

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: 618.19-006.6-091.8-07-037(043.2)

CARPENCO Ecaterina

**MODIFICĂRI ALE STROMEI ÎN SUBTIPURILE
MOLECULARE DE CANCER MAMAR**

311.02 - ANATOMIE PATOLOGICĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Chișinău, 2023

Teza a fost elaborată la Catedra de histologie, citologie și embriologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” în colaborare cu Departamentul de Morfologie Microscopică/Histologie, Centrul de Cercetare în Angiogeneză al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, România.

Conducător științific

Șaptefrați Lilian, dr. hab. șt. med., prof. univ. _____

Conducător prin cotutelă

Raica Marius, dr., prof. univ., _____

UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România

Membrii comisiei de îndrumare:

Onea Emilian, dr. șt. biol., conf. univ. _____

Fulga Veaceslav, dr. hab. șt. med., conf. univ. _____

David Valeriu, dr. șt. med., conf. univ. _____

Susținerea va avea loc la 20.09.2023 la ora 14:00 în incinta USMF „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul nr. 205, în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului din 25.05.23 (*proces verbal nr.9*).

Componenta Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

Președinte:

Rîvneac Victor, dr. hab. șt. med., prof. univ.,
USMF „Nicolae Testemițanu” _____

Membrii:

Pretula Ruslan, dr. șt. med., conf. univ.,
USMF „Nicolae Testemițanu” (**secretar**) _____
Șaptefrați Lilian, dr. hab. șt. med., prof. univ.,
USMF „Nicolae Testemițanu” _____

Raica Marius, dr., prof. univ., _____
UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România

Referenți oficiali:

Ceașu Raluca-Amalia, dr., conf. univ., _____
UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România
Fulga Veaceslav, dr. hab. șt. med., conf. univ. (comisia de îndrumare) _____
Petrovici Vergil, dr. șt. med., cerc. șt., Institutul Mamei și Copilului _____

Autor

Carpenco Ecaterina _____

© Carpenco Ecaterina, 2023

CUPRINS

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII.....	4
CONȚINUTUL TEZEI	7
1. STROMA TUMORALĂ ÎN DIVERSE VARIANTE MOLECULARE DE CARCINOAME MAMARE.....	7
2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE	7
2.1. Design-ul studiului, caracteristica lotului de cercetare	7
2.2. Metoda histologică	7
2.3. Metoda imunohistochimică.....	8
2.4. Metode de cuantificare	9
2.5. Analiza statistică	10
3. MODIFICĂRI CANTITATIVE ȘI CALITATIVE ALE ELEMENTELOR STROMALE ÎN DIVERSE SUBTIPURI MOLECULARE DE CARCINOAME MAMARE	10
3.1. Profilul histopatologic al tumorilor incluse în studiu.....	10
3.2. Profilul molecular al tumorilor incluse în studiu	10
3.3. Macrofage CD68 pozitive în carcinoamele mamare.....	11
3.4. Mastocite triptază pozitive în carcinoamele mamare.....	12
3.5. Celule dendritice S100 pozitive în carcinoamele mamare	14
3.6. Vase sangvine CD34 pozitive în carcinoamele mamare	16
3.7. Vasele limfatice D2-40 pozitive în carcinoamele mamare	18
3.8. Interrelații statistice dintre vasele sangvine, limfatice și elementele celulare incluse în studiu în dependență de subtipul molecular al tumorii	19
4. EVALUAREA MODIFICĂRILOR STROMALE ÎN VARIANTELE MOLECULARE DE CANCER MAMAR	21
CONCLUZII GENERALE	25
RECOMANDĂRI	26
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	26
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI	28
ADNOTARE (în română, rusă și engleză)	30

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei. Cancerul mamar este una dintre cele mai frecvente tumori maligne în lume. Conform datelor GLOBOCAN, în 2020 această tumoare a înregistrat o incidență de 11.7% (2 206 771 de cazuri noi) dintre toate cancerurile și o mortalitate de 6.9% (684 996 de decese) reprezentând prima cauză de deces la femeile cu vârsta cuprinsă între 20 și 50 de ani. O incidență mai mare se atestă în țările dezvoltate, fapt datorat diagnosticului mai precoce grație implementării *screening*-ului prin mamografie și a prevalenței unor factori de risc hormonal și reproductivi, precum: instalarea precoce a menarhei și instituirea menopauzei la o vârstă mai înaintată, prima naștere tardivă, număr mic de copii, alăptare la sân de scurtă durată, folosirea contraceptivelor orale, terapia de substituție hormonală, stil de viață nesănătos (abuz de alcool și/sau droguri, greutate corporală excesivă, lipsa activității fizice) [1, 2].

Cancerul mamar este o afecțiune eterogenă în ceea ce privește histologia tumorii, răspunsul terapeutic, modalitatea de metastazare la distanță și prognosticul [3]. Parametrii standard analizați, precum dimensiunile tumorii, gradul histologic, invazia vasculară și metastazele limfonodale sunt utili, dar insuficienți. Mai mult decât atât, pacientele cu parametri aparent identici pot evolua complet diferit ceea ce face imperativă necesitatea unei abordări individuale. Factorii sus-menționați au impus studierea caracteristicilor moleculare ale tumorii și au permis descoperirea subtipurilor moleculare de către Perou et al. în 2000. Aceste subtipuri au la bază diferiți factori de risc, evoluează diferit și trebuie abordate individual din punct de vedere terapeutic, iar clasificarea tumorilor în baza expresiei ER, PR și HER2 a devenit o procedură de rutină în clinică [1, 4-5].

Cu trecerea timpului s-a observat că nici clasificarea moleculară nu descrie perfect toate entitățile, motiv pentru care se impune identificarea unor noi markeri moleculari [6]. Astfel au apărut în scenă elementele stromei tumorale, care până acum erau în umbră deoarece studiul cancerului a fost axat preponderent pe celulele tumorale propriu-zise. Deși Paget a propus teoria „seminței și a solului” încă în 1889, sugerând că celulele neoplazice („semințele”) pot forma tumori doar în cazul unui micromediu favorabil („solul”), abia recent cercetătorii au început să studieze importanța stromei tumorale [7]. Modificările produse la nivelul stromei acum sunt considerate drept unul din elementele esențiale ale tumorigenezei și ale progresiei tumorale. Astfel, s-a stabilit că elementele microambianței tumorale, precum celulele imune, matricea extracelulară, pot acționa sinergic blocând imunitatea antitumorală și stimulând progresarea cancerului și metastazarea. În acest fel, elementele stromale s-au dovedit a fi factori de prognostic, iar unele dintre acestea ar putea fi țintite terapeutic [8].

În acest studiu am analizat expresia unui șir de markeri celulari din stroma tumorală în dependență de subtipurile moleculare ale neoplasmului.

Scopul lucrării: Studiul varietăților celulare și al elementelor vasculare din stroma carcinoamelor mamare în dependență de subtipurile moleculare ale tumorii în vederea îmbunătățirii diagnosticului morfologic și prognosticului cancerului mamar.

Obiectivele studiului:

1. Evaluarea histologică și imunohistochimică a varietăților celulare (CD68, S100, triptaza mastocitară) din stroma carcinoamelor mamare în diferite subtipurile moleculare ale tumorii.
2. Studiul particularităților rețelelor vasculare sangvină (CD34) și limfatică (D2-40) în carcinoamele mamare în funcție de subtipurile moleculare.

3. Analiza interrelațiilor dintre elemente celulare, vase sangvine și limfatice *versus* subtipul molecular al tumorii.
4. Elucidarea impactului diverselor elemente stromale asupra diagnosticului, prognosticului și evoluției carcinomului mamar.

Metodologia cercetării științifice. Specimenele și datele pacientelor au fost selectate din fișele histopatologice din arhiva Spitalului Clinic Județean de Urgență, Serviciul de Anatomie Patologică, Arad, România. Profilul histopatologic al tumorilor s-a realizat pe secțiuni colorate cu hematoxilina și eozină, conform procedurii standard. Ulterior, s-a realizat colorarea imunohistochimică cu scopul de a stabili profilul molecular al tumorii. Pentru studiul elementelor stromale, din materialul tisular rămas în cadrul fiecărui bloc de parafină s-au creat blocuri *microarray*. Întreaga tehnică imunohistochimică a fost realizată automat (Leica Bond-Max, Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK), aplicându-se următorii anticorpi: anti-ER, anti-PR, anti-HER2, anti-CK5/6, anti-Ki-67, anti-CD68, anti-S100, anti-triptază mastocitară, anti-D2-40 și anti-CD34. Datele au fost stocate într-o bază de date MS Excel 2010, iar ulterior analizate cu ajutorul programului SPSS. Esecurile statistice au inclus determinarea mediei, deviației standard, medianei, intervalului intercuantilic, intervalului de încredere, coeficientului de corelație al lui Spearman. Diferența dintre două grupuri de variabile s-a analizat prin aplicarea testului Mann-Whitney U. Am considerat un $p \leq 0,05$ drept statistic semnificativ. Cercetarea s-a efectuat în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și în cadrul Departamentului de Morfologie Microscopică/ Histologie, Centrul de Cercetare în Angiogenază al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, România. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (nr. 33/ 37/ 12.02.2018).

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute. Pentru prima dată a fost efectuat un studiu comparativ al profilului molecular al carcinoamelor mamare *versus* elemente celulare (macrofage, mastocite, celule dendritice) și vasculare (sangvine și limfatice) din stroma tumorală. În premieră a fost evaluat gradul expresiei unor markeri celulari (CD68, S100, triptaza, CD34, D2-40) în ariile intra- și peritumorale în raport cu expresia markerilor ER, PR și HER2. Au fost descrise modificările cantitative și calitative ale componentelor celulare și vasculare din stroma tumorală în subtipurile luminale și non-luminale.

Problema științifico-aplicativă soluționată. În această lucrare a fost analizată posibilitatea existenței relației dintre expresia diferențiată a markerilor unor elemente celulare din stroma tumorală și evoluția carcinoamelor mamare de tip luminal *versus* non-luminal.

Semnificația teoretică. Evaluarea cantitativă și calitativă a elementelor stromale în carcinoamele mamare permite completarea cunoștințelor existente despre rolul stromei în evoluția și progresarea neoplaziilor mamare, cu accent asupra diferențelor între grupul luminal și non-luminal.

Valoarea aplicativă a lucrării. Lucrarea confirmă utilitatea aplicării metodelor histologice și a colorației imunohistochimice în diagnosticarea și evaluarea modificărilor stromei în neoplaziile mamare.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

1. Microambianța tumorală constituie un element esențial în structura carcinoamelor mamare, influențând creșterea și progresia acestora. Interrelațiile dintre celulele epiteliale și structurile stromale sunt complexe, stimulatorii sau inhibitorii, astfel gestionarea stromei este imperativă pentru potențarea sau încetinirea expansiunii celulelor neoplazice.

2. În carcinoamele mamare de tip luminal densitatea mastocitelor în ariile peritumorale prevalează față de cea a macrofagelor și a celulelor dendritice manifestând o corelație pozitivă statistic semnificativă. În tumorile ER+ și PR+ ariile intratumorale au prezentat o densitate mai înaltă a mastocitelor față de cele peritumorale, astfel tumorile hormonal pozitive manifestă chemoatractivitate pentru celulele triptază+, stimulând migrarea acestora.
3. Majoritatea carcinoamelor mamare hormonal independente au prezentat o densitate înaltă a macrofagelor atât în stroma intratumorală cât și în cea peritumorală. În cadrul carcinoamelor ER+ și PR+ densitatea celulelor CD68+ a înregistrat valori joase.
4. Pierderea receptorilor pentru estrogeni/ progesteron este însoțită de creșterea densității celulelor S100+ peritumorale. Pozitivitatea pentru S100 a celulelor canceroase sugerează modularea antigenică a acestora, cu transfer de proprietăți și „mimetism” sau poate fi consecința fuziunii celulei dendritice cu celula neoplazică.
5. Mastocitele sunt elementele celulare capabile să moduleze stroma carcinoamelor mamare, fiind implicate în angiogeneză și limfangiogeneză, densitatea înaltă a mastocitelor fiind însoțită și de scăderea numărului de celule dendritice și macrofage.
6. În carcinoamele mamare slab diferențiate densitatea vaselor sangvine și limfatice este mai înaltă, cu predilecție în ariile peritumorale, creând astfel condiții favorabile pentru expansiunea tumorală. Carcinoamele mamare ce expresează receptori pentru estrogeni, progesteron sau proteina HER2 nu manifestă corelație semnificativ statistică cu densitatea vasculară.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele obținute au fost implementate în activitatea didactică și științifică a Catedrei de histologie, citologie și embriologie și a Laboratorului de morfologie al USMF „Nicolae Testemițanu”.

Aprobarea rezultatelor: Rezultatele obținute și concepțiile de bază ale tezei au fost prezentate și discutate în cadrul următoarelor reuniuni științifice: Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Chișinău, 2019); Congresul consacrat aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Chișinău, 2020); Conferința științifică internațională dedicată aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Chișinău, 2020); Congresul internațional medical pentru studenți și tineri medici MedEspera (Chișinău, 2020); Conferința științifică anuală Cercetarea în biomedicină și sănătate: Calitate, excelență și performanță. Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Chișinău, 2021).

Rezultatele acestui studiu au fost discutate și aprobate la ședința Catedrei de histologie, citologie și embriologie a USMF „Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr.8 din 11.04.23) și Seminarul științific de profil 311. Anatomie și morfologie; 351. Medicină interdisciplinară (proces verbal nr. 2 din 23.05.23).

Publicații la tema tezei. La tema tezei au fost publicate 9 lucrări științifice, dintre care: 1 articol în reviste internaționale indexate în SCOPUS / PubMed; 5 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil; 1 articol în materialele conferințelor științifice internaționale; materiale la conferințe naționale și internaționale – 2. Totodată au fost obținute 1 certificat de inovator și 1 act de implementare practică a rezultatelor științifice.

Sumarul compartimentelor tezei. Lucrarea cuprinde lista abrevierilor, introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice. Bibliografia cuprinde 209 surse, fiind urmată de 7 anexe, declarația privind asumarea răspunderii, CV-ul autorului. În introducere au fost descrise actualitatea

și importanța problemei abordate în teză, scopul, obiectivele, metodologia generală de cercetare, noutatea științifică, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor studiului. Capitolul 1 cuprinde review-ul literaturii, capitolul 2 – material și metode de cercetare, capitolul 3 – datele obținute, capitolul 4 – sinteza și analiza rezultatelor obținute.

Cuvinte-cheie: ER, PR, HER2, subtipurile moleculare, microambianță, stroma intratumorală, stroma peritumorală

CONȚINUTUL TEZEI

1. STROMA TUMORALĂ ÎN DIVERSE VARIANTE MOLECULARE DE CARCINOAME MAMARE

În acest capitol au fost descriși factorii etiologici în dezvoltarea carcinoamelor mamare, histologia și profilul molecular al glandei mamare atât în normă cât și în transformarea malignă. De asemenea a fost analizat rolul elementelor stromale (celulare și vasculare) în declanșarea și susținerea procesului neoplazic, controversese legate de acestea, posibilitatea țintirii terapeutice.

2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Design-ul studiului, caracteristica lotului de cercetare

Studiul dat a fost unul retrospectiv bazat pe consultarea buletinelor histopatologice și evaluarea microscopică a unui număr de 111 cazuri de carcinoame de glandă mamară. Cazurile incluse în studiu au fost selectate în perioada 2018-2019, în cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență, Serviciul de Anatomie Patologică, Arad, România. Fragmentele biopsice au fost obținute în urma mastectomiei parțiale sau totale de la paciente cu vârsta cuprinsă între 37 și 85 de ani, media de vârstă fiind de 67,9±8,6 ani, iar mediana 64 (25-75% IQR 59-73) ani.

Pacientele nu au fost supuse radio- sau chimioterapiei până la operație. Toate procedurile au fost efectuate conform principiilor Declarației de la Helsinki. Cercetarea s-a efectuat în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie al USMF „Nicolae Testemițanu” și în cadrul Departamentului de Morfologie Microscopică/ Histologie, Centrul de Cercetare în Angiogeneză al UMF „Victor Babeș” din Timișoara, România.

2.2. Metoda histologică

Profilul histopatologic s-a realizat pe secțiuni colorate cu hematoxină și eozină, conform procedurii standard. Specimenele au fost fixate în soluție de formalină tamponată 10% timp de 48 de ore și, tradițional, incluse în parafină după procedurile de deshidratare și clarifiere.

Ulterior, din fiecare bloc s-au tăiat secțiuni cu grosimea de 4 μm pentru colorația cu hematoxină și eozină. Pentru secționare a fost folosit microtomul Leica RM2245 (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Secțiunile au fost etalate pe lame silanate Surgipath X-tra Adhesive (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) și uscate la 37°C timp de 20-30 minute. Aceste lame au servit pentru determinarea tipului histologic a tumorii și evaluarea gradului de diferențiere (scorul Nottingham). Cazurile au fost examinate de 3 morfopatologi independenți, iar secțiunile potrivite au fost alese pentru colorarea imunohistochimică.

2.3. Metoda imunohistochimică

În continuare, din fiecare bloc s-au tăiat secțiuni pentru determinarea subtipurii moleculare. Apoi, materialul tisular rămas în cadrul fiecărui bloc de parafină a fost utilizat pentru crearea de blocuri tisulare *microarray* cu ajutorul TMA Grand Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary). Din cadrul fiecărui bloc s-au extras între 1-4 fragmente tisulare din regiunile cele mai reprezentative ale tumorii. Astfel, au fost obținute 11 blocuri TMA, *per* total conținând 211 de fragmente tisulare.

Din fiecare bloc *microarray* au fost tăiate o serie de secțiuni de 4 μm. Pentru secționare a fost folosit microtomul Leica RM2245 (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Secțiunile au fost etalate pe lame silanate Surgipath X-tra Adhesive (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Tehnica imunohistochimică a fost realizată cu ajutorul automatului Leica Bond-Max (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Demascarea s-a realizat cu ajutorul PT-link, la 97°C timp de 20 min și Bond Epitope Retrieval Solution 1 și 2, soluții cu pH 6 și pH 9 respectiv (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Pentru blocarea peroxidazei endogene a fost folosit peroxid de hidrogen de 3%, timp de 5 minute. Această etapă a fost succedată de incubarea cu anticorpii primari: ER, PR, HER2, CK5, EGFR, Ki-67 – pentru a determina subtipurii moleculare; CD68 pentru studiul macrofagelor; S100 pentru a pune în evidență DC; triptaza mastocitară pentru studiul MC; D2-40 pentru determinarea vaselor limfatice; CD34 pentru studiul vaselor sangvine.

Cromogenul utilizat a fost 3,3-diaminobenzidină tetraclorid, timp de 10 minute. Contracolorarea nucleilor s-a realizat cu hematoxină Mayer, 5 minute. Montarea s-a realizat în mod automat cu Leica CV5030 (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) folosind un mediu de montare permanent de tip ENTELLAN și anume Leica CV Mount (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Din anumite considerente (material tisular insuficient, dezlipirea secțiunilor de pe lame, etc.), colorația imunohistochimică a fost realizată cu succes pe un număr mai mic de fragmente tisulare. Ulterior, dintre acestea s-au selectat doar cazurile la care s-a reușit determinarea profilului molecular prin IHC. Detaliile tehnicii imunohistochimice se regăsesc în tabelul 1.

Tabelul 1. Anticorpi, diluții, sistem de detecție, demascare, incubare

Anticorpi	Sursa	Clona	Diluție	Sistem de detecție	Demascare	Timp incubare anticorp
ER	Leica Bond (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)	6F11	Prediluat	Bond Polymer Refine Detection System	20 de minute ER 2	30 de minute
PR		16				
CK5		XM26				
CD 34		QBEnd10				
Triptaza mastocitară		10D11				
CD68		514H12				
S100		policlonal				
Ki-67		MM1				
HER2	Novocastrol (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)	CB11	1:40	Bond Polymer Refine Detection System	20 de minute ER 2	1 ora
EGFR		EGFR.113				
D2-40	Abcam (Cambridge, UK)	gp36	1:40	Bond Polymer Refine Detection System	10 minute ER 1	1 ora

Notă: ER 1 = Bond Epitope Retrieval Solution 1, pH6; ER 2 = Bond Epitope Retrieval Solution 2, pH9

2.4. Metode de cuantificare

Aprecierea subtipurii molecular

Pentru clasificarea specimenelor de carcinoame mamar în funcție de profilul molecular, s-a analizat expresia receptorilor hormonal ER și PR, expresia proteinelor Ki-67, HER2, CK5 și EGFR. Pozitivitatea pentru fiecare marker imunohistochimic a fost determinată microscopic de către 3 morfopatologi care au revizuit fiecare lamă și au atribuit un scor. Ki-67 a fost evaluat semiautomat.

Receptorii hormonal (**ER și PR**) au fost evaluați în funcție de scorul Allred. Proteina **HER2** a fost apreciată conform recomandărilor Societății Americane de Oncologie Clinică. Pentru evaluarea markerului **Ki-67** s-a aplicat metoda semiautomată propusă de Suciu et al. [6]. Astfel, s-au numărat nucleele imunomarcate și cele negative din celulele tumorale și s-a calculat procentajul celor colorate. Pragul pozitivității a fost de 14%. În baza Consensului Internațional de Experți 2017 de la St Gallen, profilul imunohistochimic al subtipurilor moleculare a fost următorul:

ER+ și/ sau PR+, HER2-, Ki-67 < 14% pentru subtipurii luminal A;

ER+ și / sau PR+, HER2+ și/ sau Ki-67 > 14% pentru luminal B;

ER-, PR-, HER2+ pentru subtipurii HER2+.

Specimenele în care a lipsit colorația pentru ER, PR și HER2 au fost calificate ca subtip triplu-negativ.

Identificarea și cuantificarea elementelor stromale

Toate elementele stromale analizate au fost cuantificate prin metoda hot-spot: zonele cu cea mai mare densitate a elementelor vizate au fost mai întâi detectate prin scanarea secțiunilor la ob. 10× folosind microscopul Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Germany). Ulterior s-au analizat 2-3 câmpuri consecutive din ariile tumorale și stroma peritumorală, calculându-se media aritmetică.

Macrofagele au fost identificate datorită expresiei citoplasmice a markerului CD68. Am cuantificat macrofagele în câte 2 câmpuri consecutive din stroma intratumorală și cea peritumorală la ob. 20×, ulterior calculând media aritmetică. Am aplicat următorul scor:

„0” – nu s-a observat nici o celulă CD68+ în câmp;

„+1” – până la 25% din celulele CD68+ în câmp;

„+2” – 25-50% celule CD68+ în câmp;

„+3” – peste 50% de celule CD68+ în câmpul de vedere.

Mastocitele și celulele dendritice au fost identificate datorită expresiei markerilor specifici: triptazei și a proteinei S100, respectiv. Am analizat distribuția acestora în insula tumorală și plajele peritumorale prin numărarea directă a celulelor din zonele respective. Au fost analizate câte 3 câmpuri microscopice, identificate prin metoda hot-spot, pentru fiecare zonă, la ob. 40×. Ulterior, s-a calculat media aritmetică a celor 3 valori.

Vasele sanguine au fost depistate datorită expresiei membranare a CD34, marker al celulelor endoteliale și a progenitorilor celulelor hematopoietice. Astfel, inițial am localizat zonele cele mai vascularizate ale tumorii (CD34it) și din jurul tumorii (CD34pt). Am analizat câte 3 câmpuri din regiunile intratumorală și peritumorală la ob. 20× și am numărat vasele sanguine CD34 pozitive, MVD reprezentând media aritmetică a celor 3 valori.

Vasele limfatice au fost detectate grație expresiei D2-40 de către endoteliul limfatic. Acestea au fost numărate în câte 3 câmpuri consecutive din zonele intra- și peritumorală, la ob. 20×, ulterior calculându-se media aritmetică. Această valoare a reprezentat LVD.

2.5. Analiza statistică

Datele au fost stocate într-o bază de date MS Excel 2010, iar ulterior importate și analizate cu ajutorul programului SPSS (SPSS Statistics 23.0; IBM, Chicago, IL, USA). S-au determinat media, deviația standard, mediana, IQR, CI. Am aplicat testul de corelație al lui Spearman (r_s), iar valorile au fost considerate statistic semnificative în cazul unui $p \leq 0,05$. Gradul de asociere dintre variabile a fost descifrat, în baza ultimelor recomandări din domeniu, după Lovakov și Agadullina (2021) după cum urmează: $r_s < 0.12$ - corelație foarte slabă, $0.12 \leq r_s < 0.24$ - corelație slabă, $0.24 \leq r_s < 0.41$ - corelație moderată, $r_s \geq 0.41$ - corelație puternică.

Variabilele au fost grupate în dependență de scopul urmărit (de exemplu subtip luminal/ non-luminal, densitate joasă/ înaltă, etc.). Valorile numerice ale elementelor stromale, în baza studiilor din domeniu, au fost grupate folosind mediana drept prag (*cut-off*). Ulterior, diferența dintre două grupuri de variabile s-a analizat prin aplicarea testului Mann-Whitney U. Au fost analizate statistic cazurile la care s-a cunoscut profilul molecular.

3. MODIFICĂRI CANTITATIVE ȘI CALITATIVE ALE ELEMENTELOR STROMALE ÎN DIVERSE SUBTIPURI MOLECULARE DE CARCINOAME MAMARE

3.1. Profilul histopatologic al tumorilor incluse în studiu

În studiul realizat, majoritatea tumorilor au fost moderat diferențiate (G2) (78 de cazuri). A fost depistat un singur caz de tumoare cu grad înalt de diferențiere (G1), iar 27 au fost slab diferențiate (G3). 71.7% din tumori (76 de cazuri) au fost clasificate drept carcinoame ductale invazive, tip NST. Majoritatea tumorilor G3 (23 din 27/ 85.2%) au fost de tip ductal invaziv NST. Repartizarea cazurilor conform tipului histologic și gradului de diferențiere a celulelor tumorale este redată în tabelul 2.

Tabelul 2. Clasificarea histopatologică a tumorilor incluse în studiu

Tipul histologic	Gradul tumorii			Total	
	G1	G2	G3	n (%)	95% CI
Carcinom ductal invaziv, tip NST	1	52	23	76 (71.69%)	0-88.77
Carcinom lobular invaziv	-	4	-	4 (3.77%)	0-7.07
Carcinom mucinos	-	2	-	2 (1.88%)	0-3.53
Carcinom medular	-	8	-	8 (7.54%)	0-14.14
Carcinom papilar intraductal	-	1	-	1 (0.94%)	0-1.76
Carcinom <i>in situ</i> :	lobular	2	-	2 (1.88%)	0-3.53
	ductal	-	1	1 (0.94%)	0-1.76
Carcinom mixt:	ductal invaziv+lobular invaziv	5	3	8 (7.54%)	0-8.91
	ductal invaziv+medular	1	-	1 (0.94%)	0-1.76
	ductal invaziv+mucinos	3	-	3 (2.83%)	0-5.30
Total	1 (0.94%)	78 (73.58%)	27 (25.47%)	106	

Notă: în tabel sunt redată doar cazurile la care s-a reușit determinarea subtipului molecular.

3.2. Profilul molecular al tumorilor incluse în studiu

Cel mai frecvent subtip molecular stabilit în urma colorației imunohistochemice a fost cel luminal B/ HER2+. Cele mai multe tumori de acest subtip molecular au fost carcinoame ductale

invazive (36 de cazuri), 7 cazuri au fost carcinoame de tip medular, 1 caz – papilar, 1 caz – DCIS, celelalte – de tip mixt.

11 din 12 tumori TNBC au fost carcinoame ductale invazive, 2/3 din cazuri (8 din 12) fiind slab diferențiate. Dintre cazurile HER2+, 1 singură tumoare a fost carcinom medular, restul – ductal invazive, de tip NST. 8 din 16 cazuri de tumori HER2+ au fost slab diferențiate. Tumorile de tip luminal A au inclus unicul caz de tumoare bine diferențiată G1, iar 14 cazuri din 19 au fost moderat diferențiate. Carcinoamele lobular infiltrative au fost fie de tip luminal A (1 caz), fie de tip luminal B/HER2+ (3 cazuri).

3.3. Macrofage CD68 pozitive în carcinoamele mamare

Macrofagele, colorate brun, au prezentat aspecte variate din punct de vedere morfologic. În unele specimene au apărut drept celule mici și rotunjite, cu puține sau fără extensii citoplasmice. Citoplasma a fost uniform colorată, moderat sau intens. Totodată au fost puse în evidență și macrofage cu aspect ameboid, cu numeroase extensii citoplasmice pe suprafața celulară. Un alt grup de macrofage s-a caracterizat printr-o puternică granulație citoplasmică. Pe lângă cele menționate, au fost prezente și macrofage fusiforme, unele multinucleate care au fost caracterizate printr-un corp celular alungit cu prelungiri citoplasmice la polurile opuse.

Din punct de vedere topografic, în toate secțiunile au fost determinate atât macrofage CD68 pozitive intratumorale, cât și peritumorale. Ultimele au fost concentrate în jurul celulelor tumorale, perivascular și/ sau în zonele de invazie (figura 1a, b).

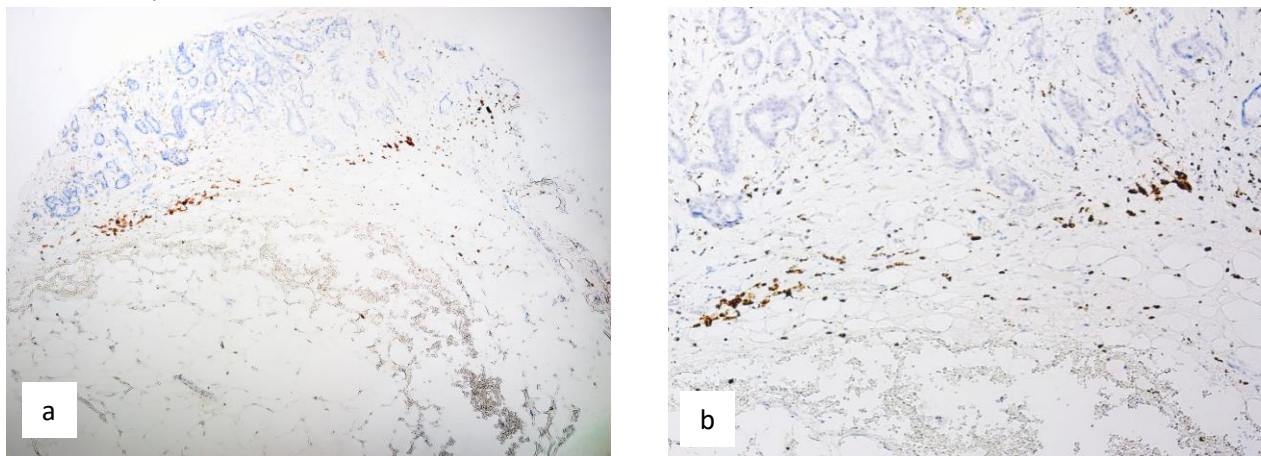


Figura 1. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Macrofage la hotarul ariei de invazie (a, b) (a - ob. 10×, b - ob. 20×). Imunoreacție pentru CD68, DAB.

În majoritatea tumorilor, atât CD68it cât și CD68pt au prezentat o densitate joasă, cu scor +1 în 38 (48.1%) și scor <1 în 43 de cazuri (54.5%). Scorul +2 a fost frecvent acordat tumorilor de tip luminal. Macrofagele CD68+ peri- și intratumorale au fost practic egal distribuite în tumorile de tip luminal B/ HER2+ și cele TNBC. Cea mai înaltă densitate a macrofagelor CD68it a fost înregistrată în tumorile TNBC, iar a CD68pt – în tumorile HER2+. De remarcat că, 10 din cele 14 tumori în care s-a acordat scorul +3 pentru CD68pt, au exprimat proteina HER2. De asemenea, 5 din 8 tumori în care s-a acordat scorul +3 pentru CD68it, au exprimat proteina HER2. Cel mai mare decalaj dintre macrofagele intra- și peritumorale s-a înregistrat în tumorile HER2+. Distribuția macrofagelor intra- și peritumorale nu a prezentat diferențe în tumorile G2; macrofagele intratumorale au prevalat ușor asupra celor peritumorale în tumorile G3 (figura 2).

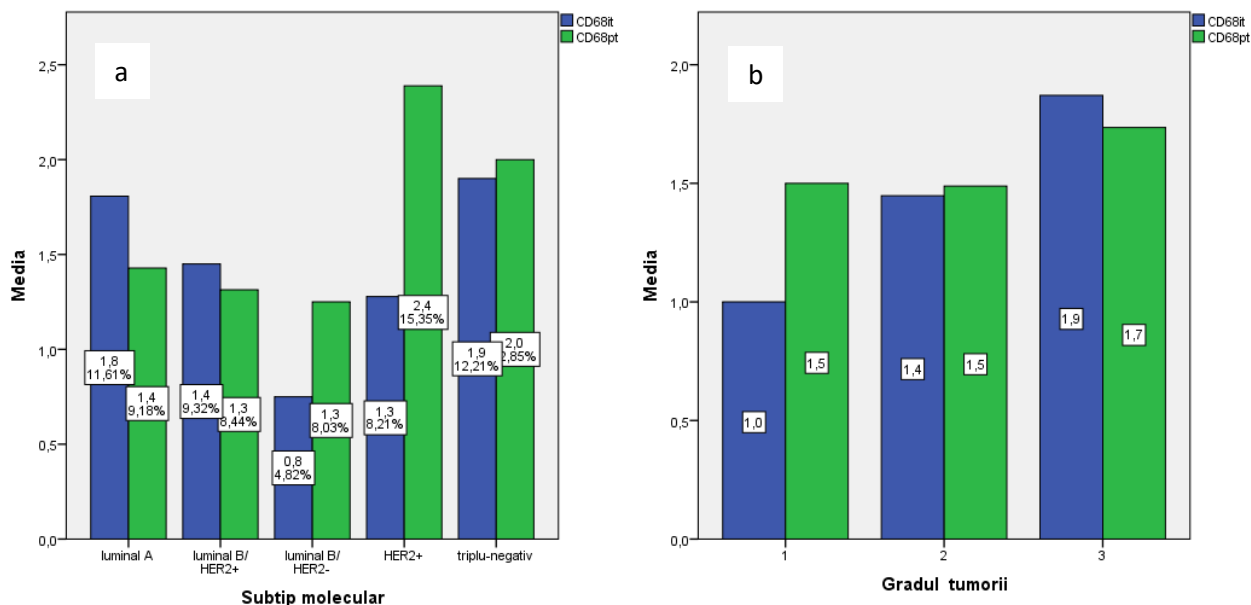


Figura 2. Densitatea macrofagelor CD68+ în dependență de: (a) subtipul molecular și (b) gradul de diferențiere a tumorii.

Analiza statistică a arătat corelații inverse, semnificative statistic dintre CD68pt și receptorii hormonali ER ($r_s = -0.316$, $p = 0.005$) și PR ($r_s = -0.280$, $p = 0.012$). De asemenea, CD68pt a corelat cu subtipul molecular al tumorii ($r_s = 0.267$, $p = 0.017$). CD68it au fost influențate de gradul tumorii ($r_s = 0.233$, $p = 0.039$).

Ulterior, cazurile au fost grupate în 2 categorii: luminale și non-luminale. Pentru a compara CD68pt și CD68it în subtipurile luminale *versus* non-luminale, am efectuat testul Mann-Whitney U (tabelul 3). Datele obținute au confirmat influența expresiei receptorilor hormonali asupra dinamicii CD68pt ($U = 265$, $p = 0.0002$).

Tabelul 3. CD68pt și CD68it în carcinoamele mamare luminale *versus* non-luminale

	CD68it	CD68pt
Mann-Whitney U	562,000	265,000
Wilcoxon W	2392,000	2095,000
Z	-,096	-3,699
p	,924	,0002

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminale A, B/HER2+ și B/HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negativ; CD68it – celule CD68+ intratumorale, CD68pt – celule CD68+ peritumorale

3.4. Mastocite triptază pozitive în carcinoamele mamare

Microscopic, mastocitele au fost caracterizate drept celule de dimensiuni mari, de o formă ovoidă, nucleu rotund, deseori invizibil din cauza conținutului înalt de granule cu mediatori în citoplasmă. Astfel de mastocite aveau o citoplasmă întunecată, intens colorată și au fost clasificate drept granulate (figura 3a). În schimb, în cazul mastocitelor degranulate, nucleul a fost vizibil, citoplasma s-a colorat mai slab, iar granulele au putut fi observate în ECM (figura 3b).

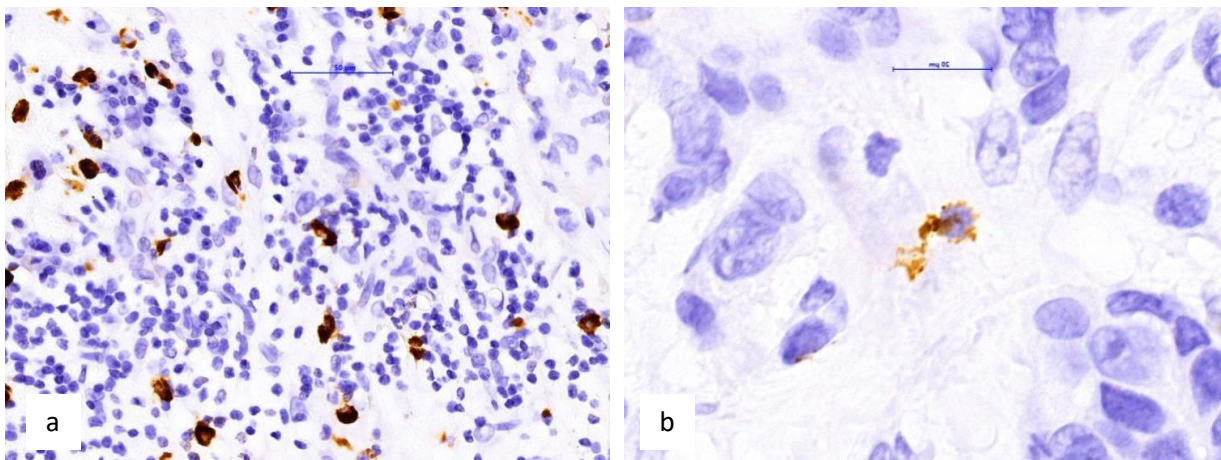


Figura 3. (a) Carcinom ductal invaziv, de tip NST și (b) carcinom lobular infiltrativ. Mastocite: (a) granulate și (b) degranulate (a - ob. 40×, b - ob. 100×). Imunoreacție pentru triptază, DAB.

Mastocitele din stroma peritumorală aveau tendința de „a delimita” insulele de celule tumorale, situându-se la interfața dintre aria tumorală și stroma conjunctivă peritumorală. Frecvent am putut observa mastocite peritumorale în jurul vaselor sangvine sau în cadrul infiltratului inflamator.

Pentru o mai bună apreciere a infiltrării cu MC, datele au fost ulterior dihotomizate. Astfel, cazurile au fost divizate în 2 grupuri: cu o densitate înaltă a MC și cu o densitate scăzută, drept prag (*cut-off*) servind mediana. Pentru MC_{cit}, media și eroarea standard au fost 3.54 ± 0.61 , cu mediana 1.3 (25-75% IQR 0.3-3.9). În cazul MC_{pt} – media și eroarea standard au constituit 12.26 ± 1.39 , iar mediana – 9.0 (25-75% IQR 3.3-15.9). 41 de cazuri (51.2%) au avut o densitate scăzută a MC intratumorale (≤ 1.3). La fel, 41 de tumori (51.2%) au avut o densitate scăzută a MC peritumorale (≤ 9.0) (tabelul 4). Dintre toate cazurile, 29 de tumori (36.2%) au avut o densitate joasă atât a MC_{cit} cât și a MC_{pt}. 17 dintre ele au aparținut grupului luminal. O densitate înaltă atât a MC_{cit} cât și a MC_{pt} a fost înregistrată în 27 de tumori (33.8%), majoritatea dintre ele fiind de tip luminal (23 de tumori).

Studiul cazurilor conform subtipului molecular a arătat că cele mai înalte densități, atât pentru MC_{cit} cât și pentru MC_{pt}, s-au înregistrat în cadrul subtipului luminal B/ HER2+, aceste tumori fiind moderat diferențiate. Cele mai mici densități s-au înregistrat în tumorile G3, subtipurile HER2+ și cele TNBC, adică non-luminale. În toate subtipurile moleculare, MC_{pt} au fost mai numeroase decât MC_{cit}.

Analizând fiecare subtip molecular în parte, au fost depistate mai multe corelații semnificative statistic dintre populațiile de MC intra- și peritumorale, precum și cu receptorii hormonali ER și PR. Astfel, în subtipul luminal A, MC intratumorale au fost influențate de expresia PR ($r_s = -0.703$, $p = 0.005$). În subtipul molecular luminal B, MC intratumorale au fost dependente de ER ($r_s = 0.350$, $p = 0.017$), pe când cele peritumorale au corelat cu ambii receptori hormonali ($r_s = 0.322$, $p = 0.029$ pentru ER și $r_s = 0.308$, $p = 0.037$ pentru PR). În acest subtip molecular, precum și în cel triplu-negativ, densitățile celor două categorii de MC au fost interdependente ($r_s = 0.590$, $p = 0.00001$ și $r_s = 0.687$, $p = 0.002$, respectiv) (tabelul 4).

Ulterior, am verificat dacă există corelații semnificative statistic în cadrul tumorilor slab diferențiate și moderat diferențiate. În tumorile G2, MC au corelat cu expresia receptorilor hormonali. Expresia ER a influențat MC_{cit} ($r_s = 0.309$, $p = 0.015$) precum și MC_{pt} ($r_s = 0.346$, $p = 0.006$). Expresia PR a influențat doar densitatea MC_{pt} ($r_s = 0.357$, $p = 0.005$). Mai mult decât atât, densitatea MC_{cit} a fost

dependentă de densitatea MCpt ($r=0.493$, $p=0.00005$). Ambele populații de MC au fost dependente de vârsta pacientelor ($r_s = -0.259$, $p=0.044$ pentru MCit și $r_s = -0.281$, $p=0.028$ pentru MCpt).

Tabelul 4. Corelațiile semnificative statistic stabilite între receptorii hormonal și mastocite

Subtipul luminal A	Subtipul luminal B	TNBC
MCit și PR ($r_s=-0.703$, $p=0.005$)	MCit și MCpt ($r_s=0.590$, $p=0.00001$)	MCit și MCpt ($r_s=0.687$, $p=0.002$)
	MCpt și ER ($r_s=0.322$, $p=0.029$)	
	MCpt și PR ($r_s=0.308$, $p=0.037$)	
	MCit și ER ($r_s=0.350$, $p=0.017$)	

Notă: r_s – coeficientul de corelație al lui Spearman, MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale. Valorile au fost considerate semnificative statistic la un $p \leq 0.05$

În grupul tumorilor slab diferențiate MCit au corelat cu expresia ambilor receptori hormonal (ER: $r_s=0.626$, $p=0.005$ și PR: $r_s=0.561$, $p=0.015$). MCpt au fost influențate doar de ER ($r_s=0.497$, $p=0.036$). MC din zona peritumorală și cele intratumorale s-au influențat reciproc ($r_s=0.689$, $p=0.002$). Analiza statistică a cazurilor *per total* a confirmat corelațiile stabilite în cadrul subtipurilor moleculare. MCit au corelat semnificativ statistic cu expresia ER ($r_s=0.393$, $p=0.0003$) și PR ($r_s=0.236$, $p=0.035$). Similar, MCpt au fost dependente atât de ER ($r_s=0.378$, $p=0.001$) cât și de PR ($r_s=0.383$, $p=0.0004$). În toate subtipurile moleculare incluse în studiul dat, MC peri- și intratumorale au fost dependente unele de altele ($r_s=0.445$, $p=0.000003$).

În continuare, am grupat cazurile conform subtipului molecular în luminale și non-luminale. Pentru a compara MC din grupurile luminale și non-luminale am aplicat testul Mann-Whitney U. Acesta a confirmat influența expresiei receptorilor hormonal asupra dinamicii atât a MC intra- ($U=390.5$, $p=0.019$) cât și a celor din zonele peritumorale ($U=361.0$, $p=0.008$) (tabelul 5).

Tabelul 5. Rezultatele testului Mann-Whitney U la compararea MC în grupurile luminal și non-luminal de carcinoame mamare

	MCit	MCpt
Mann-Whitney U	390,500	361,000
Wilcoxon W	600,500	571,000
Z	-2,340	-2,657
p	,019	,008

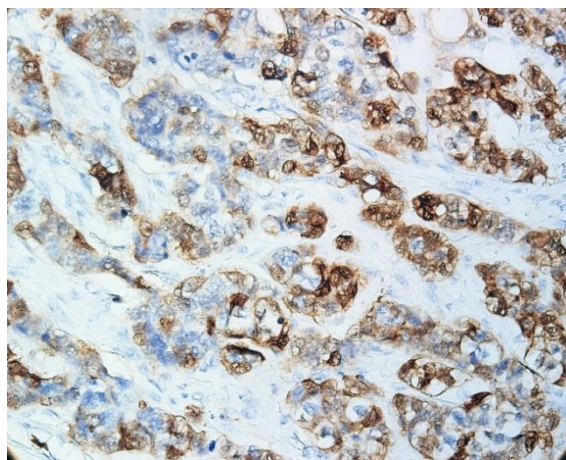
Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminale A, B/HER2+ și B/HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative. MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale

3.5. Celule dendritice S100 pozitive în carcinoamele mamare

Celulele S100 pozitive au fost prezente în majoritatea cazurilor (71 de tumori din 75, 94,6%), dar au fost variate din punct de vedere morfologic, ceea ce ne-a permis să le grupăm în câteva categorii. Astfel, primul grup a fost constituit din celule S100 pozitive ce au prezentat o morfologie tipică DC. Acestea au fost de dimensiuni medii, cu o citoplasmă colorată uniform, intensitatea colorației variind de la slabă până la puternică. De la corpul celular porneau numeroase extensii citoplasmice subțiri și lungi, deseori ramificate. Un alt grup de celule S100 pozitive a manifestat caracteristici similare celor descrise mai sus, cu unele diferențe. Aceste celule aveau de asemenea o

formă stelată, însă erau de dimensiuni mai mari cu citoplasma intens colorată, iar procesele citoplasmice erau groase și scurte. Astfel de DC erau localizate în regiunile peritumorale, în componența infiltratului inflamator. Acest aspect a fost caracteristic și DC din cadrul câtorva noduri limfatici analizați pentru comparație. Al treilea fenotip de celule S100 pozitive a fost complet diferit față de cele descrise anterior, fiind constituit din celule mici, punctiforme, cu o citoplasmă intens colorată, lipsite de extensii citoplasmice.

Următorul grup de celule S100 pozitive pe care l-am observat prezintă un interes deosebit deoarece acesta cuprindea celule tumorale propriu-zise. Astfel, în unele tumori markerul S100 putea fi expresat de toate celulele neoplazice din cadrul unui grup de celule tumorale (figura 4). În alte cazuri, insulele tumorale expresau proteina în cauză doar regional. În cadrul insulei era neomogenă și intensitatea reacției, variind de la slabă până la intens pozitivă. Celulele canceroase S100 pozitive s-au caracterizat printr-o citoplasmă spumoasă, neuniform colorată, cu granulație intra-citoplasmatică.



**Figura 4. Carcinom ductal invaziv de tip NST. Arii tumorale S100 pozitive (ob. 40×).
Imunoreacție pentru S100, DAB.**

Ultimul grup observat de noi a inclus cazuri cu expresie bazală a proteinei S100. Celulele din această categorie prezentau o formă cubică, fiind aranjate într-un strat continuu sau discontinuu, iar expresia markerului S100 a fost una nucleară și citoplasmatică. De menționat, că toate carcinoamele cu expresie bazală a proteinei S100 erau de tip medular.

În cadrul unor fragmente tisulare puteau fi găsite combinații dintre fenotipurile sus-menționate, de exemplu atât celule punctiforme cât și stelate; celule S100 pozitive canceroase și celule S100 pozitive în cadrul infiltratului inflamator (figura 5).

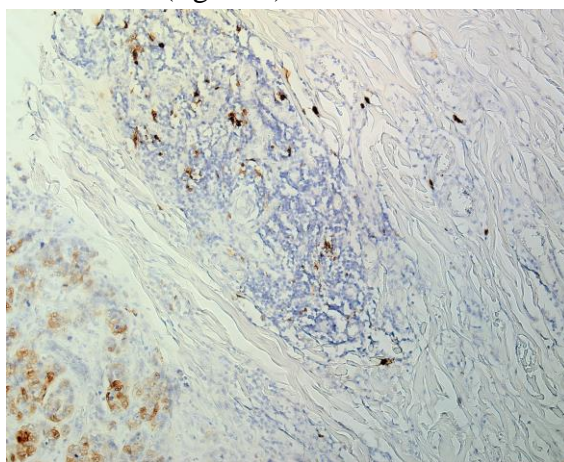


Figura 5. Carcinom ductal invaziv NST. Arii tumorale S100 pozitive și DC din infiltratul inflamator (ob. 40×). Imunoreacție pentru S100, DAB.

Cele mai multe celule S100 pozitive intratumorale s-au înregistrat în cadrul carcinoamelor G3 și HER2+. Cele peritumorale au fost mai numeroase în cazul neoplasmelor G2 și TNBC (figura 6).

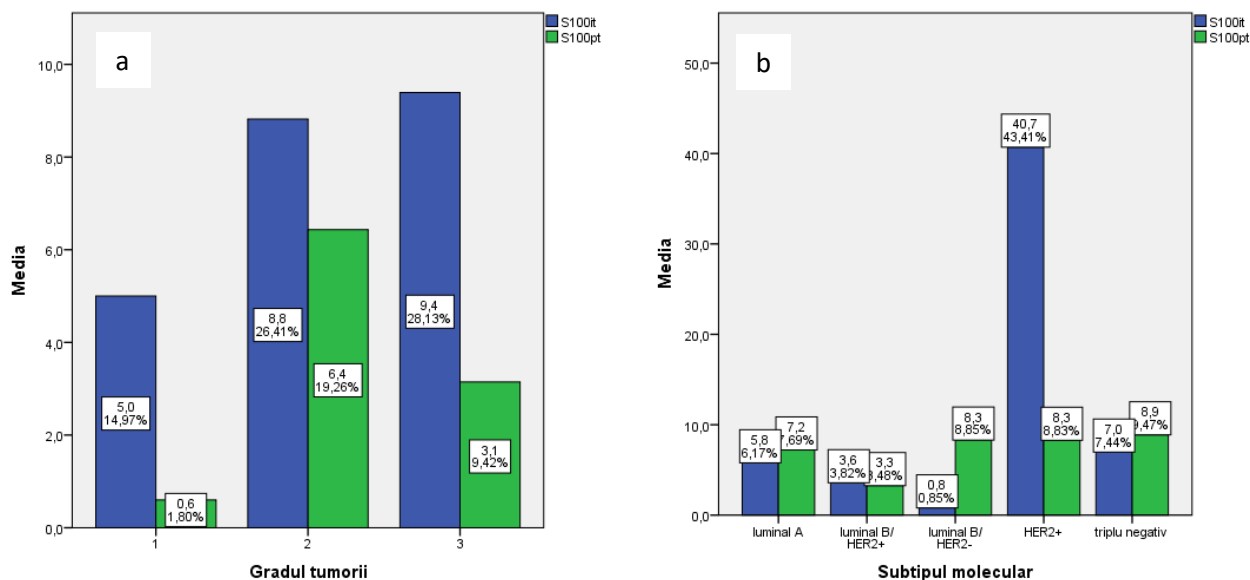


Figura 6. Distribuția celulelor S100+ în dependență de: (a) gradul de diferențiere a tumorii și (b) subtipul molecular.

S100it nu au fost prezente în 25 de cazuri (33.3%), dintre care, 17 (68%) au exprimat proteina HER2. S100pt au absentat în 10 cazuri (13.3%), dintre care, 7 au exprimat proteina HER2 (70%). În cazul tumorilor de tip luminal B, celulele S100it au corelat invers cu vârsta ($r_s = -0.357$, $p = 0.024$) și direct cu expresia PR ($r_s = 0.364$, $p = 0.021$). În tumorile TNBC, S100it au fost influențate de gradul tumorii ($r_s = -0.719$, $p = 0.013$). Analiza statistică a tuturor cazurilor a pus în evidență corelații semnificative statistic între S100it și vârsta pacienților ($r_s = -0.271$, $p = 0.019$), precum și dintre S100pt și expresia PR ($r_s = -0.239$, $p = 0.039$). De asemenea, densitățile celulelor S100it și S100pt au corelat între ele ($r_s = 0.349$, $p = 0.002$). De menționat că corelațiile stabilite în urma analizei cazurilor *per total* au fost confirmate și în tumorile G2. În tumorile slab diferențiate corelații semnificative statistic nu s-au stabilit.

Ulterior, am analizat expresia proteinei S100 în carcinoamele luminale *versus* non-luminale. În acest scop, am efectuat testul Mann-Whitney U (tabelul 6). Datele obținute au confirmat că există diferențe ale densității S100it în tumorile din grupul luminal și cel non-luminal ($U = 346.0$, $p = 0.013$).

Tabelul 6. Datele testului Mann-Whitney U privind expresia diferită a markerului S100 pozitive în carcinoamele mamare luminale *versus* non-luminale

	S100it	S100pt
Mann-Whitney U	346,000	435,000
Wilcoxon W	1886,000	1975,000
Z	-2,492	-1,383
p	,013	,167

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminal A, B/HER2+ și B/HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative. S100it – celule S100+ intratumorale, S100pt – celule S100+ peritumorale

3.6. Vase sangvine CD34 pozitive în carcinoamele mamare

Vasele sangvine CD34 pozitive au fost prezente în ambele zone studiate: atât intra- cât și peritumoral, fiind diferite din punct de vedere morfologic. Astfel, au fost depistate 2 tipuri de vase

sangvine: cu lumen și fără lumen. Mai frecvent, vase fără lumen erau cu sediu intratumoral. Morfologic, acestea erau mici, fără lumen, prezentând cordoane de celule endoteliale (figura 7a). Vasele cu lumen erau concentrate cu predilecție la periferia tumorii, la hotarele ariei de invazie și în stroma peritumorală (figura 7b).

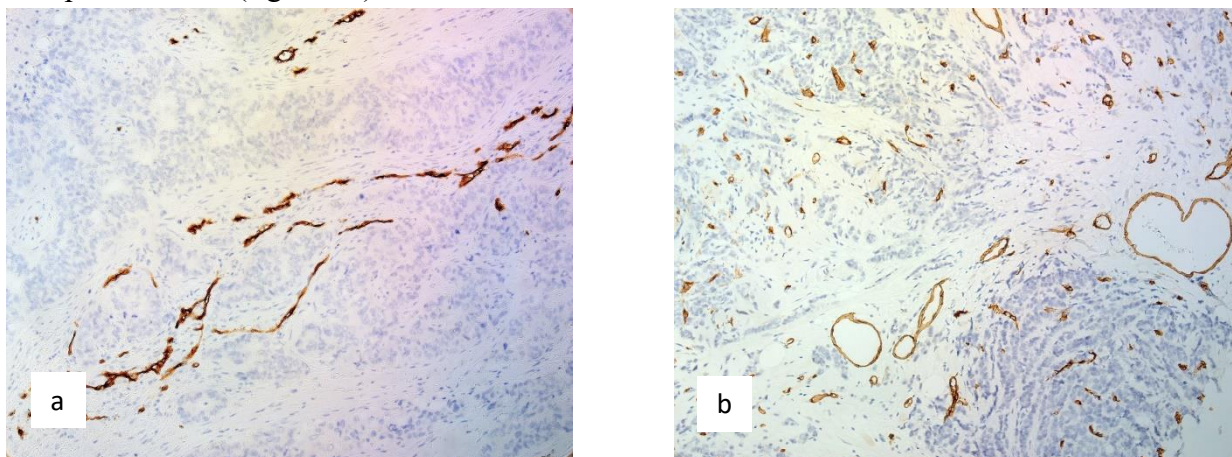


Figura 7. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Vase sangvine cu sediu: (a) intra- și (b) peritumoral (ob. 20×). Imunoreacție pentru CD34, DAB.

Vasele CD34 pozitive peritumorale au prevalat numeric în cazul tumorilor slab diferențiate. În cazul tumorilor moderat diferențiate – densitățile vaselor intra- și peritumorale au fost aproximativ identice. MVD a fost diferită și în dependență de subtipul molecular. Astfel, densitatea vaselor peritumorale a fost mai înaltă în toate subtipurile moleculare, cu excepția celui luminal A. Cele mai mici valori ale MVD intratumorale au fost determinate în subtipul luminal B/ HER2-.

Analizând subtipurile moleculare în parte, nu au fost stabilite careva corelații semnificative statistic între MVD, expresie receptorilor hormonal, a proteinei HER2 și alți parametri incluși în studiu. Analizând cazurile *per total*, unica corelație semnificativă statistic a fost cea dintre CD34it și subtipul molecular ($r_s = -0,225$, $p = 0,045$). Totodată, trebuie să menționăm că nu au fost stabilite corelații semnificative statistic dintre CD34it sau CD34pt și expresia receptorilor hormonal, a proteinei HER2 sau cu ceilalți parametri clinicopatologici incluși în acest studiu (vârsta pacientelor, gradul tumorii). Compararea grupurilor conform criteriului luminal/ non-luminal nu a confirmat că MVD este influențată de subtipul molecular ($p = 0,172$ pentru CD34it și $p = 0,619$ pentru CD34pt) (tabelul 7).

Tabelul 7. Datele testului Mann-Whitney U privind MVD în carcinoamele grupului luminal *versus* non-luminal

	CD34it	CD34pt
Mann-Whitney U	494,500	574,000
Wilcoxon W	725,500	2344,000
Z	-1,367	-,498
p	,172	,619

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminale A, B/ HER2+ și B/ HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative. CD34it – vase sangvine cu sediu intratumoral, CD34pt – vase sangvine cu sediu peritumoral

3.7. Vasele limfatice D2-40 pozitive în carcinoamele mamare

Imunoreacția pentru D2-40 a fost reușită în 87 de cazuri, pentru unul dintre acestea fiind imposibilă determinarea subtipului molecular. Majoritatea cazurilor cercetate (56 de tumori, 65,11%) nu au conținut vase limfatice intratumorale. În celelalte cazuri, când erau prezente, vasele limfatice intratumorale erau de dimensiuni mici, cu un traiect sinuos, perete subțire, deseori colabate sau aveau un lumen mic. Lumenul vaselor era deseori septat, iar la margini puteau fi observate cordoane de celule endoteliale, posibil reflectând procesul de limfangiogeneză. Ocazional conțineau emboli de celule tumorale. În regiunea peritumorală, vasele limfatice au fost absente în 38 (44,18%) de cazuri. Este de remarcat că majoritatea dintre aceste tumori (25 de cazuri) au expresat proteina HER2, 16 fiind de tip luminal B/HER2+ și 9 fiind de tip HER2+. În restul tumorilor, în care vasele limfatice peritumorale au fost prezente, acestea aveau dimensiuni mai mari, și un lumen (figura 8).

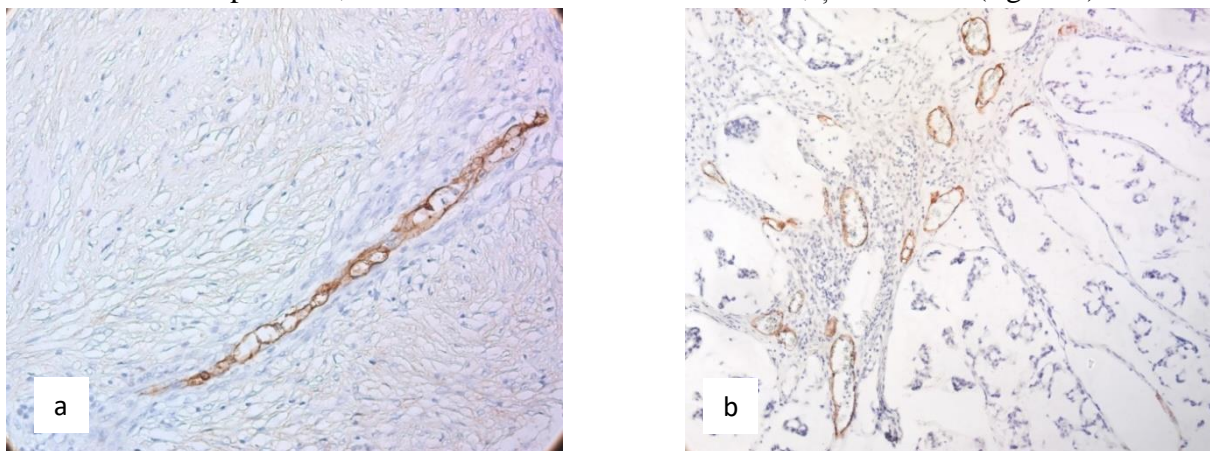


Figura 8. Carcinoame ductale invazive de tip NST. Vase limfatice D2-40 pozitive intra- (a) și peritumorale (b) (a - ob. 40×, b - ob. 20×). Imunoreacție pentru D2-40, DAB.

Vasele limfatice peritumorale au fost mai numeroase decât cele intratumorale în toate subtipurile moleculare cu excepția celui HER2+ (figura 9a). De remarcat că valorile numerice maxime atât ale D2-40it, cât și ale D2-40pt au fost obținute în cazul carcinoamelor mamare TNBC (respectiv 19 și 17). În relație cu gradul histologic, am determinat că atât în tumorile slab diferențiate, cât și în cele moderat diferențiate predomină vasele limfatice peritumorale (figura 9b).

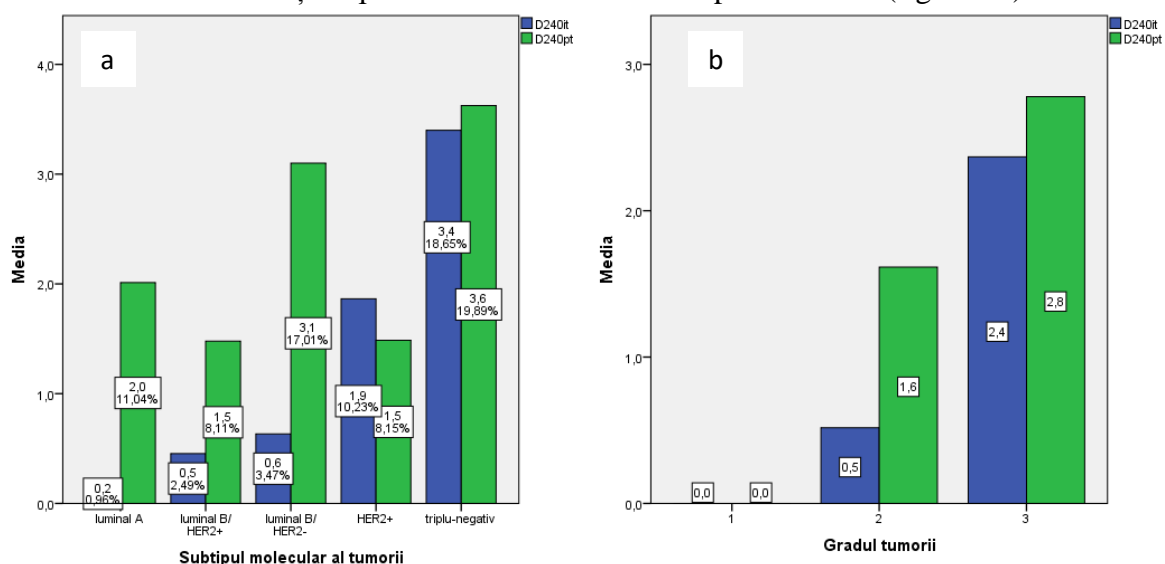


Figura 9. Densitatea limfovaculară (LVD) în dependență de: (a) subtipul molecular și (b) gradul de diferențiere a tumorii.

În cazul subtipurii luminal A, a fost detectată o corelație pozitivă dintre vasele limfatice intratumorale și expresia ER ($r_s = 0.659$, $p = 0.005$). Tot în cadrul acestui subtip molecular am determinat că LVD peritumorale crește odată cu regresarea gradului de diferențiere a tumorii ($r_s = 0.543$, $p = 0.03$). Densitatea vaselor limfatice intratumorale și a celor peritumorale au fost interdependente în subtipul molecular HER2+ ($r_s = 0.545$, $p = 0.044$). În lotul tumorilor TNBC, a fost stabilită o asociere inversă dintre vasele limfatice peritumorale și vârstă ($r_s = -0.832$, $p = 0,001$) și o asociere directă dintre D2-40it și gradul tumorii ($r_s = 0.657$, $p = 0.02$).

Analiza statistică a cazurilor conform grupurilor luminal și non-luminal nu a pus în evidență corelații semnificative statistic dintre densitatea vaselor limfatice intra- și peritumorale și apartenența la un anumit subtip molecular ($p = 0.185$ și $p = 0.806$ pentru D2-40it și D2-40pt respectiv) (tabelul 8).

Tabelul 8. Datele testului Mann-Whitney U privind LVD în carcinoame mamare aparținând grupului luminal și non-luminal

	D2-40it	D2-40pt
Mann-Whitney U	660,000	755,000
Wilcoxon W	2490,000	1106,000
Z	-1,327	-,246
p	,185	,806

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminale A, B/ HER2+ și B/ HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative. D2-40it – vase limfatice cu sediul intratumoral, D2-40pt – vase limfatice cu sediu peritumoral

La compararea cazurilor *per total* am determinat mai multe corelații veridice statistic. Astfel, vasele limfatice intratumorale au corelat pozitiv cu gradul tumorii ($r_s = 0.269$, $p = 0.012$). Corelație pozitivă a fost determinată și la asocierea vaselor limfatice intratumorale și a celor peritumorale ($r_s = 0.325$, $p = 0.002$). Nu au găsit confirmare statistică observațiile privind expresia proteinei HER2 și lipsa vaselor limfatice peritumorale ($p = 0.798$).

3.8. Interrelații statistice dintre vasele sangvine, limfatice și elementele celulare incluse în studiu în dependență de subtipul molecular al tumorii

Analiza cazurilor per total. Densitatea vaselor sangvine în stroma intratumorală a fost dependentă de numărul MC atât intratumorale ($r_s = 0,384$, $p = 0,001$), cât și a celor peritumorale ($r_s = 0,232$, $p = 0,041$); dar a fost invers dependentă de macrofagele peritumorale ($r_s = -0,260$, $p = 0,021$). Vasele sangvine peritumorale au corelat cu MC peritumorale ($r_s = 0,349$, $p = 0,002$) dar și cu vasele limfatice din aceeași zonă ($r_s = 0,261$, $p = 0,033$).

Vasele limfatice din zonele intra- și peritumorale au prezentat asocieri pozitive ($r_s = 0,303$, $p = 0,009$). Totodată vasele peritumorale au fost influențate de MC din regiunile omoloage ($r_s = 0,309$, $p = 0,010$).

Asocieri pozitive au fost stabilite și dintre populațiile de celule S100 pozitive intra- și peritumorale ($r_s = 0.349$, $p = 0.002$), precum și dintre MC din ambele localizări ($r_s = 0.506$, $p = 0.0000014$). Celulele S100 pozitive peritumorale au corelat cu macrofagele de aceeași localizare ($r_s = 0,258$, $p = 0,030$). Ulterior am analizat interrelațiile în cadrul formelor moleculare aparte, fiecare prezentând anumite particularități.

Subtipul luminal A. Macrofagele peritumorale au corelat invers cu DC intratumorale ($r_s = -0.540$, $p = 0.046$). LVD peritumorale a fost direct dependentă de numărul MC peritumorale ($r_s = 0.737$, $p = 0.006$) și a corelat pozitiv cu densitatea vaselor sangvine peritumorale ($r_s = 0.789$, $p = 0.002$).

Subtipul luminal B. În cadrul acestui subtip molecular în prim plan a ieșit densitatea vaselor sangvine. Astfel, densitatea vaselor sangvine peritumorale a fost direct dependentă de expresia markerului S100 ($r_s = 0.342$, $p = 0.035$) și de numărul MC peritumorale ($r_s = 0.358$, $p = 0.02$). Pornind de la ideea că MC stimulează angiogeneza, am verificat dacă există aceleași corelații și în regiunea intratumorală. Răspunsul a fost afirmativ ($r_s = 0.468$, $p = 0.002$ pentru asocierea MCit și CD34it). Ideea a fost susținută și de corelația veridică statistic dintre cele 2 populații de MC (adică intra- și peritumorale): $r_s = 0.590$, $p = 0.0000161$. Putem astfel presupune că MC din stroma intra- și peritumorală se stimulează reciproc și induc angiogeneza în regiunile respective.

Subtipul HER2+. Și în acest subtip molecular am demonstrat dependența dintre MC și LVD, însă doar în stroma intratumorală ($r_s = 0.872$, $p = 0.005$). Atât MC, cât și vasele limfatice din această zonă au corelat cu macrofagele din ariile peritumorale ($r_s = 0.815$, $p = 0.007$ și $r_s = 0.860$, $p = 0.006$, respectiv). Vasele limfatice din stroma peritumorală s-au asociat cu expresia S100 în aceeași zonă ($r_s = 0.727$, $p = 0.041$), iar expresia S100 în regiunea intratumorală a corelat cu MC peritumorale ($r_s = 0.728$, $p = 0.026$).

Subtipul triplu-negativ. LVD din zona intratumorală a fost influențată nu de MC, ci de macrofagele intratumorale ($r_s = 0.686$, $p = 0.02$). MC din aceeași zonă în schimb au prezentat mai multe corelații semnificative statistic, influențând densitatea vaselor sangvine peritumorale ($r_s = 0.582$, $p = 0.047$) și omoloagele sale din plajele peritumorale ($r_s = 0.668$, $p = 0.018$). De asemenea, s-a stabilit și o asociere inversă cu macrofagele peritumorale ($r_s = -0.623$, $p = 0.041$).

În figura 10 sunt prezentate imagini comparative ale unor imunoreacții realizate în studiu.

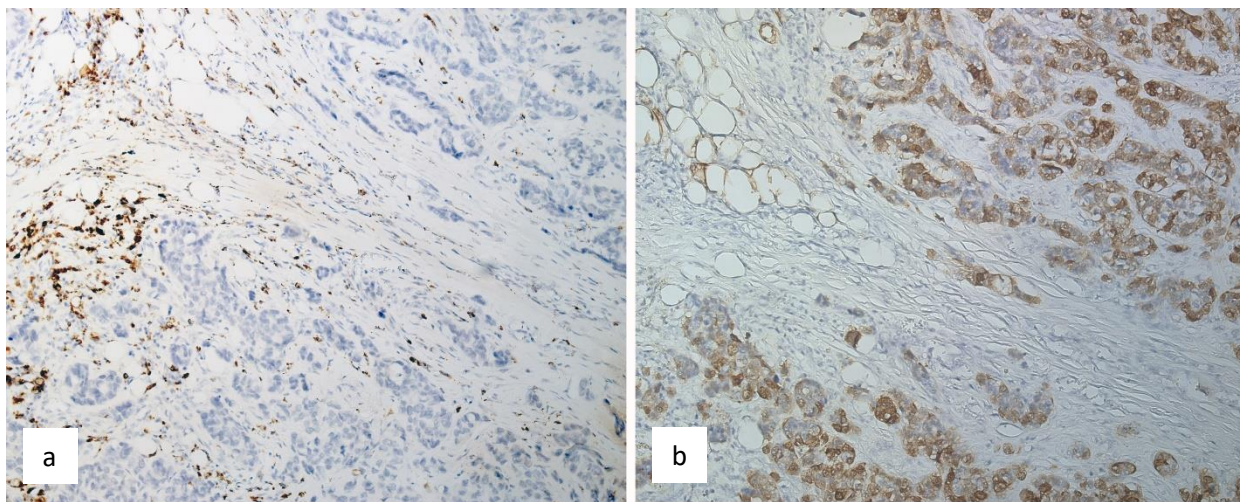


Figura 10. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. (a) Celule CD68+ peritumorale versus (b) celule S100+ intratumorale (ob. 40×). Imagini din aceeași zonă a tumorii. Imunoreacție pentru: (a) CD68 și (b) pentru S100, DAB.

4. EVALUAREA MODIFICĂRILOR STROMALE ÎN VARIANTELE MOLECULARE DE CANCER MAMAR

Micromediul tumoral este considerat un important factor al progresiei tumorii și al răspunsului la tratament. Ca urmare, există un interes din ce în ce mai mare pentru dezvoltarea de noi terapii care vizează micromediul tumoral, în special în ceea ce privește progresia invazivă și metastatică. Stabilitatea genomică a celulelor din stromă face ca dezvoltarea chimiorezistenței să fie mai puțin probabilă. În plus, modificările epigenetice care contribuie la modificările fenotipice, deși sunt moștenite, sunt reversibile și există un interes crescând pentru „normalizarea” stromei modificate, abrogând astfel rolul său de susținere a tumorii [7]. Conform datelor din literatură, ER, PR, HER2 și proteina nucleară Ki-67 sunt principalii biomarkeri necesari în evaluarea prognosticului carcinoamelor mamare. Pozitivitatea celulelor neoplazice pentru ER și/ sau PR este un factor important pentru evaluarea preliminară a terapiei hormonale. Supraexpresia HER2 indică un grad mai mare de malignitate, cu progresie rapidă, grad înalt de diferențiere a tumorii, probabilitate mai înaltă de recidivare și metastazare [8]. În timpul evoluției unei tumori, se stabilește o comunicare complexă și dinamică între celulele neoplazice și celulele din microambianța tumorală; de aceea, elucidarea acțiunii componentelor stromei asupra expresiei markerilor incluși în studiul actual (ER, PR, HER2) ar putea contribui la înțelegerea mecanismelor de inițiere și progresie ale tumorii.

Unul dintre actorii micromediului tumoral abordați în acest studiu sunt macrofagele. Rezultatele ne-au demonstrat că densitatea acestor celule diferă în funcție de apartenența la grupul luminal sau non-luminal, corelația statistică cu receptorii hormoni fiind una inversă, adică macrofagele peritumorale ar putea diminua expresia ER și PR în celulele tumorale. De asemenea, cu cât mai slab diferențiată este tumoarea, cu atât mai multe macrofage intratumorale vor fi. Aceleași date au fost obținute și de Lindsten et al., care afirmă că creșterea de macrofage a fost asociată negativ cu ERα sau PR, în timp ce a fost observată o asociere pozitivă cu Ki-67. Similar rezultatelor noastre, legătura dintre infiltratele macrofagelor și statusul HER2 a fost inconsecventă [9]. Jeong et al. susțin că numărul mare de macrofage (CD68+, CD11c+ sau CD163+) a fost asociat cu un grad înalt de diferențiere, indice de proliferare Ki-67 înalt, negativitatea receptorilor pentru estrogeni și progesteron [10]. Datele respective pun în evidență rolul pro-tumoral al macrofagelor din regiunile peritumorale. Aflându-se în afara ariei neoplazice, ele inhibă expresia receptorilor hormoni și pot orienta tumoarea spre un fenotip non-luminal, care nu poate beneficia de terapia antihormonală și are un prognostic mai rezervat. În studiul nostru, macrofagele intratumorale au corelat pozitiv cu gradul de diferențiere a tumorii, confirmând că densitatea acestora crește odată cu creșterea severității tumorii.

Klingen et al. afirmă că nivelurile ridicate de macrofage CD163 pozitive au fost asociate cu invazia vaselor de sânge și implicarea limfatică. În plus, prezența unor niveluri ridicate de macrofage CD163+ a fost observată mai frecvent în carcinoamele mamare HER2 pozitive, bazale și TNBC [11]. În studiul nostru la fel am determinat corelații pozitive statistic semnificative dintre densitatea macrofagelor peritumorale și CD34it precum și MC intratumorale, care pot stimula limfangiogeneza. Globa et al. au raportat date similare în cazul carcinoamelor de prostată și anume a fost obținută corelație statistic semnificativă dintre densitățile celulelor CD68+ peritumorale și vasele CD34+ intratumorale [12]. De remarcat că în studiul nostru macrofagele au corelat cu LVD anume în tumorile non-luminale (HER2+ și TNBC). Astfel, putem presupune că, stimulând angio- și limfangiogeneza, macrofagele contribuie la prognosticul rezervat al tumorilor non-luminale. O

corelație pozitivă dintre densitatea TAM și creșterea vascularizației, precum și un prognostic rezervat, a fost raportată de Takeya et al. în cancerul pulmonar non-microcelular [13]. Klingen et al. de asemenea susține că macrofagele asociate tumorilor sunt strâns legate de invazia vasculară și subtipurile non-luminale [11].

O altă corelație stabilită în studiul nostru a fost cea dintre macrofagele și DC. Considerăm că este o asociere firească, pentru că DC participă împreună cu macrofagele în reacțiile imune și este logic ca densitățile acestor populații celulare să fie interdependente. Asocierile au prezentat câteva variante: densitățile CD68pt și S100it au corelat invers în subtipul luminal A, iar densitatea CD68pt a corelat direct cu densitatea S100pt în urma analizei cazurilor *per total*. Similar datelor noastre, în carcinoamele de prostată, Globa T. et al. au obținut corelații statistic semnificative atât pentru celulele CD68+ ($p=0,008$ intratumoral, $p=0,001$ peritumoral), cât și pentru celulele S100+ ($p=0,036$ intraepitelial, $p=0,042$ stromal). În plus, autorii au descris o corelație pozitivă statistic semnificativă dintre densitatea celulelor S100+ intraepiteliale și a celulelor CD68+ intratumorale. De asemenea, densitatea celulelor S100+ și CD68+ s-a asociat semnificativ statistic cu gradul histologic al tumorii, ceea ce le-a permis autorilor să considere aceste celule drept biomarkeri predictivi în carcinoamele de prostată [14].

În studiul nostru, corelațiile au fost în dependență de subtipul molecular al tumorii, iar majoritatea dintre ele au vizat S100it. Astfel, S100it au corelat invers cu gradul de diferențiere al tumorii în subtipul TNBC, iar în subtipul luminal B – cu expresia PR de către celulele neoplazice și cu vârsta pacienților. Aceste asocieri statistice au fost valabile pentru tumorile G2, însă nu și pentru tumorile slab diferențiate. Prin urmare, odată cu progresia tumorii se pierde interdependența dintre S100, vârsta pacienților și expresia PR de către celulele tumorale.

Observațiile noastre privind legătura dintre S100 și expresia proteinei HER2 au fost confirmate și de alți cercetători. Astfel, Nava et al. au emis ipoteza că proteinele familiei S100 ar putea influența creșterea și metastazarea celulelor tumorale induse de EGF, contribuie indirect la rezistența la herceptină și ar putea servi drept țintă în terapia carcinoamelor HER2+ [15].

Macrofagele și MC sunt complici cunoscuți, fiind reglatori ai inflamației, răspunsului imunologic și angiogenezei în micromediul tumoral. Datele noastre accentuează asupra corelațiilor spațiale dintre cele 2 tipuri de celule. Astfel, în tumorile non-luminale (HER2+ și TNBC), macrofagele peritumorale au influențat densitatea MC intratumorale. Aceasta ne permite să speculăm că inițial macrofagele sunt poziționate în jurul ariilor tumorale unde, prin diverse mecanisme, atrag alte celule, precum MC. MC la rândul lor exercită efectele protumorale (angio- și limfangiogeneza, degradarea ECM, etc.) cu toate consecințele respective. Aceasta ar putea fi una din explicațiile agresivității tumorilor non-luminale. Tamma et al. au confirmat rolul important al macrofagelor și MC în progresia tumorii și angiogeneza în carcinoamele mamare ductale invazive [16]. În studiile noastre anterioare, am prezentat că dinamica MC este puternic influențată de receptorii hormonal și statutul HER2. MCit au crescut în tumorile agresive G3 și pot fi considerate drept un factor de prognostic nefavorabil [17].

De cealaltă parte, un șir de studii clinice susțin rolul protector al MC care infiltrează tumorile mamare. De exemplu, după o analiză multivariată, Dabiri Sh. et al. au constatat că prezența MC stromale este un factor de prognostic pozitiv, prezentând o corelație puternică cu o rată înaltă de supraviețuire [18].

Mai mulți cercetători au observat o densitate mare de MC în subtipurile luminale de carcinom mamar, care pot fi tratate hormonal și au un prognostic mai favorabil. Acest lucru sugerează că MC

sunt asociate cu tumori mai puțin agresive. Pe de altă parte, știm că estrogenii acționează ca un factor proliferativ și pot stimula dezvoltarea carcinoamelor mamare [19]. Acest lucru poate explica de ce, în studiul nostru, densitatea atât a MCit, cât și a MCpt a corelat cu expresia ER în tumorile G2 și G3. Corelațiile pozitive dintre ER și MC sugerează că estrogenii ar putea fi molecule chemotactice pentru MC. Ne-a interesat în special corelația dintre celulele carcinomului ER+ și MC intratumorale, deoarece unele studii au demonstrat că estrogenii activează MC în endometrioza ovariană și că MC uterine umane exprimă ER β [20]. Keser S. et al. de asemenea raportează corelații dintre MCit și pozitivitatea pentru ER [21]. Rao et al. susțin că ultimele joacă un rol pro-tumorigenic în cancerul de vezică urinară prin stimularea ER β și într-un model murin de cancer de vezică urinară s-a demonstrat că un antagonist selectiv ER β poate inhiba creșterea tumorală promovată de MC [22].

Un alt aspect al studiului nostru a evedințiat faptul că densitatea MC din cele 2 localizări analizate s-au asociat între ele, corelația fiind una de talie puternică ($r_s > 0.41$). Date asemănătoare au fost obținute de Keser S. et al. Aceștia au arătat că conținutul de MC intratumorale a corelat pozitiv cu MC peritumorale, care, la rândul lor, au corelat cu MC din țesuturile neafectate [21].

Există studii care au arătat o corelație negativă dintre populațiile de MC și gradul de diferențiere a tumorii, date care nu au fost confirmate de noi. În studiul asupra carcinoamelor mamare efectuat de către Sang et al., densitatea MC la pacienții cu Ki-67 $\leq 14\%$ a fost semnificativ mai mare decât conținutul MC la pacienții cu Ki-67 $> 14\%$. Deși nu au putut concluziona că MC sunt un factor inhibitor al proliferării celulelor canceroase, rezultatele au arătat că densitatea MC este, de asemenea, invers asociată cu gradul de proliferare al tumorii, ceea ce sugerează din nou că MC ar putea avea un efect inhibitor asupra diviziunii celulare [8]. Globa T. et al. infirmă această idee. Autorii susțin că în carcinoamele de prostată, MC chimază+ din zonele peritumorale și MC CD117+ din zonele intratumorale corelează direct cu gradul tumorii [24]. Unii autori au ajuns la concluzia că prognosticul este mai nefavorabil în cazul creșterii densității MC în stroma tumorală [8]. Xiang et al. au observat mai multe MC peritumorale în cancerule de sân G3, triptaza crescută fiind asociată cu tumorile slab diferențiate și mai multe metastaze nodale în comparație cu tumorile G1 și G2. Autorii au remarcat, de asemenea, că triptaza facilitează invazia și migrarea celulelor canceroase prin activarea MMP-2 [25]. Raica et al. au relevat corelații pozitive puternice între populațiile de MC și vasele limfatice în unele subtipuri moleculare de cancer de sân, susținând astfel ideea implicării MC în metastazare prin limfangiogeneza [26]. În studiul nostru, MC peritumorale au corelat cu LVD în subtipul luminal A. În subtipul HER2+, MC din zona intratumorală au influențat LVD cu sediul intratumoral.

Keser S. et al. au demonstrat că există interrelații dintre densitatea MC și LVD [21]. Similar datelor noastre, mai multe studii raportează că MC au fost în general observate în stroma adiacentă celulelor neoplazice și în apropierea structurilor vasculare [18, 27]. Angio- și limfangiogeneza permit progresia tumorii cu inițierea metastazării. Vasele de sânge și limfatice oferă însă condiții diametral opuse pentru migrarea și supraviețuirea celulelor tumorale. Aceste condiții sunt strâns legate de funcțiile distincte și caracteristicile structurale ale acestor două sisteme (de exemplu diferența în lumen, structura membranei bazale, ancorarea la ECM, etc.) [28].

Limfangiogeneza este esențială pentru evadarea celulelor canceroase din locul lor primar către nodurile limfatice regionale, ceea ce are ca rezultat răspândirea sistemică a tumorii. În studiul nostru, atât în subtipurile moleculare luminale, cât și în cele non-luminale, densitatea microvasculară și LVD au fost dependente de MC. De remarcat că în subtipurile luminale, MC peritumorale au influențat vasele limfatice și sangvine din aceeași zonă. În subtipurile non-luminale, densitatea MC

intratumorale a corelat cu vasele intratumorale. Aceasta poate fi una din explicațiile agresivității mai înalte a carcinoamelor non-luminale.

De asemenea, în literatura de specialitate, există date precum că în timpul progresiei cancerului de sân, MC pot contribui la remodelarea stromală și diferențierea miofibroblastelor, prin triptaza eliberată în ECM. În carcinoamele de prostată, Globa T. et al. au determinat o corelație totală dintre CD34pt și triptază în zonele peritumorale precum și absența unei asocieri semnificative dintre acestea în zonele intratumorale [29]. În leziunile cervixului uterin, Cebanu A. et al. au presupus că MC au rol limfangiogen. Rezultatele acestora au semnalat o corelație semnificativă dintre numărul de vase limfatice și cel al MC din zonele peritumorale în carcinoamele invazive, în comparație cu metaplazia scuamoasă și cu carcinomul *in situ* [30].

DC exercită o activitate pro-angiogenă puternică care este mediată de factorul de creștere angiogenic VEGF-A. De asemenea, DC se pot transdiferenția în endoteliocite, astfel contribuind la angio- și vasculogeneză. Acest aspect poate explica rezultatele studiului nostru și anume interrelațiile dintre expresia CD34 și S100. Similar carcinoamelor mamare, Yamagata et al. au stabilit că în carcinoamele scuamocelulare orale, macrofagele CD163 pozitive promovează limfangiogeneza prin expresia VEGF-C, care contribuie la metastazarea în nodurile limfatice regionale [31]. Astfel, mediatorii angiogeni, produși de diverse celule stromale și de însăși celulele canceroase pot avea acțiune paracrină, creându-se un cerc vicios. Sammarco G. et al. confirmă că și în cancerul gastric densitatea MC este crescută și există o corelație cu angiogeneza, numărul metastazelor în nodurile limfatice și supraviețuirea acestor pacienți. MC exercită un rol protumorigen în cancerul gastric prin eliberarea de factori angiogenici (VEGF-A, CXCL8, MMP-9) și limfangiogenici (VEGF-C și VEGF-F) [32].

În studiul nostru, prin utilizarea anticorpului D2-40 am demonstrat existența vaselor limfatice în interiorul tumorii. În studiul dat am demonstrat interrelația dintre D2-40it și D2-40pt, corelația fiind una de talie moderată ($r_s = 0.325$). Densitatea mai înaltă a vaselor limfatice peritumorale comparativ cu cele intratumorale ne poate sugera ideea că ele formează o rețea la periferia tumorii și sunt vase funcționale. În studiul nostru am determinat o corelație statistic semnificativă dintre densitatea vaselor limfatice intratumorale și expresia ER de către celulele tumorale în subtipul luminal A, ceea ce presupune un control hormonal al sistemului limfatic. În ciuda numeroaselor date care indică un efect benefic al estradiolului asupra vaselor sangvine, surprinzător de puține date sunt cunoscute despre efectele acestuia asupra endoteliului limfatic. Cunoaștem că influența estradiolului asupra endoteliului limfatic este mediată în exclusivitate de receptorul ER α . Aceasta este o diferență majoră față de endoteliul vaselor sangvine, care exprimă atât ER α cât și ER β [33]. Pornind de la aceste premise, Morfousse F. et al. au modelat limfedemul la șoareci și au ajuns la concluzia că ER α reglează direct genele limfangiogene, ceea ce stimulează migrarea și înmugurirea (sprouting-ul) endoteliului limfatic. De asemenea, grupul dat de cercetători a stabilit că blocarea ER α folosind un modulator selectiv de estrogen, cum ar fi tamoxifenul, are un efect dăunător asupra drenajului și funcției vaselor limfatice, crescând riscul de a se dezvolta limfedem secundar [34], ceea ce și se întâmplă în cazul tratamentului cancerului mamar de tip luminal.

Corelațiile statistic semnificative dintre CD34 și D2-40 stabilite de noi sugerează legătura strânsă dintre aceste procese. Atât modelele *in vivo* pe animale, cât și testele *in vitro* au indicat că limfangiogeneza are loc după angiogeneză. Prin urmare, formarea vaselor limfatice se poate baza nu numai pe factori limfangiogeni, ci și pe factori angiogenici [28]. În leziunile de col uterin, Șaptefrați et al. au observat că principala sursă de VEGF sunt celulele tumorale. VEGF nu s-a exprimat în

specimenele normale de col uterin. Markerul a fost identificat într-un număr redus de cazuri de CIN1, dar expresia VEGF s-a intensificat pe măsura progresiei neoplaziei de col uterin. Datele acestor autori atestă dobândirea fenotipului angiogenic al leziunilor de col uterin la stadiile de CIN2-3, adică mult mai devreme decât apariția carcinomului propriu-zis. Expresia imunohistochimică a VEGF nu a fost limitată doar la celulele epiteliale, dar s-a observat și în celulele stromale, care în cazurile cu carcinoame invazive exprimau VEGF într-o proporție de peste 60%.

Micromediul stromal joacă un rol major în menținerea homeostaziei tisulare normale și în promovarea creșterii tumorii. Tot mai multe dovezi ne sugerează faptul că micromediul tisular normal este o barieră în calea tumorigenezei, în timp ce semnalele proinflamatorii aberante destabilizează homeostazia țesuturilor și promovează tumorigeneza. Astfel, celulele canceroase educă celulele din micromediul tumoral și le forțează să joace după regulile proprii. În această lucrare, au fost analizați actorii cheie din stroma tumorilor mamare și rolul lor în tumorigeneză și progresia cancerului. Cu toate acestea, rămâne o întrebare cheie: ce vine mai întâi, disfuncția celulelor epiteliale sau disfuncția micromediului lor?

CONCLUZII GENERALE

1. Microambianța tumorală constituie un element esențial în structura carcinoamelor mamare, influențând creșterea și progresia acestora. Interrelațiile dintre celulele epiteliale și structurile stromale sunt complexe, stimulatorii sau inhibitorii, astfel gestionarea stromei este imperativă pentru potențarea sau încetinirea expansiunii celulelor neoplazice.
2. În carcinoamele mamare de tip luminal densitatea mastocitelor în ariile peritumorale prevalează față de cea a macrofagelor și a celulelor dendritice manifestând o corelație pozitivă statistic semnificativă. În tumorile ER+ și PR+ ariile intratumorale au prezentat o densitate mai înaltă a mastocitelor față de cele peritumorale, astfel tumorile hormonal pozitive manifestă chemoatractivitate pentru celulele triptază+, stimulând migrarea acestora.
3. Majoritatea carcinoamelor mamare hormonal independente au prezentat o densitate înaltă a macrofagelor atât în stroma intratumorală cât și în cea peritumorală. În cadrul carcinoamelor ER+ și PR+ densitatea celulelor CD68+ a înregistrat valori joase.
4. Pierderea receptorilor pentru estrogeni/ progesteron este însoțită de creșterea densității celulelor S100+ peritumorale. Pozitivitatea pentru S100 a celulelor canceroase sugerează modularea antigenică a acestora, cu transfer de proprietăți și „mimetism” sau poate fi consecința fuziunii celulei dendritice cu celula neoplazică.
5. Mastocitele sunt elementele celulare capabile să moduleze stroma carcinoamelor mamare, fiind implicate în angiogeneză și limfangiogeneză, densitatea înaltă a mastocitelor fiind însoțită și de scăderea numărului de celule dendritice și macrofage.
6. În carcinoamele mamare slab diferențiate densitatea vaselor sangvine și limfatice este mai înaltă, cu predilecție în ariile peritumorale, creând astfel condiții favorabile pentru expansiunea tumorală. Carcinoamele mamare ce expresează receptori pentru estrogeni, progesteron sau proteina HER2 nu manifestă corelație semnificativ statistică cu densitatea vasculară.

RECOMANDĂRI

1. În studiul elementelor stromale, propunem determinarea densității acestora separat în ariile intra- și peritumorale.
2. În studiul varietăților celulare, se recomandă utilizarea medianei drept valoare prag pentru a diviza ulterior datele în 2 categorii: densitate joasă și densitate înaltă.
3. Determinarea macrofagelor CD68+ și a celulelor dendritice S100+ în speciunile neoplazice de glandă mamară permite selectarea pacienților care ar putea beneficia de terapia imună.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] A. Goldhirsch, W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, B. Thürlimann, and H. J. Senn, "Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011," *Ann. Oncol.*, vol. 22, no. 8, pp. 1736–1747, 2011, doi: 10.1093/annonc/mdr304.
- [2] A. Prat and C. M. Perou, "Deconstructing the molecular portraits of breast cancer," *Mol. Oncol.*, vol. 5, no. 1, pp. 5–23, 2011, doi: 10.1016/J.MOLONC.2010.11.003.
- [3] J. Choi, J. Gyamfi, H. Jang, and J. S. Koo, "The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology.," *Histol. Histopathol.*, vol. 33, no. 2, pp. 133–145, Feb. 2018, doi: 10.14670/HH-11-916.
- [4] C. B. Williams, E. S. Yeh, and A. C. Soloff, "Tumor-associated macrophages: Unwitting accomplices in breast cancer malignancy," *npj Breast Cancer*, vol. 2, no. 1, 2016, doi: 10.1038/npjbcancer.2015.25.
- [5] S. D. Soysal, A. Tzankov, and S. E. Muenst, "Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer," *Pathobiology*, vol. 82, no. 3–4, pp. 142–152, 2015, doi: 10.1159/000430499.
- [6] C. Suci, A. Muresan, R. Cornea, O. Suci, A. Dema, and M. Raica, "Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast," *Oncol. Lett.*, vol. 7, no. 1, pp. 107–114, 2014, doi: 10.3892/ol.2013.1654.
- [7] A. E. Place, S. Jin Huh, and K. Polyak, "The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment," *Breast Cancer Res.*, vol. 13, no. 6, p. 227, 2011, doi: 10.1186/bcr2912.
- [8] J. Sang, D. Yi, X. Tang, Y. Zhang, and T. Huang, "The associations between mast cell infiltration, clinical features and molecular types of invasive breast cancer.," *Oncotarget*, vol. 7, no. 49, pp. 81661–81669, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.13163.
- [9] T. Lindsten *et al.*, "Effect of macrophages on breast cancer cell proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2," *Int. J. Oncol.*, vol. 51, no. 1, pp. 104–114, 2017, doi: 10.3892/ijo.2017.3996.
- [10] H. Jeong, I. Hwang, S. H. Kang, H. C. Shin, and S. Y. Kwon, "Tumor-associated macrophages as potential prognostic biomarkers of invasive breast cancer," *J. Breast Cancer*, vol. 22, no. 1, pp. 38–51, 2019, doi: 10.4048/jbc.2019.22.e5.
- [11] T. A. Klingen, Y. Chen, H. Aas, E. Wik, and L. A. Akslen, "Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer," *Hum. Pathol.*, vol. 69, pp. 72–80, 2017, doi: 10.1016/j.humpath.2017.09.001.
- [12] T. Globa, L. Globa, E. Pelin, P. Globa, and V. David, "Analiza imunohistochimică a macrofagelor CD68+ din stroma carcinomului de prostată," *Probl. actuale ale Morfol. Mater. Conferinței Științifice Internaționale dedicată celor 70 ani la fondarea Univ. Stat Med. și Farm. "Nicolae Testemițanu", Chișinău*, pp. 63–67, 2020.
- [13] M. Takeya and Y. Komohara, "Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe?," *Pathol. Int.*, vol. 66, no. 9, pp. 491–505, 2016, doi: 10.1111/pin.12440.
- [14] T. Globa, L. Globa, V. David, P. Globa, E. Pelin, and L. Saptefrati, "Macrophages and dendritic cells density correlates with depth of invasion in the prostate carcinoma," *Mold. Med. J.*, vol. 63, no. 4, pp. 27–34, 2020, doi: 10.5281/zenodo.4016808.
- [15] Miguel Nava, N. R. Zemke, A. Berk, R. Farias-Eisner, J. Vadgama, and Y. Wu, "Abstract 362: EGFR signaling activates S100 gene expression in HER2-positive breast cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 78, no. 13, p. 362, 2018.
- [16] R. Tamma *et al.*, "Spatial distribution of mast cells and macrophages around tumor glands in human

- breast ductal carcinoma,” *Exp. Cell Res.*, vol. 359, no. 1, pp. 179–184, 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.07.033.
- [17] E. Carpenco *et al.*, “Mast cells as an indicator and prognostic marker in molecular subtypes of breast cancer,” *In Vivo (Brooklyn)*, vol. 33, no. 3, 2019, doi: 10.21873/invivo.11534.
- [18] A. B. Rajput *et al.*, “Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: A study of 4,444 cases,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 107, no. 2, pp. 249–257, 2008, doi: 10.1007/s10549-007-9546-3.
- [19] E. Cavalieri *et al.*, “Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1766, no. 1, pp. 63–78, 2006, doi: 10.1016/j.bbcan.2006.03.001.
- [20] T. Zhu, D. Shao-Jie, L. Tlan-Tian, Z. Li-Bo, H. Xiu-Feng, and Z. Xin-Mei, “Estrogen is an important mediator of mast cell activation in ovarian endometriomas,” *Reproduction*, vol. 155, no. 1, pp. 73–83, 2016.
- [21] S. H. Keser *et al.*, “Relationship of mast cell density with lymphangiogenesis and prognostic parameters in breast carcinoma,” *Kaohsiung J. Med. Sci.*, vol. 33, no. 4, pp. 171–180, 2017, doi: 10.1016/j.kjms.2017.01.005.
- [22] Q. Rao *et al.*, “Recruited mast cells in the tumor microenvironment enhance bladder cancer metastasis via modulation of ER β /CCL2/CCR2 EMT/MMP9 signals,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 7, pp. 20–22, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.5467.
- [23] A. Glajcar *et al.*, “The relationship between breast cancer molecular subtypes and mast cell populations in tumor microenvironment,” *Virchows Arch.*, vol. 470, no. 5, pp. 505–515, 2017, doi: 10.1007/s00428-017-2103-5.
- [24] T. Globa, L. Şaptefraţi, R. A. Ceauşu, P. N. Gaje, A. M. Cimpean, and M. Raica, “Mast cell phenotype in benign and malignant tumors of the prostate,” *Polish J. Pathol.*, vol. 65, no. 2, pp. 147–153, 2014.
- [25] M. Xiang, Y. Gu, F. Zhao, H. Lu, S. Chen, and L. Yin, “Mast cell tryptase promotes breast cancer migration and invasion,” *Oncol. Rep.*, vol. 23, no. 3, pp. 615–619, 2010, doi: 10.3892/or.
- [26] M. Raica, A. M. Cimpean, R. Ceauşu, D. Ribatti, and P. Gaje, “Interplay between mast cells and lymphatic vessels in different molecular types of breast cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 3, pp. 957–964, 2013.
- [27] S. Dabiri *et al.*, “The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis,” *Mod. Pathol.*, vol. 17, no. 6, pp. 690–695, 2004, doi: 10.1038/modpathol.3800094.
- [28] R. Paduch, “The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis,” *Cell. Oncol.*, vol. 39, no. 5, pp. 397–410, 2016, doi: 10.1007/s13402-016-0281-9.
- [29] T. Globa, “Angiogeneza și mastocitele în leziunile proliferative benigne de prostată,” *Probl. actuale ale Morfol. Mater. Conferinței Științifice Internaționale dedicată celor 70 ani la fondarea Univ. Stat Med. și Farm. “Nicolae Testemițanu”*, Chişinău, pp. 64–70, 2015.
- [30] A. Cebanu, L. Şaptefraţi, V. Mazuru, T. Globa, V. David, and L. Rudico, “The lymphangiogenic role of mast cells in premalignant and malignant lesions of uterine cervix,” *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, vol. 1, no. 12, pp. 168–173, 2011.
- [31] Y. Yamagata *et al.*, “CD163-Positive Macrophages Within the Tumor Stroma Are Associated With Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 75, no. 10, pp. 2144–2153, 2017, doi: 10.1016/j.joms.2017.03.009.
- [32] G. Sammarco *et al.*, “Mast cells, angiogenesis and lymphangiogenesis in human gastric cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 9, p. 2106, 2019, doi: 10.3390/ijms20092106.
- [33] M. J. Evans, H. A. Harris, C. P. Miller, S. K. Karathanasis, and S. J. Adelman, “Estrogen receptors α and β have similar activities in multiple endothelial cell pathways,” *Endocrinology*, vol. 143, no. 10, pp. 3785–3795, 2002, doi: 10.1210/en.2002-220356.
- [34] F. Morfoisse *et al.*, “Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor- α Signaling to Protect From Lymphedema,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 38, pp. 1346–1357, 2018, doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310997.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

- **Articole în reviste științifice peste hotare:**
 - ✓ **articole în reviste ISI, SCOPUS și alte baze de date internaționale**
 1. **Carpenco E.**, Ceausu R. A., Cimpean A. M., Gaje P. N., Saptefrati L., Fulga V., David V., Raica M. Mast cells as an indicator and prognostic marker in molecular subtypes of breast cancer. In: *IN VIVO*. 2019, 33(3):743-748. PMID: 31028192. ISSN: 0258-851X. DOI: <https://doi.org/10.21873/invivo.11534>. (IF 1,541)
- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**
 - ✓ **articole în reviste de categoria B+**
 2. **Carpenco E.** Tumor associated macrophages in breast cancer. In: *Moldovan Medical Journal*, 2019, 62(1):24-27. ISSN 2537-6373. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/75800
 3. **Carpenco E.** The key players of tumor microenvironment and their role in breast cancer. In: *Moldovan Medical Journal*, 2019, 62(3):67-71. ISSN 2537-6373. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/84122
 4. **Carpenco E.** S100 protein in molecular subtypes of breast cancer. In: *Moldovan Medical Journal*, 2020, 63(5):15-18. ISSN 2537-6373. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/116021
 5. **Carpenco E.**, Fulga V., David V., Foca E., Șaptefrăți L. Mast cells in luminal *versus* non-luminal breast cancers. In: *Moldovan Medical Journal*, 2021, 64(4):35-38. ISSN 2537-6373. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/140666
 - ✓ **articole în reviste de categoria B**
 6. **Carpenco E.**, Fulga V., Șaptefrăți L. Peculiarities of lymphangiogenesis in molecular subtypes of breast carcinomas: experimental study. In: *Moldovan Journal of Health Sciences*, 2020, 25(4):26-34. ISSN 2345-1467. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/145592
 - ✓ **articole în lucrările conferințelor științifice:**
 - ✓ **internaționale**
 7. **Carpenco Ecaterina.** The influence of mast cells on tumor lymphatic vessels in breast cancer. In: *Probleme actuale ale morfologiei. Materialele Conferinței științifice internaționale dedicată aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*, Chișinău, 30-31 octombrie 2020, pp. 19-22
- **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții:**
 8. **Carpenco E.**, Șaptefrăți L., Fulga V., Foca E., David V. Densitatea mastocitelor ca factor predictiv și de prognostic în evoluția subtipurilor moleculare de carcinom mamar. Certificat de inovator Nr. 5967. 13.12.2022.

- **Rezumate în materialele congreselor, conferințelor, simpoziunilor științifice**
 - ✓ **naționale**
 - 9. **Carpenco E.**, David V., Foca E. Mastocitele în cancerul mamar luminal versus non-luminal. In: *Materialele Conferinței științifice anuale Cercetarea în biomedicină și sănătate. Calitate, excelență și performanță. Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*. Chișinău, 2021, p.11
 - ✓ **internaționale desfășurate în Republica Moldova**
 - 10. **Carpenco E.** Lymphatic vessels density and its implications in breast cancer. In: *MedEspera 2020: abstract book. The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors*, Chișinău, 24-26 septembrie 2020, pp. 244-245.

- **Participări cu comunicări la forumuri științifice:**
 - ✓ **internaționale**
 - 11. **Carpenco E.** Lymphatic vessels density and its implications in breast cancer. *MedEspera 2020. The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors*, Chișinău, 24-26 septembrie 2020.
 - 12. **Carpenco E.** The influence of mast cells on tumor lymphatic vessels in breast cancer. *Probleme actuale ale morfologiei. Conferința științifică internațională dedicată aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*, Chișinău, 30-31 octombrie 2020.
 - ✓ **naționale**
 - 13. **Carpenco E.** Studiul mastocitelor în stroma tumorală din cancerul mamar. *Conferința științifică anuală în cadrul Zilelor Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*, Chișinău, 15-18 octombrie 2019.
 - 14. **Carpenco E.** Proteina S100 în subtipurile moleculare de cancer mamar. *Congresul consacrat aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*, Chișinău, 21-23 octombrie 2020.
 - 15. **Carpenco E.**, David V., Foca E. Mastocitele în cancerul mamar luminal versus non-luminal. *Conferința științifică anuală Cercetarea în biomedicină și sănătate. Calitate, excelență și performanță. Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*. Chișinău, 20-22 octombrie 2021.

- **Participări cu postere la forumuri științifice:**
 - 16. **Carpenco E.** Macrofagele asociate tumorilor în cancerul mamar. *Poster moderat la Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*, Chișinău, 15-18 octombrie 2019.

ADNOTARE

Carpenco Ecaterina

„Particularități ale stromei în subtipurile moleculare de cancer mamar”

Teză de doctor în științe medicale, Chișinău, 2023

Structura tezei: Teza este expusă pe 92 pagini de text de bază: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice, 47 figuri și 26 tabele. Bibliografia include 209 surse. Rezultatele studiului au fost publicate în 9 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: ER, PR, HER2, subtipuri moleculare, microambianță, stroma intratumorală, stroma peritumorală.

Scopul lucrării: Studiul varietăților celulare și al elementelor vasculare din stroma carcinoamelor mamare în dependență de subtipul molecular al tumorii în vederea îmbunătățirii diagnosticului și prognosticului cancerului mamar.

Obiectivele lucrării: Evaluarea histologică și imunohistochimică a varietăților celulare (CD68, S100, triptaza mastocitară) din stroma carcinoamelor mamare în diferite subtipuri moleculare ale tumorii. Studiul particularităților rețelelor vasculare sangvine (CD34) și limfatice (D2-40) în carcinoamele mamare în funcție de subtipul molecular. Analiza interrelațiilor între elemente celulare, vase sangvine și limfatice *versus* subtipul molecular al tumorii. Elucidarea impactului diverselor elemente stromale asupra diagnosticului, prognosticului și evoluției carcinomului mamar.

Noutatea și originalitatea științifică: Pentru prima dată a fost efectuat un studiu comparativ al profilului molecular al carcinoamelor mamare *versus* elemente celulare (macrofage, mastocite, celule dendritice) și vasculare (sangvine și limfatice) din stroma tumorală. În premieră a fost evaluat gradul expresiei unor markeri celulari (CD68, S100, triptaza, CD34, D2-40) în ariile intra- și peritumorale în raport cu expresia markerilor ER, PR și HER2. Au fost descrise modificările cantitative și calitative ale componentelor stromei tumorale în subtipurile luminală și non-luminală.

Importanța teoretică și aplicativă a lucrării: Evaluarea cantitativă și calitativă a elementelor stromale în carcinoamele mamare permite completarea cunoștințelor existente despre rolul stromei în evoluția și progresarea neoplaziilor mamare, cu accent asupra diferențelor în grupul luminal *versus* non-luminal.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele studiului dat au fost implementate în activitatea didactică și științifică a Catedrei de histologie, citologie și embriologie și a Laboratorului de morfologie al USMF „Nicolae Testemițanu”.

АННОТАЦИЯ

Карпенко Екатерина

„Особенности стромы в молекулярных подтипах рака молочной железы”

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, Кишинев, 2023

Структура диссертации: Диссертация представлена на 92 страницах основного текста: введение, 4 главы, общие выводы и практические рекомендации, 47 рисунков и 26 таблиц. Библиография включает 209 источников. Результаты исследования опубликованы в 9 научных статьях.

Ключевые слова: ER, PR, HER2, молекулярные субтипы, микроокружение, строма опухоли, перитуморальная строма.

Область исследования: патологическая анатомия.

Цель исследования: Изучение разновидностей клеток и сосудистых элементов стромы карцином молочной железы в зависимости от молекулярного подтипа опухоли с целью улучшения диагностики и прогноза рака молочной железы.

Задачи исследования: Гистологическая и иммуногистохимическая оценка клеток стромы карцином молочной железы в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. Изучение особенностей кровеносной и лимфатической сети в зависимости от молекулярного подтипа карциномы. Анализ взаимосвязей между клетками, кровеносными и лимфатическими сосудами в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. Изучение влияния различных стромальных элементов на прогноз карциномы молочной железы.

Новизна и оригинальность исследования. Впервые проведено сравнительное исследование молекулярного профиля карцином молочной железы относительно с клеточными (макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки) и сосудистыми (кровяными и лимфатическими) элементами в строме опухоли. Впервые оценена степень экспрессии некоторых клеточных маркеров (CD68, S100, триптазы, CD34, D2-40) в интра- и перитуморальной областях по отношению к экспрессии ER, PR и HER2. Описаны количественные и качественные изменения стромальных компонентов опухоли при люминальном и нелюминальном подтипах.

Практическая значимость: Количественная и качественная оценка стромальных элементов в карциномах молочной железы позволяет дополнить существующие знания о роли стромы в развитии и прогрессировании неоплазий молочной железы с акцентом на различия в люминальной и нелюминальной группе.

Внедрение результатов: Результаты данного исследования были внедрены в дидактическую и научную деятельность Кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии и Лаборатории морфологии ГУМФ им. Николае Тестемицану.

ANNOTATION

Carpenco Ecaterina

„Peculiarities of the stroma in the molecular subtypes of breast cancer”

PhD, Thesis in Medical Science, Chisinau, 2023

Thesis structure: The thesis is presented on 92 pages of basic text: introduction, 4 chapters, general conclusions and practical recommendations, 47 figures and 26 tables. The bibliography includes 209 sources. The results of the study were published in 9 scientific papers.

Keywords: ER, PR, HER2, molecular subtypes, microenvironment, tumor stroma, peritumoral stroma.

Field of study: Pathology.

Purpose of study: The study of cell varieties and vascular elements in the stroma of breast carcinomas depending on the molecular subtype of the tumor in order to improve the diagnosis and prognosis of breast cancer.

Objectives: Histological and immunohistochemical evaluation of cell varieties (CD68, S100, mast cell tryptase) from the stroma of breast carcinomas in different molecular subtypes of tumors. The study of the peculiarities of the blood vascular (CD34) and lymphatic (D2-40) networks in breast carcinomas according to the molecular subtype. Analysis of interrelationships between cellular elements, blood vessels and lymphatics *versus* tumor molecular subtype. Elucidating the impact of various stromal elements on the diagnosis, prognosis and evolution of breast carcinoma.

Scientific novelty and originality: For the first time, a comparative study of the molecular profile of breast carcinomas *versus* cellular (macrophages, mast cells, dendritic cells) and vascular (blood and lymphatic) elements in the tumor stroma was performed. For the first time, the degree of expression of some cell markers (CD68, S100, tryptase, CD34, D2-40) in intra- and peritumoral areas was evaluated in relation to the expression of ER, PR and HER2 markers. Quantitative and qualitative changes in tumor stromal components in luminal and non-luminal subtypes were described.

The theoretical and applied importance of the work: Quantitative and qualitative assessment of stromal elements in breast carcinomas allows to complement the existing knowledge about the role of stroma in the evolution and progression of breast neoplasias, with emphasis on the differences in the luminal versus non-luminal group.

Implementation of the scientific results: The results of the given study were implemented in the didactic and scientific activity of the Department of histology, cytology and embryology and the Laboratory of morphology of „Nicolae Testemitanu” sUMPh.