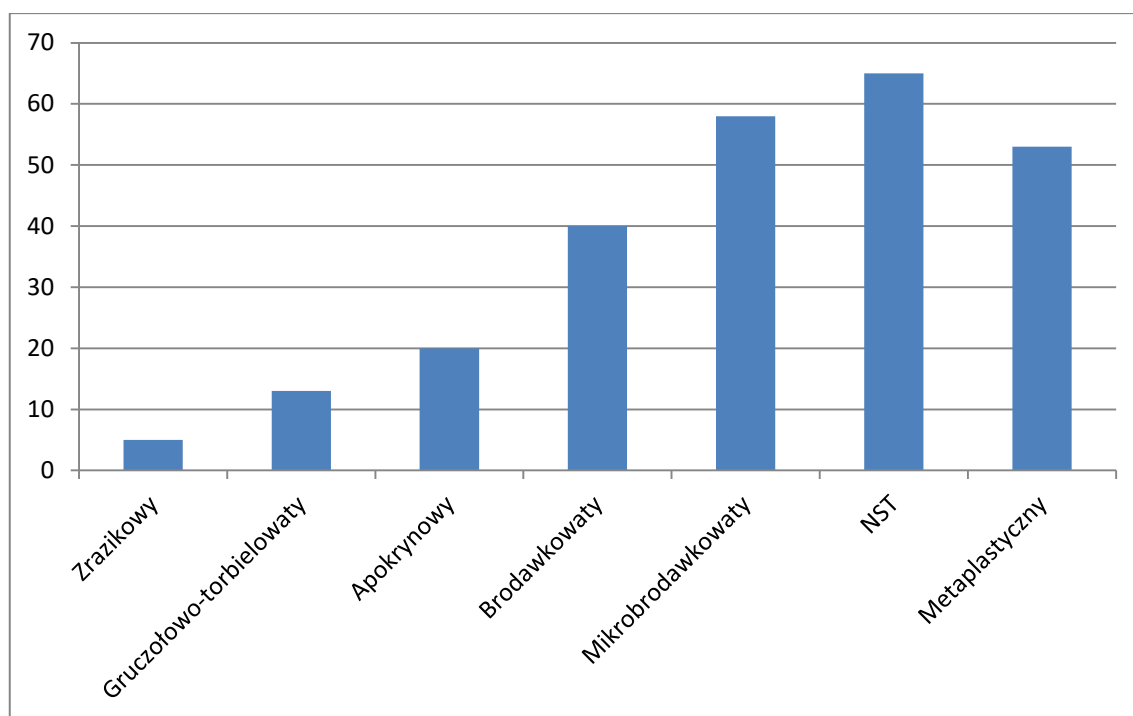
Rycina 4. Wykres kolumnowy przedstawiający średnicę guza (średnia) w zależności od rozpoznanego podtypu histologicznego raka piersi w grupie badanej.

Najwyższą średnią liczby mitoz liczonych na 10 dużych pól widzenia mikroskopu (w zaokrągleniu do całości) stwierdzono w przypadku raka typu NST. Wynosiła ona 33 mitozy/10HPF. Zbliżony wynik stwierdzono w przypadku raka metaplastycznego (32 mitozy/10HPF). W raku mikrobrodawkowatym stwierdzono średnio 23 mitozy/10 HPF, w raku brodawkowatym 11, w raku z różnicowaniem apokrynowym 6, w raku gruczołowo-torbielowatym 3, zaś w raku zrazikowym stwierdzono 2 mitozy/10HPF (Ryc. 5).



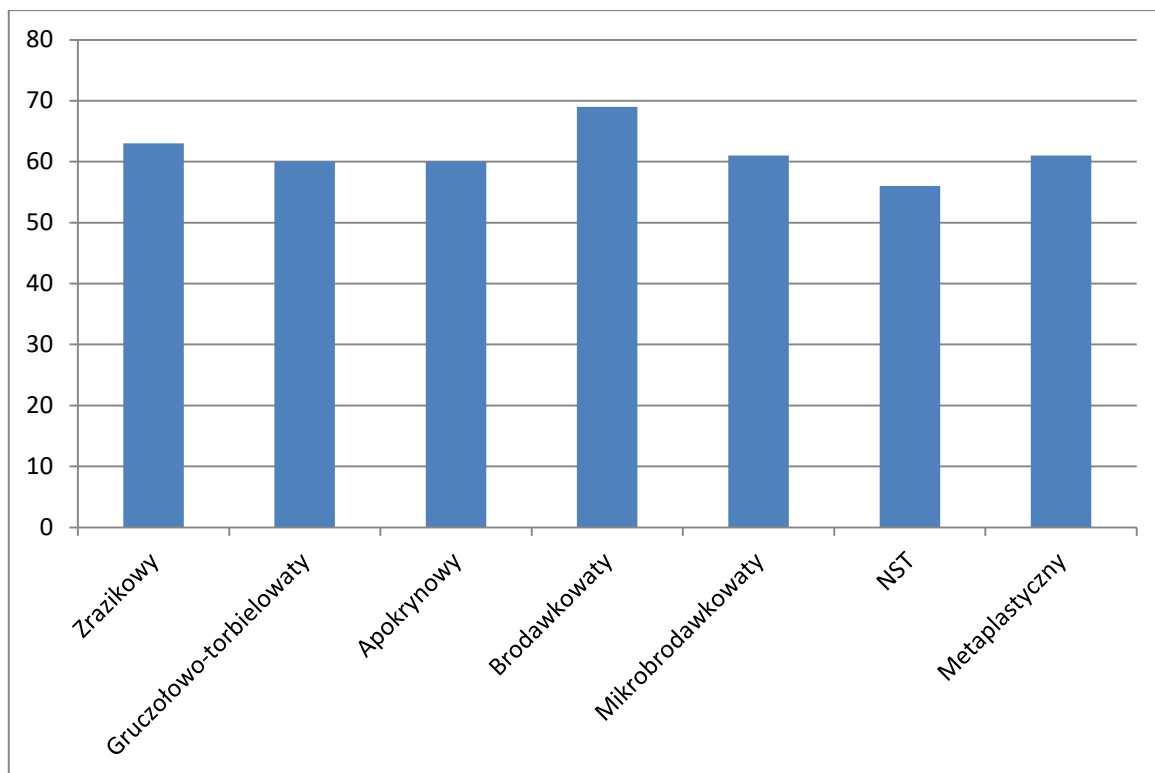
Rycina 5. Wykres kolumnowy przedstawiający liczbę mitoz (średnia zaokrąglona do całości) liczonych na 10 dużych polach widzenia mikroskopu w zależności od rozpoznanego podtypu histologicznego raka piersi w grupie badanej.

Średnia wartość Ki-67 w badanej grupie (w zaokrągleniu do całości) była najwyższa w raku typu NST, najniższa zaś w raku zrazikowym (65 vs 5). Wysoka średnia wartość Ki-67 występowała także w raku metaplastycznym (53) oraz raku mikrobrodawkowatym (58). W raku brodawkowatym wartość ta wynosiła 40, w raku z różnicowaniem apokrynowym 20, w raku gruczołowo-torbielowatym natomiast 13 (Ryc. 6).



Rycina 6. Wykres kolumnowy przedstawiający wartości Ki-67 (średnia zaokrąglona do całości) w zależności od rozpoznanego podtypu histologicznego raka piersi w grupie badanej.

Średnia wieku pacjentek w chwili rozpoznania w przypadku raka typu NST wynosiła 56 lat. W pozostałych podgrupach średnia otrzymanych wartości wynosiła 60 lat bądź więcej i wynosiła ona odpowiednio: 60 dla raka z różnicowaniem apokrynowym i dla raka gruczołowo-torbielowatego, 61 dla raka mikrobrodawkowego i metaplastycznego, 63 dla raka zrazikowego oraz 69 dla raka brodawkowego (Ryc. 7).



Rycina 7. Wykres kolumnowy przedstawiający średni wiek pacjentek w chwili rozpoznania potrójnie ujemnego raka piersi (w zaokrągleniu do całości) w zależności od rozpoznanego podtypu histologicznego guza w grupie badanej.

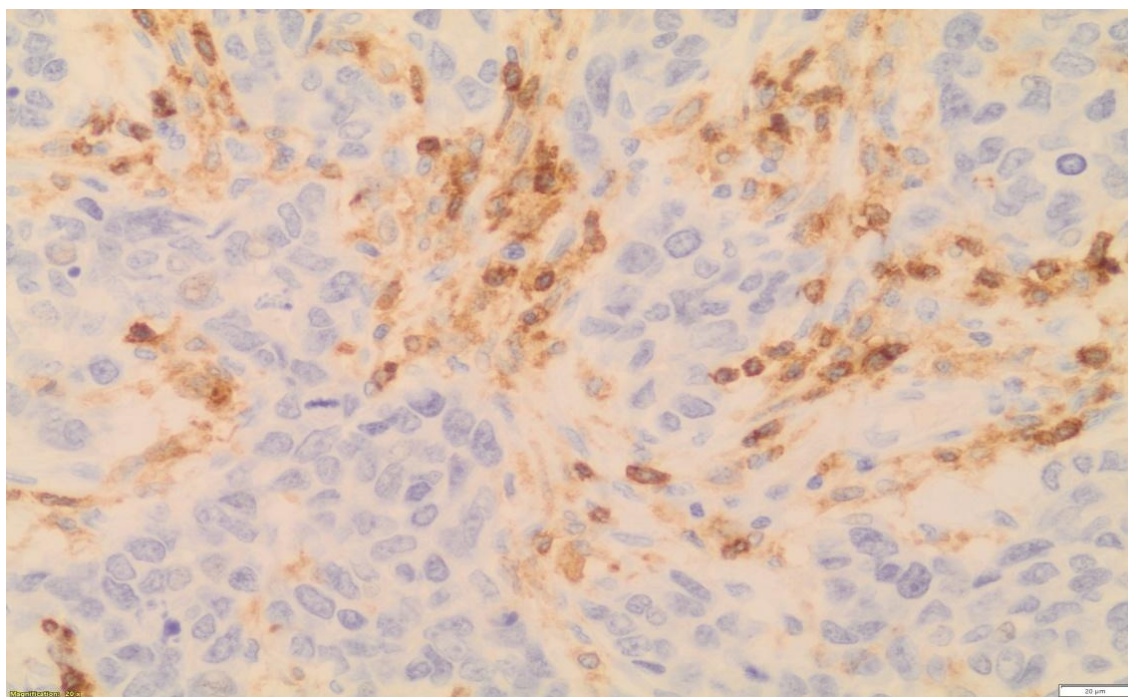
Nie wykazano zależności pomiędzy pozostałymi danymi wynikającymi z oceny histopatologicznej (obecność DCIS, obecność inwazji naczyń, obecność owrzodzenia skórniego) a podtypami histopatologicznymi raka piersi w grupie badanej.

2. Wyniki oceny ekspresji wybranych antygenów w badaniach immunohistochemicznych

Analiza odczynów immunohistochemicznych miała na celu ocenę obecności antygenów związanych z elementami komórkowymi wchodzącymi w skład mikrośrodowiska nowotworowego. Wykonano odczyny immunohistochemiczne dla antygenów: CD4, CD8, CD68, FoxP3, CD163, CD19, CD56, CD138, CD1a. Wyniki badań IHC zostały ocenione zgodnie z opisaną wcześniej skalą IRS [126].

2.1 CD4

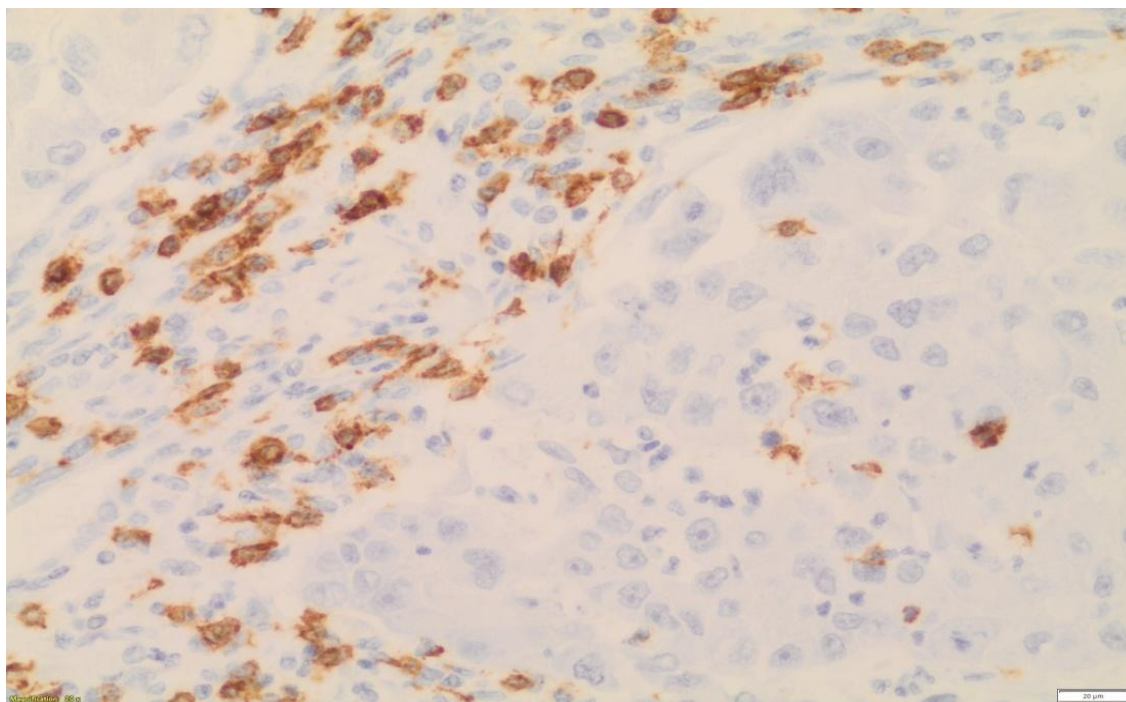
Obecność komórek CD4⁺ w mikrośrodowisku potwierdzona została w 300 na 312 badanych przypadków (96,15 %). Obserwowano reakcję błonowo-cytoplazmatyczną. Miała ona średnią lub dużą intensywność. W 120 przypadkach stwierdzono, że dodatnia reakcja z przeciwciałem przeciwko CD4 dotyczyła więcej niż 50% komórek występujących w mikrośrodowisku badanych guzów (w tym w 8 przypadkach komórki CD4⁺ stanowiły ponad 80% komórek mikrośrodowiska). W 151 przypadkach dodatnia reakcja z użytym przeciwciałem przeciwko CD4 występowała w 11-50% komórek mikrośrodowiska. W 29 przypadkach komórki z dodatnią reakcją skierowaną przeciwko CD4 stanowiły 10% lub mniej wśród komórek mikrośrodowiska. W 12 przypadkach nie stwierdzono występowania reakcji z przeciwciałem przeciwko CD4. Mediana otrzymanych wyników ekspresji CD4 w komórkach mikrośrodowiska (przy zastosowaniu skali IRS) wyniosła 4, średnia 5,4, odchylenie standardowe 2,79. Komórki wykazujące ekspresję CD4 występowały w obrębie całego mikrośrodowiska, miały ponadto tendencję do skupiania się w większe grupy (Ryc.8)(Ryc.19).



Rycina 8. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD4 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu (powiększenie obiektywu mikroskopu 20x).

2.2 CD8

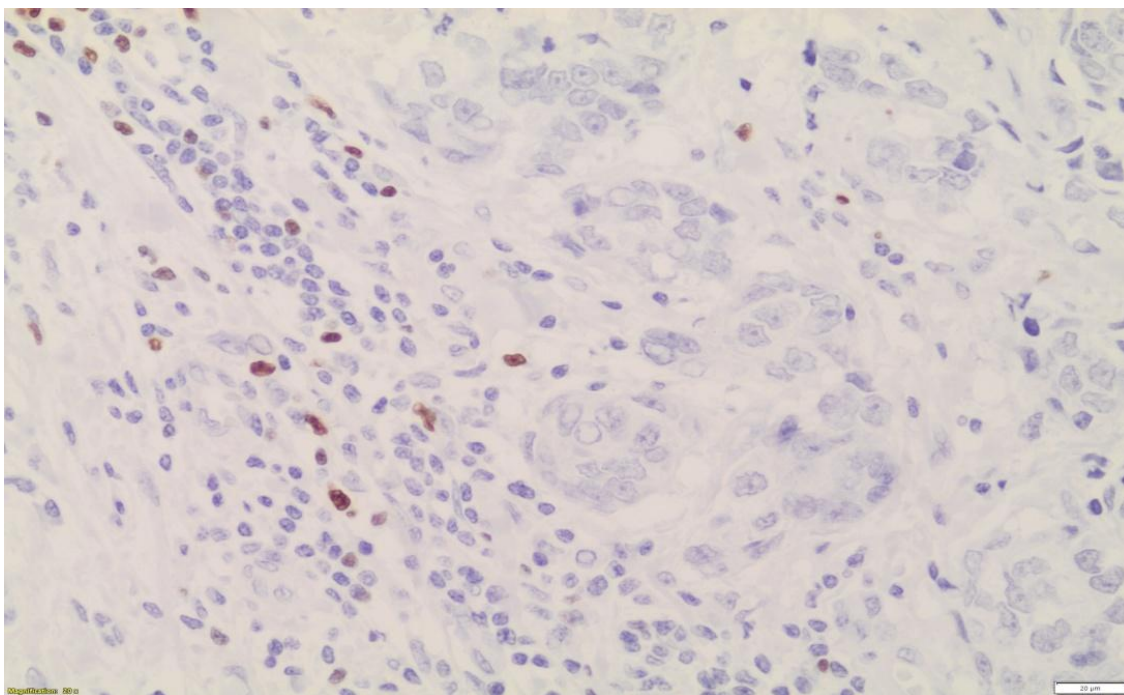
Stwierdzono obecność komórek CD8+ w 96,15% przypadków (300/312). W 54 przypadkach stwierdzono, że komórki wykazujące ekspresję CD8 stanowiły ponad 50% elementów mikrośrodowiska. W 193 przypadkach dodatni odczyn dotyczył 11-50% komórek mikrośrodowiska. W 12 przypadkach nie stwierdzono występowania reakcji z przeciwciałem skierowanym przeciwko CD8. W 53 przypadkach dodatnia reakcja z przeciwciałem przeciwko CD8 była obecna w 10% lub mniej komórek mikrośrodowiska. Obserwowane odczyny immunohistochemiczne miały duże nasilenie. Po zastosowaniu użytej skali IRS średnia otrzymanych wyników ekspresji CD8 w komórkach mikrośrodowiska wyniosła 5,36, mediana 6, odchylenie standardowe natomiast 2,27 (Ryc. 9). W trakcie analizy barwienia wykrywającego obecność komórek CD8+ w mikrośrodowisku nowotworowym stwierdzono ich obecność również w gniazdach raka inwazyjnego. Te komórki nie były brane pod uwagę w ocenie liczby komórek CD8+ w mikrośrodowisku. Analiza obejmowała jedynie komórki związane z podścieliskiem badanych raków piersi. Silna reakcja z przeciwciałem skierowanym przeciwko CD8 występowała w komórkach równomiernie rozłożonych w mikrośrodowisku. Zazwyczaj dotyczyła ona rozrzuconych, nie skupiających się komórek mikrośrodowiska (Ryc.19).



Rycina 9. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD8 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu (powiększenie obiektywu mikroskopu 20x).

2.3 FoxP3

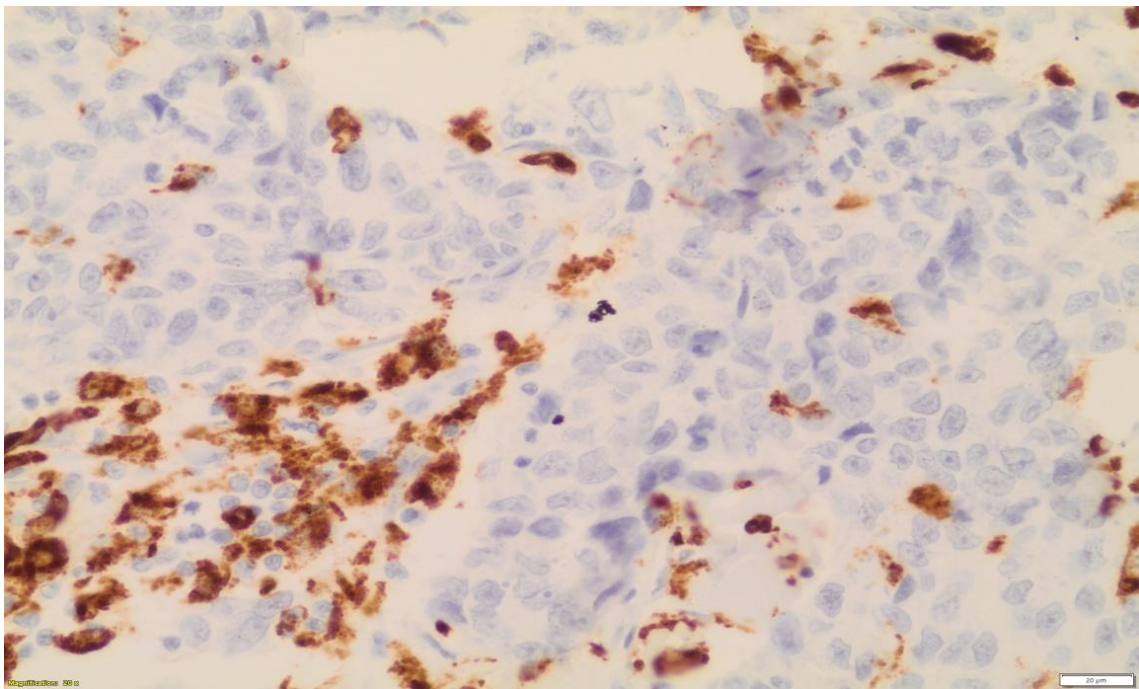
Jądrową reakcję z przeciwciałem przeciwko FoxP3 obserwowano w 287 przypadkach (91,99%). Była to reakcja o umiarkowanym lub dużym stopniu intensywności, występująca w pojedynczych rozproszonych komórkach mikrośrodowiska. Komórki wykazujące ekspresję FoxP3 w większość przypadków stanowiły ok. 10% komórek mikrośrodowiska. Średnia uzyskanych wyników ekspresji FoxP3 w komórkach mikrośrodowiska (przy zastosowaniu skali IRS) wynosiła 3,12, mediana 4, odchylenie standardowe natomiast 1,8 (Ryc. 10).



Rycina 10. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu FoxP3 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu (powiększenie obiektywu mikroskopu 20x).

2.4 CD68

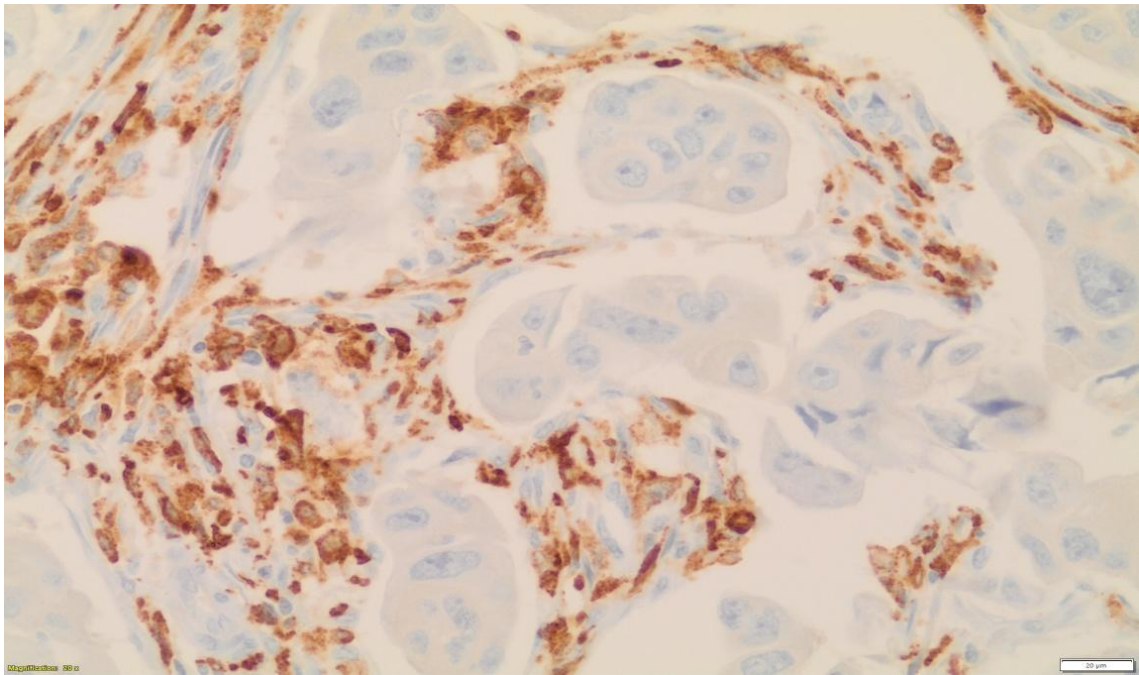
Dodatnia cytoplazmatyczna reakcja potwierdzająca obecność komórek wykazujących ekspresję CD68 stwierdzona została w 308 przypadkach (98,71%). Reakcja zazwyczaj miała silne nasilenie. W 89 przypadkach stwierdzono, że komórki CD68+ stanowiły ponad 50% komórek mikrośrodowiska (w tym w 9 przypadkach komórki te stanowiły ponad 80% komórek mikrośrodowiska, natomiast w 80 przypadkach stanowiły 51-80% komórek mikrośrodowiska). W 177 przypadkach reakcja dodatnia dotyczyła 11-50% komórek mikrośrodowiska. W 42 przypadkach komórki CD68+ stanowiły 10% lub mniej wśród komórek mikrośrodowiska. W 4 przypadkach nie stwierdzono obecności komórek CD68+. Średnia otrzymanych wyników ekspresji CD68 w komórkach mikrośrodowiska (przy zastosowaniu skali IRS) wynosiła 5,76, mediana 6 (Ryc.11). Komórki wykazujące ekspresję CD68 były równo rozłożone w obrębie mikrośrodowiska. Nie miały tendencji do skupiania się (Ryc.19).



Rycina 11. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD68 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu (powiększenie obiektywu mikroskopu 20x).

2.5 CD163

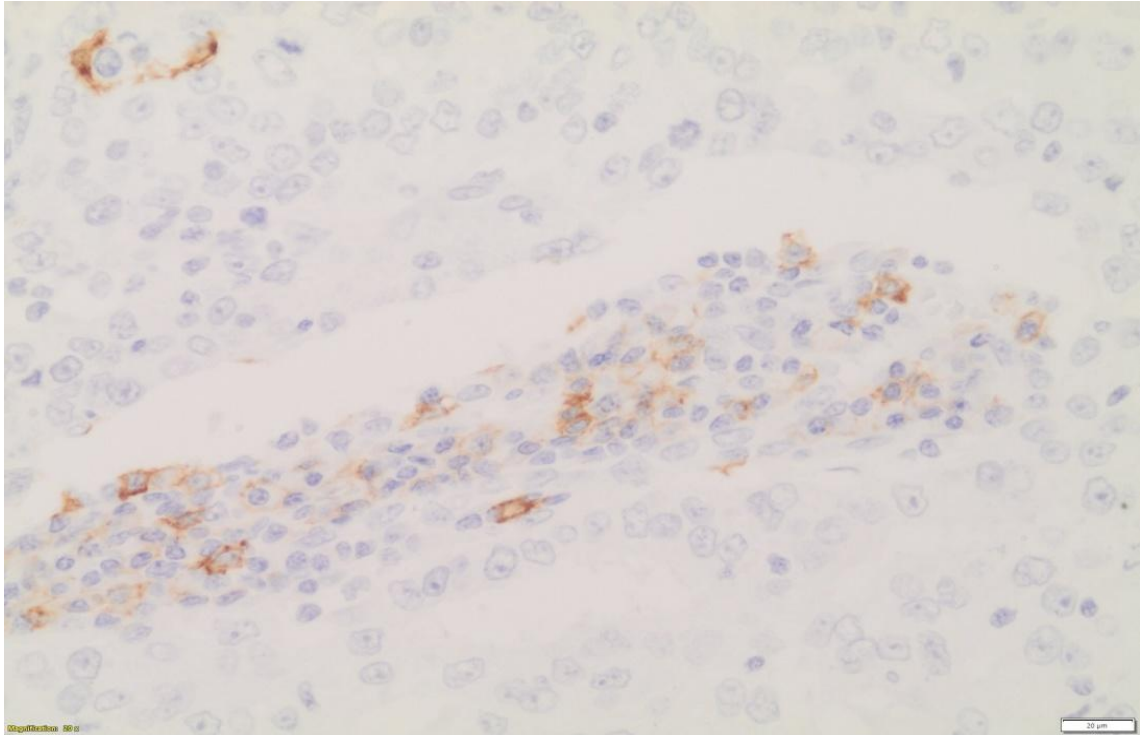
Umiarkowaną cytoplazmatyczną reakcję potwierdzającą obecność antygenu CD163 w komórkach mikrośrodowiska obserwowano w 309/312 przypadków (99,04%). W 31 przypadkach komórki CD163+ stanowiły więcej niż 50% komórek mikrośrodowiska. W żadnym z analizowanych przypadków komórki te nie stanowiły więcej niż 80% wśród komórek mikrośrodowiska. W 207 przypadków komórki CD163+ stanowiły 11-50% komórek mikrośrodowiska. W 71 przypadkach komórki wykazujące ekspresję CD163 stanowiły 10% lub mniej. W 3 przypadkach nie stwierdzono reakcji z przeciwciałem przeciwko CD163 w obrębie komórek mikrośrodowiska. Średnia otrzymanych wyników ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska (przy zastosowaniu skali IRS) wynosiła 3,88, mediana 4, odchylenie standardowe 1,94 (Ryc.12). Komórki CD163+ w większości przypadków były równomiernie rozłożone w obrębie całego mikrośrodowiska badanych guzów (Ryc. 19).



Rycina 12. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu (powiększenie obiektywu mikroskopu 20x).

2.6 CD19

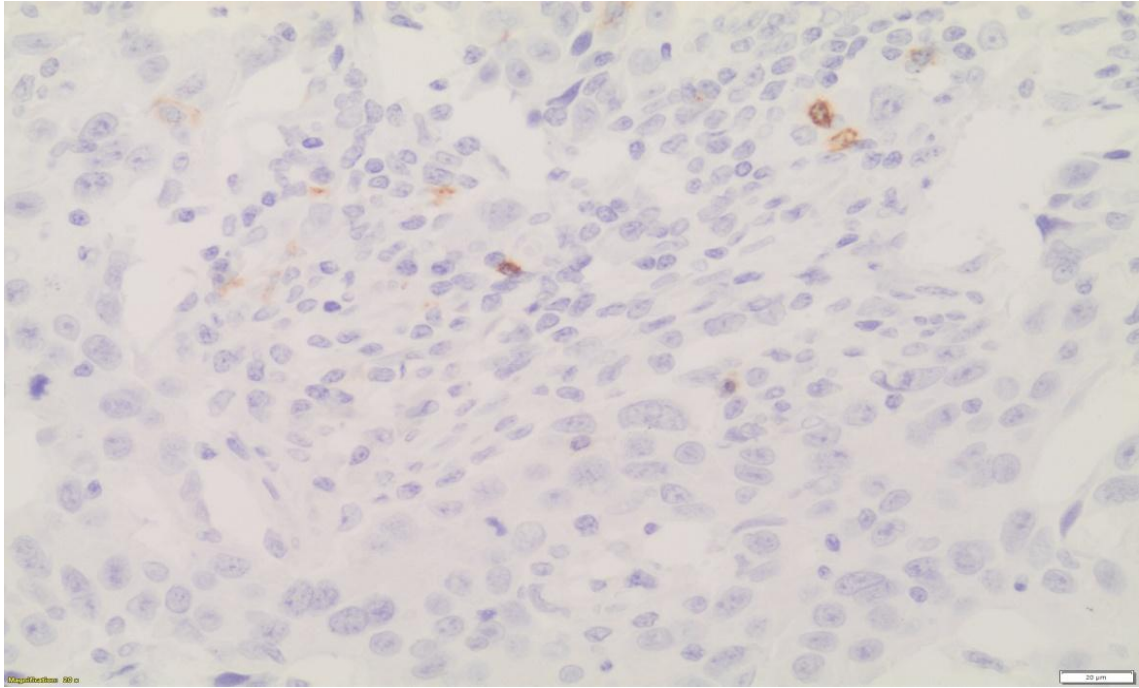
Reakcja z przeciwciałem skierowanym przeciwko CD19 obecna była w 144 przypadkach (46,15%). W 93 przypadkach ze stwierdzoną ekspresją CD19 w obrębie mikrośrodowiska, komórki wykazujące dodatnią reakcję z użytym przeciwciałem stanowiły 10% lub mniej komórek w obrębie mikrośrodowiska. W pozostałych przypadkach komórki CD19+ stanowiły nieco ponad 10% komórek mikrośrodowiska. Zazwyczaj były to pojedyncze, rozproszone komórki. Reakcja miała niskie nasilenie. Średnia otrzymanych wyników ekspresji CD19 w komórkach mikrośrodowiska (przy zastosowaniu skali IRS) wynosiła 0,94, mediana 0, maksymalna otrzymana wartość wynosiła 6 (Ryc.13)(Ryc.19).



Rycina 13. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD19 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu (powiększenie obiektywu mikroskopu 20x).

2.7 CD56

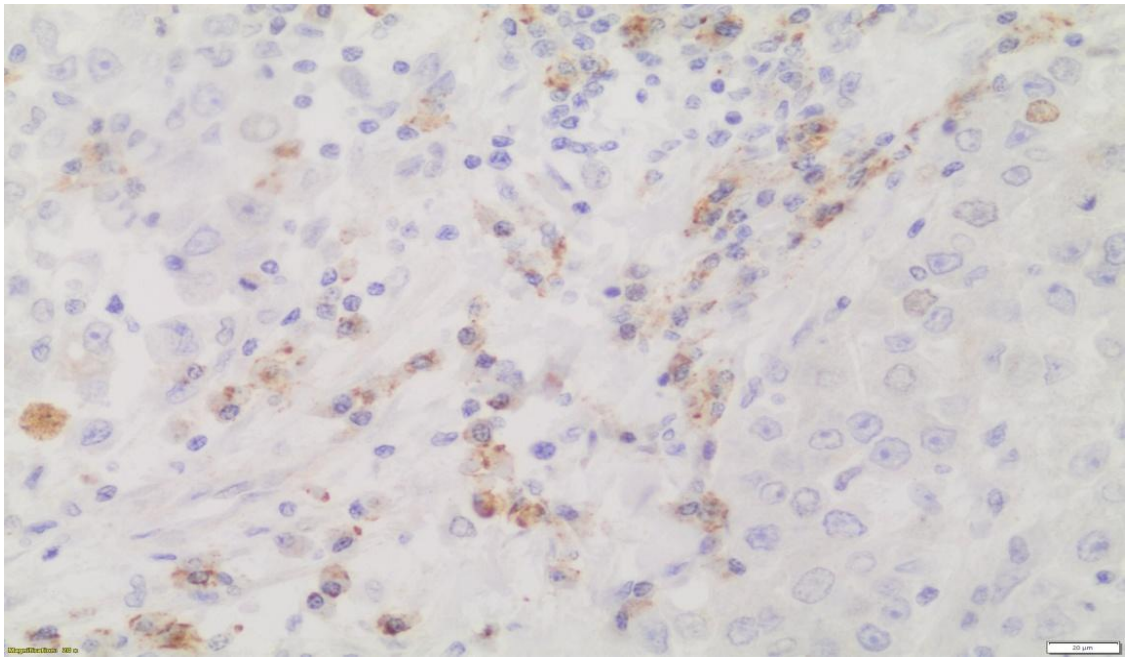
Reakcję z przeciwciałem skierowanym przeciwko CD56 stwierdzono w mikrośrodowisku w 123 przypadkach (39,42%). Była to reakcja typu błonowego. Intensywność reakcji była niska. W 6 przypadkach komórki CD56+ stanowiły nieco ponad 10% komórek mikrośrodowiska. W pozostałych przypadkach reakcja dotyczyła pojedynczych, rozproszonych komórek. Średnia otrzymanych wyników ekspresji CD56 w komórkach mikrośrodowiska (przy zastosowaniu skali IRS) wynosiła 0,49, mediana 0, maksymalna wartość wynosiła 4 (Ryc. 14).



Rycina 14. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD56 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu (powiększenie obiektywu mikroskopu 20x).

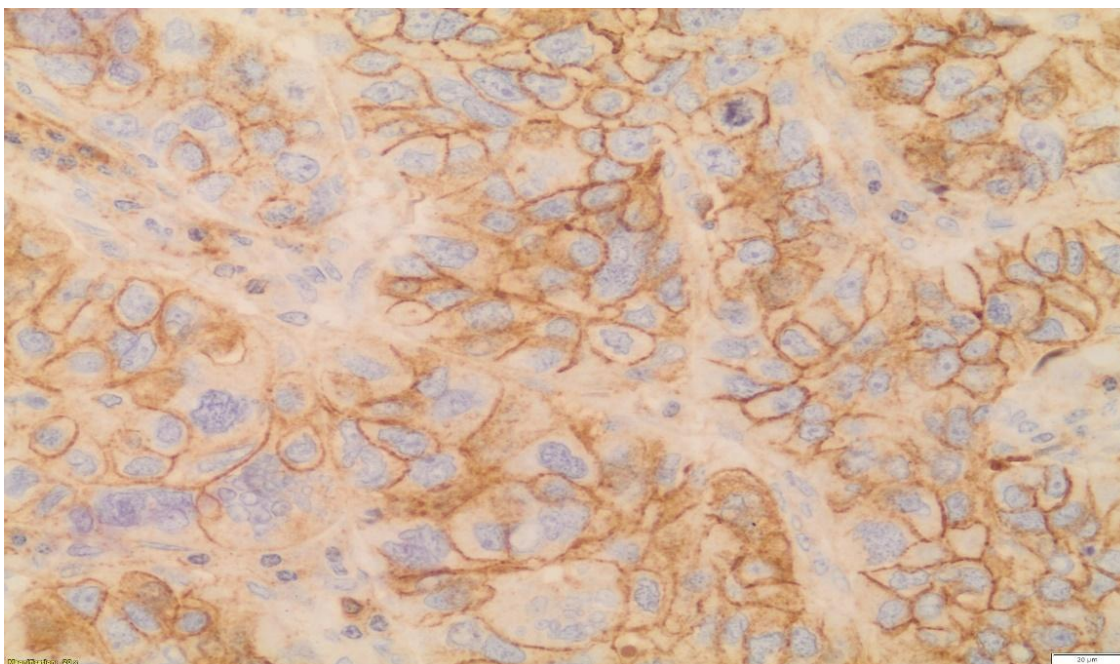
2.8 CD138

Podobnie jak w przypadku antygenów CD19 oraz CD56 reakcja z przeciwciałem przeciwko CD138 w komórkach mikrośrodowiska miała niską intensywność. Obserwowano ją w 146 przypadkach (46,79%). W 47 przypadkach była ona stwierdzona w 11-50% komórek mikrośrodowiska. W 6 przypadkach komórki CD138+ stanowiły ponad 50% komórek mikrośrodowiska. W pozostałych przypadkach reakcja dodatnia dotyczyła 10% lub mniej komórek mikrośrodowiska. Średnia otrzymanych wyników ekspresji CD138 w komórkach mikrośrodowiska (przy zastosowaniu skali IRS) wynosiła 1,11, mediana 0, maksymalna wartość natomiast 9 (Ryc. 15).



Rycina 15. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD138 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu (powiększenie obiektywu mikroskopu 20x).

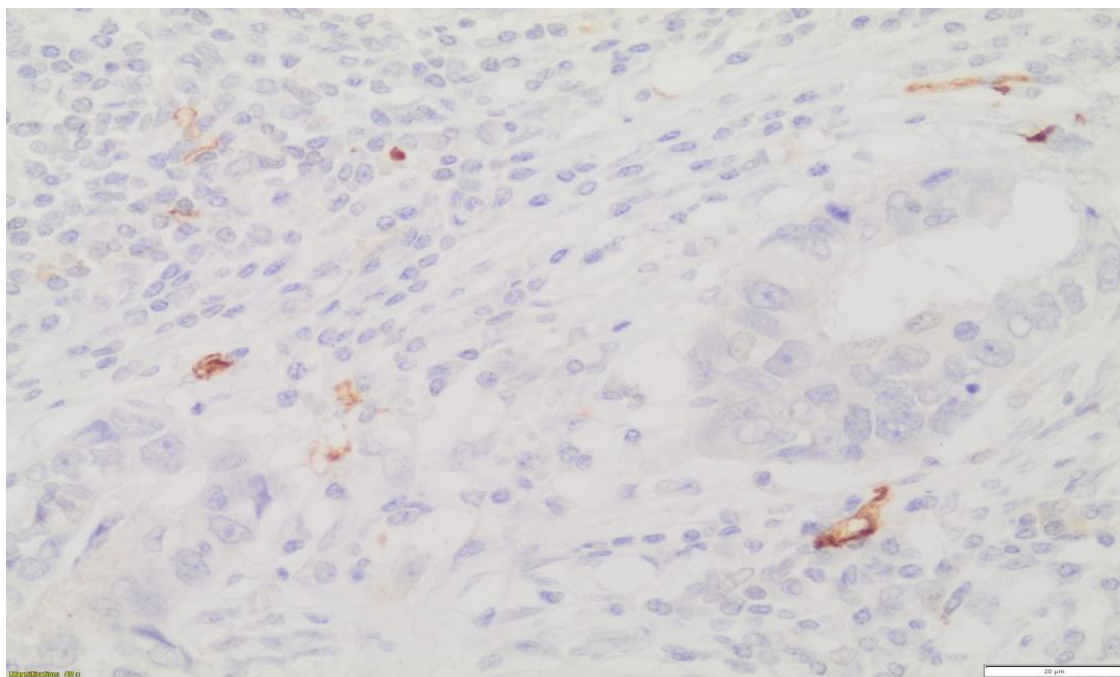
W trakcie analizy barwień z użyciem przeciwciała przeciwko CD138 stwierdzono występowanie dodatniej reakcji błonowej nie tylko w komórkach mikrośrodowiska, ale również w komórkach raka. Dodatnia reakcja z użytym przeciwciałem została stwierdzona w komórkach potrójnie ujemnego raka piersi w 199 analizowanych przypadkach. Na rycinie 16 przedstawiono przykładową reakcję przeciwko CD138 stwierdzoną w komórkach raka.



Rycina 16. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD138 w komórkach raka inwazyjnego (powiększenie obiektywy mikroskopu 20x).

2.9 CD1a

Dodatnią reakcję z przeciwciałem skierowanym przeciwko CD1a obserwowano w 159 przypadkach (50,96%). W jednym przypadku stwierdzono, że komórki CD1a⁺ stanowiły powyżej 10% komórek mikrośrodowiska. W pozostałych przypadkach reakcja dodatnia z użytym przeciwciałem była stwierdzana w pojedynczych komórkach mikrośrodowiska, intensywność reakcji była zróżnicowana (od małej do dużej). Średnia otrzymanych wyników ekspresji CD1a w komórkach mikrośrodowiska (przy zastosowaniu skali IRS) wynosiła 1.06, mediana natomiast 1 (Ryc. 17). W trakcie analizy stwierdzono obecność komórek CD1a⁺ w bezpośrednim kontakcie z komórkami raka inwazyjnego oraz pomiędzy tymi komórkami. Podobnie jak w przypadku oceny reakcji z przeciwciałem przeciwko CD8, komórki te nie były brane pod uwagę w ocenie liczby komórek CD1a⁺ w obrębie mikrośrodowiska (Ryc.19).

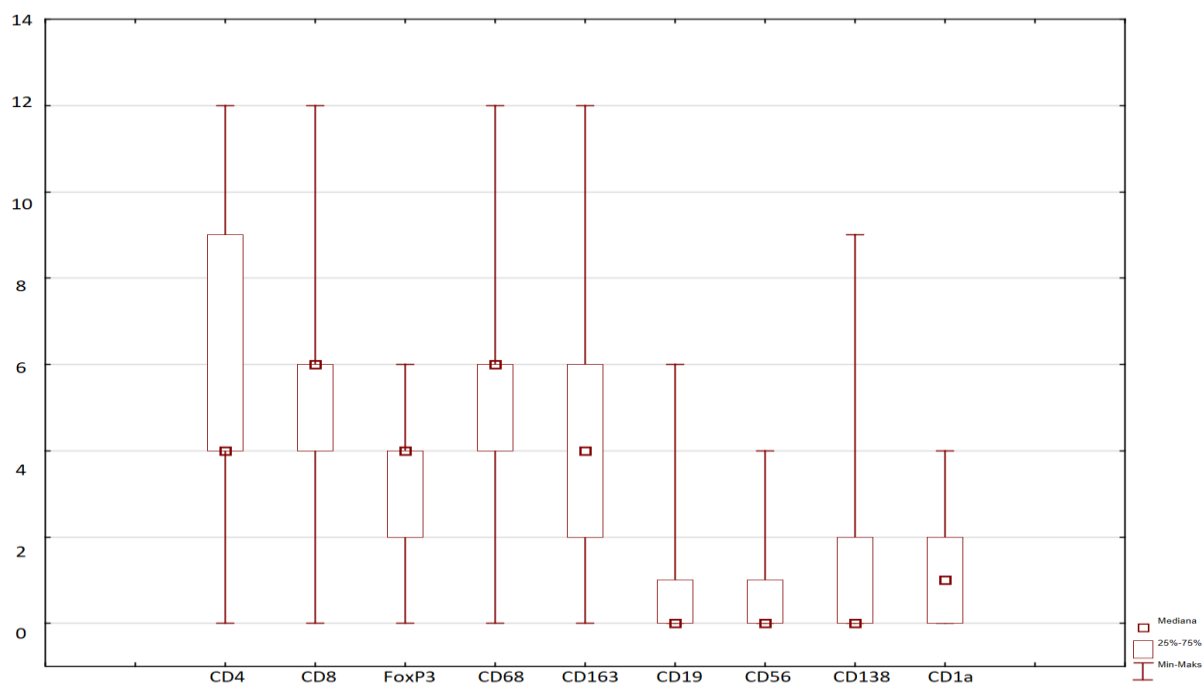


Rycina 17. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD1a w komórkach mikrośrodowiska nowotworu (powiększenie obiektywu mikroskopu 20x).

Zestawienie mediany, wartości minimalnych, maksymalnych, średnich oraz odchylenia standardowego dla wszystkich badanych antygenów przedstawiono w tabeli 14 oraz na rycinie 18.

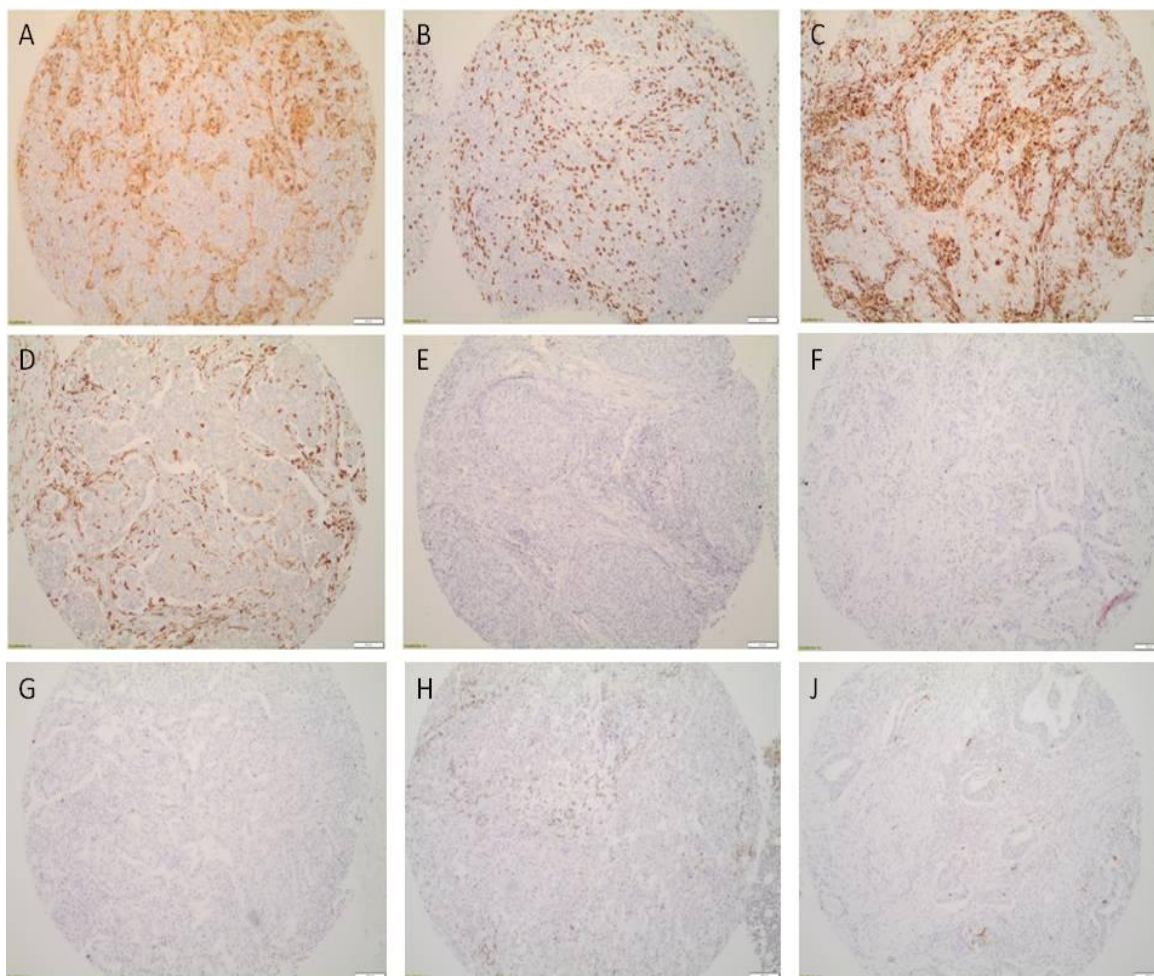
Tabela 14. Zestawienie mediany, wartości minimalnych, maksymalnych, średnich oraz odchylenia standardowego dla wykonanych odczynów immunohistochemicznych (przy zastosowaniu skali IRS).

	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
CD4	5,4	4	0	12	2,79
CD8	5,36	6	0	12	2,27
FoxP3	3,12	4	0	6	1,8
CD68	5,76	6	0	12	2,38
CD163	3,88	4	0	12	1,94
CD19	0,94	0	0	6	1,41
CD56	0,49	0	0	4	0,71
CD138	1,11	0	0	9	1,69
CD1a	1,06	1	0	4	1,2



Rycina 18. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający zestawienie ekspresji badanych antygenów w komórkach mikrośrodowiska TNBC w wykonanych odczynach immunohistochemicznych (przy zastosowaniu skali IRS).

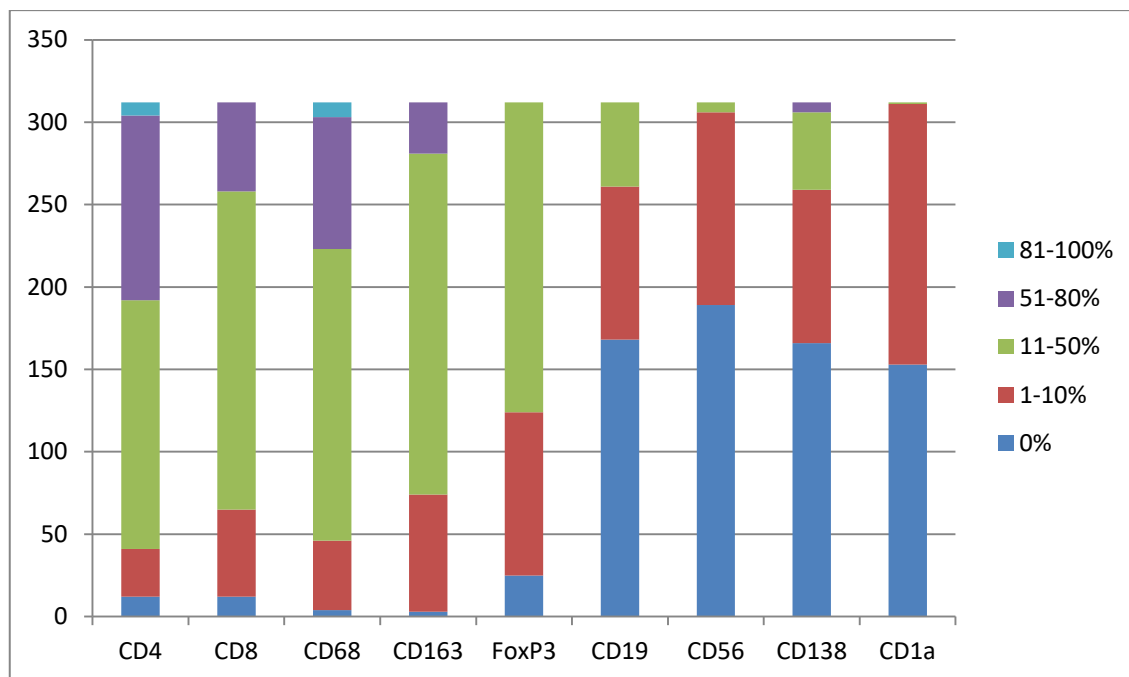
Stwierdzone różnice rozkładu komórek wykazujących ekspresję badanych antygenów w obrębie mikrośrodowiska analizowanych potrójnie ujemnych raków piersi przedstawiono na zamieszczonych poniżej mikrofotografiach (Ryc. 19).



Rycina 19. Przykładowe rozmieszczenia w mikrośrodowisku TNBC komórek wykazujących ekspresję badanych antygenów.

A. Komórki CD4+, B. Komórki CD8+, C. Komórki CD68+, D. Komórki CD163+, E. Komórki FoxP3+, F. Komórki CD19+, G. Komórki CD56+, H. Komórki CD138+, J. Komórki CD1a+.

Na rycinie 20 przedstawiono zestawienie obecności badanych markerów w komórkach mikrośrodowiska z uwzględnieniem odsetka komórek mikrośrodowiska wykazujących reakcję dodatnią z użytymi przeciwciałami.



Rycina 20. Zestawienie obecności badanych antygenów w obrębie mikrośrodowiska z uwzględnieniem odsetka komórek mikrośrodowiska wykazujących reakcje dodatnie z użytym przeciwciałem.

W trakcie analizy wykazano obecność bardzo licznych korelacji pomiędzy poszczególnymi elementami komórkowymi wchodzącymi w skład mikrośrodowiska. (Tab. 15).

Tabela 15. Korelacje pomiędzy elementami komórkowymi wchodzącymi w skład mikrośrodowiska TNBC w obrębie grupy badanej.

	CD8	FoxP3	CD68	CD163	CD19	CD56	CD138	CD1a
CD4	0,551	0,380	0,176	0,231	0,399	0,457	0,209	0,172
CD8		0,454	0,201	0,157	0,373	0,457	0,205	0,153
FoxP3			0,195	ns	0,344	0,376	0,251	0,194
CD68				0,161	ns	ns	ns	ns
CD163					ns	0,161	ns	ns
CD19						0,483	0,357	ns
CD56							0,225	ns
CD138								ns

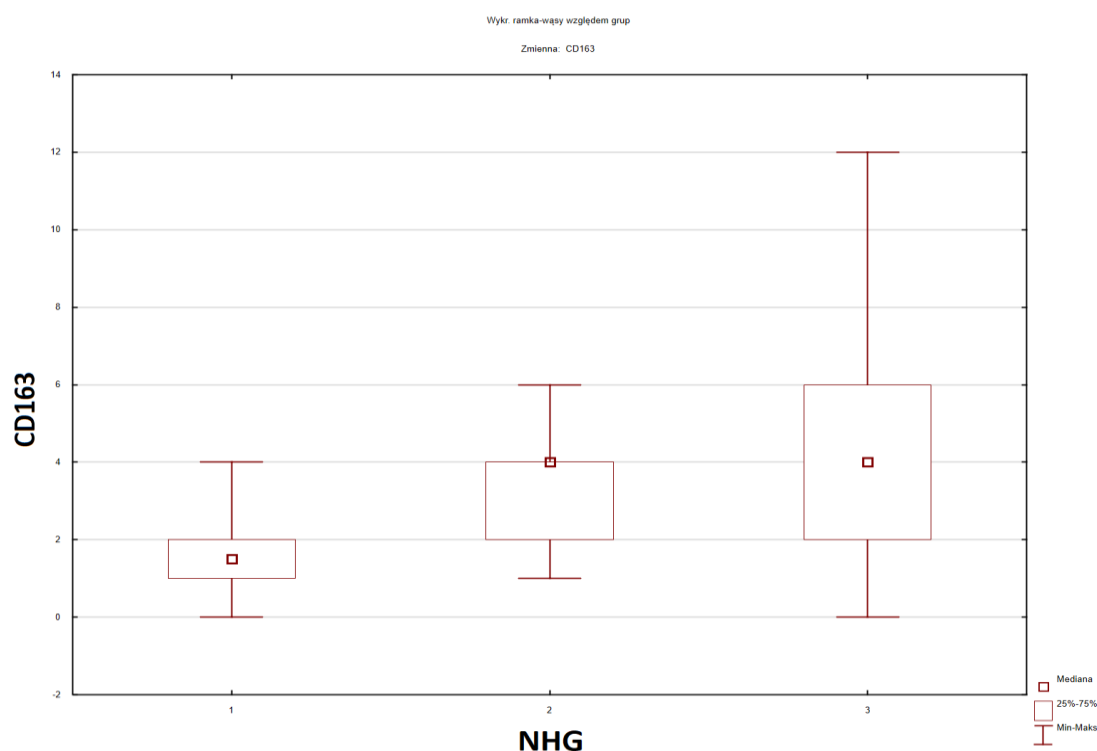
(ns- nieistotne statystycznie)

3. Ocena elementów mikrośrodowiska

3.1 Ocena elementów mikrośrodowiska względem stopnia dojrzałości histologicznej NHG

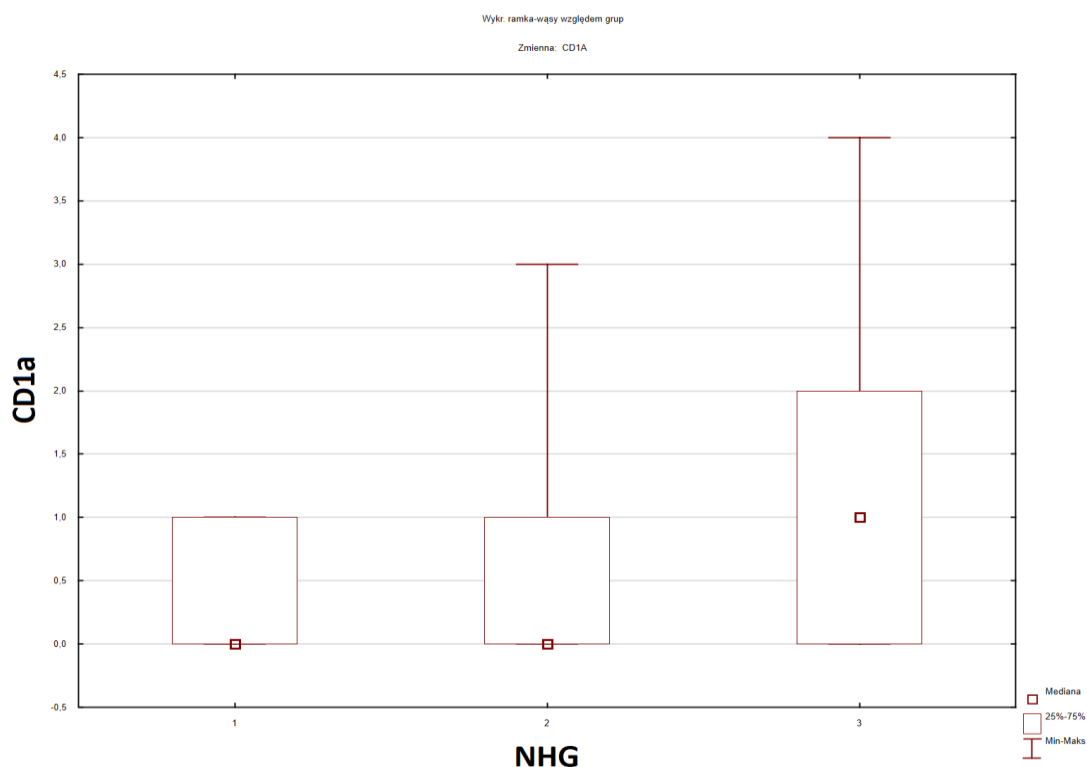
Przy użyciu testu rang Kruskala-Wallisa wykazano istotny statystycznie związek ($p < 0,05$) pomiędzy obecnością komórek CD163+ ($p = 0,003$), komórek CD1a+ ($p = 0,0163$) i komórek FoxP3+ ($p = 0,0308$) a stopniem dojrzenia potrójnie ujemnego raka piersi określanym w skali NHG.

W przypadku oceny ekspresji CD163 (zgodnie z zastosowaną skalą IRS) w rakach w stopniu NHG1 mediana otrzymanych wyników ekspresji wynosiła 1,5. W rakach NHG2 i NHG3 wynosiła ona 4. Maksymalne wartości otrzymanych wyników ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska w podgrupie raków NHG1 wynosiły 4, w rakach NHG2 6 a w rakach NHG3 12. Wartości pierwszego i trzeciego kwartyla w rakach NHG1 wynosiły 1 i 2. W rakach NHG2 wartości te wynosiły 2 i 4. Natomiast w rakach NHG3 wynosiły one odpowiednio 2 i 6 (Ryc. 21).



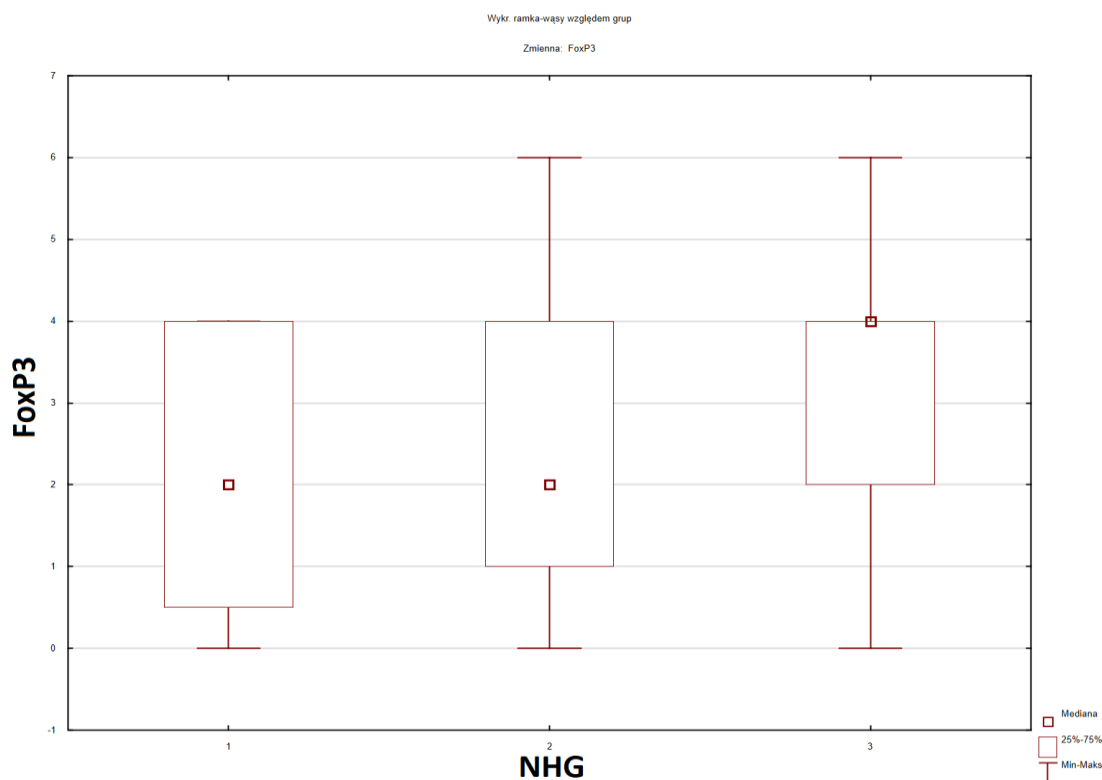
Rycina 21. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia NHG raka piersi.

Mediana otrzymanych wyników (zgodnie ze skalą IRS) ekspresji CD1a w rakach NHG1 wynosiła 0, w rakach NHG 2 również wynosiła 0, natomiast w przypadku raków NHG3 wynosiła 1. W przypadku raków w stopniu NHG3 maksymalna wartość otrzymanych wyników wynosiła 4. W rakach NHG2 wynosiła 3, natomiast w rakach NHG1 wynosiła 1 (Ryc. 22).



Rycina 22. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD1a w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia NHG raka piersi.

W przypadku ekspresji FoxP3 w komórkach mikrośrodowiska (zgodnie ze skalą IRS) mediana otrzymanych wyników w rakach NHG1 i NHG2 wynosiła 2. W rakach NHG3 mediana wynosiła 4. Otrzymane wartości maksymalne w przypadku raków NHG1 wynosiły 4. W przypadku raków NHG2 oraz raków NHG3 wartości te wynosiły 6. Wartości trzeciego kwartyła we wszystkich grupach wynosiły 4. Wartość pierwszego kwartyła w przypadku raków NHG1 wynosiła 0,5, w przypadku raków NHG2 wynosiła 1, natomiast w przypadku raków NHG3 wynosiła 2 (Ryc.23).

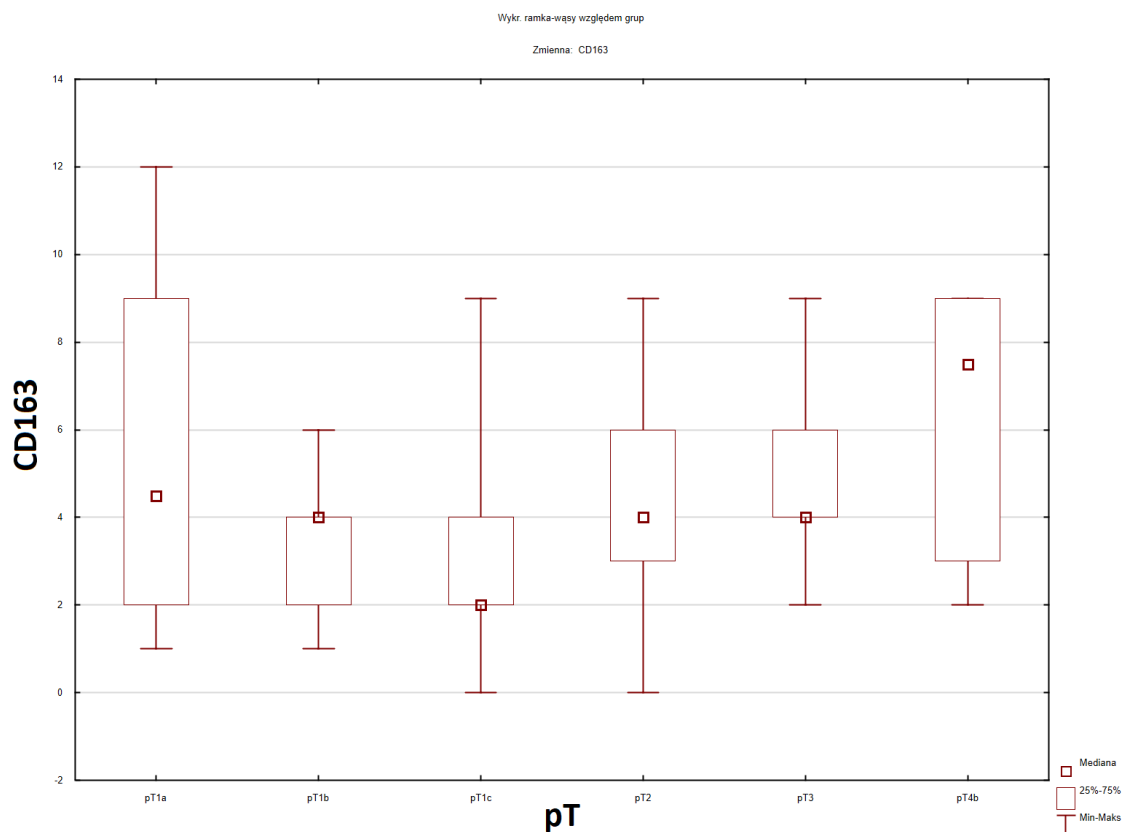


Rycina 23. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji FoxP3 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia NHG raka piersi.

3.2 Ocena elementów mikrośrodowiska względem stopnia pT

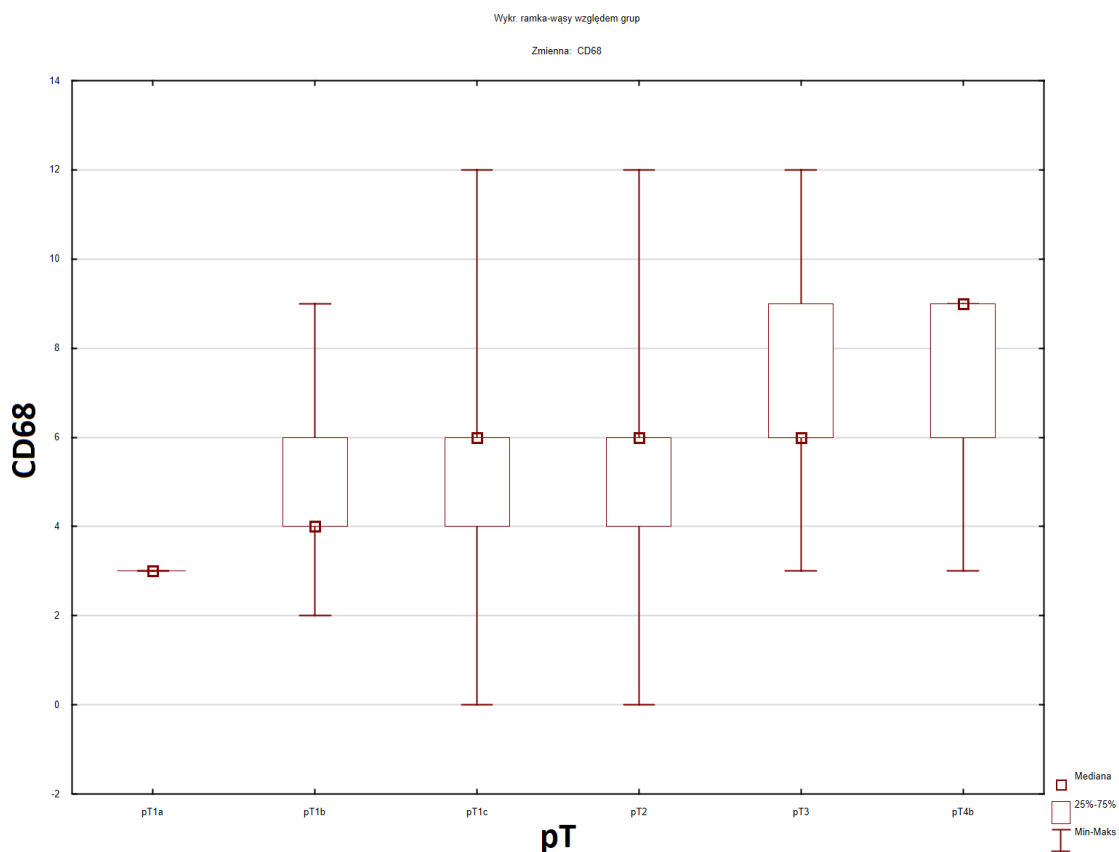
Przy użyciu testu rang Kruskala-Wallisa wykazano istotny statystycznie związek ($p < 0,05$) pomiędzy obecnością komórek CD68+ ($p = 0,0022$) oraz komórek CD163+ ($p = 0,000$) a stopniem pT badanego nowotworu.

W przypadku otrzymanych wartości ekspresji CD163 (zgodnie ze skalą IRS) w grupie pT1a mediana otrzymanych wyników wynosiła 4,5, w grupie pT1b 4. W grupach pT1c, pT2, pT3 i pT4b mediana wynosiła odpowiednio: 2, 4, 4 oraz 7,5. Uzyskane wartości maksymalne w grupie pT1a wynosiły 12, w pozostałych grupach (pT1b, pT1c, pT2, pT3, pT4b) wynosiły one odpowiednio: 6, 9, 9, 9, 9 (Ryc. 24).



Rycina 24. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia pT raka piersi.

Analiza różnic w ekspresji CD68 (ocenianej zgodnie ze skalą IRS) względem stopnia pT wykazała, że w grupie pT1a wartość minimalna, maksymalna oraz mediana wynosiły 3. W podgrupach pT1b wartość mediany wynosiła 4, w podgrupach pT1c, pT2, pT3 mediana wynosiła 6, w podgrupie pT4b natomiast mediana wynosiła 9 (Ryc. 25).

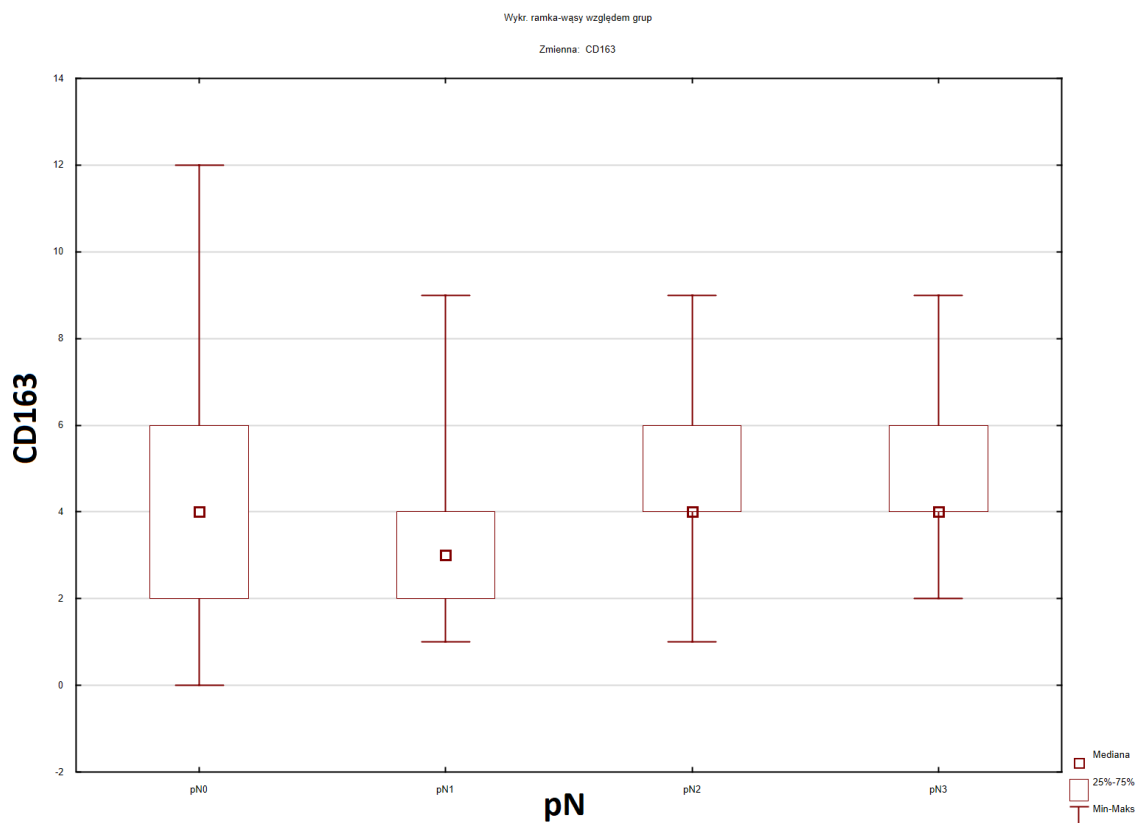


Rycina 25. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD68 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia pT raka piersi.

3.3 Ocena elementów mikrośrodowiska względem obecności przerzutów w węzłach chłonnych

Istotny statystycznie związek ($p < 0,05$) pomiędzy obecnością przerzutów w węzłach chłonnych a ekspresją badanych markerów w obrębie mikrośrodowiska wykazano w przypadku CD163 ($p = 0,0166$).

Otrzymane wartości maksymalne ekspresji CD163 w obrębie komórek mikrośrodowiska w przypadku raków z ujemnym statusem węzłów chłonnych wynosiły 12. W przypadku raków pN1, pN2, pN3 wynosiły natomiast 9. Mediana otrzymanych wyników w przypadku raków pN0 wynosiła 4. W rakach pN1 wynosiła 3. W rakach w stopniu pN2 i pN3 wynosiła 4. Wartości minimalne w badanych podgrupach kształtowały się następująco: 0 w rakach pN0, 1 w rakach pN1 i pN2 oraz 2 w rakach pN3 (Ryc. 26).



Rycina 26. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia pN.

4. Ocena korelacji elementów mikrośrodowiska z danymi histopatologicznymi

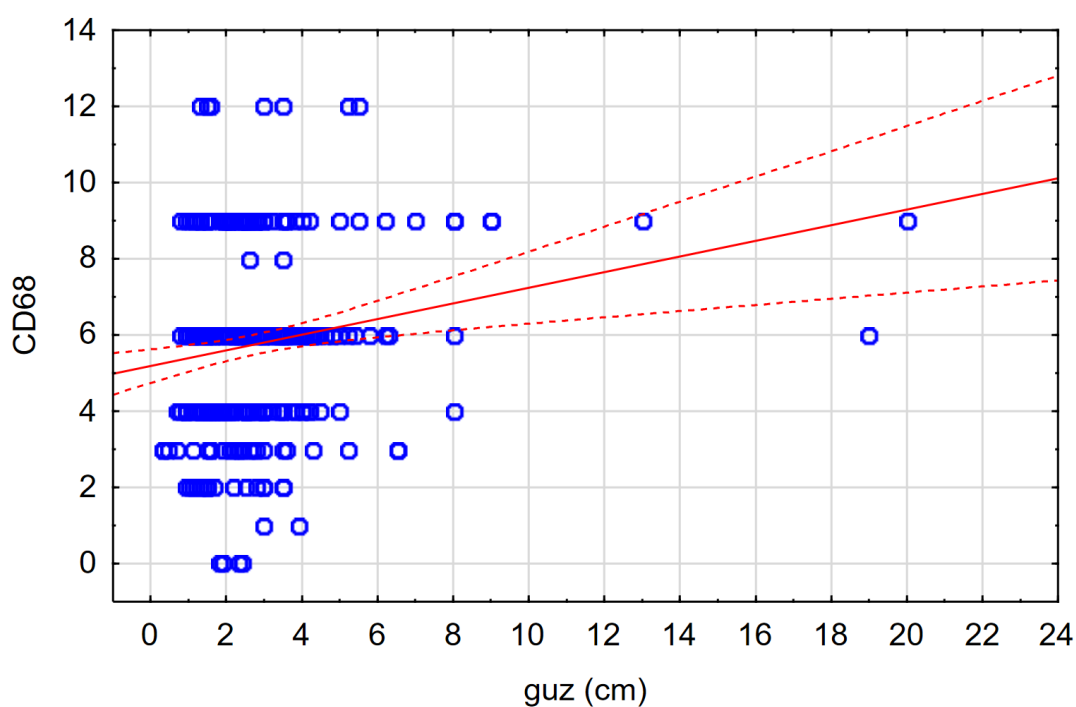
Testem porządku rang według Spearmana wykazano korelację pomiędzy średnicą guza a ekspresją CD68 ($r=0,163$) oraz CD163 ($r=0,284$) w komórkach mikrośrodowiska TNBC. Wykazano ujemną korelację pomiędzy liczbą przerzutowych węzłów chłonnych a ekspresją CD56 w komórkach mikrośrodowiska ($r= - 0,112$). Poza tym wykazano korelacje pomiędzy liczbą mitoz liczoną na 10 HPF a ekspresją w komórkach mikrośrodowiska FoxP3 ($r=0,156$), CD68 ($r=0,110$), CD163 ($r=0,147$) oraz CD1a ($r=0,138$). Wspomniane zależności zostały przedstawione zbiorczo w tabeli 16. W odniesieniu do pozostałych danych histopatologicznych (obecność DCIS, obecność inwazji naczyniowej, obecność owrzodzenia skórno) nie stwierdzono występowania korelacji z wynikami ekspresji badanych antygenów.

Tabela 16. Wyniki analiz korelacji statystycznych ekspresji oznaczonych antygenów względem średnicy guza, liczby przerzutowych węzłów chłonnych oraz liczby mitoz.

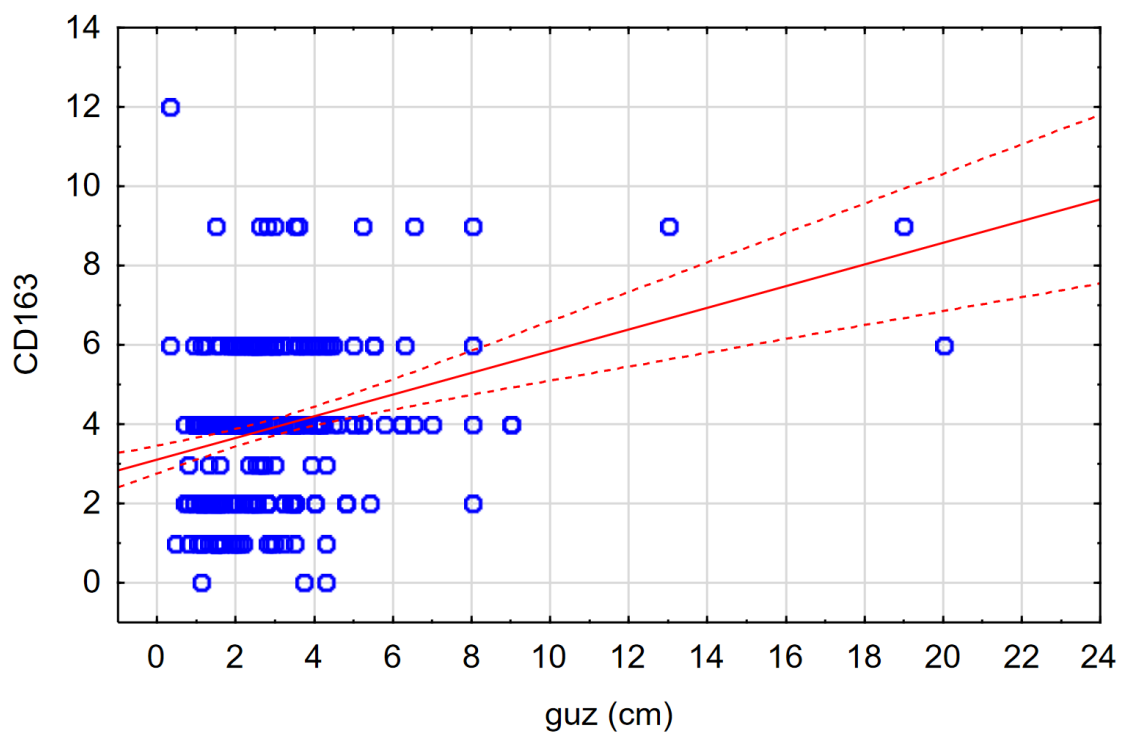
	Średnica guza	Liczba przerzutowych węzłów chłonnych	Liczba mitoz
CD4	Ns	ns	Ns
CD8	Ns	ns	Ns
FoxP3	Ns	ns	0,156
CD68	0,163	ns	0,110
CD163	0,284	ns	0,147
CD19	ns	ns	ns
CD56	ns	-0,112	ns
CD138	ns	ns	ns
CD1a	ns	ns	0,138

(ns- nieistotne statystycznie)

Wraz ze wzrostem średnicy guza zaobserwowano wzrost ekspresji CD68 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu ($r = 0,163$) (Ryc. 27). Dodatnia korelacja ze średnicą guza dotyczyła również CD163 ($r = 0,284$) (Ryc. 28).

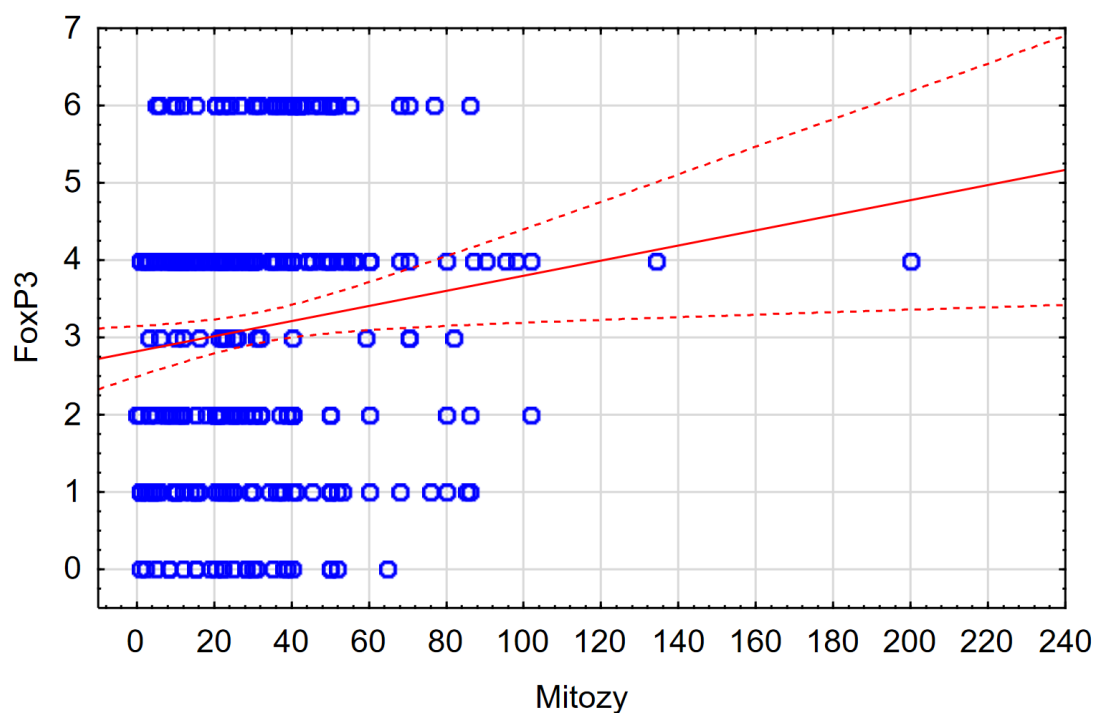


Rycina 27. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy ekspresją CD68 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu a średnicą guza.

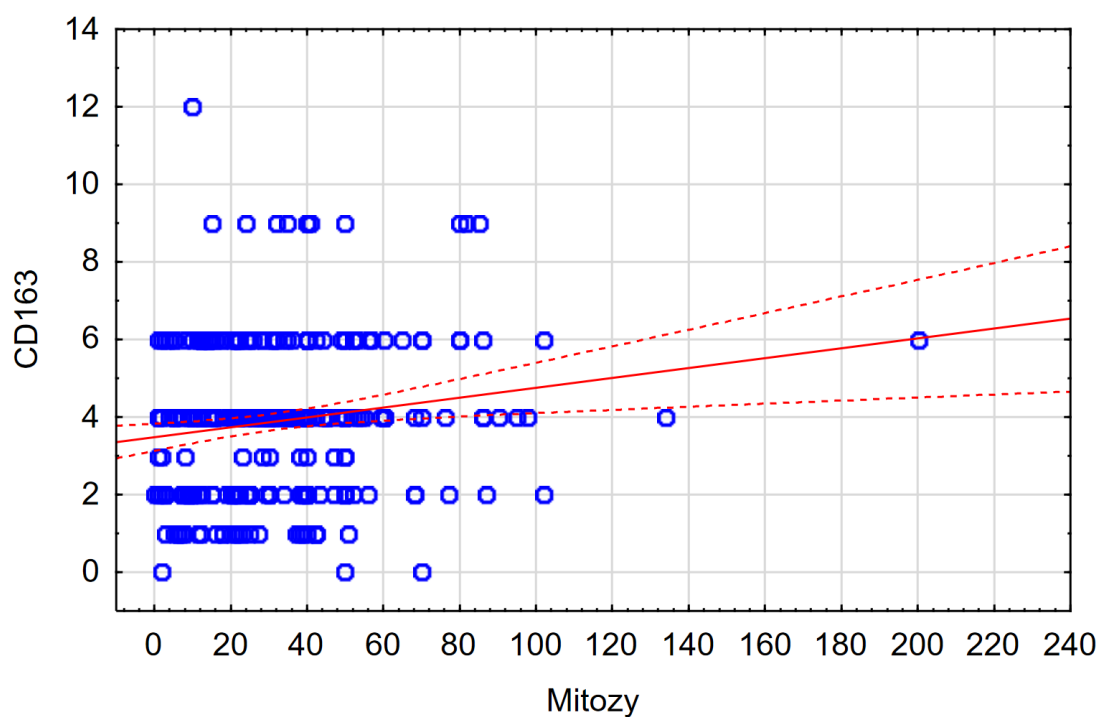


Rycina 28. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy ekspresją CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu a średnicą guza .

Wraz ze wzrostem liczby mitoz liczonych na 10 dużych polach widzenia stwierdzono wzrost ekspresji CD68 ($r = 0,110$), FoxP3 ($r = 0,156$) (Ryc. 29), CD163 ($r = 0,147$)(Ryc. 29), oraz CD1a ($r = 0,138$).



Rycina 29. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy ekspresją FoxP3 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu a liczbą mitoz liczoną w 10 dużych polach widzenia mikroskopu.



Rycina 30. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy ekspresją CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu a liczbą mitoz liczoną w 10 dużych polach widzenia mikroskopu.

5. Ocena korelacji danych histopatologicznych i klinicznych

Wykonano analizę korelacji pomiędzy danymi histopatologicznymi i klinicznymi w obrębie badanej podgrupy. Zestawienie badanych korelacji przedstawiono w tabeli 17.

W trakcie analizy stwierdzono występowanie dodatniej korelacji pomiędzy średnicą guza a liczbą mitoz/10 HPF oraz pomiędzy średnicą guza a liczbą przerzutowych węzłów chłonnych. Stwierdzono również, że liczba mitoz/10 HPF zmniejsza się wraz z wiekiem pacjentki.

W trakcie analizy nie stwierdzono występowania korelacji pomiędzy pozostałymi zebranymi danymi histopatologicznymi a danymi klinicznymi.

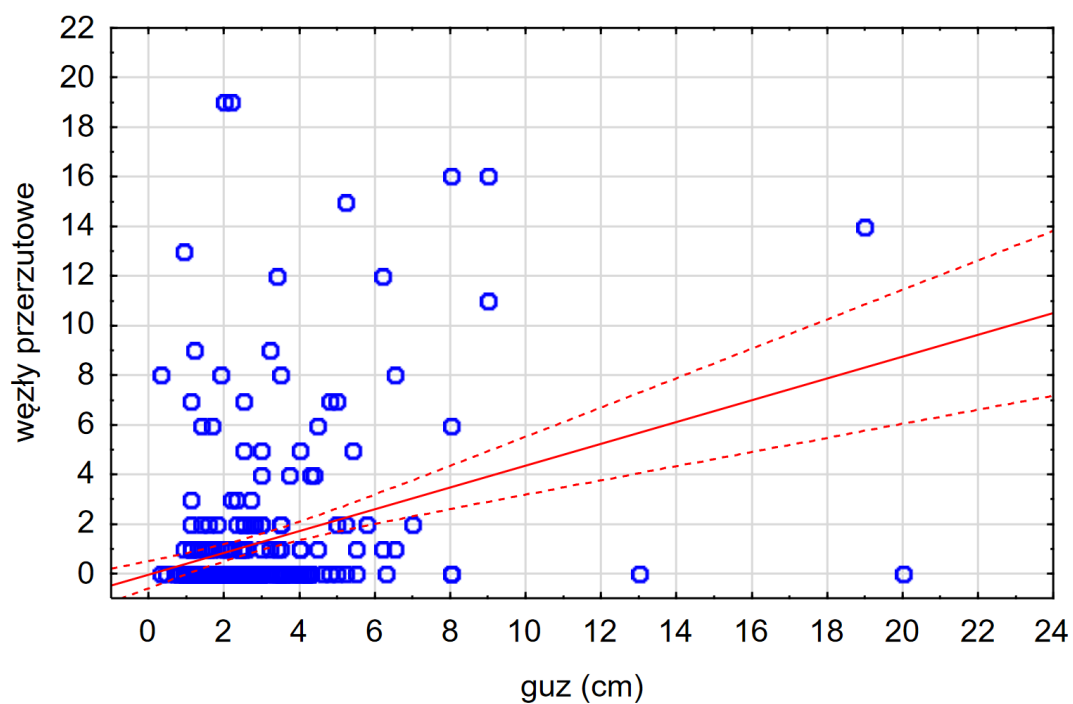
Tabela 17. Wyniki analiz statystycznych występowania korelacji pomiędzy średnicą guza, liczbą przerzutowych węzłów chłonnych, liczbą mitoz a wiekiem pacjentki w chwili rozpoznania nowotworu.

	Średnica guza	Liczba przerzutowych węzłów chłonnych	Liczba mitoz
Liczba przerzutowych węzłów chłonnych	0,157	-	ns
Liczba mitoz	0,167	ns	-
Wiek	Ns	ns	-0,175

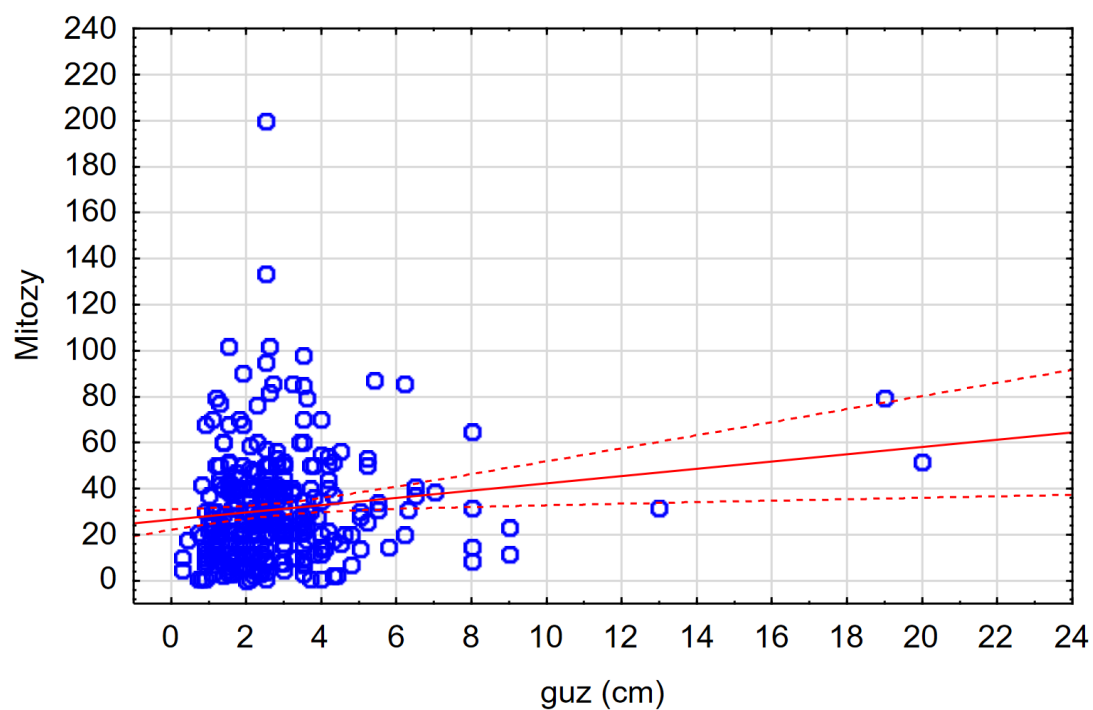
ns- nieistotne statystycznie

Wraz ze wzrostem średnicy guza stwierdzono wzrost liczby przerzutowych węzłów chłonnych ($r = 0,157$) (Ryc. 31). Podobnie wzrost średnicy guza korelował dodatnio z liczbą mitoz/10HPF ($r=0,167$) (Ryc. 32).

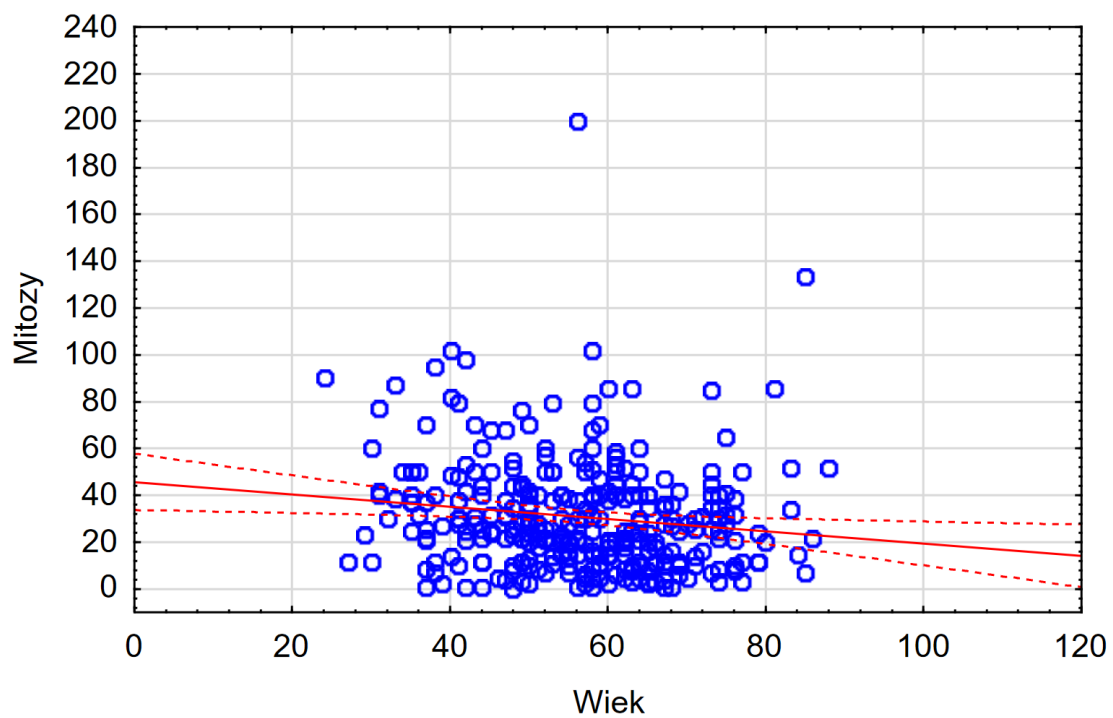
Stwierdzono natomiast, że liczba mitoz/10HPF zmniejsza się wraz z wiekiem pacjentki w chwili rozpoznania nowotworu ($r=-0,175$) (Ryc. 33).



Rycina 31. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy liczbą przerzutowych węzłów chłonnych a średnicą guza.



Rycina 32. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy liczbą mitoz liczoną w 10 dużych polach widzenia mikroskopu a średnicą guza.



Rycina 33. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy liczbą mitoz liczoną w 10 dużych polach widzenia mikroskopu a wiekiem pacjentki w trakcie rozpoznania.

V. DYSKUSJA

1. Potrójnie ujemny rak piersi

1.1. Charakterystyka TNBC

Potrójnie ujemny rak piersi to rak piersi, w którego komórkach nie stwierdzono obecności receptora estrogenowego i progesteronowego oraz nie stwierdzono nadekspresji białka HER-2 lub amplifikacji genu *HER-2* [22][23]. Rozpoznanie TNBC wiąże się aktualnie z ograniczonymi możliwościami terapeutycznymi. Podstawową metodą leczenia wciąż pozostaje leczenie chirurgiczne w skojarzeniu z chemioterapią zarówno przed- jak i pooperacyjną [82][83]. Nie tylko ze względu na ograniczenia w dostępnym leczeniu, ale również ze względu na gorsze rokowanie i charakterystyczny przebieg kliniczny [10][41-48][127] u pacjentów z TNBC niezbędne jest poszukiwanie nowych możliwych ścieżek terapeutycznych.

Szczególnie istotne u pacjentów z TNBC jest osiągnięcie pCR w efekcie leczenia chemioterapią neoadiuwantową. Pomimo złego rokowania związanego z charakterem TNBC, pacjenci którzy osiągają pCR mają zdecydowanie lepsze wskaźniki przeżycia. Stwierdzenie choroby resztkowej po chemioterapii neoadiuwantowej, u pacjentów z potrójnie ujemnym rakiem piersi, wskazuje na sześciokrotnie większe ryzyko nawrotu choroby nowotworowej oraz na dwunastokrotnie wyższe ryzyko śmierci związanej z obecnością przerzutów nowotworowych niż u pacjentów z uzyskanym pCR. Dlatego tak istotne jest poszukiwanie metod poprawiających wskaźniki osiągniętych pCR u pacjentów z TNBC [73].

Celem badania było określenie obecności w mikrośrodowisku TNBC komórek związanych z układem odpornościowym oraz zbadanie czy istnieje związek pomiędzy tymi komórkami a cechami histopatologicznymi badanych nowotworów. Do antygenów związanych z komórkami mikrośrodowiska TNBC ocenianych w trakcie badania należały: CD4, CD8, CD68, FoxP3, CD163, CD19, CD56, CD138, CD1a.

1.2 Zróżnicowanie histologiczne TNBC

TNBC jest bardzo zróżnicowanym histologicznie i biologicznie podtypem raka piersi. Najczęstszym podtypem histologicznym TNBC jest rak typu NST. U pacjentów z rozpoznaniem rakiem typu NST stwierdzić możemy obecność dodatkowych wariantów utkania histologicznego np. układów rdzeniastych czy różnicowania neuroendokrynnego. Wśród TNBC, częściej niż w grupie wszystkich diagnozowanych raków piersi, stwierdzane są rzadkie podtypy raka takie jak rak metaplastyczny, rak z różnicowaniem apokrynowym czy bardzo rzadkie raki o morfologii śliniankowej [4].

W badanym materiale potwierdzono dużą różnorodność budowy histologicznej przypadków potrójnie ujemnego raka piersi (Ryc. 3). Najczęściej stwierdzanym podtypem histologicznym, podobnie jak w większości prac dotyczących TNBC [4], był rak typu NST (85,3%). Większość badanych guzów charakteryzowała się niskim stopniem dojrzewania histologicznego (82,4% stanowiły raki w stopniu NHG3). W trakcie analizy mikroskopowej potwierdzono w badanych guzach obecność cech, które są uznawane za charakterystyczne dla potrójnie ujemnego raka piersi [4]. Do cech tych należały: wyraźny pleomorfizm komórkowy, obecność litego, rozpychającego typu wzrostu, wysoka aktywność mitotyczna, obecność nacieku limfocytarnego w podścielisku guza.

W trakcie analizy stwierdzono występowanie związku pomiędzy rozpoznanymi podtypami histologicznymi TNBC a niektórymi cechami kliniczno-patologicznymi. Średnia średnicy guzów zakwalifikowanych do badania, była najwyższa w przypadkach rozpoznania raka metaplastycznego. Najwyższa średnia liczby mitoz liczonych na 10 HPF występowała w przypadku raka typu NST. Również w przypadku raka metaplastycznego ta średnia była wysoka. W raku typu NST stwierdzono najwyższy średni poziom wartości Ki-67. W raku metaplastycznym średnie wartości Ki-67 również były wysokie. Obserwacje te są zgodne z wcześniej opublikowanymi badaniami dotyczącymi TNBC. Raki typu NST oraz większość podtypów raka metaplastycznego są uznawane za podtypy histologiczne TNBC o najbardziej agresywnym przebiegu [64-66].

Według danych literaturowych średnia wieku pacjentów w chwili rozpoznania potrójnie ujemnego raka piersi jest niższa niż w przypadku rozpoznania pozostałych podtypów biologicznych. Wynosi ona zazwyczaj poniżej 50 lat [39].

W przeprowadzonych na materiale pochodzącym od pacjentek z WCO badaniach średnia wieku pacjentek w chwili rozpoznania raka typu TNBC wynosiła 56 lat. W przypadku raka typu NST średnia ta wynosiła tyle samo co dla całej grupy badanej czyli 56 lat. W pozostałych rozpoznanych podtypach histologicznych TNBC średnia wieku wynosiła 60 lat bądź więcej. Odpowiednio było to: 60 lat dla raka z różnicowaniem apokrynowym i dla raka gruczołowo-torbielowatego, 61 lat dla raka mikrobrodawkowego i metaplastycznego, 63 lata dla raka zrazikowego oraz 69 lat dla raka brodawkowego. Średni wiek pacjentek w badanej grupie był zatem wyższy niż średni wiek pacjentek z TNBC wskazywany w opracowaniach dotyczących potrójnie ujemnego raka piersi. W badanej podgrupie około 30% pacjentek miało 50 lat bądź mniej. Istotne zdaje się w tym miejscu pytanie czy różnica ta wynika z różnic biologicznych pacjentek z rakiem piersi w Polsce czy też wynika z rozpoznawania raka piersi w późniejszych stadiach zaawansowania.

W trakcie analizy danych podjęto próbę zróżnicowania podtypów histologicznych TNBC w grupie badanej pod względem komórek wchodzących w skład ich mikrośrodowiska. Nie znaleziono różnic pomiędzy ekspresją badanych antygenów związanych z elementami komórkowymi mikrośrodowiska a poszczególnymi podtypami histologicznymi TNBC. Z analizy danych literaturowych wynika, że wśród podtypów histologicznych TNBC, obecność obfitego nacieku limfocytarnego najczęściej wiązana jest z rakiem typu NST, a szczególnie w jednym z jego wariantów czyli rakiem NST z układami rdzeniastymi [4]. W przeprowadzonych analizach nie stwierdzono tej zależności. Zaskakujący wydaje się fakt braku zróżnicowania w składzie komórkowym mikrośrodowiska pomiędzy rakami metaplastycznymi a pozostałymi podtypami histologicznymi TNBC. Raki metaplastyczne zazwyczaj nie są kojarzone z obecnością obfitego nacieku podścieliska przez komórki wchodzące w skład TILs [4]. W części raków metaplastycznych w trakcie oceny preparatów histologicznych oraz barwień immunohistochemicznych stwierdzono ogólną niską komórkowość w obrębie mikrośrodowiska badanych nowotworów. Być może to było przyczyną braku zróżnicowania pomiędzy składem mikrośrodowiska w rakach metaplastycznych składem mikrośrodowiska w pozostałych podtypach histologicznych stwierdzanych w grupie badanej.

2. Mikrośrodowisko

Mikrośrodowisko jest integralną częścią nowotworu. Jest to złożony system składający się ze wszystkich elementów otaczających komórki nowotworowe. Głównymi komórkowymi elementami mikrośrodowiska są TILs oraz TAMs. W jego skład wchodzi ponadto neutrofile, komórki dendrytyczne, fibroblasty, komórki tłuszczowe oraz komórki śródbłónka naczyń. Ważnym elementem mikrośrodowiska jest również ECM [93][94]. W TME dochodzi do nieustannego wzajemnego wpływu komórek nowotworowych oraz elementów mikrośrodowiska. Wzajemne interakcje są związane z cytokinami, czynnikami wzrostu czy enzymami wydzielanymi przez wszystkie komórki wchodzące w skład guza (zarówno komórki nowotworowe jak i nienowotworowe) [128].

W przeprowadzonym badaniu oceniano ekspresję antygenów związanych z wybranymi elementami komórkowymi mikrośrodowiska TNBC. Badanymi antygenami były CD4, CD8, CD68, CD163, FoxP3, CD19, CD56, CD138, CD1a. Potwierdzono obecność wszystkich powyższych antygenów w komórkach mikrośrodowiska analizowanych guzów. Wyniki ekspresji poszczególnych antygenów w komórkach mikrośrodowiska różniły się pomiędzy sobą.

Komórkami dominującymi w obrębie mikrośrodowiska badanych guzów były komórki CD4+, CD8+, CD68+ oraz CD163+. Obecność komórek CD4+ została potwierdzona w 96,15% przypadków, obecność komórek CD8+ potwierdzono w 96% przypadków. Komórki CD68+ obecne były w 99% przypadków. Komórki CD163+ natomiast były obecne w 99,04% przypadków. W przypadku komórek CD68+ i CD163+ najczęściej obserwowano równomierne rozmieszczenie ocenianych komórek w obrębie TME. Zazwyczaj ich układ przypominał gęstą sieć. Komórki CD4+ miały skłonności do skupiania się.

Komórki CD8+ w większości przypadków były liczne i zazwyczaj były równomiernie rozłożone w obrębie całego zrębu nowotworu. Komórkami odgrywającymi również ważną rolę w mikrośrodowisku TNBC okazały się komórki wykazujące ekspresję FoxP3. Ich obecność potwierdzono w mikrośrodowisku w 92% badanych przypadków. W przypadku komórek FoxP3+ stwierdzono występowanie

w mikrośrodowisku pojedynczych komórek rozłożonych pomiędzy występującymi

gęsto komórkami CD4+, CD8+, CD68+, CD163+. Najniższy odsetek dodatnich reakcji spośród badanych dotyczył CD56. Obecność komórek CD56+ potwierdzono w 39,42% przypadków. Zazwyczaj obserwowano niską siłę reakcji immunohistochemicznej. Obecność komórek CD138 oraz CD19 potwierdzono w około połowie przypadków. Siła reakcji IHC w przypadku tych odczynów była zazwyczaj niska. Mediana otrzymanych wyników ekspresji badanych antygenów w przypadku komórek CD19+, CD56+ i CD138+ wynosiła 0. Najwyższa mediana otrzymanych wyników ekspresji badanych markerów (ocenionych za pomocą skali IRS) związana była z występowaniem komórek CD8+ i CD68+. W obu przypadkach wynosiła ona 6. Medianę równą 4 stwierdzono w odniesieniu do markerów CD4, FoxP3 oraz CD163.

Stwierdzono bardzo liczne korelacje pomiędzy poszczególnymi elementami mikrośrodowiska w badanych guzach. Najsilniejsza korelacja dotyczyła występowania komórek CD4+ oraz komórek CD8+. Wysoki wskaźnik korelacji dotyczył również komórek CD8+ i FoxP3+ oraz komórek CD4+ i FoxP3+. Otrzymane wyniki mogą wskazywać na silny wzajemny wpływ wszystkich komórek wchodzących w skład mikrośrodowiska.

2.1 TILs

2.1.1 Komórki CD4+ oraz CD8+

Komórki CD4+ i CD8+ są głównymi komórkami wchodzącymi w skład TILs [98]. TILs czyli limfocyty związane z nowotworem są w ostatnich latach przedmiotem licznych badań. Udowodniono związek TILs z rozwojem i przebiegiem nowotworu w wielu nowotworach złośliwych takich jak: czerniak, rak jajnika, rak pęcherza, rak okrężnicy czy rak prostaty [129-131]. Znaczenie TILs potwierdzono również w przypadku raka piersi [132]. Dodatkowo wykazano, że większa ekspresja antygenów związanych z TILs jest związana w przypadku raka piersi z brakiem ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz brakiem nadekspresji białka HER-2 w komórkach raka [132]. Udowodniono ponadto, że obecność TILs w TNBC oraz raku HER dodatnim ma dużo większe znaczenie prognostyczne niż w innych podtypach biologicznych raka piersi [102].

Przeprowadzone badania wykazały, że komórki CD4⁺ oraz komórki CD8⁺ obecne były w mikrośrodowisku w prawie wszystkich badanych przypadkach TNBC. Co więcej obecność tych komórek w mikrośrodowisku wykazywała liczne korelacje zarówno pomiędzy sobą jak i pomiędzy innymi elementami komórkowymi wchodzącymi w skład mikrośrodowiska. W przypadku komórek CD4⁺, najczęściej spośród wszystkich badanych elementów mikrośrodowiska, stwierdzano „przewagę” ilościową nad innymi elementami TME. W 120 z 300 przypadków, w których potwierdzono obecność komórek CD4⁺ w TME badanych guzów, stwierdzono, że komórki wykazujące ekspresję tego antygeny stanowiły ponad połowę komórek wchodzących w skład mikrośrodowiska. W przypadku komórek CD8⁺ taka sytuacja występowała w 54 przypadkach. Komórki CD4⁺ miały skłonność do skupiania się. Komórki CD8⁺ były rozproszone pomiędzy pozostałymi komórkami mikrośrodowiska. Ze względu na ekspresję badanych antygenów związanych z komórkami mikrośrodowiska (ocenianą przy użyciu skali IRS) w przypadku komórek CD8⁺ (oraz komórek CD163⁺) stwierdzono najwyższą medianę uzyskanych wyników. Wysokie wartości otrzymanych wyników w przypadku obecności komórek CD8⁺ w mikrośrodowisku wynikały częściowo (obok występowania licznych komórek CD8⁺ w TME) z wysokiej intensywności otrzymanej reakcji immunohistochemicznej. W przypadku komórek CD4⁺ wysokie otrzymane wartości wynikały przede wszystkim z dużej liczby komórek CD4⁺ w obrębie mikrośrodowiska.

Analiza opublikowanych wyników badań innych autorów wskazuje, że odsetek TILs w mikrośrodowisku jest ważnym czynnikiem rokowniczym. W jednym z takich badań wykazano, że wzrost procentowy liczby TILs w mikrośrodowisku o każde 10 % związany był ze zmniejszeniem o 11% ryzyka zgonu związanego z rakiem piersi [133]. W innym badaniu wskazano natomiast, że wzrost liczby TILs o każde 10% zmniejszał ryzyko nawrotu choroby lub zgonu o 14% [134]. Opublikowane inne wyniki badań wiązały 10 procentowy wzrost TILs w mikrośrodowisku z poprawą odpowiedzi na chemioterapię oraz wyższym odsetkiem uzyskanych pCR. Badanie to dotyczyło jednak pacjentów z potwierdzoną nadekspresji białka HER-2 [135]. Tym istotniejsze wydają się wyniki wykazujące wysoki odsetek komórek CD4⁺ oraz CD8⁺ w obrębie mikrośrodowiska TNBC.

W dostępnych opracowaniach wskazano poziom TILs jako niezależny czynnik prognozujący korzyść z chemioterapii neoadiuwantowej u pacjentów z rakiem piersi [136]. W przeprowadzonych przez innych autorów badaniach poziom TILs

w mikrośrodowisku guza związany był z odsetkiem uzyskanych pCR po chemioterapii neoadiuwantowej. Co więcej u pacjentów z nowotworem złośliwym piersi wykazano powiązanie poziomów TILs z OS [102][132].

W badaniu przeprowadzonym na dużej grupie pacjentów z rakiem piersi (3771 pacjentów) przez Denkerta i wsp. potwierdzono dużą wartość prognostyczną TILs oraz ich związek z TNBC. W badaniu tym również potwierdzono, że wysokie poziomy TILs były związane z większym odsetkiem pCR. Znaczenie miała nie tylko sama obecność komórek należących do TILs, ale również odsetek jaki stanowiły one w mikrośrodowisku raka. Wykazano, że pacjenci z wysokimi poziomami TILs (czyli pacjenci, u których TILs stanowiły $\geq 60\%$ komórek układu immunologicznego obecnych w mikrośrodowisku) mieli pCR na poziomie 50%. Niższe poziomy TILs związane były z pCR na poziomie 31% [137]. Szacuje się, że w grupie raków TNBC pCR osiąga około 17-50% pacjentów [85-87]. Różnice w osiągnięciu pCR u tych pacjentów mogą wynikać właśnie z procentowej zawartości TILs w mikrośrodowisku TNBC [73]. W przytoczonym powyżej badaniu potwierdzono również, że 10% wzrost liczby TILs był związany z wydłużeniem DFS oraz OS w TNBC. Co ciekawe wykazano, że w rakach luminalnych HER2 ujemnych TILs były niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [137]. Do tych samych wniosków doszli autorzy metaanalizy obejmującej 33 badania dotyczące raka piersi. Na podstawie łącznej sumy badań 1870 pacjentek z rakiem piersi potwierdzono związek TILs z pCR zarówno w rakach HER-dodatnich jak i TNBC. Potwierdzono również, że w przypadku podtypów luminalnych wysokie wartości TILs mogą być niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [138].

W trakcie przeprowadzonego badania nie stwierdzono związku pomiędzy obecnością komórek CD4+ i CD8+ w mikrośrodowisku nowotworu a zdiagnozowanym podtypem histologicznym raka piersi. Nie znaleziono również związku pomiędzy obecnością komórek CD4+ i CD8+ a danymi kliniczno-histopatologicznymi takimi jak: status węzłów chłonnych, obecność inwazji naczyniowej, średnica guza, stopień pT badanego nowotworu, stopień dojrzałości histologicznej, liczba mitoz/10 HPF, wartość Ki-67 czy wiek pacjentek w chwili rozpoznania raka.

Wyniki te są zbieżne z badaniami przeprowadzonymi przez innych autorów. W nich również nie potwierdzono związku pomiędzy obecnością TILs a cechami kliniczno-histopatologicznymi, za wyjątkiem stopnia NHG badanego nowotworu. Dla przykładu w badaniu Denkerta i wsp. dotyczącym TNBC nie potwierdzono

związku pomiędzy obecnością TILs a obecnością inwazji naczyniowo-limfatycznej, stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu oraz statusem węzłów chłonnych. W badaniu tym natomiast wskazano na istotny związek obecności TILs ze stopniem dojrzenia nowotworu określonym w skali NHG [102]. Wyniki te w swoich badaniach potwierdzili również Loi i wsp. [139]. Wykazali oni związek TILs ze stopniem NHG a także z potrójnie ujemnym charakterem raka. W badaniu tym ponadto wykazano, że „przewodowa” morfologia raka była najczęściej związana z wysoką liczbą TILs w mikrośrodowisku guza. W przypadku tego badania, podobnie jak w badaniach wcześniejszych, nie potwierdzono natomiast związku TILs z wiekiem pacjentów, zajęciem węzłów chłonnych czy średnicą guza. Co jednak istotne potwierdzono związek TILs zarówno z OS jak i PFS [139].

W badaniach dotyczących podtypów molekularnych TNBC potwierdzono zróżnicowanie liczby TILs pomiędzy poszczególnymi podtypami molekularnymi TNBC. Występowanie TILs w mikrośrodowisku guza było związane głównie z podtypem molekularnym IM (jednym z początkowych sześciu podtypów molekularnych TNBC). Wraz z nowym podziałem TNBC na cztery grupy molekularne stwierdzono, że guzy z podtypu IM weszły w dużej mierze w skład podtypu molekularnego BL1. Podtyp BL1 z kolei charakteryzuje się najlepszą odpowiedzią na chemioterapię neoadiuwantową (największy odsetek pCR) [73][98]. Ta prawidłowość podobnie jak inne badania dotyczące TNBC, TILs i pCR mogą wskazywać na znaczenie TILs w prognozowaniu odpowiedzi na chemioterapię neoadiuwantową i procent uzyskanych pCR w pacjentów z TNBC również w odniesieniu do podtypów molekularnych.

2.1.2 Komórki FoxP3+

Wśród TILs większość stanowią komórki CD4+ i CD8+. Ważnym elementem TILs są jednak również limfocyty regulatorowe. Limfocyty regulatorowe wykazują ekspresję antygenów CD4, CD25 oraz FoxP3. Szczególnie charakterystyczna dla tych komórek jest ekspresja FoxP3. Czynniki transkrypcyjny FoxP3 jest niezbędny do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania regulatorowych limfocytów T i to on jest najczęściej stosowanym markerem dla potwierdzenia obecności limfocytów regulatorowych w badanych tkankach [140][98]. Limfocytom regulatorowym

przypisywane jest działanie supresyjne względem cytotoksycznych limfocytów T. Mechanizm ten zapobiega uszkodzeniom tkanek w czasie prawidłowej odpowiedzi immunologicznej oraz bierze udział w zapobieganiu chorobom autoimmunologicznym. W nowotworach, limfocyty regulatorowe odpowiadają za hamowanie przeciwnowotworowej aktywności limfocytów cytotoksycznych [141].

Wpływ ekspresji FoxP3 w TME na krótszy czas przeżycia pacjentów oraz możliwość pojawienia się przerzutów do węzłów chłonnych wykazano w przypadku raka żołądka [142]. Podobne wyniki osiągnięto w badaniach dotyczących innych nowotworów [143].

W przeprowadzonym badaniu obecność komórek wykazujących ekspresję FoxP3 potwierdzono w 92% przypadków. W większości przypadków komórki FoxP3+ stanowiły około 10% wśród komórek mikrośrodowiska. Zazwyczaj występowały jako nieskupiające się, pojedyncze komórki rozrzucone pomiędzy komórkami CD4+ i CD8+. W trakcie analizy potwierdzono związek komórek FoxP3+ ze stopniem dojrzewania nowotworu określonym w skali NHG. Raki NHG3 miały najwyższą medianę otrzymanych wyników (4 vs 2 w rakach NHG 1 i 2). W przypadku raków NHG1 obserwowano najniższe wartości maksymalne otrzymanych wyników.

Dodatnia korelacja pomiędzy obecnością komórek FoxP3+ w mikrośrodowisku a stopniem dojrzewania nowotworu, w raku piersi, potwierdzona została w badaniu Liu i wsp. [144]. Autorzy tego badania wskazali ponadto, że wyższe poziomy limfocytów regulatorowych i cytotoksycznych były związane z ujemnym statusem receptorowym badanych guzów [144].

W badaniach przeprowadzonych u pacjentów z rakiem jelita grubego wykazano, że istotny jest nie tylko odsetek komórek FoxP3+, ale również ich stosunek względem pozostałych komórek wchodzących w skład TILs. Wyższy stosunek: komórki CD8+/komórki FoxP3+ w mikrośrodowisku raka jelita grubego był dodatnio skorelowany z OS i PFS pacjentów. Dodatkowo wskazano, że ten stosunek był niezależnym czynnikiem prognostycznym OS [145].

Na wagę relacji pomiędzy odsetkiem komórek CD8+ a odsetkiem komórek FoxP3+ w TME wskazywali autorzy innego badania przeprowadzonego u pacjentów z rakiem piersi typu TNBC, u których zastosowano chemioterapię neoadiuwantową. Dokonano analizy materiałów pochodzących z guzów piersi, które były pobrane zarówno przed jak i po chemioterapii neoadiuwantowej. Na podstawie tej analizy

stwierdzono że wyższe poziomy komórek CD8+ i większy stosunek komórek CD8+ do komórek FoxP3+ w guzach po wcześniejszej chemioterapii były czynnikami lepszego rokowania u pacjentów z TNBC, u których nie osiągnięto pCR. Stosunek CD8+/FoxP3+ korelował z ponadto z PFS u tych pacjentów [141].

W piśmiennictwie dostępne są badania dotyczące wpływu chemioterapii przedoperacyjnej na skład TILs, w obrębie mikrośrodowiska nowotworu, u pacjentów z rakiem piersi. W jednym z takich badań potwierdzono związek pomiędzy stwierdzeniem pCR u pacjentów a znacznym spadkiem liczby komórek FoxP3+ w mikrośrodowisku guza. U pacjentów ze stwierdzonym pCR natomiast pozostał niezmienny w mikrośrodowisku poziom komórek CD8+ i CD3+. Co więcej liczba komórek FoxP3+ nie zmniejszała się u osób nie odpowiadających na zastosowaną chemioterapię. W badaniu tym wskazywano na to, że ujemny status receptorów hormonalnych, wysoki stopień złośliwości histologicznej nowotworu oraz zajęcie węzłów chłonnych były związane ze zwiększeniem intensywności nacieków komórek CD3+, CD8+ i FoxP3+ w mikrośrodowisku guza [146].

Do podobnych wniosków doszli autorzy pracy oceniającej obecność komórek FoxP3+ w mikrośrodowisku raka szyjki macicy. W omawianym badaniu po zastosowaniu chemioterapii liczba komórek FoxP3+ zmniejszyła się nie tylko w mikrośrodowisku guza, ale również w jego okolicach. Podobnie jak w przedstawionym wcześniej badaniu, pacjenci z osiągniętym pCR, mieli zdecydowanie niższą liczbę komórek FoxP3+ w mikrośrodowisku w wycinkach z guzów pobranych po chemioterapii względem tych pobranych przed chemioterapią neoadiuwantową. Co więcej pacjenci ze stwierdzonym pCR mieli po chemioterapii neoadiuwantowej niższe poziomy komórek FoxP3+ w komórkach mikrośrodowiska, niż pacjenci bez pCR. W badaniu potwierdzono ponadto, że stosunek pomiędzy komórkami CD8+ a FoxP3+, był niezależnym czynnikiem prognostycznym [147].

W przeprowadzonym badaniu analiza liczby komórek wykazujących ekspresję FoxP3 dotyczyła jedynie przypadków bez wcześniej przeprowadzonej chemioterapii. Jednym z kryteriów wyłączenia z grupy badanej była chemioterapia neoadiuwantowa. W obrębie grupy badanej stwierdzono występowanie licznych korelacji pomiędzy obecnością komórek FoxP3+ a obecnością innych komórek mikrośrodowiska w TNBC. Najsilniejsza z tych korelacji dotyczyła występowania komórek FoxP3+ i CD8+.

Są badania potwierdzające związek komórek FoxP3+ a niektórymi z cechami kliniczno-patologicznymi [148][149]. W obszernej metaanalizie dotyczącej badań

przeprowadzonych u pacjentów z rakiem piersi (analizowane badania obejmowały łącznie próbki od 8277 pacjentów) wykazano zależność pomiędzy występowaniem komórek FoxP3+ w mikrośrodowisku guza a występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych [150].

O tym, że wpływ komórek FoxP3+ na przebieg i rozwój nowotworu nie jest do końca jeszcze poznany wskazują badania, których autorzy wykazują, że komórki te mogą mieć również korzystny wpływ na rokowanie pacjenta. W jednym z takich badań wykazano, że większa ekspresja markera FoxP3 w mikrośrodowisku guza była związana, podobnie jak w przypadku wysokich poziomów komórek CD8+, z większym odsetkiem pCR u pacjentów ze stwierdzonym rakiem piersi. W badaniu tym wskazano, że obecność komórek FoxP3+ w mikrośrodowisku nowotworowym była obok poziomu Ki-67 niezależnym czynnikiem prognostycznym pCR u tych pacjentów [151]. W innym badaniu wykazano, że wysokie poziomy komórek FoxP3 wśród TILs były związane z dłuższym RFS u pacjentów z TNBC. Wykazano również występowanie dodatniej korelacji pomiędzy występowaniem w TME komórek CD8+ oraz komórek FoxP3+ [140].

Wydaje się jednak, że komórki FoxP3+ podobnie jak komórki CD4+ i komórki CD8+ mają głównie związek z odpowiedzią guza na zastosowaną chemioterapię. Powyżej przytoczone badania wskazują, że komórki te mogą być dobrym celem dalszych badań. Szczególnie cenna może być ocena korelacji pomiędzy komórkami FoxP3+ a komórkami CD4+ i CD8+ oraz analiza wpływu tych komórek na pCR.

2.1.3 Komórki CD56+

Obecność CD56 w komórkach przez wiele lat była kojarzona jako cecha typowa dla komórek NK. Obecnie wiadomo, że CD56 może występować w pewnych subpopulacjach limfocytów T, w komórkach dendrytycznych oraz monocytach. Niezależnie od miejsca występowania, obecność CD56 kojarzona jest z działaniem cytotoksycznym, w tym z cytotoksycznym zabijaniem komórek nowotworowych [152]. Badania przeprowadzone na modelach mysich wykazały, że komórki NK mają związek z rozwojem guzów oraz powstawaniem przerzutów. W trakcie badań przeprowadzonych na tkankach ludzkich jednak nie udało się dotąd w sposób jednoznaczny potwierdzić tego zjawiska. W większości przypadków liczba komórek

NK w mikrośrodowisku guza jest znikoma. Stąd możliwość zbadania wpływu komórek CD56+ na rozwój nowotworu jest ograniczona [153].

W przeprowadzonym badaniu komórki CD56+ były najrzadziej stwierdzanymi komórkami w mikrośrodowisku guzów spośród wszystkich badanych typów komórek. Mediana otrzymanych wyników ekspresji CD56 w komórkach mikrośrodowiska (zgodnie z zastosowaną skalą IRS) wynosiła 0, wartość maksymalna wynosiła 4. Komórki CD56+ występowały zazwyczaj jako pojedyncze, rozproszone komórki. Siła otrzymanej reakcji immunohistochemicznej była w większości wypadków bardzo niska. Nie stwierdzono żadnych związków pomiędzy obecnością komórek CD56+ a którymkolwiek z badanych parametrów kliniczno-histopatologicznych. Podobne wyniki otrzymano w trakcie innego badania, również przeprowadzonego w potrójnie ujemnym raku piersi. Autorzy tego badania stwierdzili, że komórki NK były obecne w mikrośrodowisku TNBC jedynie w 4% badanych przypadków [154].

W przeprowadzonym badaniu wykazano, ujemną korelację pomiędzy obecnością komórek CD56+ w obrębie mikrośrodowiska a liczbą przerzutowych węzłów chłonnych. Nie udało się znaleźć w badaniach innych autorów podobnych wyników. Nie ustalono możliwego mechanizmu tego zjawiska.

Prace nad związkiem komórek CD56+ z rozwojem i przebiegiem nowotworów jednak cały czas trwają. Jedno z najnowszych badań dotyczących komórek CD56+ w nowotworach złośliwych wskazuje na potencjalne znaczenie ich obecności w mikrośrodowisku nowotworowym. Obserwacje te dotyczą jednak obecności antygenu CD56 na komórkach nowotworowych a nie na komórkach mikrośrodowiska TNBC [155].

Ciekawe, a zarazem obiecujące badania związane z TNBC i komórkami CD56+ prowadzone są przy użyciu „indukowanych cytokinami komórek zabójców” (ang. *cytokine induced killer*, CIK). Komórki te wykazują immunofenotyp CD3+CD56+. W trakcie terapii CIK pobierane są komórki NK człowieka. W kolejnych etapach dochodzi do transformacji i namnożenia pobranych i transformowanych komórek. Indukowane w ten sposób komórki podawane są w formie immunoterapii pacjentom. Celem CIK jest bezpośrednie zabijanie komórek nowotworowych [156]. Niemniej jednak brak obecnie prac jednoznacznie wskazujących na skuteczność takiej terapii w szerszym zastosowaniu.

2.1.4 Komórki CD19+

Jedną z podstawowych funkcji limfocytów B jest wydzielanie immunoglobulin oraz prezentacja antygenów. Dodatkowo komórki te wpływają na aktywację limfocytów T [157]. Podstawowymi markerami obecności limfocytów B w badanych tkankach są CD19 i CD20 [157]. Badania dotyczące obecności i wpływu limfocytów B na TNBC są zdecydowanie mniej liczne niż badania dotyczące związków limfocytów T z tym podtypem raka.

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że komórki CD19+ stanowiły, obok komórek CD56+, najmniej liczną populację komórek mikrośrodowiska. Siła otrzymanej reakcji była bardzo niska. Nie potwierdzono związków pomiędzy występowaniem w mikrośrodowisku komórek wykazujących ekspresję antygenu CD19 a badanymi cechami kliniczno-histopatologicznymi.

W jednym z przeprowadzonych przez innych autorów badań stwierdzono, że większa „gęstość” komórek wykazujących ekspresję CD19 w mikrośrodowisku była związana w raku piersi z ujemnym statusem receptora estrogenowego i progesteronowego. W badaniu tym wykazano również związek pomiędzy występowaniem komórek CD19+ a przerzutami do węzłów chłonnych oraz wyższym stopniem zaawansowania nowotworu w skali TNM [158]. Autorzy wspomnianego wyżej badania wskazali ponadto, że istnieje specjalna subpopulacja komórek B wykazująca ekspresję markerów CD19, CD24 oraz CD38. Ta subpopulacja komórek B, może być odpowiednikiem regulatorowych limfocytów B. Komórki te poprzez wydzielanie IL-10 mogą wpływać na kształtowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej. Dodatkowo stwierdzono, że obecność komórek B w mikrośrodowisku może promować pojawianie się w mikrośrodowisku limfocytów regulatorowych FoxP3+ [158].

W badaniach z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko CD20 wykazano potencjalną rolę obecności komórek CD20+ w mikrośrodowisku nowotworowym u pacjentów z rakiem piersi. Wykazano, że komórki te mogą odgrywać rolę w szacowaniu prawdopodobieństwa osiągnięcia pCR w trakcie chemioterapii przedoperacyjnej u tych pacjentów. Przewidywanie szans na osiągnięcie pCR w oparciu o obecność komórek CD20+ w tym badaniu było niezależne od parametrów kliniczno-histopatologicznych nowotworu [159]. Te obserwacje zostały potwierdzone przez innych autorów, którzy również wskazali na znaczenie obecności komórek CD20+ w TME w prognozowaniu szans pacjenta na osiągnięcie pCR po zastosowaniu

chemioterapii przedoperacyjnej [160]. Nie stwierdzono podobnych wyników badań w przypadku użycia CD19 jako markera limfocytów B w TME.

2.2 TAMs

TAMs to makrofagi, które zostaną zrekrutowane do mikrośrodowiska nowotworowego [105][107]. Wśród TAMs wyróżnia się dwie subpopulacje komórkowe czyli makrofagi M1 i M2. Obie te formy mogą przechodzić w siebie w procesie nazywanym polaryzacją. Wykazano, że biologia TNBC sprzyja polaryzacji makrofagów M1 do formy M2 [161]. Makrofagi M2 są związane z działaniem immunosupresyjnym. Zjawisko to może sprzyjać rozwojowi nowotworu oraz może być związane z powstawaniem przerzutów [114]. Markerem stosowanym do potwierdzenia obecności makrofagów w badanych tkankach przy pomocy reakcji immunohistochemicznej jest CD68, markerem stosowanym do potwierdzenia obecności makrofagów M2 jest CD163 [162].

Związek TAMs z rozwojem i przebiegiem nowotworów złośliwych wykazano w badaniach przeprowadzonych na nowotworach złośliwych w różnych lokalizacjach [163-167]. W badaniach dotyczących raka piersi i występowania TAMs w obrębie mikrośrodowiska nowotworowego wykazano związek obecności komórek CD163+ w TME z brakiem obecności receptorów estrogenowych i progesteronowych w komórkach raka [168]. Ibrahim i wsp. potwierdzili w swoich badaniach, że mikrośrodowisko TNBC zawierało więcej komórek CD68+ i CD163+ niż mikrośrodowisko guzów luminalnych [168].

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono w TME obecność zarówno komórek wykazujących ekspresję CD68 jak i komórek wykazujących ekspresję CD163. Obecność komórek CD68+ została potwierdzona w 98,71% badanych przypadków. Komórki CD163+ występowały w 99,04% przypadków. Oba typy komórek były licznie obecne w obrębie mikrośrodowiska i tworzyły one strukturę przypominającą sieć. Poziomy ekspresji CD68 były w komórkach mikrośrodowiska TNBC nieco wyższe niż poziomy ekspresji CD163. Siła otrzymanej reakcji w przypadku komórek CD68+ miała większe nasilenie niż w przypadku komórek CD163+.

Na podstawie analiz otrzymanych wyników potwierdzono korelacje pomiędzy ekspresją w komórkach mikrośrodowiska TNBC markerów związanych z TAMs

a częścią badanych cech kliniczno-histopatologicznych. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy obecnością w mikrośrodowisku komórek CD68+ a średnicą guza oraz dodatnią korelację pomiędzy obecnością komórek CD163+ a średnicą guza i liczbą mitoz liczoną na 10 HPF. Obecność powyższych korelacji wskazywać może na związek TAMs z potencjałem wzrostowym raków piersi.

Obserwowano również związki pomiędzy obecnością komórek CD163+ a stopniem pT nowotworu, stopniem dojrzewania nowotworu określonym w skali NHG oraz statusem węzłów chłonnych. Stwierdzono, że wyższa ekspresja CD163 w komórkach mikrośrodowiska związana była z niższym stopniem dojrzewania histologicznego badanego nowotworu. W rakach w stopniu NHG3 stwierdzono najwyższe wartości ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska. Najniższa mediana otrzymanych wyników występowała natomiast w rakach NHG1.

Otrzymane wyniki są zbieżne z wynikami badań i analiz przeprowadzonych przez innych autorów. W badaniach przeprowadzonych przez Medreka i wsp. potwierdzono, że większa ekspresja komórek CD68+ i CD163+ w mikrośrodowisku nowotworów piersi związana była z niższym stopniem dojrzewania histologicznego raka. Co więcej obecność licznych komórek CD68+ w mikrośrodowisku związana była z większą średnicą raka oraz wyższymi wartościami Ki-67 [169]. W jednym z przytoczonych wcześniej badań przeprowadzonym przez Ibrahima i wsp. wykazano ponadto, że obecność licznych komórek CD163+ korelowała z takimi cechami raka piersi jak: wyższy stopień w skali NHG, większa średnica guza oraz wyższe wartości Ki-67 [168]. Dodatnią korelację komórek CD68+ ze średnicą guza potwierdzono również w innym badaniu przeprowadzonym u pacjentów z TNBC [170].

Co ciekawe w trakcie analizy ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska w zależności od stopnia pT badanego nowotworu stwierdzono, że otrzymane wartości ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska były podobne w przypadku raków w stopniu pT1a i pT4b. Najniższa wartość mediany otrzymanych wyników obserwowana była w przypadku raków w stopniu pT1c.

Podobne obserwacje wiązały się z poziomem ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska a jego związkiem ze statusem węzłów chłonnych. W przypadku raków w stopniu pN0 stwierdzono najwyższe wartości maksymalne ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska. Mediana otrzymanych wyników w przypadku stopnia pN0 była taka sama jak w przypadku raków ze statusem węzłów chłonnych w stopniu pN2 i pN3. Najniższe wartości otrzymanych wyników ekspresji CD163 w komórkach

mikrośrodowiska TNBC stwierdzono w przypadku raków ze statusem węzłów chłonnych w stopniu pN1. Należy jednak pamiętać, że przypadki ze statusem węzłów chłonnych, określanym jako pN0, stanowiły zdecydowaną większość w badanej grupie.

Podobnych obserwacji nie dokonano w przypadku zależności stopnia pT od ekspresji CD68 w komórkach mikrośrodowiska. W przypadku tego antygenu obserwowano wzrost otrzymanych wyników ekspresji CD68 wraz ze wzrostem stopnia pT badanego nowotworu.

Opisane powyżej obserwacje mogą wskazywać na to, że obecność makrofagów wykazujących ekspresję CD163, czyli makrofagów typu M2, nie jest zjawiskiem związanym jedynie z rozwojem bardzo zaawansowanych nowotworów oraz nie ma wpływu jedynie na powstawanie przerzutów, ale jest również zjawiskiem występującym we wczesnych fazach rozwoju nowotworu.

Interesujące wyniki, mogące częściowo tłumaczyć otrzymane w przeprowadzonym badaniu rezultaty, związane z ekspresją komórek CD68+ i CD163+ w mikrośrodowisku, również w zmianach na wczesnym etapie rozwoju, przeprowadzono z wykorzystaniem modeli mysich. Badano obecność komórek CD68+ i CD163+ w obrębie zmian inwazyjnych oraz w okolicy zmian przedinwazyjnych. Wykazano, że makrofagi są rekrutowane w okolice zmian już w chwili powstawania zmian przedinwazyjnych. Co ciekawe zwiększony napływ makrofagów korelował z potencjałem złośliwości zmian przedinwazyjnych i nie był obserwowany w przypadku zmian przedinwazyjnych o niskim potencjale złośliwości. Dodatkowo stwierdzono, że już na wczesnym etapie rozwoju raka inwazyjnego część makrofagów polaryzowała się w kierunku makrofagów o właściwościach immunosupresyjnych. Na dalszych etapach przeprowadzonego badania w jednej z badanych podgrup okolica zmian przedinwazyjnych została pozbawiona makrofagów. Wiązało się to z rozwojem zmian przedinwazyjnych o niższym potencjale złośliwości, mniejszą komórkowością zmian przedinwazyjnych oraz opóźnieniem wzrostu guza względem podgrup z niezmienną liczbą makrofagów. Co więcej zaobserwowano, że w modelu z niezmienną liczbą makrofagów częściej stwierdzano naruszenie błon podstawnych zmian przedinwazyjnych [171]. Wyniki te wskazują na to, że makrofagi są istotnymi komórkami już na wczesnych etapach rozwoju nowotworu. W badaniu przeprowadzonym przez innych autorów wykazano natomiast, że usunięcie TAMs z guza skutkowało zahamowaniem jego wzrostu oraz wzrostem naciekania tego guza przez limfocyty CD8+ [172].

Potwierdzono, że komórki potrójnie ujemnego raka piersi sprzyjają osiedlaniu się w mikrośrodku TNBC makrofagów. W obrębie guzów diagnozowanych jako TNBC stwierdzono wyższy poziom czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (*ang. macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) niż w innych podtypach biologicznych raka piersi. Mikrośrodek TNBC sprzyjał polaryzacji makrofagów w kierunku makrofagów M2 [161][173]. Podobne obserwacje dotyczyły czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (*ang. granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) w mikrośrodku TNBC. W badaniu Hollmén i wsp. wykazano, że w przypadkach potrójnie ujemnego raka piersi stwierdzano wysokie poziomy G-CSF. Było to związane z obecnością licznych komórek CD163+ w obrębie mikrośrodka badanych guzów. Co więcej wydzielanie G-CSF przez linie komórkowe TNBC w tym badaniu wpływało na interakcje pomiędzy makrofagami a komórkami nowotworowymi i związane było z większymi zdolnościami migracyjnymi komórek raka piersi [174].

Obecność różnych poziomów komórek CD68+ i CD163+ na różnych etapach rozwoju nowotworu została wykazana również w badaniach przeprowadzonych na zmianach pochodzących z jamy ustnej. Wykazano, że poziom ekspresji obu badanych antygenów był najwyższy w ogniskach raka płaskonabłonkowego inwazyjnego jamy ustnej. Pośredni poziom ekspresji CD68 i CD163 był stwierdzony w obszarach zawierających dysplazję nabłonka płaskiego, natomiast w rejonach prawidłowej błony śluzowej ekspresja badanych antygenów była najniższa [162].

W badaniach dotyczących znaczenia makrofagów w rozwoju zmian przedinwazyjnych i inwazyjnych na wczesnym etapie, a w szczególności obecności komórek CD163+ w takich zmianach, wskazuje się również na znaczenie chemokin. Jedną z takich chemokin jest białko chemotaktyczne dla monocytów (*ang. chemokine C-C motif ligand 2*, CCL2) [175]. Zauważano, że CCL2 może być chemokiną obecną na wczesnych stadiach rozwoju nowotworu złośliwego i może promować wytwarzanie kolejnych chemokin. CCL2 może być uwalniana zarówno przez komórki mikrośrodka jak i komórki nowotworowe [175]. Wykazano, że wysoka ekspresja CCL2 charakteryzuje makrofagi mikrośrodka związane z wydzielaniem M-CSF do tego mikrośrodka. Blokada CCL2 wpływa na zmniejszenie w makrofagach ekspresji markerów związanych z polaryzacją tych komórek w kierunku podtypu M2 [176].

W kontekście obecności komórek CD68+ i CD163+ w obrębie mikrośrodowiska nowotworowego zwraca się uwagę na związek tych komórek z obecnością przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej w komórkach nowotworowych. Jednym z istotnych zjawisk EMT jest obniżenie ekspresji e-kadheryny w komórkach nabłonkowych. Efektem zachodzących zmian jest osłabienie połączeń międzykomórkowych w komórkach raka oraz zwiększone zdolności komórek do przemieszczania się w podścielisku guza. Umożliwienie pojedynczym komórkom nowotworowym oddzielenia się od głównej masy guza prowadzi do większej zdolności nowotworów do naciekania otoczenia [74]. EMT ma również związek z powstawaniem przerzutów [75]. Zależność ta może tłumaczyć w pewnym stopniu związek pomiędzy komórkami CD163+ a stopniem pN oraz związek obecności komórek wykazujących badane antygeny ze stopniem pT i średnicą guza.

W przeprowadzonych przez Zhanga i wsp. badaniach potwierdzono związek pomiędzy obecnością komórek CD163 dodatnich w TME a ekspresją e-kadheryny w komórkach raka typu TNBC. Wykazano, że niska ekspresja e-kadheryny została potwierdzona w 30,6% badanych guzów typu TNBC. Niższa ekspresja e-kadheryny wiązała się u tych pacjentów z niższym dojrzewaniem histologicznym raka [177]. Niska ekspresja e-kadheryny, związek z EMT oraz obfity naciek zapalny są związane nie tylko z TNBC, ale są cechami łączonymi z podtypem molekularnym raków piersi jakim jest claudin-low [11][80].

Zagouri i wsp. wskazali natomiast, że przemiany nabłonkowo-mezenchymalne w TNBC mogą powstawać w nieco innym mechanizmie. Mogą one mianowicie wynikać z nadekspresji w TNBC c-Met. Wysoka ekspresja c-Met wiązała się z krótszym ogólnym przeżyciem oraz krótszym przeżyciem wolnym od wznowy. Nawet 52% guzów TNBC wykazywała nadekspresję c-Met. W guzach tych częściej obserwowano niższy stopień dojrzałości histologicznej guza (NHG3) [76]. c-Met wskazano jako nowy potencjalny cel terapii przeciwnowotworowej [178].

Wpływ na potencjał wzrostowy guza w odniesieniu do TAMs wynika oczywiście również z wydzielanych przez te komórki MMPs. Rolą MMPs jest przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej. Może to prowadzić do wzrostu guza i powstawania przerzutów odległych [112][115].

2.3 CD138

W prawidłowych tkankach białko CD138 ulega ekspresji na komórkach plazmatycznych. Ekspresję CD138 stwierdzić możemy również w różnych typach komórek nabłonkowych [179]. W przeprowadzonym badaniu komórki wykazujące ekspresję markera CD138 stanowiły niewielką część komórek mikrośrodowiska. Otrzymana reakcja miała zazwyczaj niskie nasilenie. Mediana otrzymanych wyników wynosiła 0. W trakcie oceny mikroskopowej obecności komórek CD138+ w mikrośrodowisku TNBC stwierdzono występowanie w niektórych przypadkach dodatniej ekspresji CD138 w komórkach raka piersi. Taką pozytywną reakcję w komórkach TNBC w grupie badanej potwierdzono w 199 spośród 312 analizowanych przypadków. Obecność komórek CD138+ w obrębie komórek nowotworowych została potwierdzona również przez innych autorów [180]. Obecność ekspresji CD138 na komórkach raka wykazano między innymi w przypadku raka: przełyku, szyjki macicy, płuc, pochwy, piersi, pęcherza moczowego, pęcherzyka żółciowego, trzustki czy jajnika i prostaty [179].

W badaniach dotyczących podtypów biologicznych raka piersi wykazano dodatkowo, że ekspresja CD138 była wyższa w przypadku TNBC niż w przypadku innych podtypów biologicznych raka piersi. Co więcej wykazano że terapia skierowana przeciwko CD138 wiązała się z zahamowaniem wzrostu guzów. Powoduje to, że leki skierowane przeciwko CD138 są atrakcyjnym kierunkiem badań nad nowymi możliwymi terapiami w różnych typach nowotworów, szczególnie pochodzenia nabłonkowego [181][182].

W przeprowadzonym badaniu nie wykazano związków ekspresji CD138 w komórkach mikrośrodowiska z cechami kliniczno-histopatologicznymi analizowanych guzów. W badaniach przeprowadzonych przez innych autorów również nie potwierdzono takich związków [180].

2.4 CD1a

CD1a jest uznawany za marker niedojrzałych komórek dendrytycznych. Jest to również cząsteczka związana z prezentacją antygenów. Komórki CD1a mogą wnikać do tkanki nowotworowej i brać udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej [183]. Obecność komórek CD1a+ potwierdzono w przeprowadzonym badaniu w nieco ponad połowie badanych przypadków TNBC (w 50,96% przypadków). Dodatni odczyn zazwyczaj dotyczył pojedynczych komórek mikrośrodowiska. Niska ekspresja cząsteczki CD1a w komórkach mikrośrodowiska została również potwierdzona przez innych badaczy [184].

Pomimo niskich wartości ekspresji CD1a w komórkach mikrośrodowiska w przeprowadzonym badaniu wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy ekspresją białka CD1a w komórkach TME a stopniem dojrzewania raka piersi. Wraz ze zwiększeniem stopnia NHG obserwowano nieznaczny wzrost wartości ekspresji CD1a w komórkach mikrośrodowiska. W przypadku raków NHG3 stwierdzono wyższą wartość mediany oraz wyższą wartość wartości maksymalnych niż w rakach NHG1 i NHG2. Nie znaleziono badań odnoszących się do otrzymanych wyników.

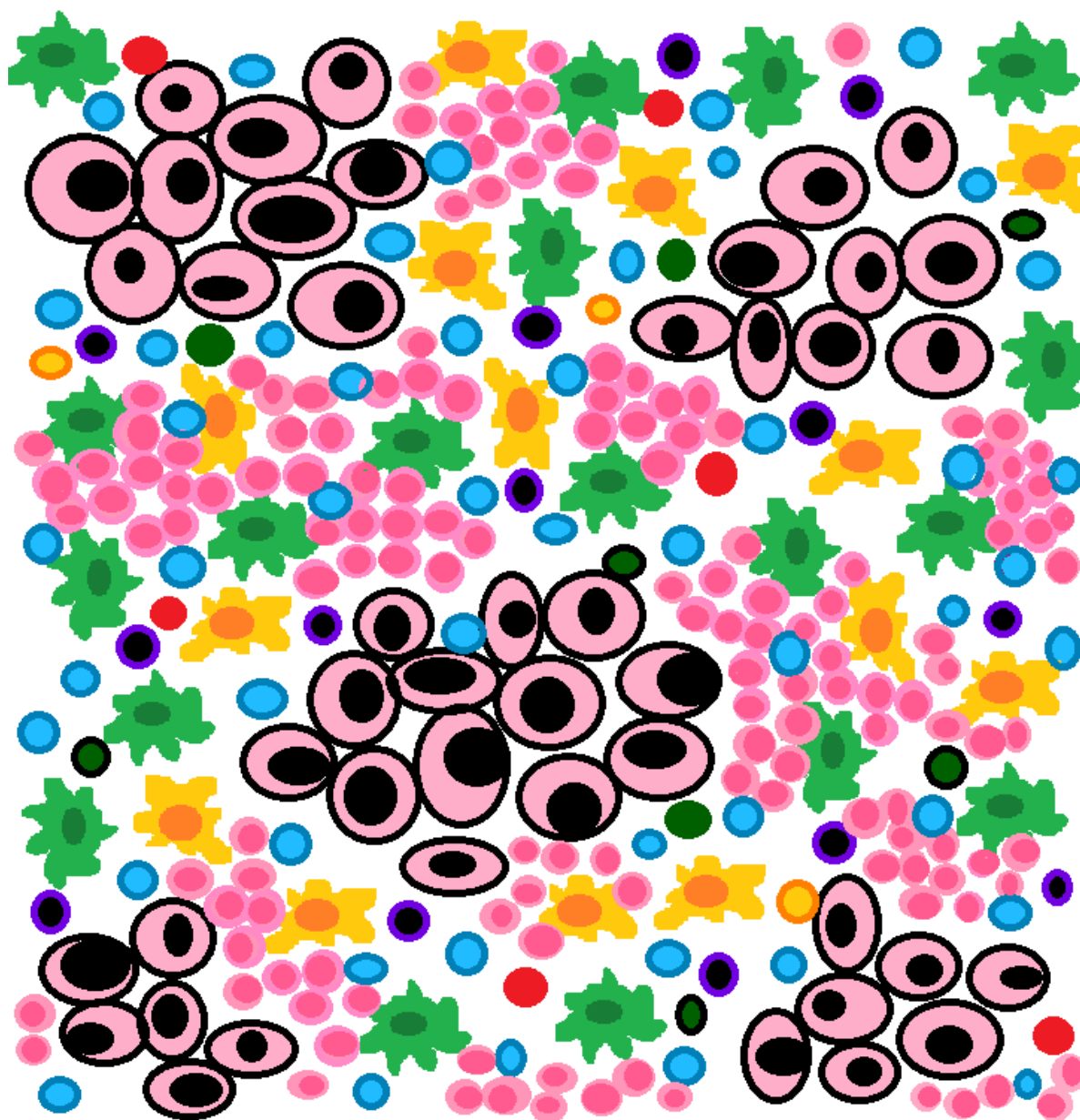
Jest niewiele prac badawczych związanych z ekspresją CD1a w obrębie mikrośrodowiska nowotworów. W jednym z takich badań, dotyczącym raka piersi, wykazano, że ekspresja CD1a w TME nie miała istotnego statystycznie związku z 5-letnim przeżyciem pacjentów [185]. Brak zależności pomiędzy obecnością komórek CD1a+ pomiędzy danymi klinicznymi oraz przeżyciem potwierdzili w swoich badaniach również Iwamoto i wsp. [186]. Wskazuje się, że być może lepszym markerem związanym z obecnością komórek dendrytycznych w TME TNBC jest CD83 [185].

3. Korelacje między danymi histopatologicznymi oraz klinicznymi

Potwierdzono dodatnią korelację pomiędzy średnicą guza a liczbą mitoz/10HPF oraz liczbą przerzutowych węzłów chłonnych. Wykazano również obecność ujemnej korelacji pomiędzy wiekiem pacjentki w chwili rozpoznania TNBC a liczbą mitoz/10HPF.

Obecność korelacji danych histopatologicznych i klinicznych potwierdzona została również przez innych autorów. Thike i wsp. również potwierdzili związek pomiędzy średnicą guza a statusem węzłów chłonnych [187]. Zwiększona liczba mitoz/10HPF jest wyrazem zwiększonej proliferacji guza i stąd może wynikać związek pomiędzy tym parametrem a średnicą raka. Ujemna korelacja pomiędzy wiekiem pacjentki w chwili rozpoznania nowotworu a liczbą mitoz/10HPF wskazywać może na zmniejszenie potencjału proliferacyjnego nowotworów piersi w zależności od wieku pacjentek.

Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano następujący schemat przedstawiający mikrośrodowisko TNBC:



	komórki raka		komórki CD68+
	komórki CD4+		komórki CD163+
	komórki CD8+		komórki CD138+
	komórki FoxP3+		komórki CD1a+
	komórki CD19+		komórki CD56+

VI. WNIOSKI

1. Wśród potrójnie ujemnych raków piersi dominują raki typu NST o niskim stopniu dojrzałości;
Rozpoznanie potrójnie ujemnego raka piersi typu NST oraz raka metaplastycznego wiąże się z niekorzystnym rokowaniem.
2. Komórkami dominującymi w mikrośrodkowisku potrójnie ujemnego raka piersi są komórki CD4+, CD8+, CD68+, CD163+;
Komórki mikrośrodkowiska wpływają na siebie wzajemnie tworząc bardzo liczne zależności;
W składzie komórkowym mikrośrodkowiska nie potwierdzono różnic zależnych od podtypu histologicznego potrójnie ujemnego raka piersi.
3. Limfocyty naciekające potrójnie ujemne raki piersi mają związek z oszacowaniem odpowiedzi na neoadiuwantową chemioterapię;
Obecność makrofagów naciekających guz jest związana z potencjałem proliferacyjnym, wzrostowym i przerzutowym potrójnie ujemnego raka piersi;
Ze względu na stwierdzoną rolę w mikrośrodkowisku potrójnie ujemnego raka piersi komórek CD68+, CD163+, FoxP3+ wskazane jest prowadzenie dalszych badań w celu poznania ich szczegółowego wpływu na biologię tego podtypu nowotworu.

VII. STRESZCZENIE

Rak piersi jest najczęściej stwierdzanym w Polsce nowotworem złośliwym kobiet. W ostatnich latach obserwowana jest tendencja wzrostowa liczby nowych zachorowań na raka piersi. Rak piersi stanowi niezwykle heterogenną grupę nowotworów, zarówno pod względem morfologicznym, biologicznym jak i molekularnym. W każdym przypadku rozpoznanego raka piersi należy określić jego podtyp biologiczny. Potrójnie ujemny rak piersi (TNBC) to podtyp raka piersi, w którym w komórkach raka nie stwierdza się obecności receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz nie stwierdza się nadekspresji białka HER-2. Szacuje się, TNBC stanowi między 12 a 24 % wszystkich przypadków raka piersi. Przebieg kliniczny TNBC jest w większości przypadków bardziej agresywny niż przebieg choroby nowotworowej w innych podtypach biologicznych. Ze względu na brak receptorów hormonalnych oraz brak nadekspresji białka HER-2 w komórkach raka, rozpoznanie TNBC wiąże się z ograniczonymi możliwościami terapeutycznymi. Obecnie podstawową metodą leczenia TNBC jest leczenie operacyjne skojarzone z przedoperacyjną chemioterapią.

Mikrośrodowisko nowotworowe (TME) stanowi nienowotworowy komponent guza. TME ma bardzo złożoną budowę. W skład mikrośrodowiska wchodzi: macierz pozakomórkowa, makrofagi, limfocyty, plazmocyty, fibroblasty, komórki tłuszczowe, komórki nabłonkowe oraz śródbłónki naczyń. Elementy mikrośrodowiska wpływają na siebie wzajemnie oraz wchodzi w interakcje z komórkami nowotworowymi.

Konieczne jest poszukiwanie nowych ścieżek terapeutycznych dla pacjentów z TNBC w celu poprawienia rokowania w tym podtypie biologicznym.

Celami pracy było scharakteryzowanie raków typu TNBC jako podtypu biologicznego ze szczególnym uwzględnieniem, powiązań danych klinicznych z danymi histopatologicznymi, określenie elementów mikrośrodowiska TNBC oraz próba określenia zależności pomiędzy elementami mikrośrodowiska a cechami histopatologicznymi nowotworu.

Grupa badana składała się z 312 przypadków wyselekcjonowanych ze wszystkich przypadków raka piersi zdiagnozowanych w latach 2011-2017 w Wielkopolskim Centrum Onkologii. W celu wykonania badań immunohistochemicznych przygotowano

mikromacierze tkankowe. Na przygotowanych z mikromacierzy skrawkach przeprowadzono badania immunohistochemiczne w celu wykrycia antygenów: CD4, CD8, FoxP3, CD68, CD163, CD19, CD56, CD138, CD1a.

Najczęstszym podtypem raka stwierdzanym w grupie badanej był rak typu NST. Większość przypadków stanowiły raki NHG3. Rozpoznanie raka typu NST oraz raka metaplastycznego wiązało się z występowaniem niekorzystnych parametrów histopatologicznych guza. Nie stwierdzono występowania różnic pomiędzy składem komórkowym mikrośrodowiska a podtypem histologicznym TNBC. Komórkami dominującymi w obrębie mikrośrodowiska wszystkich guzów były komórki CD4+, CD8+, CD68+, CD163+ oraz FoxP3+. Występowały liczne korelacje pomiędzy poszczególnymi elementami mikrośrodowiska. Potwierdzono związek pomiędzy obecnością komórek CD68+ i CD163+ a takimi parametrami histopatologicznymi TNBC jak: większa średnica guza, wyższy stopień pT, wyższy stopień pN, większa liczba mitoz na 10HPF. Wysoka ekspresja CD163 obserwowana była zarówno na wczesnych etapach rozwoju TNBC jak i w jego zaawansowanych stadiach. Nie potwierdzono zależności pomiędzy cechami histopatologicznymi nowotworu a obecnością komórek CD4+ lub CD8+.

Obecność makrofagów naciekających guz związana jest z potencjałem proliferacyjnym, wzrostowym i przerzutowym TNBC. Limfocyty naciekający potrójnie ujemne raki piersi mają związek z oszacowaniem odpowiedzi na neoadiuwantową chemioterapię.

W związku z rolą jaką odgrywają komórki CD68+, CD163+ oraz FoxP3+ w mikrośrodowisku TNBC wskazane jest prowadzenie dalszych badań związanych z ich wpływem na rozwój i przebieg TNBC.

VIII. ABSTRACT

Breast cancer is a the most commonly diagnosed cancer among women in Poland. In recent years, there has been an upward trend in the number of new cases of breast cancer. Breast cancer is an extremely heterogeneous group of neoplasms: morphologically, biologically and molecularly. With regards to therapy, each case must be assessed individually to identify its biological subtype. Triple negative breast cancer (TNBC) is a biological subtype of breast cancer in which there are no progesterone and estrogen receptors in cell and where there is no overexpression of HER-2 protein. It is estimated that TNBC represents between 10 and 14 percent of all cases of breast cancer. In most cases the clinical course of TNBC is more aggressive than that of neoplastic disease of other biological subtypes. Due to the lack of hormone receptors as well as HER-2 protein overexpression in cancer cells, the diagnosis of TNBC is associated with limited therapeutic options. Currently the main method of treating TNBC is surgery combined with preoperative chemotherapy.

The tumour microenvironment is a non-neoplastic element of the tumour and has a very complex composition. This includes the extra-cellular matrix, macrophages, lymphocytes and fibroblasts, fat cells, and both epithelial and endothelial cells. Each of these elements affects each of the others and is involved in interactions with tumour cells.

In order to improve the prognosis for this biological subtype, new ways of therapy need to be explored for TNBC patients.

The aim of the study was to characterize TNBC carcinomas as a biological subtype with particular emphasis on the relations between clinical and histopathological data, to determine the elements of the microenvironment in TNBC and attempt to determine the correlation between the microenvironmental elements and the histopathological features of the tumor.

The study group consisted of 312 cases selected from all breast cancer cases diagnosed between 2011 and 2017 in the Greater Poland Cancer Centre. Tissue microarrays were prepared due to perform immunohistochemical stains. Tissue microarrays were prepared, using three cores from each tissue sample. Immunohistochemistry was performed in TMA in order to determine

the presence of CD4, CD8, FoxP3, CD68, CD163, CD19, CD56, CD138, CD1a antigens.

The most common cancer subtype found in the study group was NST. Most of the cases were NHG3 cancers. The diagnosis of NST cancer and metaplastic cancer was associated with the occurrence of unfavorable histopathological parameters of the tumor. There were no determined differences between cellular composition of the microenvironment and histological subtype of TNBC. The CD4+, CD8+, CD68+, CD163+ and FoxP3+ cells were dominant cells in the microenvironment of all tumors. There were numerous correlations between individual elements within the microenvironment. The relationship between the presence of CD68+ and CD163+ cells and such histopathological parameters of TNBC as: larger tumor diameter, higher pT degree, higher pN degree, higher number of mitoses per 10HPF was confirmed. High expression of CD163 was observed both in early and advanced stages of TNBC development. The relationship between histopathological features of the tumor and the presence of CD4+ or CD8+ cells was not confirmed.

The presence of tumor-infiltrating macrophages is associated with the proliferative, growth and metastatic potential of TNBC. Lymphocytes infiltrating triple-negative breast cancer are associated with the assessment of responses to neoadjuvant chemotherapy.

Due to the role that CD68+, CD163+ and FoxP3+ cells have in the TNBC microenvironment it is advisable to conduct further research on to their influence on the development and course of TNBC.

IX. SPIS TABEL I RYCIN

Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja histologiczna raków piersi według WHO .

Tabela 2. Zasady oceny ekspresji białka HER2 w badaniach immunohistochemicznych.

Tabela 3. Podtypy biologiczne raka piersi w oparciu o status receptora estrogenowego (ER), progesteronowego (PR) oraz ocenę ekspresji białka HER-2.

Tabela 4. Odsetek przypadków TNBC w podtypach histologicznych raka piersi określonych zgodnie z klasyfikacją WHO.

Tabela 5. Podtypy molekularne TNBC wraz z zaburzeniami procesów komórkowych w nich występującymi.

Tabela 6. Skala NHG (w modyfikacji Elstona-Ellisa) służąca do oceny stopnia dojrzałości histologicznej raka piersi.

Tabela 7. Składowa pT skali pTNM określająca miejscowe zaawansowanie guza pierwotnego w raku piersi.

Tabela 8. Składowa pN skali pTNM określająca status węzłów chłonnych u pacjentów z rakiem piersi.

Tabela 9. Składowa pM skali pTNM określająca obecność lub brak przerzutów odległych u chorych z rakiem piersi.

Tabela 10. Wartości minimalne, maksymalne oraz średnie dla: wieku pacjentek w chwili rozpoznania raka, średnicy guza, liczby mitoz/10HPF, wartości Ki-67 w grupie badanej.

Tabela 11. Rozkład pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi w grupie badanej w zależności od stopnia pT, stopnia pN oraz stopnia dojrzałości nowotworu w skali NHG.

Tabela 12. Zestawienie przeciwciał zastosowanych w przeprowadzonych reakcjach immunohistochemicznych wraz z reakcjami kontrolnymi przeprowadzonymi dla poszczególnych przeciwciał.

Tabela 13. Skala IRS (immunoreactive score) wg Remmele i Stegner.

Tabela 14. Zestawienie mediany, wartości minimalnych, maksymalnych, średnich oraz odchylenia standardowego dla wykonanych odczynów immunohistochemicznych (przy zastosowaniu skali IRS).

Tabela 15. Korelacje pomiędzy elementami komórkowymi wchodzącymi w skład mikrośrodowiska TNBC w obrębie grupy badanej.

Tabela 16. Wyniki analiz korelacji statystycznych ekspresji oznaczonych antygenów względem średnicy guza, liczby przerzutowych węzłów chłonnych oraz liczby mitoz.

Tabela 17. Wyniki analiz statystycznych korelacji pomiędzy średnicą guza, liczbą przerzutowych węzłów chłonnych, liczbą mitoz a wiekiem pacjentki w chwili rozpoznania nowotworu.

Spis rycin

Rycina 1. Schemat postępowania po wykonanych badaniach immunohistochemicznych nadekspresji białka HER-2 w przypadku otrzymania wyniku określonego jako niejednoznaczny.

Rycina 2. Rozkład podtypów histologicznych raka piersi w badanej grupie.

Rycina 3. Mikrofotografie przedstawiające zróżnicowanie budowy histologicznej potrójnie ujemnych raków piersi w obrębie grupy badanej.

Rycina 4. Wykres kolumnowy przedstawiający średnicę guza (średnia) w zależności od rozpoznanego podtypu histologicznego raka piersi w grupie badanej.

Rycina 5. Wykres kolumnowy przedstawiający liczbę mitoz (średnia zaokrąglona do całości) liczonych w 10 dużych polach widzenia mikroskopu w zależności od rozpoznanego podtypu histologicznego raka piersi w grupie badanej.

Rycina 6. Wykres kolumnowy przedstawiający wartości Ki-67 (średnia zaokrąglona do całości) w zależności od rozpoznanego podtypu histologicznego raka piersi w grupie badanej.

Rycina 7. Wykres kolumnowy przedstawiający średni wiek pacjentek w chwili rozpoznania potrójnie ujemnego raka piersi (w zaokrągleniu do całości) i w zależności od rozpoznanego podtypu histologicznego guza w grupie badanej.

Rycina 8. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD4 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu.

Rycina 9. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD8 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu.

Rycina 10. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu FoxP3 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu.

Rycina 11. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD68 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu.

Rycina 12. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu.

Rycina 13. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD19 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu.

Rycina 14. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD56 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu.

Rycina 15. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD138 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu.

Rycina 16. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD138 w komórkach raka inwazyjnego.

Rycina 17. Reprezentatywny odczyn reakcji immunohistochemicznej wykrywającej obecność antygenu CD1a w komórkach mikrośrodowiska nowotworu .

Rycina 18. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający zestawienie ekspresji badanych antygenów w komórkach mikrośrodowiska TNBC w wykonanych odczynach immunohistochemicznych.

Rycina 19. Przykładowe rozmieszczenia w mikrośrodowisku TNBC komórek wykazujących ekspresję badanych antygenów.

Rycina 20. Zestawienie obecności badanych antygenów w obrębie mikrośrodowiska z uwzględnieniem odsetka komórek mikrośrodowiska wykazujących dodatnie z badanym przeciwciałem.

Rycina 21. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia NHG raka piersi.

Rycina 22. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD1a w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia NHG raka piersi.

Rycina 23. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji FoxP3 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia NHG raka piersi.

Rycina 24. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia pT raka piersi.

Rycina 25. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD68 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia pT raka piersi.

Rycina 26. Wykres „ramka-wąsy” przedstawiający różnice ekspresji CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu względem stopnia pN.

Rycina 27. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy ekspresją CD68 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu a średnicą guza.

Rycina 28. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy ekspresją CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu a średnicą guza .

Rycina 29. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy ekspresją FoxP3 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu a liczbą mitoz liczoną w 10 dużych polach widzenia mikroskopu.

Rycina 30. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy ekspresją CD163 w komórkach mikrośrodowiska nowotworu a liczbą mitoz liczoną w 10 dużych polach widzenia mikroskopu.

Rycina 31. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy liczbą przerzutowych węzłów chłonnych a średnicą guza.

Rycina 32. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy liczbą mitoz liczoną w 10 dużych polach widzenia mikroskopu a średnicą guza.

Rycina 33. Wykres rozrzutu przedstawiający związek pomiędzy liczbą mitoz liczoną w 10 dużych polach widzenia mikroskopu a wiekiem pacjentki w trakcie rozpoznania.

X. PIŚMIENNICTWO

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 2017; 67:7-30.
2. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. [http://onkologia.org.pl/raporty/dostęp na 04/2021](http://onkologia.org.pl/raporty/dostęp%20na%2004/2021).
3. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E i wsp. WHO Classification of Tumours Editorial Board. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology* 2020; 77(2):181-185.
4. WHO Classification of Tumours Editorial Board. WHO Classification of Tumours 5th Edition: Breast tumours. 2019; 82-161.
5. Cserni G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica* 2020; 112:25-41.
6. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology* 2012; 23(suppl 10):207–210.
7. Cadoo KA, Fornier MN, Morris PG. Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2013; 57:312-321.
8. Ozlem Yersal, Sabri Barutca. Biological subtypes of breast cancer. Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology* 2014; 5(3):412-424.

9. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rija M i wsp. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747–752.
10. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL i wsp. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer* 2012; 118:5463-5472.
11. Prat A, Parker J, Karginova O, Fan C i wsp. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research* 2010; 12:R68.
12. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A i wsp.. Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate aRelationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies. *PLoS Medicine* 2010; 7(5): e1000279.
13. Tang P, Tse GM. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. *Archives of Pathology & Laboratory* 2016; 140(8):806-814.
14. Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, Basso U i wsp. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Current Medicinal Chemistry* 2013; 20(5):596-604.
15. Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1984; 2(10):1102-1109.
16. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS i wsp. Thresholds for therapy. Highlights of the San Gallen International Experts Consensus on Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Annals of Oncology* 2009; 2009:1319-1329.

17. Marszałek A, Krzakowski M. Recommendations for evaluation of predictive marker HER2 in patients with invasive breast cancer. *Oncology in Clinical Practice* 2018; 14(5):272-277.
18. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2011; 135(1): 55-62.
19. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular biology international* 2014 (2014): 852748.
20. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE i wsp. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Archives of Pathology & Laboratory medicine* 2018; 36(20):2105-2122.
21. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clinical Medicine & Research* 2009; 7(1-2):4-13.
22. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA i wsp. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 2007; 109(9):1721-1728.
23. Zhao S, Ma D, Xiao Y, Jiang YZ i wsp. Clinicopathologic features and prognoses of different histologic types of triple-negative breast cancer: A large population-based analysis. *European Journal of Surgical Oncology* 2018; 44(4):420-428.
24. Rakha EA, Ellis I. Triple negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology* 2009, 41: 40-47.

25. Rakha E, Ellis I, Reis-Filho J. Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymous? *Clinical Cancer Research* 2008; 14:618.
26. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B i wsp. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Research* 2007; 9(5):R65.
27. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL i wsp. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology* 2011; 24:157–167.
28. Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK i wsp. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* 2013; 18:123-133.
29. de Ronde JJ, Hannemann J, Halfwerk H, Mulder L i wsp. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010; 119:119–126.
30. Jumppanen M, Gruvberger-Saal S, Kauraniemi P, Tanner M i wsp. Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. *Breast Cancer Research* 2007; 9:R16.
31. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B i wsp. How basal are triple-negative breast cancers? *International Journal of Cancer* 2008; 123:236–240.
32. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M i wsp. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:5367–5374.
33. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S i wsp. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical Cancer Research* 2008; 14:1368–1376.

34. Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D i wsp. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *Journal of Clinical Pathology* 2006; 59:729–735.
35. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS i wsp. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109:25–32.
36. Elsayaf Z, Sinn HP, Rom J, Bermejo JL i wsp. Biological subtypes of triple-negative breast cancer are associated with distinct morphological changes and clinical behaviour. *The Breast* 2013; 22(5):986-992.
37. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discovery* 2019; 9(2):176-198.
38. Rastelli F, Biancanelli S, Falzetta A, Martignetti i wsp. Triple-negative breast cancer: current state of the art. *Tumori* 2010; 96: 875-888.
39. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM i wsp. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research* 2007; 15: 4429-4434.
40. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D i wsp. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018. National Cancer Institute. Bethesda, MD. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/, dostęp na 04.2021.
41. Rahmani L, Shahriari Ahmadi A, Basi A, Zarouk Ahimahalle T. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Characteristics, Prognostic Features, and Long-Term Outcome: A Comparative Study. *International Journal of Hematology Oncology and Stem Research* 2012; 6(1):24-29.
42. Ajay A, Radhakrishnan P. Clinical pathological and epidemiological study of triple negative breast cancer 2017. *International Journal of Research in Medical Sciences* 2017; 5(6):2657-2661.

43. Criscitiello C, Azim HA, Schouten PC, Linn SC i wsp. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology* 2012; 23 (suppl 6):vi13-vi18.
44. Heitz F, Harter P, Lueck HJ, Fissler-Eckhoff A i wsp. Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *European Journal of Cancer* 2009; 45(16):2792-8.
45. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F i wsp. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26:1275-1281.
46. Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E i wsp. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2009; 115: 423– 428.
47. Metzger-Filho O, Sun Z, Viale G, Price KN i wsp. Patterns of Recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph node-negative disease: results from international breast cancer study group trials VIII and IX. *Journal of Clinical Oncology* 2013; 31(25):3083-3090.
48. Gangi A, Mirocha J, Leong T, Giuliano AE. Triple-negative breast cancer is not associated with increased likelihood of nodal metastases. *Annals of Surgical Oncology* 2014; 21(13):4098-103.
49. Lund, M.J., Trivers, K.F., Porter, P.L. Coates RJ i wsp. Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA. *Breast Cancer Research and Treatment* 2009; 113(2): 357–370.
50. Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS, Niemierko A i wsp. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. *Journal of Clinical Oncoogy*. 2008; 26(14):2373-8.

51. Mills MN, Yang GQ, Oliver DE, Liveringhouse CL i wsp. Histologic heterogeneity of triple negative breast cancer: A National Cancer Centre Database analysis. *European Journal of Cancer* 2018; 98:48-58.
52. Iorfida M, Maiorano E, Orvieto E, Maisonneuve P i wsp. Invasive lobular breast cancer: subtypes and outcome. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012; 133:713-723.
53. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K i wsp. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet* 2014; 384(9938):164-172.
54. Montagna E, Maisonneuve P, Rotmensz N, Canello G i wsp. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: histologic subtyping to inform the outcome. *Clinical Breast Cancer* 2013; 13(1):31-39.
55. Ryś J, Kruczak A. Potrójnie ujemny rak sutka (triple-negative breast cancer) – jednorodna czy heterogenna grupa nowotworów? *Polish Journal of Pathology* 2014; 65 (4) (suppl 2):S53-S61.
56. Huober J, Gelber S, Goldhirsch A, Coates A.S, Viale G i wsp. Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 international breast cancer study group (IBCSG) trials. *Annals of Oncology* 2012; 23:2843–2851.
57. Cao A.Y, He M, Huang L, Shao Z.M i wsp. Clinicopathologic characteristics at diagnosis and the survival of patients with medullary breast carcinoma in China: a comparison with infiltrating ductal carcinoma-not otherwise specified. *World Journal of Surgical Oncology* 2013; 11:91.
58. Mills AM, Gottlieb CE, Wendroth SM, Brenin CM i wsp. Pure Apocrine Carcinomas Represent a Clinicopathologically Distinct Androgen Receptor–Positive Subset of Triple-Negative Breast Cancers. *The American Journal of Surgical Pathology* 2016; 40(8):1109–1116.

59. Takeuchi H, Tsuji K, Ueo H, Kano T i wsp. Clinicopathological feature and long-term prognosis of apocrine carcinoma of the breast in Japanese women. *Breast Cancer Research Treatment* 2004; 88(1):49-54.
60. Bhutani N, Kajal P, Singla S. Adenoid cystic carcinoma of the breast: Experience at a tertiary care centre of Northern India. *International Journal of Surgery Case Reports* 2018; 51:204-209.
61. Arpino G, Clark GM, Mohsin S, Bardou VJ i wsp. Adenoid cystic carcinoma of the breast: molecular markers, treatment, and clinical outcome. *Cancer* 2002; 94(8):2119-2127.
62. Wang S, Ji X, Wei Y, Yu Z i wsp. Adenoid cystic carcinoma of the breast: Review of the literature and report of two cases. *Oncology Letters* 2012; 4(4):701-704.
63. Geyer FC, Pareja F, Weigelt B, Rakha E i wsp. The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease: High- and Low-Grade Lesions. *The American Journal of Pathology* 2017; 187(10):2139-2151.
64. Langlands F, Cornford E, Rakha E, Dall B i wsp. Imaging overview of metaplastic carcinomas of the breast: a large study of 71 cases. *The British Journal of Pathology* 2016; 89(1064):20140644.
65. Jung SY, Kim HY, Nam BH, Min SY i wsp. Worse prognosis of metaplastic breast cancer patients than other patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010; 120:627–637.
66. Liao HY, Zhang WW, Sun JY, Li FY i wsp. The Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Different Histological Subtypes in Triple-negative Breast Cancer. *Journal of Cancer* 2018; 9(2):296-303.

67. Cimino-Mathews A, Verma S, Figueroa-Magalhaes MC, Jeter SC i wsp. A Clinicopathologic Analysis of 45 Patients With Metaplastic Breast Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology* 2016; 145(3):365-372.
68. Pezzi CM, Patel-Parekh L, Cole K, Franko J i wsp. Characteristics and treatment of metaplastic breast cancer: analysis of 892 cases from the National Cancer Data Base. *Annals of Surgical Oncology* 2007; 14(1):166-73.
69. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ i wsp. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Research* 2009; 69(10):4116-4124.
70. Bednarska-Ryś M, Romanowicz H. Potrójnie ujemny rak piersi-diagnostyka i leczenie. *Journal of Oncology* 2012; 62(6):450-454.
71. Chiorean R, Braicu C, Berindan-Neagoe I. Another review on triple negative breast cancer. Are we on the right way towards the exit from the labyrinth? *Breast* 2013; 22(6):1026-1033.
72. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME i wsp. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation* 2011; 121(7):2750-2767.
73. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV i wsp. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* 2016; 11(6):e0157368.
74. Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39:2153-2160.
75. Al Moustafa AE. Epithelial-mesenchymal transition and its regulators are major targets of triple-negative breast cancer. *Cell Adhesion & Migration* 2013; 7:424-425.

76. Zagouri F, Bago-Horvath Z, Rössler F, Brandstetter A i wsp. High MET expression is an adverse prognostic factor in patients with triple-negative breast cancer. *British journal of cancer* 2013; 108(5):1100-1105.
77. Venkitaraman AR. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science* 2014; 343(6178):1470-1475.
78. Hartman AR, Kaldate RR, Sailer LM, Painter L i wsp. Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer. *Cancer* 2012; 118(11):2787-2795.
79. Yagi T, Baba Y, Okadome K, Kiyozumi Y i wsp. Tumour-associated macrophages are associated with poor prognosis and programmed death ligand 1 expression in oesophageal cancer. *European Journal of Cancer* 2019; 111:38-49.
80. Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS i wsp. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *Journal Clinical Oncology* 2012; 30(15):1879-1887.
81. Gangi A, Chung A, Mirocha J, Liou DZ i wsp. Breast-conserving therapy for triple-negative breast cancer. *Journal of the American Medical Association surgery* 2014; 149(3):252-258.
82. Irvin WJ Jr, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *European Journal of Cancer* 2008; 44(18):2799-2805.
83. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2016; 293:247-269.
84. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C i wsp. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2014; 15(7):747-756.

85. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L i wsp. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research* 2007; 13(8):2329-2334.
86. Keam B, Im SA, Kim HJ, Oh DY i wsp. Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II/III breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel and doxorubicin chemotherapy: paradoxical features of the triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2007; 7:203.
87. Sánchez-Muñoz A, García-Tapiador AM, Martínez-Ortega E, Dueñas-García R i wsp. Tumour molecular subtyping according to hormone receptors and HER2 status defines different pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. *Clinical and Translational Oncology* 2008; 10(10):646-653.
88. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 2010; 363(20):1938-1948.
89. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC i wsp. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(20):3271-3277.
90. Kassam F, Enright K, Dent R, Dranitsaris G i wsp. Survival outcomes for patients with metastatic triple-negative breast cancer: implications for clinical practice and trial design. *Clinical Breast Cancer* 2009; 9(1):29-33.
91. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer* 2016; 8:93-107.
92. Salimi M. Study Break: Future of Triple Negative Breast Cancer: Can Immunotherapy Treat This Deadly Subtype of Breast Cancer? *Iranian biomedical journal* 2018; 22(2):76-77.

93. Fan F, Schimming A, Jaeger D, Podar K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *Journal of Oncology* 2012; 2012:281261.
94. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007; 101(4):805-815.
95. Zhang W, Huang P. Cancer-stromal interactions: role in cell survival, metabolism and drug sensitivity. *Cancer Biology & Therapy* 2011; 11(2):150-156.
96. Yuan Y, Jiang Y, Sun C, Chen, QM. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). *Oncology Reports* 2016; 35(5):2499-2515.
97. Chin Y, Janseens J, Vandepitte J, Vandenbrande J i wsp. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. *Anticancer Research* 1992; 12(5):1463–1466.
98. Saraiva DP, Guadalupe Cabral M, Jacinto A, Braga S. How many diseases is triple negative breast cancer: the protagonism of the immune microenvironment. *European Society for Medical Oncology* 2017; 2(4):e000208.
99. DeNardo D, Brennan D, Rexhepaj E, Ruffell B i wsp. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discovery* 2011; 1(1): 54–67.
100. Loi S. Host antitumor immunity plays a role in the survival of patients with newly diagnosed triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2014; 32(27):2935–7.
101. Matsumoto H, Koo SL, Dent R, Tan PH i wsp. Role of inflammatory infiltrates in triple negative breast cancer. *Journal of Clinical Pathology* 2015; 68(7):506–510.

102. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M i wsp. Tumor Associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(1):105–113.
103. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N i wsp. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Annals of Oncology* 2014; 25(8):1544-1550.
104. Shen M, Wang J, Ren X. New Insights into Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Breast Cancer: Clinical Impacts and Regulatory Mechanisms. *Frontiers in Immunology* 2018; 9:470.
105. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P i wsp. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 2002; 23(11):549-555.
106. Gordon S., Taylor P. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5:953–964.
107. Zhou J, Tang Z, Gao S, Li C i wsp. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Frontiers in Oncology* 2020; 10:188.
108. Yang, L., Zhang, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *Journal of Hematology & Oncology* 2017; 10:58.
109. Joanna Kopeć-Szlęzak. Makrofagi i ich rola w układzie krwiotwórczym *Journal of Transfusion Medicine* 2014; 7(3):84-92.
110. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences* 2014; 10(5):520–529.

111. Ni C, Yang L, Xu Q, Yuan H i wsp. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis. *Journal of Cancer* 2019; 10(19):4463-4472.
112. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of clinical investigation* 2007; 117(5):1155-1166.
113. Yuan ZY, Luo RZ, Peng RJ, Wang SS i wsp. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *OncoTargets and Therapy* 2014; 7:1475-1480.
114. Ding J, Jin W, Chen C, Shao Z i wsp. Tumor associated macrophage × cancer cell hybrids may acquire cancer stem cell properties in breast cancer. *PLoS One* 2012; 7(7):e41942.
115. Sousa, S., Brion, R., Lintunen, M. Kronqvist P i wsp. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Research* 2015; 17:101.
116. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X i wsp. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* 2004; 10(9):942–949.
117. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International journal of biological sciences* 2011; 7(5):651-658.
118. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD i wsp. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(34):5373-5380.
119. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi GN. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 2018; 25(7):1783-1785.

120. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW i wsp. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26(19):3153-3158.
121. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British journal of cancer* 1957; 11(3):359-377.
122. Elston CW. Classification and grading of invasive breast carcinoma. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 2005; 89:35-44.
123. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19(5):403-410.
124. Leslie H, Sobin MD. Principles, history and relation to Rother prognostic factors. *American Cancer Society* 2001; 91(58):1589-1592.
125. Brierley JD, Gospodarowicz MK. TNM Klasyfikacja Nowotworów Złośliwych Wydanie Ósme 2017: 168-176.
126. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe* 1987; 8:138–40.
127. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D i wsp. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018. National Cancer Institute. Bethesda, MD. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/, dostęp na 04.2021.
128. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 2012; 10(6):717-728.
129. Chao X, Liu L, Sun P, Yang X i wsp. Immune parameters associated with survival in metaplastic breast cancer. *Breast Cancer Research* 2020; 22:92.

130. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA i wsp. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003; 348(3):203-213.
131. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA i wsp. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Advances in Anatomic Pathology* 2017; 24(6):311-335.
132. Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Takada K i wsp. Use of Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) to predict the treatment response to eribulin chemotherapy in breast cancer. *PLoS ONE* 2017; 12(2):e0170634.
133. Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumorigenesis. *Tumour Biology* 2005; 26(4):173-185.
134. Adams S, Goldstein LJ, Sparano JA, Demaria S i wsp. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) improve prognosis in patients with triple negative breast cancer (TNBC). *Oncoimmunology* 2015; 4(9):e985930.
135. Ingold Heppner B, Untch M, Denkert C, Pfitzner BM i wsp. Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-Treated HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2016; 22(23):5747-5754.
136. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M i wsp. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(1):105-13.

137. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B i wsp. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncology* 2018; 19(1):40-50.
138. Gao Zh, Li Cx, Liu M, Jiang Jy. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2020; 20(1):1150.
139. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R i wsp. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of Clinical Oncology* 2013; 31(7):860-7.
140. West NR, Kost SE, Martin SD, Milne K i wsp. Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *British Journal of Cancer* 2013; 108(1):155-162.
141. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H i wsp. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Research* 2015; 17(1):124.
142. Lee JS, Won HS, Sun S, Hong JH i wsp. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 2018; 97(32):e11769.
143. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H i wsp. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(23):8326-8331.

144. Liu, F, Lang, R, Zhao, J. i wsp. CD8⁺ cytotoxic T cell and FOXP3⁺ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Research and Treatment* 2011; 130:645–655.
145. Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, Wada J i wsp. Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy* 2010; 59(5):653-661.
146. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B i wsp. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3⁺ regulatory T cells. *Clinical Cancer Research* 2008; 14(8):2413-20.
147. Liang Y, Lü W, Zhang X, Lü B. Tumor-infiltrating CD8⁺ and FOXP3⁺ lymphocytes before and after neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *Diagnostic Pathology* 2018; 13:93.
148. Gupta S, Joshi K, Wig JD, Arora S. Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncologica* 2007; 46(6):792-797.
149. Romagnoli G, Wiedermann M, Hübner F, Wengers A i wsp. Morphological Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) to Investigate Invasive Breast Cancer Immunogenicity, Reveal Lymphocytic Networks and Help Relapse Prediction: A Retrospective Study. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(9):1936.
150. Jiang D, Gao Z, Cai Z, Wang M i wsp. Clinicopathological and prognostic significance of FOXP3⁺ tumor infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2015; 15:727.
151. Oda N, Shimazu K, Naoi Y, Morimoto K i wsp. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012; 136(1):107-116.

152. Santoni M, Romagnoli E, Saladino T, Foghini L i wsp. Triple negative breast cancer: Key role of Tumor-Associated Macrophages in regulating the activity of anti-PD-1/PD-L1 agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2018; 1869(1):78-84.

153. Levy EM, Roberti MP, Mordoh J. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011; 2011:676198.

154. Han Li, Liping Li, Huifang Mei, Guofeng Pan i wsp. Antitumor properties of triptolide: phenotype regulation of macrophage differentiation. *Cancer Biology & Therapy* 2020; 21(2):178-188.

155. Chumsri S, Carter JM, Ma Y, Hinerfeld D, Brauer HA i wsp. Role of intratumoral NK cells in triple-negative breast cancer in the FinXX trial and Mayo Clinic cohort. *Journal of Clinical Oncology* 2020; 38(suppl 15):510-510.

156. Zhang Y, Wang S, Yang B, Lu S i wsp. Adjuvant treatment for triple-negative breast cancer: a retrospective study of immunotherapy with autologous cytokine-induced killer cells in 294 patients. *Cancer Biology & Medicine* 2019; 16(2):350-360.

157. Azarsiz E, Karaca NE, Aksu G, Kutukculer N. Reference values for B-cell surface markers and co-receptors associated with primary immune deficiencies in healthy Turkish children. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2017; 30(2):194-200.

158. Guan H, Lan Y, Wan Y, Wang Q i wsp. PD-L1 mediated the differentiation of tumor-infiltrating CD19⁺ B lymphocytes and T cells in Invasive breast cancer. *Oncoimmunology* 2015; 5(2):e1075112.

159. Brown JR, Wimberly H, Lannin DR, Nixon C i wsp. Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2014; 20(23):5995-6005.
160. Song IH, Heo SH, Bang WS, Park HS i wsp. Predictive Value of Tertiary Lymphoid Structures Assessed by High Endothelial Venule Counts in the Neoadjuvant Setting of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research and Treatment* 2017; 49(2):399-407.
161. Sun S, Fei X, Mao Y, Wang X i wsp. PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 2014; 63:395-406.
162. He KF, Zhang L, Huang CF, Ma SR i wsp. CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Biomed Research International* 2014; 2014(2):838632.
163. Alves AM, Diel LF, Lamers ML. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2018; 47(5):460-467.
164. Minami K, Hiwatashi K, Ueno S, Sakoda M i wsp. Prognostic significance of CD68, CD163 and Folate receptor- β positive macrophages in hepatocellular carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine* 2018; 15(5), 4465–4476.
165. Liu L, Ye Y, Zhu X. MMP-9 secreted by tumor associated macrophages promoted gastric cancer metastasis through a PI3K/AKT/Snail pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019; 117:109096.
166. Kostine M, Briaire-de Bruijn IH, Cleven AHG, Vervat C i wsp. Increased infiltration of M2-macrophages, T-cells and PD-L1 expression in high grade leiomyosarcomas supports immunotherapeutic strategies. *Oncoimmunology* 2017; 7(2):e1386828.

167. Gomez-Bouchet A, Illac C, Gilhodes J, Bouvier C i wsp. CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* 2017; 6(9):e1331193.
168. Ibrahim SA, Hassan H, Vilardo L, Kumar SK i wsp. Syndecan-1 (CD138) modulates triple-negative breast cancer stem cell properties via regulation of LRP-6 and IL-6-mediated STAT3 signaling. *PLoS One* 2013; 8(12):e85737.
169. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* 2012; 12:306.
170. Jamiyan T, Kuroda H, Yamaguchi R, Abe A i wsp. CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast. *Virchows Archiv* 2020; 477:767–775.
171. Carron EC, Homra S, Rosenberg J, Coffelt SB i wsp. Macrophages promote the progression of premalignant mammary lesions to invasive cancer. *Oncotarget* 2017; 8(31):50731-50746.
172. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV i wsp. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* 2014; 344(6186):921-925.
173. Lu X, Yang R, Zhang L, Xi Y i wsp. Macrophage Colony-stimulating Factor Mediates the Recruitment of Macrophages in Triple negative Breast Cancer. *International journal of biological sciences* 2019; 15(13):2859–2871.
174. Hollmén M, Karaman S, Schwager S, Lisibach A i wsp. G-CSF regulates macrophage phenotype and associates with poor overall survival in human triple-negative breast cancer. *Oncology & Immunology* 2015; 5:3.

175. Yaal-Hahoshen N, Azenshtein E, Shina S, Leider-Trejo L i wsp. Concomitant expression of the chemokines RANTES and MCP-1 in human breast cancer: A basis for tumor-promoting interactions. *Cytokine* 2008; 44(1):191-200.
176. Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barroso R i wsp. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *Journal of Immunology* 2014; 192(8):3858-67.
177. Zhang WJ, Wang XH, Gao ST, Chen C i wsp. Tumor-associated macrophages correlate with phenomenon of epithelial-mesenchymal transition and contribute to poor prognosis in triple-negative breast cancer patients. *Journal of Surgical Research* 2018; 222:93-101.
178. Sierra JR, Tsao MS. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Therapeutic advances in medical oncology* 2011; 3(suppl 1):S21-S35.
179. Kind S, Merenkow C, Büscheck F, Möller K i wsp. Prevalence of Syndecan-1 (CD138) Expression in Different Kinds of Human Tumors and Normal Tissues. *Disease Markers* 2019; 2019:4928315.
180. von Minckwitz G, Pfitzner BM, Müller V, Häder T i wsp. Expression of CD138 / syndecan-1 in triple-negative breast cancer – correlative study of GeparSixto. *Annals of Oncology* 2015; 26(suppl 3): iii6–iii9.
181. Thuy L, Nguyen MD, William E, Grizzle i wsp. Syndecan-1 Overexpression Is Associated With Nonluminal Subtypes and Poor Prognosis in Advanced Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 2013; 140(4):468–474.
182. Schönfeld K, Herbener P, Zuber C, Häder T i wsp. Activity of Indatuximab Ravtansine against Triple-Negative Breast Cancer in Preclinical Tumor Models. *Pharmaceutical Research* 2018; 35(6):118.

183. Utsunomiya A, Ohe R, Kabasawa T, Aung NY i wsp. Cancer stem cell marker-positive tumour nests in intrahepatic cholangiocarcinoma are related to epithelial type CD1a-positive dendritic cell infiltration and to high Sox9 expression. *Research Square* 2020; DOI: 10.21203/rs.3.rs-36086/v1.
184. Coventry B, Lee PL, Gibbs D, Hart DN. Dendritic cell density and activation status in human breast cancer – CD1a, CMRF-44, CMRF-56 and CD-83 expression. *British Journal of Cancer* 2002; 86:546–551.
185. Coventry BJ, Morton J. CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer. *British Journal of Cancer* 2003; 89(3):533-538.
186. Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M i wsp. Value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *International Journal of Cancer* 2003; 104(1):92-7.
187. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B i wsp.. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Modern Pathology* 2010; 23:123–133.

XI. AKTYWNOŚĆ NAUKOWA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O NADANIE STOPNIA DOKTORA

1. Florczak A, Deptuch T, Lewandowska A i wsp. Functionalized silk spheres selectively and effectively deliver a cytotoxic drug to targeted cancer cells in vivo. *Journal of Nanobiotechnology* 2020; 18(177):1-18
2. Panderecka K, Ibbs M, Kałużna A, Lewandowska A i wsp. Implementation of a dynamic culture condition to the heterotypic 3D breast cancer model. *Journal of Biomedical Materials Research* 2020; 108(4):1186-1197.
3. Florczak A, Deptuch T, Lewandowska A, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. Evaluation of the effective dose of doxorubicin delivered by the functionalized silk spheres in a mouse model of breast cancer. *Współczesna Onkologia* 2019; 23 (supl 1):32.
4. Lewandowska A, Szyłberg Ł, Kałużna A, Ibbs M i wsp. Microenvironment and androgen receptor in triple negative breast cancer (TNBC). *Polish Journal of Pathology* 2019; 70(abstr):34.
5. Deptuch T, Florczak A, Panderecka K, Lewandowska A i wsp. In vivo evaluation of toxicity and efficacy of nanospheres made of bioengineered spider silk for targeted drug delivery. *29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials, Maastricht the Netherlands, September 9-13 2018*; abstr 241.
6. Deptuch T, Florczak A, Panderecka K, Lewandowska A i wsp. Nanoparticles made of functionalized spider silk for targeted cancer therapy - the evaluation of their toxicity and efficacy in the mice model. *Współczesna Onkologia* 2018; 22 (supl 2): 35.

7. Florczak A, Deptuch T, Lewandowska A, Korski K i wsp. Bioengineered silk spheres for targeted drug delivery in Her2-positive breast cancer model. *Współczesna Onkologia* 2016; 19(suppl 1):22.
8. Dams-Kozłowska H, Kwiatkowska-Borowczyk E, Gryska K, Lewandowska A i wsp. Effects of designer hyper-interleukin 11 (H11) on hematopoiesis in myelosuppressed mice. *Plos One* 2016; 11(5):e0154520 [s. 1-19]
9. Lewandowska A, Dams-Kozłowska H, Kwiatkowska-Borowczyk E, Gryska K i wsp. Wpływ stworzonej Hyper-Interleukiny 11 (H11) na zmiany rozległości włóknienia w śledzionie oraz na poziom trombocytopenii u myszy poddanych mielosupresji. *Polish Journal of Pathology* 2016; 67(suppl 1):59-60.