Полтавський державнний медичний університет
Міністерство охорони здоров’я України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

АЙКЯН АРТЕМ ЗАВЕНОВИЧ

УДК 618.19-006.04/.44:611.018

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЛЬ М1 І М2 ФЕНОТИПІВ МАКРОФАГІВ У ІМУНОПАТОГЕНЕЗІ АДЕНОКАРЦИНОМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ НАЯВНОСТІ АБО ВІДСУТНОСТІ МЕТАСТАЗІВ У РЕҐІОНАРНИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛАХ

14.03.08 – Імунологія та алергологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

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

Науковий керівник: Кайдашев Ігор Петрович, лауреат Державної премії України у галузі науки і техніки, заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Айкян А.З. Роль М1 і М2 фенотипів макрофагів у імунопатогенезі аденокарциноми молочної залози при наявності або відсутності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 - імунологія та алергологія. – Полтавський державний медичний університет, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2021.

У дисертації наведено нове вирішення і теоретичне узагальнення наукового завдання, яке полягає у встановлених взаємозв'язках між молекулярно-біологічними типами аденокарциноми, або раку, молочної залози (РМЗ), їх окремими патоморфологічними особливостями та метастазуванням у регіональні лімфатичні вузли, і представництвом у них CD68+ пухлино-асоційованих макрофагів (ПАМ) і CD163+ ПАМ для оцінки їх прогностичної та імунопатогенетичної ролі.

Матеріалом дослідження послугували інтраопераційні тканини пухлин та іпсілатеральних лімфовузлів після радикальної мастектомії, отримані від 30 пацієнток з діагнозом РМЗ, середній вік яких становив 60 років (від 28 до 79), і які були розподілені на дві врівноважені групи, в залежності від відсутності метастазів в регіональні лімфовузли – перша N0, або з метастазами – друга N1. У кожній групі дослідження представлені по 3 зразки: люмінального А, люмінального В, негативного за рецептором 2 епідермального фактора росту людини (HER2–), люмінального В HER2+, нелюмінального HER2+ та потрійного негативного молекулярно-біологічних типів РМЗ, які верифіковано на основі імуногістохімічних характеристик (HER2, естрогеновий рецептор (ER), прогестероновий рецептор (PR), маркер проліферації Ki67).

Метод імуногістохімії (ІГХ) з визначенням CD68+ ПАМ та CD163+ ПАМ використано для аналізу характеристик морфологічних фенотипових еквівалентів

М1- та М2-поляризованих макрофагів (Мф) у зразках РМЗ й метастазів в лімфатичних вузлах.

Було використано спосіб підрахунку імунопозитивних клітин – на все поле зору у послідовних 5-17 полях кожного зразку (в залежності від площі зразку) по аналогії з визначенням G-ступеня пухлин.

Виявлені закономірності відносяться до суто прогресування пухлинного процессу РМЗ, згідно кроссекційного дизайну дослідження, й не мають впливу попереднього лікування, оскільки його розпочинали з оперативного втручання.

Аналіз порівняння кількісних показників CD68+ та CD163+ ПАМ у первинних РМЗ між першою N0 групою (n=46) і другою N1 групою (n=44) показав збільшення CD68+ ПАМ у первинних вогнищах РМЗ за умов метастазування (p=0,015). А також перевагу CD68+ ПАМ над CD163+ ПАМ в обох групах (p<0,0001). Встановлено зворотну кореляцією між CD68+, CD163+ ПАМ та клінічним значенням ER/PR (p=0,02 та p=0,009, відповідно), а також пряму кореляцію між кількістю CD68+ ПАМ і експресією Ki67 (p=0,04). Для CD68+ ПАМ другої групи виявлено великий розкид варіації, а розмах кількісних результатів (від 0 до 43 клітин на поле зору) відображає високу імовірність екстремальних значень. Що, разом з кореляціями, може пояснюватись взаємозалежністю молекулярно-біологічних типів РМЗ і кількісних показників зокрема CD68+ ПАМ.

При люмінальних типах РМЗ якісна оцінка $CD68^+$ та $CD163^+$ клітин первинного вогнища виявила типову імунореактивність CD68+ та CD163+ по контуру цитоплазми або по всій клітині, рівномірно та/або у вигляді коричневої крапчастості. Форми клітин були округлими гілчастими та видовженими. Що було аналогічним і для інших типів РМЗ. Імунопозитивні клітини розташовувалися у вигляді скупчень та рівномірно. Представництво і локалізація імунопозитивних клітин були пов’язані з патогістологічними особливостями зразків РМЗ. Типова локалізація CD68+ ПАМ охарактеризована як регулярна у стромі пухлини, на відміну від пухлинних кластерів або гнізд, де відмічені певні відділи без ПАМ. CD163+ ПАМ співлокалізувалися з CD68+ у десмопластичних,

жирових відділах строми, та в окремих гніздах, у т.ч. некротичних, у меншій кількості. Отже, локалізація ПАМ та їх щільність взаємопов'язана з патоморфологією РМЗ, яка була дуже різноманітна, навіть в межах клінічно розсортованих вузьких типів. Не зважаючи на певну спільність рис, наприклад, для всіх зразків люмінальних РМЗ – десмопластична реакція строми, фіброзна, фіброзно-жирова строма, певний рівень лімфоїдної інфільтрації, осередки некрозів, мікрокальцифікати, – займані ними площі дуже різняться.

Стосовно взаємозв'язків між патоморфологію, при аналізі всієї виборки люмінальних типів, кореляційний аналіз виявив зворотний достовірний зв'язок між середніми кількостями CD68+ клітин (але не CD163+) і G-ступенем пухлин (p=0,046).

Кількісний аналіз CD68+ та CD163+ ПАМ всієї виборки люмінальних типів, в залежності від N0 (n=46) і N1 (n=44) групи, не встановив відмінностей між кількісними показниками CD68+, і CD163+ ПАМ і їх співвідношенням. У протилежність, статистика в межах кожного окремого типу люмінальних РМЗ показала наступні результати. При люмінальному А РМЗ достовірністю характеризувалося співвідношення CD68+/CD163+ ПАМ на користь перших (p=0,0395, p=0,008), не залежно від метастазування, і, аналогічно, в метастазах лімфатичних вузлів (p=0,0344). Тільки при люмінальному В HER2– РМЗ в метастазуючих зразках кількісні показники CD68+ та CD163+ ПАМ знижувалися, порівняно із зразками не метастазучого РМЗ (p=0,0294, p=0,0079), а CD163+ ПАМ були представлені у лімфатичних метастазах на вищому рівні, порівняно з первинним вогнищем (p=0,0014). При люмінальному В HER2+ РМЗ достовірність підтверджена лише для переваги CD68+ над CD163+ ПАМ в межах метастазів (p=0,0001). Достовірних кореляцій між кількісними показниками ПАМ в первинному вогнищі та метастазах не встановлено.

Один з важливих підсумків, що підкреслює доцільність персоніфікованого підходу: різні тенденції змін і співвідношень CD68+ і CD163+ ПАМ в залежності від метастазування у повній виборці РМЗ (збільшення CD68+ ПАМ), у виокремлених люмінальних типах (відсутність єдиного тренду), і, навіть, в межах

люмінальних А, В типів (достовірне зниження CD68+ і CD163+ ПАМ при метастазуванні люмінального В HER2– РМЗ; індивідуальні зниження середніх показників CD163+ ПАМ при метастазуванні люмінального А, й підвищення при метастазуванні люмінального В HER2+). Що демонструє зв'язок між молекулярно-біологічним типом РМЗ та лімфатичним метастазуванням, опосередкований ПАМ, а також внесок в прогресування ПАМ обох фенотипів.

При нелюмінальному HER2+ РМЗ якісний аналіз ПАМ показав, що в групі N0 CD68+ ПАМ на високому рівні інфільтрували пухлинну тканину, розміщуючись навколо та серед гнізд рівномірно й зосередженнями, а також в осередках некрозу. Відмічена їх регулярна присутність в ділянках лімфоїдної інфільтрації. А CD163+ ПАМ зустрічалися рідше, ніж CD68+, але чітко повторювали їх локалізацію: навколо та в середині пухлинних гнізд та серед лімфоїдних клітин, але у фіброзній стромі – на тому ж кількісному рівні, що і CD68+. В групі N1 більшість скупчень саме у пухлинних гніздах, імовірно, відповідала подвійній імунореактивності.

Патогістологічний опис нелюмінального HER2+ РМЗ демонстрував морфологічну різноманітність первинних РМЗ у межах одного типу, а також відмінності між первинним осередком та метастазами у лімфовузли. Спільними рисами всіх препаратів були десмопластична реакція строми, фокуси/осередки некрозу, наявність мікрокальцифікатів та більші, або менші, ознаки запалення у вигляді лімфоплазмацитарної інфільтрації, які не є унікальними і можуть бути притаманні іншим типам.

При нелюмінальному HER2+ РМЗ кількісна оцінка CD68+ та CD163+ клітин показала достовірне збільшення CD68+ ПАМ ($p<0{,}0001$), але не CD163+ клітин, за умов метастазування, що відображає збільшення саме М1-типу ПАМ і їх сприяння метастазуванню. Зменшення кількісних показників CD68+ ПАМ ($p<0{,}0001$) у метастазах в лімфовузли, порівняно з первинними РМЗ, без достовірної кореляції між ними, може передбачати інші функції цих клітин у метастазах.

При потрійному негативному РМЗ оцінка первинного вогнища показала поєднане розміщення CD68+ і CD163+ ПАМ у фіброзній стромі і некротичних ділянках пухлин. Відповідно, у пухлинних гніздах розміщувалися переважно CD68+ клітини. У першій N0, групі, схоже, саме ці клітини утворювали власні осередки у гніздах (враховуючи, що на одному із зразків CD163+ клітини були лише поодинокі), і набували зливної та/або вакуолізованої форми. Аналогічна картина відмічена і у другій N1 групі ПН РМЗ. Отже, частина пухлинних комплексів у первинних вогнищах і метастазах були інфільтровані скупченнями тільки CD68+ клітин, які не повторювали CD163+ клітини.

Патогістологічно зразки первинного вогнища ПН РМЗ, відповідно до групи, мали свої унікальні особливості, такі як протяжність строми, щільність представництва у ній резидентних непухлинних та інфільтруючих клітин, а також деякі риси морфології пухлинних клітин, які не обчислювали кількісно, внаслідок обмеженого числа учасниць дослідження. Спільні описові характеристики включали десмопластичну реакцію, виразну запальну реакцію (у вигляді щільної лімфоплазмоцитарної інфільтрації), крововиливи та ознаки некрозу у тій чи іншій мірі. Всі зразки метастазів характеризувалися обов’язковою присутністю ділянок некрозу.

При ПН РМЗ встановлено достовірне збільшення кількості CD68+ клітин та CD163+ клітин в первинному вогнищі у другій N1 групі з метастазами ($p<0,0001$ та $p<0,0005$), зменшення CD68+ клітин у метастазах в лімфатичних вузлах, порівняно з первинним вогнищем ($p=0,047$) та зворотну кореляцію між CD163+ ПАМ первинних вогнищ і метастазів ($p=0,0024$). Ці результати підтверджують роль ПАМ обох фенотипів, і зокрема їх підрозділу – М2-подібних макрофагів (як мінімум за рахунок подвійно позитивної (CD68+ CD163+) частини ПАМ), як сприятливих для метастазування. А також припускає зв’язок між CD68+, CD163+ ПАМ та лімфатичним метастазуванням саме при ПН РМЗ.

Аналіз зв’язку рівнів інфільтрації первинної РМЗ CD68+ та CD163+ ПАМ з післяопераційним прогнозом, проведений на повній виборці, показав виживаність 89% при високому рівні інфільтрації CD68+ ПАМ, і 83% – при низькому, різниця

не досягала достовірності; кумулятивна смертність у підгрупах не досягала достовірної різниці. А також, виживаність – 81% при помірній інфільтрації CD163+ ПАМ і 91% – при низькій. Що при порівнянні не досягає статистичної достовірності і потребує подальших спостережень для висновку, але принципово співпадає з концепцією, що відносно вища інфільтрація первинного вогнища М2-подібними Мф несе негативний прогноз.

Основний підсумок полягає в тому, що, на відміну від люмінальних типів РМЗ (які при метастазуванні характеризувалися індивідуально порівняно зменшеними середніми кількостями CD163+ ПАМ: тип A, індивідуально порівняно збільшеною середньою кількістю CD163+ ПАМ: тип B HER2+, та достовірним зниженням CD68+ та CD163+ ПАМ: тип B HER2–), а також на відміну від нелюмінального HER+ РМЗ, який при метастазуванні збільшував чисельність CD68+ ПАМ, $p<0,0001$, ПН РМЗ при лімфатичному метастазуванні характеризується збільшенням CD68+ і CD163+ ПАМ ($p<0,0001$, $p<0,0005$), що підтверджує залежність ПАМ відповідних фенотипів (і, відповідно, функціональних типів М1 і М2) та молекулярно-біологічного типу РМЗ. Отже, вперше продемонстровано що різні кількісні зміни CD68+ і CD163+ ПАМ первинного вогнища РМЗ супроводжують пухлини при їх метастазах у регіональні лімфовузли, в залежності від молекулярно-біологічного типу РМЗ, для чого використано підхід досліджень у стратифіковано рандомізованих та малих вузькоспеціалізованих групах дослідження.

Підтверджено пропухлинний потенціал CD68+ і CD163+ ПАМ, відповідно до дослідження РМЗ, який прогресує.

Також підтверджено зв’язок молекулярно-біологічного типу РМЗ, його окремих патогістологічних особливостей із кількісними показниками CD68+ і CD163+ ПАМ. Підтверджено типову локалізацію ПАМ, яка взаємопов’язана з патогістологію зразків: типова локалізація CD68+ ПАМ – строма пухлини, деякі пухлинні кластери, але не всі, і осередки некрозу. Співлокалізація CD163+ ПАМ найбільш чітка – у стромі, у інших відділах – на нижчих рівнях.

Підтверджено гетерологічність первинного вогнища РМЗ і метастазів у лімфатичних вузлах та відміни у кількісних представництвах CD68+ і CD163+ ПАМ з відсутністю достовірних кореляцій між кількостями ПАМ первинного вогнища і метастазу для більшості типів РМЗ.

Припускається, що серед CD68+ ПАМ частина макрофагів реалізує функції М1, а CD163+ ПАМ є М2-подібними макрофагами, а також двоїсте функціональне значення і CD68+, і CD163+ ПАМ в імунопатогенезі РМЗ – анти- та пропухлинне, з перевагою останнього за умов прогресування РМЗ.

Диференційований підхід до аналізу інфільтрації CD68+ та CD163+ ПАМ РМЗ залежить від молекулярно-біологічного типу пухлини, а також має індивідуальні і внутрішньопухлинні коливання, не завжди корелює з лімфатичним метастазування. Необхідно враховувати отримані відомості для відповідної екстраполяції результатів інших наукових досліджень.

Ключові слова: М1 М2 макрофаги, пухлинно-асоційовані макрофаги, імуногістохімічне дослідження, CD68, CD163, ER, PR, HER2, молекулярно-біологічний тип раку молочної залози.

ABSTRACT

Aikian A. Z. The role of M1 and M2 macrophage phenotypes in the immunopathogenesis of breast adenocarcinoma in the presence or absence of metastases in regional lymph nodes. – Qualification research work on the manuscript basis.

Thesis for a Candidate Degree in Medical Sciences, Speciality 14.03.08 – immunology and allergology. – Poltava State Medical University, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2021.

The dissertation presents a new solution and theoretical generalization of the scientific problem, which consists in the established relationships between molecular and biological types of breast adenocarcinoma, or breast cancer (BC), their individual pathomorphological features and metastasis to regional lymph nodes, and the representation therein of CD68+ tumor-associated macrophages (TAM) and CD163+ TAM to assess their prognostic and immunopathogenetic role.

The study relied on the material represented by intraoperative tissues of tumors and ipsilateral lymph nodes after radical mastectomy, obtained from 30 patients diagnosed with breast cancer, whose average age was 60 years (from 28 to 79), and who were divided into two balanced groups, depending on the absence of metastases in regional lymph nodes – the first group N0, or with metastases – the second group N1. In each study group, 3 samples were presented: luminal A, luminal B, epidermal human growth factor receptor 2 negative (HER2–), luminal B HER2+, non-luminal HER2+, and triple-negative molecular biological types of breast cancer, which were verified based on immunohistochemical characteristics (HER2, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), Ki67 proliferation marker).

The method of immunohistochemistry (IHC) with the determination of CD68+ TAM and CD163+ TAM was used to analyze the characteristics of morphological phenotypic equivalents of M1- and M2-polarized macrophages (Mph) in samples of breast cancer and lymph node metastases.

We used the method of counting immunopositive cells – for the entire field of view in successive 5-17 fields of each sample (depending on the area of the sample) by analogy with the determination of the G-grade of tumors.

The identified patterns relate to the pure progression of the tumor process of breast cancer, according to the cross-sectional design of the study, and are not affected by the previous treatment, as it began with surgery.

Analysis of the comparison of quantitative indicators of CD68+ and CD163+ TAM in primary breast cancer between the first N0 group ($n=46$) and the second N1 group ($n=44$) showed an increase in CD68+ TAM in primary breast cancer foci under conditions of metastasis ($p=0.015$). The study also revealed the advantage of CD68+ TAM over CD163+ TAM in both groups ($p<0.0001$). An inverse correlation was found between CD68+, CD163+ TAM and the clinical value of ER / PR ($p=0.02$ and $p=0.009$, respectively), as well as a direct correlation between the amount of CD68+ TAM and Ki67 expression ($p=0.04$). For CD68+ TAM of the second group, a wide range of variation was found, and the range of quantitative results (from 0 to 43 cells per field of view) reflects a high probability of extreme values. This fact, together with the

correlations, can be explained by the interdependence of molecular biological types of breast cancer and quantitative indicators, in particular CD68+ TAM.

In luminal types of breast cancer, qualitative evaluation of CD68+ and CD163+ cells of the primary focus revealed typical immunoreactivity of CD68+ and CD163+ along the contour of the cytoplasm or throughout the cell, evenly and / or in the form of brown spots. The cell shapes were rounded, branched and elongated, which was similar to other types of breast cancer. Immunopositive cells were arranged in clusters and regularly. Representation and localization of immunopositive cells were associated with pathohistological features of breast cancer samples. The typical localization of CD68+ TAM is characterized as regular in the tumor stroma, in contrast to tumor clusters or nests, where certain departments without TAM are observed. CD163+ TAM were co-localized with CD68+ in desmoplastic, fatty parts of the stroma, and in the individual nests, including necrotic, in smaller quantities. Thus, the localization of TAM and their density are interrelated with the pathomorphology of breast cancer, which was very diverse, even within clinically assorted narrow types. Despite some common features, for example, for all samples of luminal breast cancer – desmoplastic stroma reaction, fibrous, fibro-fatty stroma, a certain level of lymphoid infiltration, necrosis, microcalcifications – the areas occupied by them are very different.

Regarding the relationships between pathomorphology, in the analysis of the entire sample of luminal types, correlation analysis revealed an inverse relationship between mean CD68+ cell counts (but not CD163+) and G-grade tumors (p=0.046).

Quantitative analysis of CD68+ and CD163+ TAM of the entire sample of luminal types, depending on N0 (n=46) and N1 (n=44) groups, did not establish differences between the quantitative indicators of CD68+ and CD163+ TAM and their ratio. In contrast, statistics within each individual type of luminal breast cancer showed the following results. In luminal A breast cancer, the ratio of CD68+ / CD163+ TAM in favor of the former (p=0.0395, p=0.008) was characterized by reliability, regardless of metastasis, and, similarly, in lymph node metastases (p=0.0344). Only in luminal B HER2– breast cancer, the quantitative indicators of CD68+ and CD163+ TAM decreased in metastatic samples as compared to samples of non-metastatic breast cancer

(p=0.0294, p=0.0079), and CD163+ TAM were present in lymphatic metastases at the highest level, as compared to the primary focus (p=0.0014). In luminal B HER2+ breast cancer, the reliability was confirmed only for the advantage of CD68+ over CD163+ TAM within metastases (p=0.0001). Significant correlations between quantitative indicators of TAM in the primary focus and metastases have not been established.

One of the important results that emphasizes the feasibility of a personalized approach is as follows: there are different trends and changes in the ratio of CD68+ and CD163+ TAM depending on metastasis in a complete sample of breast cancer (increased CD68+ TAM), in isolated luminal types (no single trend) and even within the luminal A, B types (significant decrease in CD68+ and CD163+ TAM in metastasis of luminal B HER2– breast cancer; individual decreases in average CD163+ TAM in metastasis of luminal A, and increase in metastasis of luminal B HER2+). This fact demonstrates the relationship between the molecular biological type of breast cancer and lymphatic metastasis, mediated by TAM, as well as the contribution to the progression of TAM of both phenotypes.

In non-luminal HER2+ breast cancer, qualitative analysis of TAM showed that in the group N0 CD68+ TAM infiltrated tumor tissue at a high level, located around and among the nests evenly and in concentrations, as well as in the foci of necrosis. Their regular presence in the areas of lymphoid infiltration is observed. Meanwhile, CD163+ TAM were less common than CD68+, but clearly repeated their localization: around and in the middle of tumor nests and among lymphoid cells, but in the fibrous stroma – at the same quantitative level as CD68+. In group N1, most clusters in tumor nests probably corresponded to double immunoreactivity.

The histopathological description of non-luminal HER2+ breast cancer showed morphological diversity of primary breast cancer within one type, as well as differences between the primary focus and lymph node metastases. Common features of all drugs were desmoplastic stroma reaction, foci of necrosis, the presence of microcalcifications and greater or lesser signs of inflammation in the form of lymphoplasmacytic infiltration, which are not unique and may be typical of other types.

In non-luminal HER2+ breast cancer, quantitative evaluation of CD68+ and CD163+ cells showed a significant increase in CD68+ TAM ($p<0.0001$), but not CD163+ cells, under conditions of metastasis, which reflects the increase in M1-type TAM and their promotion of metastasis. The decrease in the quantitative indicators of CD68+ TAM ($p<0.0001$) in the lymph node metastases, as compared to primary breast cancer, without a significant correlation between them, may suggest other functions of these cells in metastases.

In triple-negative breast cancer, the assessment of the primary focus showed a combined placement of CD68+ and CD163+ TAM in the fibrous stroma and necrotic areas of tumors. Accordingly, CD68+ cells were predominantly housed in tumor nests. In the first N0 group, it appears that these cells formed their own cells in the nests (given that in one of the CD163+ samples the cells were only individual), and acquired a coalesced and / or vacuolated form. A similar pattern was observed in the second N1 group of triple-negative BC. Therefore, part of the tumor complexes in the primary foci and metastases were infiltrated with clusters of only CD68+ cells that did not repeat CD163+ cells.

Pathohistologically, samples of the primary focus of breast cancer, according to the group, had their own unique features, such as stroma length, density of resident non-tumor and infiltrating cells, as well as some features of tumor cell morphology that were not quantified due to the limited number of study participants. Common descriptive characteristics included a desmoplastic reaction, a pronounced inflammatory reaction (in the form of dense lymphoplasmocytic infiltration), hemorrhages, and signs of necrosis to varying degrees. All specimens of metastases were characterized by the obligatory presence of areas of necrosis.

A significant increase in the number of CD68+ cells and CD163+ cells in the primary focus in the second N1 group with metastases ($p<0.0001$ and $p<0.0005$), a decrease in CD68+ cells in lymph node metastases as compared to the primary focus ($p=0.047$) and the inverse correlation between CD163+ TAM of primary foci and metastases ($p=0.0024$) were found in triple-negative BC. These results confirm the role of TAM of both phenotypes, and in particular their subdivision – M2-like macrophages

(at least due to the double-positive (CD68+ CD163+) part of TAM), as favorable for metastasis. It also suggests a link between CD68+, CD163+ TAM and lymphatic metastasis in triple-negative breast cancer.

The analysis of relationships between the infiltration levels of primary breast cancer by CD68+ and CD163+ TAM with the postoperative prognosis, conducted on a complete sample, demonstrated a survival rate of 89% at high infiltration levels of CD68+ TAM, and 83% at low, the difference was not significant; cumulative mortality in the subgroups did not reach a reliable difference. In addition, survival was 81% with moderate infiltration of CD163+ TAM and 91% with low infiltration. When compared, this fact does not reach statistical reliability and requires further observations for the conclusion, but in principle coincides with the concept that the relatively higher infiltration of the primary focus by M2-like Mph has a negative prognosis.

The main conclusion is that in contrast to luminal types of breast cancer (which in metastasis were characterized by individually relatively reduced average amounts of CD163+ TAM: type A, individually relatively increased average amount of CD163+ TAM: type B HER2+, and a significant decrease in CD68+ and CD163+ TAM: type B and HER–), and also in contrast to non-luminal HER+ breast cancer, which increased the number of CD68+ TAM during metastasizing, $p<0.0001$, triple-negative BC during lymphatic metastasizing is characterized by an increase in CD68+ and CD163+ TAM ($p<0.0001$, $p<0.0005$), which confirms the dependence of TAM corresponding phenotypes (and, accordingly, the functional types M1 and M2) and the molecular biological type of breast cancer. Thus, it was demonstrated for the first time that different quantitative changes of CD68+ and CD163+ TAM of the primary breast cancer accompany tumors in their metastases to regional lymph nodes, depending on the molecular and biological type of breast cancer, using the approach of studies in stratified randomized and highly specialized research groups.

The tumoral potential of CD68+ and CD163+ TAM was confirmed, according to a study of progressive breast cancer.

The association of the molecular and biological type of breast cancer, its separate pathohistological features with the quantitative indicators of CD68+ and CD163+ TAM

was confirmed. The typical localization of TAM, which is interrelated with the pathohistology of the specimens, was confirmed: the typical localization of CD68+ TAM is tumor stroma, some tumor clusters, but not all of them, and the foci of necrosis. Co-localization of CD163+ TAM is most clear – in the stroma, in other areas – at lower levels.

The heterogeneity of the primary focus of breast cancer and lymph node metastases and differences in the quantitative representations of CD68+ and CD163+ TAM was confirmed with no significant correlations between the amounts of TAM of the primary focus and metastasis for most types of breast cancer.

It is assumed that among CD68+ TAM, some macrophages perform M1 functions, and CD163+ TAM are M2-like macrophages, as well as the dual functional significance of both CD68+ and CD163+ TAM in the immunopathogenesis of breast cancer – anti- and tumoral, with the latter predominating as breast cancer progresses.

Differentiated approach to the analysis of infiltration of BC by CD68+ and CD163+ TAM depends on the molecular and biological type of tumor, and also has individual and intratumoral fluctuations, not always correlated with lymphatic metastasizing. It is necessary to take into account the obtained information for the appropriate extrapolation of the results to other scientific studies.

Key words: M1 M2 macrophages, tumor-associated macrophages, immunohistochemical study, CD68, CD163, ER, PR, HER2, molecular and biological type of breast cancer.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Айкян АЗ**, Шинкевич ВІ, Кайдашев ІП. Характеристика інфільтрації $CD68^+$ та $CD163^+$ макрофагами первинного вогнища та метастатичних уражень реґіонарних лімфовузлів при люмінальних інвазивних карциномах грудної залози в залежності від їх імунофенотипу. Світ медицини та біології. 2018;4(66):15–22. DOI: 10.26724/2079-8334-2018-4-66-15-22. (*Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).*

2. **Айкян АЗ**, Кайдашев ІП. Кількісна характеристика CD68+ та CD163+ макрофагів в первинному вогнищі та в метастатичних ураженнях реґіонарних лімфовузлів при потрійно-негативній інвазивній карциномі грудної залози. Вісн. проблем біології і медицини. 2018;2(147):313–9. DOI: 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-313-319. *(Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).*

3. **Aikian AZ**, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Analysis of association between the density of infiltration in primary carcinoma of the mammary gland by tumor-associated macrophages and postoperative prognosis. The Medical and ecological problems. 2019;23(1-2):3–7. DOI: 10.31718/mep.2019.23.1-2.01. *(Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, узагальнення отриманих результатів, підготовка тексту статті).*

4. **Aikian AZ**, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Immunological features of macrophages associated with metastasis of primary breast carcinoma into regional lymph nodes. Bulletin of problems in biology and medicine. 2020;3(157):269–74. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-269-274. (*Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).*

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus.

Aikian AZ, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Quantitative assessment of CD68+ AND CD163+ macrophages in the primary focus and metastatic lesions of regional lymph nodes in non-luminal her2-positive invasive breast carcinoma. Wiadomosci Lekarskie (Poland). 2019;72(10):1861–5. (*Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті*).

ЗМІСТ

ЗМІСТ......17
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ......18
ВСТУП......22
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ВНЕСОК ПУХЛИНО-АСОЦІЙОВАНИХ МАКРОФАГІВ В ОНКОГЕНЕЗ РМЗ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)......30
1.1. Аденокарцинома молочної залози: епідеміологія і класифікації......30
1.2. Питання патогенезу раку молочної залози......34
1.3. Макрофаги і їх роль в патогенезі раку молочної залози......43
1.4. Маркери М1/М2 макрофагів асоційованих з пухлиною......54
1.5. Обґрунтування обраного напрямку досліджень......56
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЯ......62
2.1 Етичні аспекти дослідження......62
2.2 Дизайн дослідження......62
2.3 Відбір біоптатів......65
2.4 Визначення гістопатологічних ознак, молекулярно-біологічного типу та G-ступеня РМЗ......66
2.5 Імуногістохімічне визначення та оцінка CD68+ та CD163+ клітин......69
2.6 Статистичний аналіз......71
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ......73
3.1. Демографічні та клініко-лабораторні характеристики учасниць дослідження......73
3.2. Порівняння кількісних показників CD68+ та CD163+ клітин у первинних РМЗ між першою N0 групою і другою N1 групою......75
3.3. Якісна та кількісна оцінка $CD68^+$ та $CD163^+$ клітин первинного вогнища люмінальних типів РМЗ з метастазами та без метастазів......78
3.4. Якісна та кількісна оцінка CD68+ та CD163+ клітин первинного вогнища й метастатичних уражень лімфовузлів при нелюмінальному HER2+ РМЗ......94
3.5. Якісна та кількісна оцінка CD68+ та CD163+ клітин первинного вогнища й метастатичних уражень лімфовузлів при потрійному негативному РМЗ......104
3.6. Аналіз зв'язку рівнів інфільтрації первинної РМЗ CD68+ та CD163+ клітинами з післяопераційним прогнозом......113
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ......119
ВИСНОВКИ......138
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ......139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ......140
ДОДАТКИ......171

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДК – дендритна клітина;

ЕМП – епітеліально-мезенхімальний перехід;

ІГХ – імуногістохімія, імуногістохімічне дослідження;

Мф – макрофаг;

ПАМ – асоційовані з пухлиною макрофаги;

РМЗ – рак молочної залози;

ПН РМЗ – потрійний негативний рак молочної залози;

ІПКа – інвазивна протокова карцинома;

ІЛКа – інвазивна лобулярна карцинома;

A2aR – (англ. adenosine receptor A2a) – аденозиновий рецептор A2a;

AKT – (англ. akt protein kinase B) – akt-протеїн кіназа Б;

AMP – (англ. adenosine monophosphate) – аденозин монофосфат;

APC – (англ. antigen-presenting cell) – антиген-презентуюча клітина;

ATP – (англ. adenosine triphosphate) – аденозин трифосфат;

Bcl-2 – внутрішньо клітинний білковий фактор, регулятор апоптозу;

Be1 – B клітина ефектор 1;

Breg cell – регуляторна B клітина;

BTLA – (англ. B and T lymphocyte attenuator) – *B*- і T- лімфоцитарний атенюатор;

Bv8 – прокінетицин;

CAF – (англ. cancer associated fibroblast) – фібробласти асоційовані з раком;

CCL – (англ. chemokine (C-C motif) ligand) – ліганд хемокіну (C-C мотив);

CD40L – CD40 ліганд, CD154;

CSF1R – (англ. colony stimulating factor 1 receptor) – рецептор колонієстимулюючого фактору 1;

CTL – (англ. cytotoxic T lymphocyte) – цитотоксичний T лімфоцит;

CTLA-4 – (англ. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) – цитотоксичний T лімфоцит-асоційований протеїн 4 або CD152;

DAMP – (англ. danger-associated molecular patterns) – молекулярні патерни, пов'язані з небезпекою;
EGFR – (англ. epithelial growth factor receptor) – рецептор епітеліального фактору росту;
ER – естрогеновий рецептор;
Fas – (англ. first apoptosis signal receptor) – рецептор першого сигналу апоптозу, або CD95;
FasL – Fas ліганд або CD95L;
FcR – рецептор фрагмента, що кристалізується;
FGF – (англ. fibroblast growth factor) – фактор росту фібробластів;
GATA3 – GATA зв’язуючий протеїн 3;
GM-CSF – (англ. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) – гранулоцитарно-макрофагальний колнієстимулюючий фактор;
HER2 – (англ. human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор 2 епідермального фактора росту людини, або Her-2-neu;
HIF1α – (англ. hypoxia-inducible factor 1-alpha) – фактор 1-альфа, індукований гіпоксією;
HLA – (англ. human leukocyte antigen) – лейкоцитарний антиген людини;
HPF – (англ. high-power field) – при мікроскопії поле зору максимального збільшення об'єкта.
HVEM – (англ. herpesvirus entry mediator) – герпесвірусний вхідний медіатор;
IDO – (англ. indoleamine 2,3-dioxygenase) – індолеамін 2,3-діоксигеназа;
IFN-γ – (англ. interferon gamma) – інтерферон гама;
IL – (англ. Interleukin) – інтерлейкін;
ILC – (англ. innate lymphoid cell) – вроджена лімфоїдна клітина;
iNOS – (англ. inducible nitric oxide synthase) – індуцибельна оксид азот синтаза;
IP-10 – (англ. IFNγ-inducible protein 10) – IFNγ-індуцибельний протеїн 10;
IPP – (англ. isopentenyl pyrophosphate) – ізопентенилпірофосфат;
IRF5 – (англ. interferon regulatory factor 5) – регуляторний фактор 5 інтерферону;
Ki67 – нуклеарний протеїн, продукт гену MKI67, маркер клітинної проліферації;

KIR – (англ. killer-cell immunoglobulin-like receptors) – імуноглобуліноподібні рецептори клітин-кілерів;

KYN – кінуренін;

LAMP – (англ. lysosome associated membrane proteins) – мембранні білки, пов'язані з лізосомою;

LPS – ліпополісахариди;

M-CSF - (англ. macrophage colony-stimulating factor) – макрофагальний колонієстимулюючий фактор;

MDSC – (англ. myeloid-derived suppressor cells) – супресорні клітини мієлоїдного походження;

MHC – (англ. major histocompatibility complex) – головний комплекс гістосумісності;

MICA/B – (англ. major histocompatibility) – головна гістосумісність;

MMP – матриксна металопротеіназа;

mTOR – (англ. mammalian target of rapamycin) – мішень ссавців для рапаміцину;

NF-κB – нуклеарний фактор капа бі;

NK cell – (англ. natural killer cell) – природні кілерні клітини;

NKG2A – (англ. natural killer group 2 A) – група 2 A природних кілерів, або CD159a;

NKG2D – (англ. natural killer group 2 D) – група 2 D природних кілерів, або CD314;

NKT cell – (англ. natural killer T cell) – природні кілерні T клітини;

NO – оксид азоту;

p53 – транскрипційний фактор, який регулює клітинний цикл;

PD-1 – (англ. programmed cell death protein 1) – білок 1 програмованої загибелі клітини, або CD279;

PDGF-BB – (англ. platelet-derived growth factor isoform BB) – ізоформа BB тромбоцитарного фактору росту;

PD-L1 – (англ. programmed death-ligand 1) – ліганд 1 програмованої загибелі, або CD274;

PGE2 – простагландин E2;

PI3K – (англ. phosphatidylinositide 3-kinase) – фосфатиділінозитид 3-кіназа;

PPAR – (англ. proliferator-activated receptor) – проліфератор-активований рецептор;

PR – прогестероновий рецептор;

ROS – (англ. reactive oxygen species) – реактивні іони оксисену;

SIRPα – (англ. signal regulator protein alpha) – сигнальний регуляторний протеїн альфа;

STAT3 – (англ. signal transducer and activator of transcription 3) – сигнальний трансдуктор і активатор транскрипції 3;

SRCR – (англ. scavenger receptor cysteine-rich) – цистеїн-збагачений скавенджер-рецептор

TAA – (англ. tumor-associated antigen) – пухлино-асоційований антиген;

T-Bet – (англ. T-cell-specific T-box transcription factor) – Т-клітинно-специфічний Т-бокс транскрипційний фактор;

TCR – Т клітинний рецептор;

TGF-β – (англ. transforming growth factor beta) – трансформуючий фактор росту-β;

Th – (англ. T helper cell) – Т лімфоцити хелпери;

TLR – (англ. Toll-like receptor) – Toll-подібні рецептори;

TNF-α – (англ. tumor necrosis factor) – фактор некрозу пухлини альфа;

TRAIL – (англ. tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) – TNF-залежний апоптоз індукуючий ліганд;

Treg cell – гама-, дельта- регуляторна Т клітина;

Treg cell – регуляторна Т клітина;

TRP – триптофан;

TSLP – тимічний стромальний лімфопоетин;

TWEAK – (англ. TNF-like weak inducer of apoptosis) – TNF-подібний слабкий індуктор апоптозу;

ULBP1 – UL16-зв’язуючий протеїн 1;

VEGF – фактор росту ендотелію судин.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Аденокарцинома або рак молочної залози відноситься до тяжких і небезпечних для життя онкологічних патологій, і займає перше місце в структурі онкологічної захворюваності жінок у світі і різних країнах [1-4]. Статистичні дані останніх років свідчать про зростання захворюваності та смертності від цього захворювання в різних країнах і в Україні [2,3,5,6]. Рецидивний перебіг РМЗ, висока смертність, низька якість життя хворих, які перенесли лікування, зумовлюють необхідність постійно вдосконалювати діагностику та лікування [6].

Молекулярно-біологічні типи РМЗ [7] мають різні епідеміологічні фактори ризику [8,9], різні природні історії і дають різну відповідь на системну і місцеву терапію [10-12].

Серед досліджень внеску мікрооточення в онкогенез, у сучасному розумінні, подвійна роль імунних клітин висвітлюється як баланс між анти- і пропухлинною активністю, який зумовлює подальшу долю пухлини [13,14].

Макрофаг є ключовою клітиною, яка відповідає на метаболічні сигнали мікрооточення, на якій замикаються/переключаються метаболічні сигнали і імунна відповідь, що робить її роль вкрай важливою для кожного етапу онкогенезу [15,16]. Окрім Мф моноцитарного походження, резидентні Мф є гетерогенними і одночасно універсальними клітинами, що знаходяться практично у всіх тканинах [17]. Вважається, що тканинні Мф і щойно рекрутовані знаходяться у ієрархії активаційних станів у тканинах в результаті динамічного процесу потрапляння, місцевої проліферації, старіння, смерті і еміграції [18]. Хоча програми активації субсетів Мф мають відмінності, але вони утворюють чіткі різновиди, або субсети, і їх фенотипи і функції частково співпадають [19]. Відображенням крайніх функціональних типів Мф є класифікація на класично активовані М1 – прозапальні, і альтернативно активовані М2 – антизапальні макрофаги [20].

ПАМ М2-типу домінують у пухлинах і продукують молекули, стимулюючи ріст пухлини, а зміна М2-типу на М1 може уповільнювати або припиняти цей ріст [21]. При РМЗ виявлено змішаний цитокіновий профіль М1/М2 [22], що говорить про наявність у ній і функції М1, і М2 ПАМ. Імовірно, що існує спектр ПАМ, фенотип і функція яких залежить від типу пухлини та розташування всередині пухлини [оглянуто у 23].

Зв'язок ПАМ із злоякісним фенотипом та прогнозом РМЗ описано у ряді досліджень [24-27], також продемонстровано зв'язки ПАМ з проліферацією, диференціюванням, експресією ER і патогістологією [28]. Але функціональний фенотип ПАМ обговорюється мало.

Перспективними стратегіями терапії раку, орієнтованими на ПАМ, є: пригнічення залучення макрофагів, пригнічення виживання ПАМ, перетворення туморогенного М2 в протипухлинний М1 функціональний тип [29-32]. Але широкі кількісні варіації ПАМ підкреслюють необхідність кращого розуміння гетерогенності між пацієнтами [33].

Отже, на сьогоднішній день відсутній систематичний підхід дослідження який би міг співвіднести молекулярно-біологічні підтипи РМЗ з проліферативними морфологічними особливостями пухлини, і представництвом різних ПАМ. Тому важливим завданням є дослідження співвідношення субпопуляцій Мф у мікросередовищі пухлин та їх метастазів при різних видах РМЗ для встановлення зв'язків з метастазуванням з метою прогнозу і вибору лікування, у відповідності до експресії ER, PR та Ki67.

Мета дослідження. Підвищення ефективності прогнозування перебігу та наслідків аденокарциноми молочної залози залежно від визначення М1 і М2 фенотипів пухлино-асоційованих макрофагів у мікросередовищі пухлин та їх метастазів.

Об'єкт дослідження: внесок пухлино-асоційованих макрофагів в імунопатогенез РМЗ.

Предмет дослідження: М1 і М2 фенотипи пухлино-асоційованих макрофагів та молекулярно-біологічні типи РМЗ.

Завдання:

Верифікувати діагноз, встановити молекулярно-біологічні підтипи аденокарциноми молочної залози.

Сформувати дві врівноважені групи пацієнтів з аденокарциномами молочної залози за верифікованим молекулярно-біологічним типом пухлини, TNM стадією пухлини та її G-ступенем, залежно від метастазування у реґіонарні лімфатичні вузли.

Вивчити кількісні показники та морфологічні особливості CD68+ і CD163+ клітин у мікрооточенні пухлини в залежності від наявності або відсутності метастазів у реґіонарні лімфатичні вузли.

Вивчити кількісні показники та морфологічні особливості CD68+ і CD163+ ПАМ у мікрооточенні пухлини відповідно до молекулярно-біологічних типів аденокарциноми молочної залози.

Встановити взаємозв'язки кількісних показників CD68+ і CD163+ ПАМ мікрооточення пухлини з післяопераційним прогнозом

Методи дослідження. Окрім клінічних методів обстеження пацієнток з РМЗ, стадію та ступінь захворювання встановлювали після патогістологічного дослідження інтраопераційного матеріалу. Молекулярно-біологічний тип пухлини ідентифікували методами імуногістохімічного забарвлення, шляхом визначення ER, PR, епітеліального фактору росту HER2, мітотичного індексу Кі-67 та ступеню диференціації. Для клінічної практики підтверджено сурогатні підходи класифікації РМЗ за допомогою техніки ІГХ з визначенням визначення ER, PR, індекс Ki67 і HER2 як адекватні для визначення клінічно корисних груп, таких як потрійний негативний, HER2-гормон-рецептор-негативний і HER2+ гормон-рецептор-позитивний РМЗ [7].

M1 і M2 макрофаги визначали методом імуногістохімічного забарвлення за маркерами CD68 та CD163. Відомо, що молекула CD68 зв'язує окислені ліпопротеїди низької щільності, фосфатидилсерин, апоптотичні клітини. Функція рецептору потенційно може бути залучена до обробки/презентації антигену [34,35]. CD163 експресія пригнічується запальними сигналами, у той час як

протизапальні сигнали (інтерлейкін (IL) -10, глюкокортикоїди) індукують експресію CD163, а прозапальні (ліпополісахарид (LPS), фактор некрозу пухлин альфа (TNF-α), інтерферон гама (IFN-γ) пригнічують синтез CD163 [36]. Дослідження регуляції CD163 на декількох моделях пухлини показують, що високий рівень CD163 є особливістю макрофагів, які зазнають диференціації альтернативно активованого фенотипу M2 [37,38]. Таким чином, поєднане використання маркерів CD68 і CD163 обґрунтоване для ІГХ-дослідження ПАМ-інфільтрації при РМЗ, може слугувати морфологічним фенотиповим еквівалентом M1/M2-поляризованих Мф, та потребує подальшого дослідження. Вивчення відповідності CD68+ і CD163+ ПАМ до метастазування серед різних молекулярно-біологічних типів РМЗ допоможе вирішити прогноз та напрямки лікування.

Використано індивідуальний аналіз кількісних показників ПАМ, непараметричні статистичні методи, серію комп'ютерних симуляцій для моделювання, що обґрунтовано дослідженням у малих вузькоспеціалізованих групах, що, в свою чергу, відповідає сучасному прогресивному принципу персоналізованої медицини, і дозволяє досягти поставленої мети дисертації, а також статистичний метод Каплан-Майєра для прогностичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. На підставі комплексних імуногістохімічних та патогістологічних досліджень розширено та доповнено знання щодо участі CD68+ та CD163+ макрофагів в імунопатогенезі РМЗ та метастазуванні у регіональні лімфовузли.

Отримано нові дані про вірогідне кількісне переважання CD68+ макрофагів незалежно від молекулярно-біологічного типу РМЗ та метастазування.

Вперше встановлено, що при люмінальному А типі кількість інфільтруючих CD68+ ПАМ достовірно перевищує кількість CD163+ ПАМ в первинних вогнищах та метастазах РМЗ, що асоційовано з менш агресивним перебіг захворювання.

Вперше показано, що при люмінальному В HER2- типі спостерігалось зниження кількості CD68+ ПАМ при метастазуванні та підвищення кількості CD163+ ПАМ в метастазах лімфатичних вузлів.

Вперше встановлено, що при люмінальному В HER2+ типі РМЗ відзначено вірогідне підвищення CD68+ ПАМ лише в метастазах лімфовузлів.

За результатами імуногістохімічного дослідження вперше встановлено, що при нелюмінальному HER2+ типі кількість CD68+ ПАМ в первинному вогнищі метастазуючого РМЗ порівняно з неметастазуючим раком підвищена у 2-8 разів. В первинному вогнищі метастазуючого раку кількість CD68+ ПАМ переважає кількість цих клітин в метастазах лімфовузлів в 1,6-5 разів. Такі зміни є характерними для CD68+ клітин, але не для CD163+ ПАМ.

Отримані нові дані, що потрійно негативний РМЗ характеризуються збільшенням CD163+ ПАМ в метастазах лімфовузлів в 1,5-3 рази порівняно з первинними вогнищами.

Доведено наявність кореляційної залежності між рівнем CD68+ і CD163+ ПАМ та молекулярно-біологічними типами РМЗ, G-ступенем, Кі-67, ER, PR.

Вперше показано, що поєднане використання маркерів CD68+ і CD163+ – є досить надійним методом імуногістохімічного дослідження щодо ПАМ-інфільтрації при РМЗ, який слугує певним морфологічним відображенням M1/M2-поляризованих макрофагів і може бути використаний для прогнозування та тактики лікування.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є особистою науковою працею здобувача. Автор особисто виконав патентно-інформаційний пошук та всю клінічну частину роботу, а також провів аналіз клінічних, патогістологічних, імуногістохімічних результатів досліджень, статистичний аналіз даних, сформулював основні положення роботи та висновки, оформив та відредагував дисертаційну роботу. У виконанні фінішного змісту роботи участь автора є провідною. Мета і завдання дисертаційної роботи сформульовані разом з науковим керівником. У наукових працях, що опубліковані в співавторстві, внесок здобувача є вирішальним.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідалися та обговорювалися на Міжнародній науково-практичній конференції присвяченій 70-річчю від дня заснування Полтавського обласного клінічного онкологічного диспансеру Полтавської обласної ради (10-11 травня 2018 року, м. Полтава); at the International conference dedicated to the 20th anniversary of Ukrainian Society of Radiation Oncologists «Actual Questions of Radiation Oncology in Ukraine» (June 26-27, 2019, Poltava); XVII Міжнародній науковій конференціїі студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини», присвячена 215–річчю від дня заснування медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (1-2 жовтня 2020 року); XVIII Міжнародній науковій конференціїі студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини», присвячена 25-річчю заснування кафедри загальної та клінічної патології медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (22-23 квітня 2021 року).

Структура та обсяг дисертації. Матеріали дисертації викладено українською мовою на 177 сторінках комп'ютерного тексту, з них 137 сторінок – основного тексту. Робота містить анотації, вступ, зміст, перелік скорочень, аналітичний огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, розділ з 6 підрозділів результатів власних досліджень, розділ аналізу та узагальнення, висновки, список використаних джерел літератури (всього 263 джерел, із яких 15 викладено кирилицею, 248 – латиницею), додатки. Дисертаційна робота ілюстрована 34 рисунками і 15 таблицями.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Дисертація є фрагментом науково-дослідної роботи Української медичної стоматологічної академії «Комплексне дослідження патогенетичної ролі субпопуляцій М1 та М2 макрофагів в розвитку хронічного обструктивного захворювання легень для розробки та обґрунтування персоналізованої терапії з врахуванням маси тіла» (№ державної реєстрації 0117U005252).

Практичне значення отриманих результатів. У якості додаткової характеристики РМЗ рекомендовано визначення особливостей кількісних показників інфільтрації CD68+ та CD163+ ПАМ первинного вогнища РМЗ в залежності від молекулярно-біологічного типу та лімфатичного метастазування.

Визначення кількісних показників CD68+ над CD163+ПАМ в первинних вогнищах і в метастазах лімфовузлів при різному перебігу захворювання в залежності від молекулярно-біологічного підтипу РМЗ, вказує на відмінність сигналів стимуляції росту пухлини при кожному підтипі та вимагає індивідуального підходу до блокування цих сигналів (ER, PR, HER2).

Рекомендовано систему моніторингу рівня інфільтрації первинних вогнищ CD163+ПАМ, яка може корелювати із зниженням виживаності пацієнтів і використовуватися в подальшому для прогнозування.

Результати дисертаційного дослідження запроваджені в практику клінічних баз кафедри внутрішньої медицини № 3 з фтизіатрією (акт впровадження від 19.12.2019 р.), кафедри онкології та радіології з радіаційною медициною (акт впровадження від 9.09.2018 р.) Української медичної стоматологічної академії, а також у практику хірургічного відділення «Кременчуцького обласного онкологічного диспансеру Полтавської обласної ради» (акт впровадження: жовтень 2020 – листопад 2020 р.), хірургічного відділення «Полтавського обласного онкологічного диспансеру Полтавської обласної ради» (акт впровадження: жовтень 2020 – листопад 2020 р.), хірургічного відділення КНП «Мелітопольський онкологічний диспансер Запорізької обласної ради» (акт впровадження: вересень 2018 р. – листопад 2020 р.)

Практичні рекомендації.

1. У якості додаткової характеристики РМЗ рекомендовано визначення особливостей кількісних показників інфільтрації CD68+ та CD163+ ПАМ первинного вогнища РМЗ в великих групах пацієнтів для подальшого впровадження в клінічну імунологію та онкоімунологію.

2. Визначення кількісних показників CD68+ над CD163+ПАМ в первинних вогнищах і в метастазах лімфовузлів та різному перебігу захворювання

в залежності від молекулярно-біологічного підтипу РМЗ, можливо використовувати у якості додаткових характеристик первинних вогнищ та метастазів РМЗ.

3. Рекомендовано систему моніторингу рівня інфільтрації первинних вогнищ CD163+ПАМ, яка може корелювати із зниженням виживаності пацієнтів і використовуватися в подальшому для прогнозу.

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 5 наукових праць, у тому числі 4 статті – у провідних фахових вітчизняних та 1 стаття – у закордонному виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus.

РОЗДІЛ 1
СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ВНЕСОК ПУХЛИНО-АСОЦІЙОВАНИХ МАКРОФАГІВ В ОНКОГЕНЕЗ РМЗ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Аденокарцинома молочної залози: епідеміологія і класифікації.

Аденокарцинома молочної залози, або РМЗ, відноситься до тяжких і небезпечних для життя онкологічних патологій, і займає перше місце в структурі онкологічної захворюваності жінок у світі і різних країнах [1-3]. У 2012 році у світі визначено 1,7 млн. випадків захворювання на РМЗ і 521,900 випадків смерті від нього [1]. За останні 10 років в 2,5 рази збільшилася смертність від цієї патології. Захворюваність на РМЗ в Україні станом на 2018 рік становить 65,9 випадків на 100 тис. населення, а грубий показник смертності – 29.6 на 100 тис.населення [5]. РМЗ становить 25% усіх випадків раку і 15% всіх випадків смерті від раку серед жінок. На долю більш розвинених країн припадає приблизно половина всіх випадків РМЗ і 38% смертності. Рівні захворюваності на РМЗ високі в Північній Америці, Австралії/Новій Зеландії та Північній і Західній Європі; помірні в Центральній і Східній Європі, Латинській Америці та Карибському басейні; і низькі у більшості країн Африки та Азії. Міжнародні відмінності рівнів захворюваності на РМЗ відображають відмінності у доступності раннього виявлення, а також факторів ризику.

До факторів ризику РМЗ належать репродуктивні та гормональні фактори, такі як тривалий менструальний цикл, використання оральних контрацептивів та відсутність родів. Роди та грудне вигодовування зменшують ризик РМЗ [39]. Потенційно модифікуючі фактори ризику включають збільшення ваги після 18 років, із надмірною вагою або ожирінням (для РМЗ в постменопаузі), застосування у менопаузі гормонотерапії (комбінований естроген і прогестин), відсутність фізичної активності та вживання алкоголю [40,41]. У період з 1980 по кінець 1990-х років рівень захворюваності на РМЗ зріс приблизно на 30% у західних країнах, ймовірно, через зміни репродуктивних факторів та

використання менопаузальної гормональної терапії, а останнім часом через посилений скринінг [42]. Зменшення рівня захворюваності на початку 2000-х років пояснюється зменшенням використання гормональної терапії в менопаузі в країнах, де раніше це було поширеним [43]. Зниження або стабільний рівень захворюваності в західних країнах також може бути наслідком мамографічного скринінгу [44]. На відміну від цього, рівень смертності від РМЗ стабільний або зменшується приблизно з 1990 р. у Північній Америці та розвинених європейських країнах. Ці скорочення пояснюються раннім виявленням та вдосконаленим лікуванням [42,45].

Рівень захворюваності на РМЗ зростає у багатьох країнах Південної Америки, Африки та Азії, що є не повністю зрозумілим, але, ймовірно, відображає зміну репродуктивних зразків, збільшення ожиріння, зменшення фізичної активності [46]. Смертність в цих країнах також зростає [47], швидше за все, через зміни способу життя, на зразок західних країн, що ускладнюється затримкою введення ефективних програм скринінгу, а в деяких випадках обмеженим доступом до лікування [47,48].

Загалом рецидивний перебіг РМЗ, висока смертність, низька якість життя хворих, які перенесли лікування, зумовлюють необхідність постійно вдосконалювати діагностику та лікування [6].

РМЗ – неоднорідне захворювання з різними біологічними характеристиками та клінічним прогнозом. Підтипи РМЗ можуть бути визначені шляхом тестування на генетичний масив [49-51], або за допомогою наближеної (сурогатної) класифікації на основі імуногістохімічної характеристики пухлини [52-55].

Типи РМЗ мають різні епідеміологічні фактори ризику [8,9], різні природні історії [10-12], і дають різну відповідь на системну і місцеву терапію.

У березні 2015 року 14-а Міжнародна конференція по РМЗ St Gallen-2015 підтвердила способи визначення підтипів пухлин шляхом молекулярного тестування (визначення профілів генної експресії) (наприклад, методом Mamma Print/Blue Print). Для клінічної практики, в країнах, де недоступні мультипараметричні молекулярні тести, – підтвердила сурогатні підходи

класифікації за допомогою ІГХ на визначення ER, PR, індекс Ki67 і HER2 (хоча з меншою прогностичною точністю). Стандартні патоморфологічні характеристики підтверджені як адекватні для визначення клінічно корисних груп, таких як тричі негативний, HER2 гормон-рецептор-негативний і HER2+ гормон-рецептор-позитивний РМЗ [7]. ER+ пухлини гетерогенні щодо прогнозів: люмінальний А підтип має кращий прогноз, порівняно з люмінальним В; люмінальний В має високий проліферативний рівень та/або значну гістологічну ступінь, а системне лікування передбачає хемотерапію, яка слідує за гормональною [56].

До основних факторів, які в даний час визначають за допомогою проведення імуногістохімічного дослідження при РМЗ, відносять: Her-2-neu (або HER2), Ki67, p53, Bcl-2, VEGF, рецептори до гормонів (PR, до прогестерону і ER, до естрогену). У нормі через рецептор HER2 здійснюється вплив на клітини грудної залози і регулюється їх ріст і розмноження. HER2 – це білок, який спостерігається приблизно в 20% випадків раку молочної залози. Посилена експресія HER2 у РМЗ чітко корелює з агресивними пухлинами і гіршим прогнозом. Виявлення фактора Ki67 дає відомості про проліферацію пухлинних клітин, тобто про швидкість їх ділення. Наявність ER і PR у клітинах пухлини може свідчити про необхідність додаткового системного лікування антиестрогенами.

Отже, експресійна класифікація включає 4 типи РМЗ [49,57]: люмінальний А: ER+, PR+, HER2–, Ki67 14% і нижче; люмінальний В: ER+, PR+, HER2–, Ki67 15% і вище (може бути і HER2+ але із зниженими показниками PR або ER і PR, або сполучатися з високим індексом Ki67 (>14%); HER2-позитивний: HER2+, ER–, PR–; і базальний тип, (він же базальноподібний) або «потрійний негативний» РМЗ (негативна реакція на три антигени).

Частота виявлення імуногістохімічних фенотипів РМЗ, за даними [58]: люмінальний А – 56-61%, люмінальний В – 9-16%, HER2+ – 8-16%, потрійний негативний – 8-20%.

Прогностична індивідуальна інформація ґрунтується на аналізі біологічних маркерів у первинній пухлині включаючи ER, PR, HER2 та Ki67, разом із віком,

розміром пухлини, гістологічним ступенем, залученням лімфовузлів та ін. [59]. Однак, клінічні результати варіюють, не дивлячись на ідентичний профіль біомаркерів та стадії: 20% пацієнтів із N0 РМЗ мають рецидив і більше 30% пацієнтів з метастазами лімфатичних вузлів не дають рецидиву [60,61].

У роботі [56] показано, що класифікація відповідно до молекулярних підтипів St Gallen у первинних пухлинах і їхніх метастазах у лімфовузли, може відображати перехід до більш агресивного підтипу в метастазах, порівняно з первинною пухлиною. Вибір системної ад'ювантної терапії можливо покращити, якщо враховувати молекулярні підтипи в метастатичному вузлі (робота стосувалася люмінального А підтипу РГЗ.)

Гістологічно РМЗ є епітеліальною пухлиною протокового або дольового походження і класифікується наступним чином: протокова карцинома in situ (DCIS), лобулярна карцинома in situ, інвазивна протокова карцинома (протоковий рак), інвазивана лобулярна (долькова) карцинома, медулярна карцинома, муцинозна (колоїдна) карцинома, тубулярна карцинома, папілярна карцинома, метапластична карцинома грудної залози, філоїдні пухлини, хвороба сосків Педжета, запальний грудний рак [62].

Використовують і інші підходи та варіації у гістопатологічних, або патоморфологічних, класифікаціях РМЗ [63,64].

Традиційна гістопатологічна класифікація (Ноттінгемська комбінована гістологічна градація) є еталоном діагностики РМЗ та навряд чи буде замінена ближчим часом [65]. Ступінь G РМЗ проводилася за інвазивним компонентом. Це оцінка ступеня диференціації пухлини. В даний час застосовувана гістологічна система оцінювання відома як модифікація Елстона-Елліса системи класифікації Шарфа-Блума-Річардсона або Ноттінгемська комбінована гістологічна ступінь. Гістологічний ступінь є потужним прогностичним показником. Існує значна кореляція між гістологічним ступенем та частотою рецидивів, виживаністю без захворювання та загальною тривалістю виживання незалежно від клінічної стадії РМЗ.

Перспективним напрямком боротьби з РМЗ у науковому сенсі вважається персоніфікований підхід [66,67]. Клінічне визначення і врахування фенотипічних або молекулярно-біологічних характеристик РМЗ дозволяє оптимізувати підхід у подальших дослідженнях.

1.2. Питання патогенезу раку молочної залози.

Розуміння патогенезу РМЗ багато в чому дає ключові концепції діагностики та лікування. У багатьох роботах вітчизняних і закордонних вчених розвиток РМЗ описаний як багатоетапний процес, в якому, як вважається, кожен етап співвідноситься з однією або декількома різними мутаціями в генах. У клінічній практиці дотримуються наступної моделі розвитку РМЗ: норма → гіперплазія → атипова гіперплазія → карцинома in situ → инвазивная карцинома → метастатичний рак [68]. На кожному з перерахованих етапів виникає генетична мутація, що додає клітині-носію додаткові селективні переваги. В результаті відбувається проліферація клону змінених клітин, й накопичення в них генетичних порушень.

Спорадичний рак молочної залози є результатом поетапного накопичення мутацій у соматичних генах, без мутації зародкової лінії. Мутаційна активація онкогенів, часто поєднана з немутаційною інактивацією генів-супресорів пухлини, ймовірно, є ранньою подією спорадичних пухлин, що супроводжуються більшою кількістю незалежних мутацій щонайменше чотирьох-п'яти інших генів. Онкогени, які, як повідомлялося, відіграють ранню роль у спорадичному РМЗ: MYC, CCND1 (Cyclin D1) та ERBB2 (HER2/neu). При спорадичному РМЗ мутаційна інактивація BRCA1/2 зустрічається рідко, оскільки інактивація вимагає мутації або повної втрати обох копій генів. Однак немутаційне функціональне придушення може бути результатом різних механізмів, таких як гіперметилювання промотору BRCA1 або зв'язування BRCA2 EMSY. При спорадичному РМЗ можна розпізнати щонайменше три різні механізми прогресування пухлини, специфічні до різних шляхів: протоковий канцерогенез молочної залози, глобулярна карцинома та високо диференційований РМЗ на

відміну від низько диференційованого протокового раку. Вважають, що різні процеси виникають рано в процесі канцерогенезу РМЗ, що в кінцевому рахунку призводить до клінічно різних типів пухлини. Оскільки мутації, набуті на ранніх етапах онкогенезу, присутні на всіх пізніх стадіях, широкомасштабне профілювання експресії генів за допомогою методів аналізу ДНК може допомогти класифікувати РМЗ на клінічно значущі підтипи [68].

За іншими даними, РМЗ прогресує двома чітко вираженими молекулярно-генетичними шляхами, які сильно асоціюються з G-ступенем пухлини. Крім того, в епітеліальному та неепітеліальному компонентах мікросередовища пухлини найбільші молекулярні зміни (на рівні експресії генів) відбуваються до місцевої інвазії. В епітеліальному компартменті не спостерігаються значні додаткові зміни експресії генів між передінвазивною та інвазивною стадіями РМЗ. Але неепітеліальний відділ мікрооточення пухлини зазнає різких епігенетичних змін і зміни експресії генів, що відбуваються під час переходу преінвазивної в інвазивну форми хвороби [69].

Останні дані свідчать, що внутрішньопухлинна генетична гетерогенність також може бути відповідальною за різну клінічну поведінку ряду певних злоякісних утворень [70-72]. Тим не менше, серед молекулярних масивів РМЗ значення ER, PR в патогенезі певним чином з’ясоване. У клітинах ER+/PR+ РМЗ підвищений рівень циркулюючих прогестинів та естрогенів та/або надмірна експресія їх рецепторів призводять до неконтрольованого клітинного поділу [73,74]. Але вже відомо про декілька мутацій пухлини в гені, що кодує ER (ESR1), у пацієнтів із ендокринно-резистентним метастатичним ER+ РМЗ. Ці мутації з посиленням функції у лігандозв'язуючому домені ER, призводять до конституційно більш активних рецепторних сигналів і пов'язані зі зниженням виживаності [75-78]. Також, підтверджено і мутації гену який кодує PR, що зустрічаються у пацієнток з метастатичним ER+ РМЗ [79].

Стероїдний гормон яєчників прогестерон та його ядерний рецептор, рецептор прогестерону (PR), відіграють важливу роль у регуляції клітинної проліферації та диференціації в молочній залозі. Крім того, експериментальні та

клінічні дані демонструють їх вирішальну роль у контролі над пухлинами молочних залоз та розвитком раку молочної залози. При зв’язку з його лігандом основна дія PR відбувається як фактору транскрипції, який регулює експресію мереж генів-мішеней. PR також активує шляхи передачі сигналу за допомогою швидкого або негеномного механізму в клітинах раку молочної залози, подія, яка повністю інтегрована з його геномними ефектами [80].

Роль Ki67 в патогенезі РМЗ розглядається за аналогією з іншими видами пухлин. Клітинна проліферація часто визначається кількісно через Ki67; ядерний білок, який експресується в усіх фазах клітинного циклу, окрім G0 [81]. При РМЗ, Ki67 вважають незалежним прогностичним маркером і маркером чутливості або стійкості до хіміотерапії або ендокринної терапії [82]. В даний час оцінка Ki67 в основному використовується для оцінки прогнозу та вирішення вибору ад'ювантного лікування, а також для прогнозування відповіді на лікування неоад'ювантним препаратом при РМЗ ER+/HER2+. При пухлинах ER-/HER2+ та ER-/HER2- високий постнеоад'ювантний індекс Ki67 пов'язаний з несприятливим прогнозом [83,84].

HER2 виявляють приблизно у 20% всіх хворих на РМЗ. Починаючи з кінця 1980-х років у багатьох дослідженнях було встановлено, що HER2+ РМЗ має більш агресивну біологію і пов'язаний з гіршими наслідками (рецидиви та виживання) [85-87]. Препарати направлені проти HER2 мають важливе значення у покращенні прогнозу пацієнток з HER2+ РМЗ, як на ранніх стадіях, так і в метастатичних умовах, а їх розвиток продовжується [88].

Метастазування є одним з найскладніших процесів для вивчення з позицій біології раку. Метастази, або метастатична хвороба, є кінцевим результатом великої та взаємопов’язаної сукупності динамічних та системних подій, що охоплюють як просторовий, так і часовий селективний тиск на ракові клітини [89]. За останні кілька десятиліть наше розуміння цього селективного тиску та його значення на різних етапах метастатичного поширення значно покращилися. Весь процес метастазування може бути розділений на наступні етапи: (1) інвазія / міграція навколо первинної пухлини; (2) інтравазація в місцеві кровоносні та

лімфатичні судини; (3) виживання та перенос ракових клітин по кровообігу/ лімфообігу; (4) прикріплення та екстравазація на вторинних ділянках; (5) явна колонізація вторинних ділянок. Ці різні елементи часто розглядаються як чіткі, але взаємопов'язані прогресуючі стадії лінійного каскаду, як правило, притаманні пізнішими стадіями росту первинної пухлини.

Однак зараз концепція змінюється: метастатичне розповсюдження може відбуватися найраніше з початку туморегенезу, до клінічного прояву пухлин [90,91], і було показано, що воно опосередковане через такі процеси, як «деламінація» або епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП), при яких ракові клітини залишають епітелій та перетинають базальну мембрану [92].

Метастазування включає селекцію ознак для успішного виживання ракових клітин. Досягнення у секвенуючих платформах показали що мікроеволюційні генетичні зміни, такі як соматичні мутації, альтерації кількості копіювання і структурні варіації геному, поряд із спадковими факторами, виявляються незалежно в обох ділянках: первинній і вторинній, як результат сайт-специфічного, контекст-залежного селективного тиску. Крім того, було показано, що точна клітина походження раку сильно впливає на траєкторію всього цього еволюційного процесу [оглянуто у 93].

Щоб виникнути метастазу, ракові клітини повинні залишити первинну пухлину. Це вимагає активації та залучення клітинних механізмів, які забезпечують рух клітин, адгезію та деградацію позаклітинного матриксу (ПКМ) (або обох) та послаблення міжклітинної адгезії для полегшення дисоціації від епітеліальних сусідніх. Зокрема, це забезпечується скороченням актиноміозину, що лежить в основі і рухає міграцію клітин та інвазію [94]. Інвазія раку ініціюється та підтримується сигнальними шляхами (наприклад, узгодженою діяльністю RhoGTPаз RhoA, Rac1 та Cdc42 [95]), які управляють динамікою цитоскелету в пухлинних клітинах і оновленням зв’язків між клітиною і позаклітинним матриксом, та між клітинами, щоб дозволити міграцію клітин у сусідню тканину. Цей процес є високоадаптивним, на нього впливають внутрішні

та зовнішні фактори, і, як правило, є тимчасовим, маючи потенціал змінюватися. Зрештою, це дозволяє раковим клітинам подолати перешкоди для їх руху.

ЕМП – це частковий або зворотний процес, який залежить від внутрішніх та зовнішніх подразників [96]. По мірі проходження ракових клітин через безліч різних, фізіологічно відмінних і часто ворожих багатоклітинних мікросередовищ, вони реагують на безліч підказок і генерують як минущі і постійні зміни, включаючи ремоделювання ПКМ, що призводить до спільної еволюції як самих ракових клітин, так і тканин, через які вони проходять. Наприклад, зміни колагену I типу виявляються при первинному та вторинному РМЗ [97,98].

Клітини строми можуть кооперуватися з раковими клітинами для полегшення та прискорення інвазії ракових клітин. Таким чином, концепція поведінки пухлин як спільноти субклонів ракових клітин та незлоякісних клітин, значно збільшує складність в лікуванні. Останнім часом широко прийнято, що ремоделювання ПКМ активно сприяє прогресуванню раку через кластеризацію інтегринів та інших рецепторів, що призводить до активації сигнальних шляхів внутрішньоклітинної кінази, і що згодом порушує, серед іншого, ЕМП, міграцію та інвазію ракових клітин [оглянуто у 93].

Інтравазації ракових клітин можуть сприяти, окрім сигналів пухлинних клітин, активність популяції стромальних клітин, таких як Мф [99,100], та організація позаклітинного матриксу [оглянуто у 93].

РМЗ демонструє більшу схильність до метастазів у лімфатичні вузли [101]. Лімфатична система не просто пасивний шлях для пухлинних клітин, але вона робить внесок полегшуючи метастазування, сприяючи активному рекрутуванню пухлинних клітин у регіональні і дистальні лімафатичні вузли [102] за рахунок механізму CCL21–CCR7 сигналізації [103,104], сприяючи виживанню метастазуючих стовбурових клітин раку через CXCL12–CXCR4 сигналізацію [105,106], та підлаштовуючи запальну відповідь господаря для порушення протипухлинного імунного нагляду [93,107-109]. Запалення є критичним компонентом прогресування пухлини, і запальні клітини розглядаються як обов’язковий учасник прогресування. Показано, що клітини запалення змінюють

проліферацію, виживання та міграцію ракових клітин. За деяких обставин ракові клітини підміняли деякі сигнальні молекули вродженої імунної системи, включаючи хемокіни та їх рецептори (CXCL12–CXCR4 і CCL21–CCR7), для полегшення інвазії, міграції, і метастазів.

Місцева строма, що складається з позаклітинного матриксу, незлоякісних клітин і сигнальних молекул, які вони виробляють, є невід'ємним компонентом вторинних ніш, що разом з основними генетичними абераціями в ракових клітинах визначають характеристики росту, морфологію, та агресивність розповсюдження метастазів [110]. Підготовка майбутніх ніш для метастазів у вторинних органах здійснюється і за рахунок впливів секретованих пухлиною факторів і позаклітинних везикул – ракових екзосом, які також здатні моделювати (або підлаштовувати) у т.ч. і позаклітинного матриксу [111,112].

Злиття клітин (відоме також як гібридизація клітин) – поширене явище і одна з рушійних сил прогресування раку. Злиття клітин – це також дуже складний і високорегульований процес, який бере участь у деяких фізіологічних подіях, таких як запліднення та регенерації тканин [113,114], а також у ряді патологічних подій, включаючи розвиток раку та вірусну інфекцію [115,116]. Багато досліджень виявили, що ракові клітини є фузогенними між собою, або з багатьма різними типами нормальних клітин, включаючи клітини строми [117], ендотеліальні клітини [118], епітеліальні клітини [119,120] та мезенхімальні стовбурові клітини [121]. Мф також розглядається як критичний компонент мікросередовища пухлин, та є перспективним фузогенним кандидатом.

Отже, аналіз генетичних порушень в патогенезі РМЗ визначає важливість визначення і врахування його фенотипових або молекулярно-біологічних характеристик як науковий підхід для подальшого дослідження, але генетичні мутації і внутріпухлинна гетерогенність забезпечує невичерпну різноманітність РМЗ. Також, ми підійшли щільно до питання внеску мікрооточення в патогенез РМЗ – можливо підхід до вивчення більш однорідного мікрооточення пухлини виявиться більш уніфікованим.

Мікрооточення пухлини є предметом постійної уваги клініцистів і вчених. Як самостійний напрямок, сформувався на початку 90-х років минулого століття і пов'язаний з ім'ям I. Fidler, якого вважають основоположником [122]. При дослідженнях пухлинного мікрооточення умовно вирізняють морфологічну складову (клітини з позаклітинним матриксом) та метаболічну (або біохімічну) складову. Клітинами, що їх значення досліджувалося в онкогенезі, є: фібробласти, міофібробласти, міоцити, адипоцити, перицити, фібробласт залежні перицити, ендотеліоцити, клітини системи імунітету (нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити, тучні клітини і ін.), а також органоспецифічні клітини [122]. Серед метаболічних особливостей мікрооточення пухлин досліджувалися: рівень кислотності, гіпоксії, наявність різних видів реактивного кисню, оксидативний стрес, внутрішньопухлинний кровоток, проникність судин, парціальний тиск, швидкість загального кровоточу, цитокіни та ін. [123,124].

Було показано, що на моделях РМЗ транзиторна гіпоксія, але не хронічна гіпоксія, насправді сприяє клональному розмаїттю та посилює метастазування у вторинні органи [125].

Резидентні непухлинні клітини зазнають значних змін від впливу злоякісних. Кілька статей показали щільну взаємодію між фібробластами, асоційованими з раком, ремоделюванням навколо первинної пухлини і прогресуванням, зокрема РМЗ [126]. Ці фібробласти і ремодельований матрикс відіграють і про- і антипухлинну ролі, що відображає, що просте усунення строми може і не бути оптимальним терапевтичним підходом, і що натомість більш тонкі підходи, такі як реінженерія строми, або нормалізація, або короткочасне втручання по «преміюванню» [127], можуть представляти більш корисний підхід [оглянуто у 93].

Важливим питанням онкогенезу, у т.ч. і при РМЗ, є дослідження внеску імунного нагляду. У сучасному розумінні, подвійна роль імунних клітин у мікрооточенні пухлин висвітлюється як баланс між проти- і про- пухлинною активністю, який зумовлює подальшу долю пухлини щодо її елімінації, і викладена нижче, згідно даних [13,14].

Протипухлинна активність. На ранній стадії росту пухлини вроджена та адаптивна імунна відповідь співпрацюють для виявлення та усунення трансформованих клітин. Імунна система оповіщена про наявність пухлинних клітин за наявності сигналів небезпеки, таких як інтерферони типу I, молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням, та експресією стрес-індукованих лігандів, такими як MICA/B та ULBP1, трансформованими клітинами. Запальні сигнали рекрутують вроджені імунні клітини: Мф, NK-клітини, NKT-клітини та γδ-Т-клітини, які розпізнають і вбивають пухлинні клітини за допомогою різних механізмів, включаючи секрецію прозапальних цитокінів та цитотоксичних молекул, антитілозалежну цитотоксичність і фагоцитоз, та FasL- та TRAIL-індукований апоптоз. Дендритні клітини, завантажені пухлинними уламками мігрують до лімфатичних вузлів, де активують специфічні для пухлини CD4+ Th1 та цитотоксичні клітини CD8+ Т-клітини. Потім активовані CD4+ та CD8+ Т-клітини мігрують до місця пухлини, де вони працюють синергічно ефективно елімінуючи пухлинні клітини. CD4+ Т-хелперні клітини, разом із вродженими аналогами ILC1, підтримують активність цитотоксичних клітин та макрофагів шляхом секреції Th1-цитокініив: IFNγ, TNF та IL-12. В-клітини, які інфільтрують пухлину, також відіграють ключові ролі у елімінації пухлини. Вони можуть презентувати пухлинно-специфічні антигени та набувати фенотип ефектору (Be1), що характеризується секрецією Th1 цитокінів і цитотоксичних молекул. Диференціювання В-клітин у плазматичні клітини, що секретують антитіла, сприяє цитотоксичності, опосередкованій антитілами і фагоцитозу клітин, які експресують специфічні пухлинні антигени.

Пропухлинна активність. Якщо пухлина не повністю ліквідована у фазі елімінації, решта пухлинних та імунних клітин вступають у динамічну фазу рівноваги, при якій нові варіанти пухлини продовжують виникати і елімінуватися. Ця фаза триває до тих пір, поки пухлина не розвине мутації, які дозволять їй уникнути виявлення та усунення імунітетом, врешті-решт призводячи до розвитку пухлини (фаза втечі). Зміни пухлинних клітин, які призводять до імунної втечі, включають втрату експресії пухлинного антигену, зниження регуляції молекул

МНС класу I, індукцію виснаження імунних клітин через персистуючу активацію, експресію лігандів для коінгібіторних рецепторів (PD-L1/PD1, CD80/CTLA-4, HLA-E/NKG2A-CD94, клас МНС I/KIR, HVEM/BTLA) та пригнічення фагоцитозу через експресію сигнальної молекули «не їж мене» CD47. Пухлинні клітини також можуть уникнути імунних реакцій шляхом реконструкції мікросередовища пухлини. Висока експресія VEGF-A індукує аберантний ангіогенез, який характеризується дезорганізованими та проникними нещільними судинами, що призводять до гіпоксії, тоді як висока експресія VEGF-C/D сприяє лімфангіогенезу, який сприяє прогресуванню та дисемінації пухлини. Пухлина також сприяє ремоделюванню строми, насамперед за рахунок секреції TGF-β, PDGF-BB та VEGF, що спричиняє трансформацію нормальних фібробластів у CAF, відшаруванню перицитів від кровоносних судин, альтераціям клітин кровоносних судин та лімфатичних ендотеліоцитів. Аномальні стромальні компоненти виділяють імуносупресивні молекули, такі як PGE2, TGF-β та IL-6, які безпосередньо пригнічують цитотоксичну активність клітин, під час рекрутування та активації імуносупресивних клітин, разом з хемокінами, що їх секретують пухлинні клітини (CCL2, CCL5, CCL22). Інфільтруючі регуляторні клітини (Treg, Breg та γδ Treg), M2-подібні ПАМ, незрілі DC, клітини ILC2 і CD4+Th2 сприяють переходу від прозапальної відповіді Th1 на імуносупресивну відповідь Th2, опосередковану секрецією IL-10, IL-35, TGF-β, IL-4, IL-5 та IL-13. Пухлинні клітини далі пригнічують CTL через метаболічне виснаження. Пухлинні клітини успішно конкурують з Т-клітинами за кисень, глюкозу та амінокислоти.

Експресія IDO, аргінази-1, ектонуклеотидаз, CD39 і CD73 пухлинними клітинами, клітинами Treg, MDSC або незрілими ДК додатково сприяє позбавленню та пригніченню постачання поживних речовин для Т-клітин за рахунок зниження рівня триптофану та підвищення концентрації його імуносупресивного катаболіту-кінуреніну, обмежуючи доступність аргініну та через гідроліз АТФ у високоімуносупресивний аденозин. Більше того, Treg-клітини секвеструють ІЛ-2, необхідний для виживання та функціонування Т-клітин, через високу експресію альфа-ланцюга ІЛ-2 рецептору (CD25).

Розуміння різних механізмів, за допомогою яких пухлинні клітини уникають імунного нагляду стимулював розробку стратегій імунотерапії, спрямованих на маніпулювання Т-клітинним і пухлинним метаболізмом, і блокування, наприклад, інгібіторних контрольних пунктів (осі PD-1 та CTLA-4), імуносупресивних модуляторів TGF-β та IDO, сигналізацію CD47 та CCL2-опосередковане рекрутування імуносупресивних клітин [14].

Таким чином, роль імунних клітин в патогенезі РМЗ серед інших клітин мікрооточення пухлини, має перспективи для вивчення.

1.3. Макрофаги і їх роль в патогенезі раку молочної залози.

Серед всіх імунних клітин, Мф, як показано сьогодні, сприймає розмаїття сигналів мікрооточення і далі регулює напрямки відповідей. Отже, Мф є тією клітиною, на якій замикаються/переключаються метаболічні сигнали і імунна відповідь. Що робить її роль вкрай важливою для кожного етапи онкогенезу, і, очевидно, лікування.

Згідно сучасним уявленнями, мононуклеарно-фагоцитарна система включає в себе: 1) лінійно-комітовані кістковомозкові попередники, 2) циркулюючі моноцити, 3) резидентні Мф, 4) дендритні клітини (ДК). При цьому циркулюючі моноцити є попередниками, які заміщають тканинні макрофаги того ж самого походження [128]. Це уявлення було пізніше доповнено поняттям що Мф мають здатність до самовідновлення і можуть заселяти тканини ще до народження, а джерелом їх можуть бути клітини раннього гемопоезу [129].

У тканинах розгортається поляризація і реалізація функцій Мф, тому вони характеризуються ще більшою різноманітністю. Циркулюючі моноцити, що утворилися у кістковому мозку, розглядалися раніше як попередники більшості резидентних тканинних Мф. Але існують тканинні резидентні Мф не моноцитарного походження, вони є гетерогенними і одночасно універсальними клітинами, що знаходяться практично у всіх тканинах, де становлять до 10-15% від загального числа клітин в стані спокою. Спеціалізація макрофагів до мікросередовища пояснює їх гетерогенність: гістіоцити сполучної тканини,

клітини Лангерганса (КЛ) шкіри і слизових, остеокласти кісткової тканини та ін. Тканинні різновиди Мф мають настільки різні транскрипційні профілі, що могли б вважатися унікальними класами Мф, але їх функції загалом однакові: вони регулюють розвиток тканини, імунну відповідь на патогени, підтримують гомеостаз тканини (шляхом апоптозу, ремоделювання і відновлення тканин) [130].

Отже, джерелом макрофагів в фетальних і дорослих тканинах є: 1) жовтковий мішок, що дає початок деяким тканинним самовідновним Мф, 2) фетальна печінка, 3) Мф кістково мозкового походження. В умовах норми і при розвитку патологічних станів внесок цих джерел в забезпечення тканинного гомеостазу різко змінюється [131].

Тканинні резидентні Мф ембріонального походження знайдені у різних органах і тканинах, в тому числі у молочних залозах, і підтримання цієї популяції не потребує моноцитів у якості попередників [17]. Але постнатально, циркулюючі моноцити, які є гетерогенною популяцією, представляють собою так звані патрульні моноцити та запальні моноцити [132]. Патрульні моноцити відповідальні за кравлінг уздовж ендотелію для моніторингу молекулярних патернів, пов'язаних з небезпекою (DAMP), і, зіткнувшись з таким сигналом, швидко потрапляють у тканини і починають набирати додаткові ефекторні клітини для продуктивної імунної відповіді [133]. Головною функцією запальних моноцитів є реагування на місця запалення та пошкодження тканин. Моноцити рекрутуються у ці сайти за рахунок різноманітних градієнтів хемокінів, найбільш добре охарактеризованим з яких вважається ліганд 2 хемокіну (мотив С-С) (CCL2) [134.].

Роль макрофагів у регуляції розвитку молочної залози відома, хоча механізми, за допомогою якого це відбувається, залишається не повністю незрозумілими [оглянуто у 23].

Вважається, що тканинні Мф і щойно рекрутовані моноцити знаходяться у ієрархії активаційних станів у тканинах в результаті динамічного процесу потрапляння, місцевої проліферації, старіння, смерті і еміграції [18]. Хоча програми активації субсетів Мф мають відмінності, але вони утворюють чіткі різновиди, або субсети, і їх фенотипи і функції частково співпадають [19].

За час активних досліджень визначено більше 5 підтипів Мф [оглянуто у 135]. Різні M1 макрофаги (поляризовані інтерферонами, GM-CSF, LPS і іншими мікробними продуктами) ефективно знищують мікроорганізми, але реалізують токсичну дію на навколишні тканини. Ключовою ознакою M1-подібних фенотипів є висока експресія M1-ефекторних молекул TNF-α, IL-1 і IL-12, антимікробних молекул, реактивних форм кисню та азоту, а також IFN-індукованих генів – хемокінів CXCL9 і CXCL10, які залучають Th1 клітини [136].

M2a Мф стимулюються після зв'язування їх рецепторів з IL- 4 и IL-13, після чого активується сигнальний шлях STAT6. В M2a Мф посилюється експресія MRC1 (CD206), Retnla, Fizz1, Chi 313 (або Ym1), що вважаються досить селективними маркерами M2a [137,138].

M2b Мф поляризуються під впливом складних імунних комплексів, які містять агоністи TLR та/або IL-1 рецепторів, продукують підвищені рівні прозапальних цитокінів – IL-1, IL-6 и TNF-α. Такі Мф секретують CCL24, CCL1, CCL17, та CCR1 в зоні запалення, залучаючи туди еозинофіли, базофіли, Th2 клітини й регуляторні клітини [139].

M2c Мф індукуються TGF-β, глюкокортикоїдами або IL-10, який секретують ДК, В-клітини, цитотоксичні Т-клітини, Т-клітини, NK-клітини, тучні клітини, нейтрофіли, еозинофіли й самі моноцити/макрофаги [140].

Також було описано M2d поляризаційний фенотип Мф, який індукується костимуляцією через TLR и аденозиновий A2A рецептор (Adenosine A2A Receptor). Стимуляція аденозином у присутності TLR-агоністів викликає перемикання M1 Мф в ангіогенний M2-подібний фенотип [141]. Крім цих основних поляризаційних фенотипів описані й інші, специфичні для окремих патологічних станів.

Інші автори характеризують 4 підтипи M2 (M2b, M2c, і M2d) як ПАМ [142,143]. Як описано в попередніх джерелах, M2a фенотип індукується Th2-цитокінами (IL-4, IL-13), M2b – імунними комплексами і активацією TLRs, M2c – глюкокортикоїдами та IL-10, і M2d фенотип – в основному Fra-1 (Вважається, що Fra-1 різко індукує онкогенез і прогресування [144]). У M2 Мф посилена

експресія IL-1 і IL-1Rα, IL-10, рецептору-пастки, і знижена секреція CCL-22, CCL-17, IL-12 [145].

Не дивлячись на різноманітні фенотипи Мф, їх відомі функції *in vivo* полягають у: 1) відборі зразків (за рахунок фагоцитозу у своєму мікрооточенні), 2) репарації, 3) пригніченні і 4) антиген-презентації – скорочено: SHIP (Sample; Heal; Inhibit; and Present (antigen) [130, 146]. Тому, два основні субсети: M1 та M2 глобально відповідають функціям і є відображенням, у першу чергу, широкого спектру метаболічних змін [135]. Розуміння поляризації макрофагів вимагає глибокого знання сигнальних шляхів, якими реалізуються зовнішні сигнали, і, за допомогою яких, змінюються метаболічні програми. Нині охарактеризовано кілька основних сигнальних шляхів, що забезпечують поляризацію макрофагів і регуляторне переключення між M1 і M2 [147].

Узагальнено, класично активовані або M1 Мф є прозапальними і беруть участь у знищенні бактерій та сприяють запаленню шляхом збільшення вироблення запальних цитокінів, таких як IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23 та TNF-α. На відміну від цього, альтернативно активовані або M2 Mφs відіграють роль у пригніченні запалення та відновленні тканин, характеризуючись виробленням IL-10 та TGF-β [148]. Але і M1, і M2 запускають Th1/Th2 чи інші види імунних відповідей [149].

Мф є основним видом імунних клітин, які проникають в мікросередовище пухлини, і можуть змінювати фенотип відповідно до стимулів мікросередовища. Мф, асоційованими з пухлинами (ПАМ) також розглядають як M1- і M2-подібні. M1 ПАМ (стимульовані TLR-лігандами, агоністичним анти-CD40 або IFN-γ), мають важливу протипухлинну активність: реалізація ними фагоцитозу ракових клітин не пригнічується експресією CD47 («не їж мене»-сигналом) на злоякісних клітинах [150,151]. M1 макрофаги здатні ліквідовувати ракові клітини шляхом продукції активних форм кисню та реактивних азотистих проміжних сполук і виділяють хемокіни, які рекрутують і преміюють T-клітини протипухлинного фенотипу при деяких видах раку, що призводить до затримки росту або регресії пухлини). M2 ПАМ клітини, навпаки, можуть активно сприяти кожному етапу

розвитку та прогресування пухлини: проліферації ракових клітин, інвазії, метастазуванню та ангіогенезу, шляхом вивільнення цитокінів, факторів росту, ферментів які розщеплюють позаклітинну матрицю, та ангіогенних факторів, включаючи VEGF, Bv8 та MMP9. Також, М2-подібні ПАМ пригнічують цитотоксичну активність Т-клітин шляхом секреції супресивних цитокінів, таких як IL-10 і TGF-β, високим рівнем активності аргінази та виробництвом ROS або RNI [152-154]. Нарешті, М2-подібні ПАМ сприяють рецидиву пухлини після опромінення та антиангіогенної терапії [оглянуто у 155].

З іншої сторони, недавній огляд [оглянуто 23] висвітлює макрофаги різних фенотипів під час різних стадій ініціації та прогресування пухлини. На ранніх стадіях трансформації нещодавно набрані макрофаги піддаються великій різноманітності прозапальних сигналів, одержуваних від епітеліальних клітин та навколишньої строми, і часто експресують пов'язані з М1 фактори з протуморогенними властивостями, зокрема ІЛ-1β та ІЛ-6. Як складова прозапальної відповіді, виробництво реактивних форм кисню та азоту також може потенційно підвищити швидкість мутації епітеліальних клітин і тим самим прискорити туморогенез. З іншої сторони, на моделі HER2+ РМЗ у мишей показана необхідність Мф для ранньої дисемінації і метастазування [100]. У розвинених пухлинах Мф проявляють альтернативно активовані функції, включаючи вироблення імуносупресивних факторів, таких як ІЛ-10 та TGF-β, які здатні активно пригнічувати протипухлинну імунну відповідь. Ці Мф також виробляють фактори росту та перебудовують матрикс, підтримуючи ріст пухлини та посилюючи інвазію. Отже, автори огляду вважають, що фенотипи ПАМ включають комбінацію маркерів, типово привласнених фенотипам М1 та М2 [оглянуто у 23].

Нещодавні складні аналізи з використанням геномних досліджень та секвенування РНК виявили, що фенотипи макрофагів in vivo набагато більш неоднорідні та складні, ніж спочатку очікувалося. Так, профілювання генетичної експресії ПАМ і Мф тканини молочної залози з пухлини MMTV-PyMT-мишей, виявили апрегуляцію канонічних М2-маркерів у популяції ПАМ [156]. Але ті ж

автори повідомили що диференціювання ПАМ залежало від транскрипційного фактора Rbpj, що є ключовим регулятором канонічної Notch-сигналізації [оглянуто 23]. У свою чергу, Notch-сигналізація в Мф активує NF-кВ [157]. Інші автори повідомляють, що у біопсіях пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою сигналізація NOTCH негативно корелювала з активацією WNT у CD68+ макрофагах, що позитивно корелювало із запущеними стадіями карциноми, і підсумовують, що блокада NOTCH перешкоджає диференціації ПАМ моноцитарного походження [158].

Останні дані свідчать про те, що окремі пухлини можуть містити кілька різних підмножин Мф, які можуть відрізнятися за своїми функціями. Movahedi та ін. повідомили про наявність двох різних популяцій ПАМ у пухлинах молочної залози TS/A, які відрізнялися за рівнем експресії MHCII на їх поверхні [159]. Показано, що макрофаги $MHCII^{lo}$ перебувають головним чином у гіпоксичних областях пухлини та виражені маркери, пов'язані з поляризацією М2. Підмножина $MHCII^{hi}$, однак, експресувала гени М1-профілю, такі як *Cox2*, *Nos2* та *IL-12*. Ці клітини показали, що виділяють прозапальні цитокіни та хемокіни, такі як IL-6, CCL5 та CXCL3, які, в свою чергу, можуть служити для подальшого набору додаткових запальних клітин до оточення пухлини. Однак було показано, що обидві підмножини макрофагів є поганими антиген-презентуючими клітинами і були здатні пригнічувати проліферацію Т-клітин, що свідчить про те, що обидві підмножини можуть сприяти імуносупресії протипухлинних клітин. Цікаво, що Ruffell зі співавт. [160] спостерігали аналогічну локалізацію $MHCII^{lo}$ та $MHCII^{hi}$ ПАМ в пухлинах молочної залози, отриманих від мишей MMTV-PyMT; однак здатність ПАМ пригнічувати проліферацію клітин CD8+ T мали тільки клітини $MHCII^{lo}$. Ці дані свідчать про те, що деякі властивості ПАМ, швидше за все, є універсальними (набір, локалізація), тоді як інші властивості (специфічні взаємодії з іншими інфільтруючими клітинами) можуть залежати від досліджуваної моделі пухлини. Так, у дослідженні, присвяченому локалізації Мф у пухлинах молочної залози людини, високе забарвлення Мф CD68+ у межах просвітів протокових пухлинних структур співвідносилося зі зменшеними

метастазами в лімфатичні вузли [161]. У сукупності ці дані говорять про те, що ПАМ являють собою популяцію Мф, яка відрізняється як від М1, так і від М2 макрофагів, оскільки вони канонічно описані в умовах інфекції, але, високо імовірно, існує спектр ПАМ, фенотип і функція яких залежить від типу пухлини та розташування всередині пухлини [оглянуто у 23].

Далі наводимо результати ще ряду досліджень, які по-різному співвідносять фенотипи ПАМ і їх можливі функції при РМЗ.

Є підозри про причини, з яких пацієнтки з ожирінням, при якому підвищується рівень ІЛ-6, мають схильність до розвитку саме ER+ РМЗ [162], тому що Мф молочних залоз здатні продукувати естроген при РМЗ локально за рахунок експресії ферменту, який синтезує эстроген – ароматази [163]. Згідно даним [164], CD68+ ПАМ здатні підтримувати ангіогенез пухлини при РМЗ. Генеровані під впливом ІЛ-4, М2-подібні ПАМ полегшують метастазування шляхом активації сигналізації через рецептор епідермального фактора росту на пухлинних клітинах (як це показано на моделі карциноми молочної залози у мишей) [165].

Зворотні взаємозв’язки в експерименті in vitro демонструють вплив ліній ER+ та потрійних негативних ракових клітин на фенотип Мф. ER+ клітини при співкультивуванні з Мф викликали апрегуляцію гострофазової запальної відповіді, ІЛ-17-сигналізацію й каскад презентації антигену, при пригніченні тіоредоксин- і вітамін Д-рецепторних шляхів. Потрійні негативні ракові клітини призводили до пригнічення метаболізму цитруліну і диференціювання у М2-подібні Мф з підвищеною MMR-протеїн-експресією і секрецією CCL2 [166].

Гетерогенний розподіл макрофагів у мікросередовищі РМЗ тісно пов’язаний з їх морфологічними різновидами. Різні субпопуляції Мф знаходяться в різних морфологічних структурах РМЗ, а їх кількість достовірно відрізняється в залежності від структури: Мф (разом з фібробластами) частіше локалізуються у мікрооточенні солідних структур і рідше – в тубулярних. Більше число $CD68^{+}RS1^{+}$ Мф у мікрооточенні солідних структур було асоційоване з підвищеним ризиком метастазування у лімфовузли при люмінальному В HER2– РМЗ [26].

Висока кількість iNOS+ M1-подібних макрофагів, як в центрі пухлини, так і в інвазивному краї, була достовірно пов'язана з покращеною виживаністю (p = 0,009) у метастатичних хворих на HER2+ РМЗ, після лікування трастузумабом. Висока кількість CD163+ M2-подібних макрофагів у центрі пухлини, але не в інвазивному краї, показала незначну тенденцію до поганого прогнозу [167].

Показано, що висока експресія CCL5 асоційовна з рекрутуванням до потрійного негативного РМЗ зокрема М1 Мф і пов'язана з віддаленою виживаністю без рецидивів у ретроспективних дослідженнях [168]. Навпаки, ER+ РМЗ продукував високий рівень позаклітинного CCL2 та CCL5 in vivo, що було пов'язано з інфільтрацією ПАМ. При експериментальному РМЗ естрадіол підсилює приплив Мф та ангіогенез через збільшення вивільнення CCL2, CCL5 та VEGF. Ці ефекти були пригнічені анти-CCL2 або анти-CCL5 терапією, що призвело до потужного пригнічення росту пухлини. Отже, естрадіол індукував протумогенну активацію макрофагів [169].

Згідно даним [28], підвищена кількість CD163+ M2-подібних Мф чітко асоціювалася з швидкою проліферацією, низьким диференціюванням, негативною експресією ER і гістологією дуктального типу ($p<0.001$) у когорті РМЗ.

Отже, пропорції ПАМ можуть бути пов’язані з експресією Ki67, ER, PR, HER2, тобто з молекулярно-біологічним типом РМЗ. Продукція ПАМ ІЛ-8 [170], ІЛ-18 [171] сприяє інвазії і міграції пухлинних клітин.

Функції ПАМ після неоад’ювантної хемотерапії РМЗ залежать від їх внутрішньопухлинної локалізації і локального пухлинного мікрооточення, яке відіграє важливу роль в поляризації макрофагів. CD68+ ПАМ у ділянках з паренхімальними елементами негативно корелювали з лімфатичними метастазами після неоад’ювантної хемотерапії. Однак при метастазах, CD68+ і стабілін-1+ Мф грубоволокнистих ділянок прямо корелювали з метастазами в лімфовузли [164].

За даними [172], щільність інфільтрації ПАМ набагато вища у тканині карциноми при РМЗ, порівняно із сусідніми неураженими тканинами та негативно корелює з 5-ти річною виживаністю пацієнток. Але в лімфовузлах з метастазами, ця інфільтрація достовірно нижче, порівняно з неураженими

лімфовузлами. І ще один недавній аналіз розподілу Мф у відділах пухлини показав, що збільшення кількості CD68+ ПАМ у стромі протокової карциноми молочної залози (при неспецифічному інвазивному РМЗ T1-4N0-3M0) захищає від метастатичного поширення в регіональні лімфатичні вузли [161].

Отже, пропорції ПАМ пов'язують з метастазуванням РМЗ. Мф є перспективним кандидатом для згаданого раніше феномену злиття з пухлинними клітинами. Встановлено, що гібриди між ПАМ та раковими клітинами РМЗ можуть набувати властивостей стовбурових клітин раку [173]. Нещодавнє дослідження представляє докази того, що злиття неопластичних клітин з лейкоцитами (наприклад, Мф) сприяє гетерогенності пухлини, і в результаті злиті клітини виявляють підвищену метастатичну поведінку in vivo [174.]. І ще одне дослідження підтверджує значення злиття ракових клітин з Мф у розвитку РМЗ [175]: отриманий гібрид Мф з клітинами РМЗ мав посилену проліферацію, формування колоній, міграцію та інвазивні можливості, а також пригнічений апоптоз, порівняно з батьківськими клітинами РМЗ. Крім того, у гібридних клітинах спостерігався ЕМП зі значною даун-регуляцією Е-кадгерину та ап-регуляцією N-кадгерину, вімнетіну та Snail, а також явно підвищена експресія MMP-2, MMP-9, uPA та S100A4. Виявлено, що активність транскрипційного фактора TCF/LEF у шляху Wnt/β-катенін та експресія його генів-мішеней, що включають циклін D1 та c-Myc, були підвищені в гібридних клітинах [175].

Мф і адипоцити вважаються ключовими типами клітин тканин РМЗ. Обидва вони впливають на прогресування РМЗ, перехресно взаємодіючи в пухлинній тканині. Адипоцити, асоційовані з пухлиною, роблять внесок у гіпоксію та запалення мікросередовища та погіршують умови. Утворення та секреція ПАМ з фенотиповими характеристиками М2, такими як HIF-1α та TNF-α, впливають на прогрес ракових клітин, втручаючись у секрецію MCP-1 адипоцитів, асоційованих з пухлиною [176]. Взаємодії Мф з адипоцитами відіграють реципрокну роль в метаболізмі частково через фактори PPAR-транскрипції [177]. Крім того, накопичуються свідоцтва, що запалення жирової тканини є провідним фактором продукції естрогену у жінок з ожирінням після менопаузи, що відіграє важливу

роль при ER+ РМЗ. Разом з вивільненням адипоцитами, асоційованими з пухлиною, прозапальних адипокінів, таких як лептин, активуються фактори транскрипції: NF-кВ, STAT3, HIF-1α, а також різні медіатори запалення, такі як цитокіни, хемокіни і простагландини виробляються у великих кількостях. Рекрутуються різні запальні клітини: ПАМ, MDSC, тучні клітини, нейтрофіли. Цей процес, впливаючи на проліферацію та виживання клітин, сприяючи ангіогенезу, пригнічуючи протипухлинну імунну відповідь, сприяючи інфільтрації та метастазуванню пухлинних клітин, нарешті, опосередковує виникнення та розвиток пухлин. Хронічне запалення на низькому рівні зберігається в мікросередовищі пухлини, що є ще однією з умовою злоякісної модуляції ПАМ. Під індукцією STAT3 макрофаги в стромі пухлин мають тенденцію до диференціювання на ПАМ з характеристиками M2. Крім того, високий вміст молочної кислоти, що утворюється в результаті гліколізу, гальмує міграційну здатність мононуклеарних макрофагів і зменшує вивільнення TNF та ІЛ-6. У той же час, під дією молочної кислоти фенотип Мф перетворюється на тип M2, що гальмує його антигенпрезентуючу функцію, сприяючи тим самим імунній втечі [176].

За допомогою експериментів і комп’ютерного моделювання нещодавно показано що метаболізм ракових клітин має наслідком градієнти поживних речовин та відходів метаболізму, які діють як сигнали щоб знати положення стосовно кровоносних судин [178]. Ця позиційна інформація управляє модульною організацією пухлинних і стромальних клітин. Детальніше, позаклітинні градієнти метаболітів відіграть ключову роль у фенотиповому розмаїтті ПАМ. Мф при гіпоксії секретують лактат, який накопичується в середовищі клітинної культури пропорційно щільності макрофагів. Цей ефект узгоджується з недавніми даними, що показують подібний ефект лактату на рівні транскрипції мРНК Arg1 у ПАМ [179]. Поєднання низького рівню кисню та високого лактату було необхідним та достатнім, щоб викликати експресію ARG1 у макрофагах. Ці дані говорять про те, що протилежні градієнти лактату та кисню, які є всюдисущими у солідних пухлинах, створюють передбачувані фенотипові структури серед ПАМ. Оскільки ці градієнти відповідають топології судинної системи пухлини, вони

можуть передавати інформацію про відстань до судин. Недавно було показано, що метаболізм ПАМ контролює морфогенез судини пухлини та метастази [180]. Мф, відчуваючи градієнти метаболізму, можуть передавати просторову інформацію сусіднім клітинам, викликаючи функціональні адаптації до їх місцевого середовища, зокрема стимулювати ангіогенез в ділянках гіпоксії [178].

Отже, ПАМ реагують на мікрооточення і взаємодії з резидентними клітинами, що є їх звичайною функцією, а далі генерують специфічні відповіді, від яких може залежати розвиток РМЗ, що робить їх важливою мішенню при лікуванні.

Використання таргетних впливів на Мф з метою протипухлинної терапії сьогодні розробляється. Дослідження на тваринних моделях показали, що Мф синусів лімфовузлів пов'язані з індукцією протипухлинного імунітету [оглянуто у 27]. Кілька бактеріальних екстрактів, таких як BCG-CWS та OK432, використовують для неспецифічної терапії рака з метою додаткової активації дендритних клітин через TLR. Існує напрямок «вакцинації» при лікуванні РМЗ [181]. Ряд недавніх публікацій одностайні щодо перспективного напрямку пригнічення та модуляції макрофагів у процесі лікування РМЗ [29-32]. В даний час основними стратегіями терапії раку, орієнтованими на ПАМ, є: пригнічення залучення макрофагів, перетворення туморогенного М2 в протипухлинний М1 функціональний тип та пригнічення виживання ПАМ. Цікаво, що синтетичний агоніст PPARγ розиглітазон знижував секрецію прозапальних та пропухлинних М2-цитокінів в М1 та М2 макрофагах, генерованих під впливом різних кондиціонованих середовищ клітин РМЗ [31].

Однак, є дослідження, які виявили широкі кількісні варіації макрофагів (а також нейтрофілів), що можуть визначати підтипи імунітету при потрійному негативному РМЗ, і підкреслюють необхідність кращого розуміння гетерогенності між пацієнтами щодо мієлоїдного компартменту в цілому [33].

Таким чином, протипухлинна терапія, спрямована на макрофаги має місце і потенціал, але не вирішеним залишається питання гетерогенності як самих пухлин, так і ПАМ їхнього мікрооточення.

Підсумовуючи внесок ПАМ у про- та антипухлинну відповідь, антипухлинна роль приписана M1-подібним ПАМ, які сприяють елімінації пухлини за рахунок секреції TNF, генерації високого рівня NO і ROS та антитіло-залежного фагоцитозу, опосередкованого FcR. M1-подібні ПАМ підвищують коефіцієнт транскрипції IRF5, необхідний для індукції цитокінів (IL-12, IL-23 і TNF), які беруть участь у реалізації протипухлинних реакцій Th1 і Th17 [13,14]. До пропухлинної активності привносять M2-подібні ПАМ [13,14]. Вони, як вже зазначалося, поляризуються при стимуляції в основному IL-4 та IL-13. CCL2, який секретує пухлина, відіграють ключову роль у рекрутуванні M2-подібних ПАМ. M2-подібні ПАМ сприяють «втечі» пухлини, викликаючи протизапальну реакцію Th2 через секрецію IL-10 та TGF-β. M2-подібні ПАМ експресують високий рівень аргінази-1 та пригнічують CTL, обмежуючи доступність аргініну.

Отже, важливим є дослідження співвідношення функціональних та фенотипових субпопуляцій макрофагів у мікросередовищі пухлин та метастазах при різних видах РМЗ для встановлення зв’язків з метастазуванням. А також дослідження кореляцій макрофагів з експресією РМЗ ER, PR та Ki67.

1.4. Маркери M1/M2 макрофагів асоційованих з пухлиною.

З того моменту, як зв'язок ПАМ із злоякісними пухлинами став очевидним, робляться різні спроби використовувати їх в клініці. Найбільш часто різні маркери ПАМ застосовують в якості діагностичних і прогностичних маркерів різних пухлин або в якості перспективних мішеней для створення нових таргетних терапевтичних препаратів.

Прогностична значущість ПАМ продемонстрована для більшості солідних пухлин і на сьогоднішній день майже не викликає сумнівів. Показана кореляція кількості ПАМ різних фенотипів (CD68+, CD163+, CD204+, CD206+) з прогнозом перебігу захворювання, а саме збільшена кількість ПАМ асоційоване з поганим прогнозом.

CD68 – маркер, функціонально важливий для M1 макрофагів. Скавенджер рецептор для окислених ліпопротеїнів низької щільності, після зв’язування з

якими M1 макрофагів можуть активувати фагоцитоз і посилювати продукцію прозапальних цитокінів. Згадується як найкращий маркер ПАМ при дослідженнях пухлин, зокрема РМЗ [24]. На високому рівні експресується на моноцитах і тканинних макрофагах людини. Використовують для імуногістохімії, у т.ч. на парафінових зрізах тканин людини [182]. Вважається загальним маркером для всіх Мф [183]. Хоча деякі факти свідчать, що CD68 можуть експресувати інші, немієлоїдні клітини при раку [184].

CD163 – це скавенджер рецептор для гемоглобін/гаптоглобінового комплексу який експресований на більшості тканинних макрофагів. Використовують для імуногістохімії, у т.ч. на парафінових зрізах тканин людини для визначення активаційного стану M2 ПАМ зокрема при РМЗ [28]. CD163+ ПАМ відіграють важливу роль у прогресуванні раку. CD163+/CD14+ ПАМ, отримані із злоякісного плеврального ексудату, експресують на високому рівні M2-цитокіни [185].

Нещодавній метааналіз показав, що обидва типи ПАМ CD68+ і CD163+ можуть бути прогностичними маркерами при РМЗ без метастазів [186].

Спроба співвіднести CD68+ і CD163+ з продукуємими цитокінами при РМЗ показала наступні знахідки. З досліджень [187] випливає, що CD68+ експресія в потрійному негативному РМЗ пов’язана з апрегуляцією IL-6 і CCL-5, але не IL-10, IL-12, IL-1β, MIP-2. Експресія CD68 була в 3 рази вищою у групі нечутливих до неоадьювантної хемотерапії пацієнток, та пов’зана з присутністю M2-цитокінів (YKL-39– CCL18+ або YKL-39+ CCL18–) [188]. Протилежність висновків може бути пояснена, знову таки, різними молекулярно-біологічними типами пухлин, тим, що частина CD68+ ПАМ можуть бути за функцією M2-подібними Мф, а також тим, що прозапальні цитокіни M1 Мф можуть сприяти розвитку РМЗ. До того ж, канонічні M1, M2 типи Мф здатні підтримувати запалення через Th1/Th2 відповіді [19].

Тож, постає питання безпосередньо значення молекул CD68 і CD163 у макрофагів і в процесі онкогенезу. CD68 це тип I інтегрального мембранного протеїну з високо глікозильованим позаклітинним доменом і зв'язується з

тканинними та органоспецифічними лектинами або селектинами. Білок є членом сімейства скавенджер рецепторів (очищувачів), який, як правило, функціонує для видалення клітинного сміття, сприяння фагоцитозу та відбору Мф. Тож, рецептор CD68 може робити внесок у підтримання запалення [34]. З іншої сторони, співвідношення Мф які несуть і CD68, і CD163 може відображати метаболічне мікрооточення [19], і також співвідношення функціональних фенотипів ПАМ незалежно від цитокінового профілю.

Вивчення корелятивних відносин CD68+ і CD163+ ПАМ до метастазування певних молекулярно-біологічних типів РМЗ допоможе вирішити питання прогностичного значення.

1.5. Обґрунтування обраного напрямку досліджень.

Стандартні патоморфологічні характеристики підтверджені як адекватні для визначення клінічно корисних груп, таких як потрійний негативний, HER2 гормон-рецептор-негативний і HER2+ гормон-рецептор-позитивний РМЗ [7,56]. Отже, аналіз генетичних порушень в патогенезі РМЗ визначає важливість визначення і врахування його фенотипових характеристик як науковий підхід для подальшого дослідження.

У сучасному розумінні, подвійна роль імунних клітин у мікрооточенні пухлин висвітлюється як баланс між проти- і про- пухлинною активністю, який зумовлює подальшу долю пухлини [13,14]. І, як з’ясовано в ході огляду літератури, тонкі підходи, такі як стромальна реінженерія або нормалізація, чи короткочасне втручання по «преміюванню» мікрооточення пухлини [127], можуть представляти корисний підхід при лікуванні [оглянуто у 93].

Серед інших імунних клітин, Мф, як показано сьогодні, сприймає розмаїття сигналів мікрооточення і далі регулює напрямки відповідей. Отже, Мф є тією клітиною, на якій замикаються/переключаються метаболічні сигнали і імунна відповідь, що робить її роль вкрай важливою для кожного етапу онкогенезу, і, очевидно, лікування. Не дивлячись на різноманітні фенотипи Мф, їх відомі функції *in vivo* полягають у: 1) відборі зразків (за рахунок фагоцитозу у своєму

мікрооточенні), 2) репарації, 3) пригніченні і 4) презентації антигенів [130,146]. Відповідно, два основні субсети: М1 та М2 глобально відповідають функціям і є відображенням, у першу чергу, широкого спектру метаболічних змін [135].

Мф є основним видом імунних клітин, які проникають в мікросередовище пухлини, і можуть змінювати свій фенотип і функції відповідно до стимулів мікросередовища. ПАМ розглядають як М1- і М2-подібні [оглянуто у 155]. Характеристики ПАМ, зокрема їх М1/М2 пропорції, можуть бути пов’язані з експресією Ki67, ER, PR, HER2 пухлиною.

Згідно з оглядом, роль ПАМ активно вивчається при РМЗ. Однак, на сьогоднішній день відсутній систематичний підхід дослідження який би міг співвіднести молекулярно-біологічні підтипи РМЗ з проліферативними морфологічними особливостями пухлини, і представництвом різних ПАМ. Тому важливим є дослідження співвідношення субпопуляцій Мф у мікросередовищі пухлин та їх метастазів при різних видах РМЗ для встановлення зв’язків з метастазуванням з метою прогнозу і вибору лікування, у відповідності до експресії ER, PR та Ki67.

Скавенджер-рецептори загалом часто функціонують за допомогою механізмів, які включають адгезію, ендоцитоз, фагоцитоз, транспорт та сигналізацію, які в кінцевому підсумку призводять до виведення деградуючих чи шкідливих речовин [оглянуто у 189].

CD68 зв'язує окислені ліпопротеїди низької щільності, фосфатидилсерин, апоптотичні клітини і служить рецептором для спорозоїту малярії при інфекції печінки. CD68 розташований в основному в ендосомальному/лізосомальному відділенні, але може швидко перекидатися на поверхню клітини. Функція рецептору не передбачає зв'язування бактеріальних/вірусних патогенів, вроджених, безпосередньої участі у запальних або гуморальних імунних реакціях, хоча він потенційно може бути залучений до обробки/презентації антигену [34]. Хоча роль у процесингу антигенів CD68 невідома, дослідження показали підвищену здатність презентації антигену CD68–/– мононуклеарними фагоцитами для CD4+ Т клітин, що дозволяє припустити, що CD68 може мати негативні

регуляторні функції у трафіку MHC класу II, або поглинанні та завантаженні антигену [35].

CD68 є членом родини глікозильованих протеїнів LAMP (мембранні білки, пов'язані з лізосомою), присутні переважно на мембрані лізосом, експресія яких може змінюватись в різних тканинах, що говорить про розділення функцій. Для всіх п'яти представників родини, відомих сьогодні: LAMP1, LAMP2, LAMP3, CD68/макросіалін/LAMP4, і BAD-LAMP/LAMP5, припускається роль при раку [190]. Різні значення експресії CD68 для прогнозу при різних пухлинах можуть бути обумовлена декількома факторами, включаючи технічну мінливість, специфічність антитіл та відмінності випадків [34]. Кореляція CD68 з раком пов'язана не тільки з його експресією ПАМ, але і пухлинними клітинами [184]. Наприклад, CD68 виявився високо експресованим у гліомах людини на мікроглії і на пухлинних клітинах; його експресія була пов'язана зі злоякісністю в цих пухлинах і пропонувалася як прогностичний маркер зниженої виживаності при гліомах у людини [191]. Це спостереження узгоджується з тим фактом, що пухлинні клітини часто експресують маркери імунних клітин, щоб ухилитися від імунної системи під час метастазування, найчастіше це антигени макрофагів: CD68, CD47, CD163 та DAP12 [192-194]. Механізм, що пояснює експресію антигенів Мф пухлинними клітинами, все ще обговорюється, і, можливо, він опосередковується генетичним обміном в результаті будь-якого з виявлених механізмів: пряме злиття клітин раку і Мф [195] або перенос, опосередкований екзосомами [192]. CD68 виявлено у мишей в екзосомах макрофагального походження [196].

Висока щільність CD68+ ПАМ супроводжується високими стромальними та сироватковими рівнями VEGF. Існує зв'язок між експресіями CD68 і Ras в процесі ангіогенезу РМЗ [197]. Вважається, що підвищення регуляції VEGF в макрофагах під впливом опромінення знижує протипухлинну ефективність променевої терапії [198], що припускає CD68+ ПАМ у якості показника результату лікування раку, зокрема, променевої терапії. Незважаючи на широке використання CD68+ в якості

предиктора для прогнозування раку, функції CD68 у ПАМ, в основному невідомі [оглянуто у 189].

І, наприкінець, диференціація Мф та експресія CD68 та SR-A (в експерименті in vitro) значно пригнічувались разом з пригніченням RhoA, ROCK1 або ROCK2 в клітинах U937, оброблених PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, який є специфічним активатором протеїн кінази С і тому активує NF-κB), що вказує на те, що диференціація макрофагів, індукована PMA, пов'язана з сигнальним шляхом RhoA/ROCK [199]. Оскільки стимуляція NF-κB може пригнічувати CD68-експресію Мф, можливо, серед популяції CD68+ клітин у пухлинах переважають М2-подібні Мф, в яких активовано не NF-κB, а PPAR.

Протеїн CD163, як зазначено вище, також є членом суперродини цистеїн-збагачених скавенджер-рецепторів (SRCR), і виключно експресований на моноцитах і Мф. Функціонує як регулюємий гострою фазою рецептор, залучений у кліренс і ендоцитоз гемоглобін-гаптоглобінових (Hp–Hb) комплексів макрофагами, і тому може захищати тканини від вільного гемоглобін-опосередкованого оксидативного ушкодження. Цей протеїн також може функціонувати як сенсор вродженої імунної системи для бактерій та індукторів локального запалення [200].

CD163 експресія чітко пригнічується запальними сигналами, у той час як протизапальні сигнали (IL-10, глюкокортикоїди) індукують експресію CD163, а прозапальні (LPS, TNF-α, IFN-γ) пригнічують синтез CD163 [36]. Дослідження регуляції CD163 на декількох моделях пухлини показують, що високий рівень CD163 є особливістю макрофагів, які зазнають диференціації альтернативно активованого фенотипу М2 [37,38]. Поляризація макрофагів, пов'язана з CD163, може бути пов'язана з функцією очищення від Hp – Hb комплексів. Вивільнення гемоглобіну – явище, що відбулося під час фізіологічного чи патологічного гемолізу, наприклад, запалення та крововиливи в пухлину. Вільна форма гемоглобіну в циркуляції утворює комплекси з плазмовим глікопротеїном гаптоглобіном, що призводить до високоафінного кальцій-залежного зв’язування CD163 з комплексами Hp – Hb [201]. Зв'язування комплексів з CD163+ ПАМ

стимулює індукцію гемоксигенази-1 (HO-1), чутливої до стресу гемодетоксикаційного ферменту, який також бере участь у поляризації макрофагів на фенотип M2 і важливий для вироблення антизапального цитокіну IL-10 [202]. Таким чином, вісь CD163 – HO-1 – IL-10 може бути важливим фактором для формування імуносупресивного мікрооточення пухлини [оглянуто 189].

Гемоксигеназа 1 (HO-1) відіграє двоїсту роль у регуляції фероптозу. Підвищена експресія HO-1 є важливою подією при індукованому ерастином фероптозі клітини фібросаркоми HT-1080, і HO-1, ймовірно, забезпечує доставку заліза для сприяння фероптозу [203]. Але в іншому дослідженні було показано, що HO-1 пригнічувала сорафеніб- та ерастин-індукований фероптоз в клітинах гепатоцелюлярної карциноми [204]. Нокдаун HO-1 посилював гальмування росту клітин гепатоцелюлярної карциноми у відповідь на ерастин та сорафеніб. Роль HO-1 у фероптозі може залежати від різних патологічних контекстів, хоча точний механізм цього явища потребує подальшого вивчення [205].

Численні дослідження демонструють, що підвищена експресія CD163 корелює з запущеними стадіями раку, несприятливим прогнозом, раннім віддаленим рецидивом та зниженням виживаності при різних видах раку, серед яких РМЗ [37,206,207].

CD163 нещодавно був ідентифікований як рецептор для TNF-подібного слабкого індуктора апоптозу (TWEAK), члена суперродини TNF, який бере участь у запальних реакціях, сприянні ангіогенезу та ремоделюванні тканин [208-210]. У клітинах пухлини зв'язування TWEAK зі своїм рецептором FGF-індуцибельною молекулою 14 (Fn14), призводить до стимуляції проліферації пухлинних клітин, міграції та інвазії, а також сигналізації та експресії генів NF-κB, що сприяє росту пухлини, ангіогенезу та пригніченню імунітету [211,212]. На макрофагах TWEAK селективно зв'язується з доменом, багатим цистеїном на рецепторі CD163. CD163-опосередковане TWEAK-очищення макрофагами привносить у його деградацію і секвестрацію у мікрооточенні пухлини, що може запобігти TWEAK виконувати свої функції, стимулюючі пухлини, і говорить про потенційну протипухлинну

користь взаємодії TWEAK–CD163 на Мф [208]. Тож, не виключено, що CD163+ ПАМ можуть виконувати двоїсту роль при РМЗ.

CD163 існує не тільки у вигляді мембранної форми, але також присутній у вигляді розчинної форми (sCD163) у плазмі та інших тканинних рідинах. Показано, що ADAM17 розщеплює ектодомен CD163, тим самим знижуючи поверхневу експресію CD163 [213]. Припускається, що sCD163 має здатність пригнічувати проліферацію Т-клітин [214] та сприяти розпізнаванню та фагоцитозу золотистого стафілокока [215]. Циркулюючий рівень sCD163 вважається негативним прогностичним біомаркером для хворих на рак і може відображати підвищену активність CD163+ ПАМ [216]. Роль sCD163 при раку недостатньо вивчена. Можливо, він також може бути залучений до поляризації ПАМ, конкуруючи за зв'язування з Hp–Hb комплексами [оглянуто 189].

Таким чином, поєднане використання маркерів CD68 і CD163 – є досить надійним і перспективним для імуногістохімічного дослідження ПАМ-інфільтрації при РМЗ, може слугувати певним морфологічним відображенням M1/M2-поляризованих Мф, та потребує подальшого дослідження. В подальшому, вивчення відповідності CD68+ і CD163+ ПАМ до метастазування серед різних молекулярно-біологічних типів РМЗ допоможе вирішити прогноз та напрямки лікування.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЯ

2.1 Етичні аспекти дослідження.

Дане дослідження затверджене дозволом комісії з питань біомедичної етики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»: протокол № 133, від 15.03.2016 р. (Наказ про склад комісії з питань біомедичної етики № 243 від 02.09.2015р.), та проведене відповідно до Гельсінської декларації 1975 року, переглянутої у 2013 році. Усі особи підписували письмові форми інформованої згоди до участі в дослідженні.

Клінічна частина дослідження організована та проведена на базі Полтавського обласного клінічного онкологічного диспансеру. Патоморфологічне дослідження проводилося на базі Полтавського обласного патолого-анатомічного бюро. Імуногістохімічне дослідження на HER2, ER, PR, Ki67, для визначення молекулярно-біологічного підтипу РМЗ, були проедені у діагностично-консультативному центрі CSD Health care, м. Київ. Імуногістохімічне дослідження CD68+ та CD163+ клітин проведено на базі НДІ ГІОРПФ УМСА в період з 2017 по 2020 роки. Всі заклади є належним чином сертифіковані.

2.2 Дизайн дослідження.

Дослідження організоване як оригінальне наукове кроссекційне, з персоніфікованим підходом, у якому взяли участь 30 пацієнток з верифікованим діагнозом РМЗ, які були розподілені на 2 групи, по 5 підгруп в кожній. Пацієнток регулярно спостерігали під час візитів до клініки чи по телефону, протягом 58 міс., або до часу смерті. Загальну виживаність використовували для прогностичного аналізу.

Критерії включення у дослідження:

1) верифікований діагноз операбельна аденокарцинома молочної залози T1-2 N0-2 M0 (I-IIIA стадії) без неоад'ювантного курсу хіміотерпії і без променевої терапії;

2) підтверджений злоякісний процес за даними патоморфологічного дослідження;

3) визначення молекулярно-біологічного підтипу за даними імуногістохімічного дослідження на ER, PR, HER2, Кі67.

Критерії виключення:

1) наявність віддiлених метастазів в інші тканини або органи, окрім іпсилатеральних лімфовузлів;

2) наявність важких, неконтрольованих (декомпенсованих) захворювань внутрішніх органів або нервово-психічні розлади;

3) наявність інших станів, що визначали нездатність пацієнтки розуміти природу та можливі наслідки дослідження.

Діагноз «аденокарцинома молочної залози» або РМЗ встановлювали за клінічними результатами обстеження, та верифікували за результатами морфологічними або патогістологічними критеріями біопсійного інтраопераційного матеріалу.

Оцінку патогістологічного типу РМЗ проводили відповідно до класифікації ВООЗ, 2012 р. та AJCC, 2017 р. [217, 218].

Після встановлення діагнозу всім пацієнткам проведене оперативне втручання – радикальна мастектомія, після чого проводили патогістологічне дослідження та імуногістохімічне дослідження зразків видалених РМЗ та іпсилатеральних лімфовузлів.

Для всіх учасників дослідження реєстрували вік та клініко-лабораторні показники: молекулярно-біологічний тип пухлини, а також: G ступінь, наявність/відсутність метастазів в іпсилатерільні лімфовузли.

Підхід до розподілу на групи та підгрупи в рамках дизайну дослідження наведено на рис. 2.1. Для розподілу пацієнток на групи використано метод стратифікованої рандомізації: підгрупи врівноважені за молекулярно-біологічними типами РМЗ.

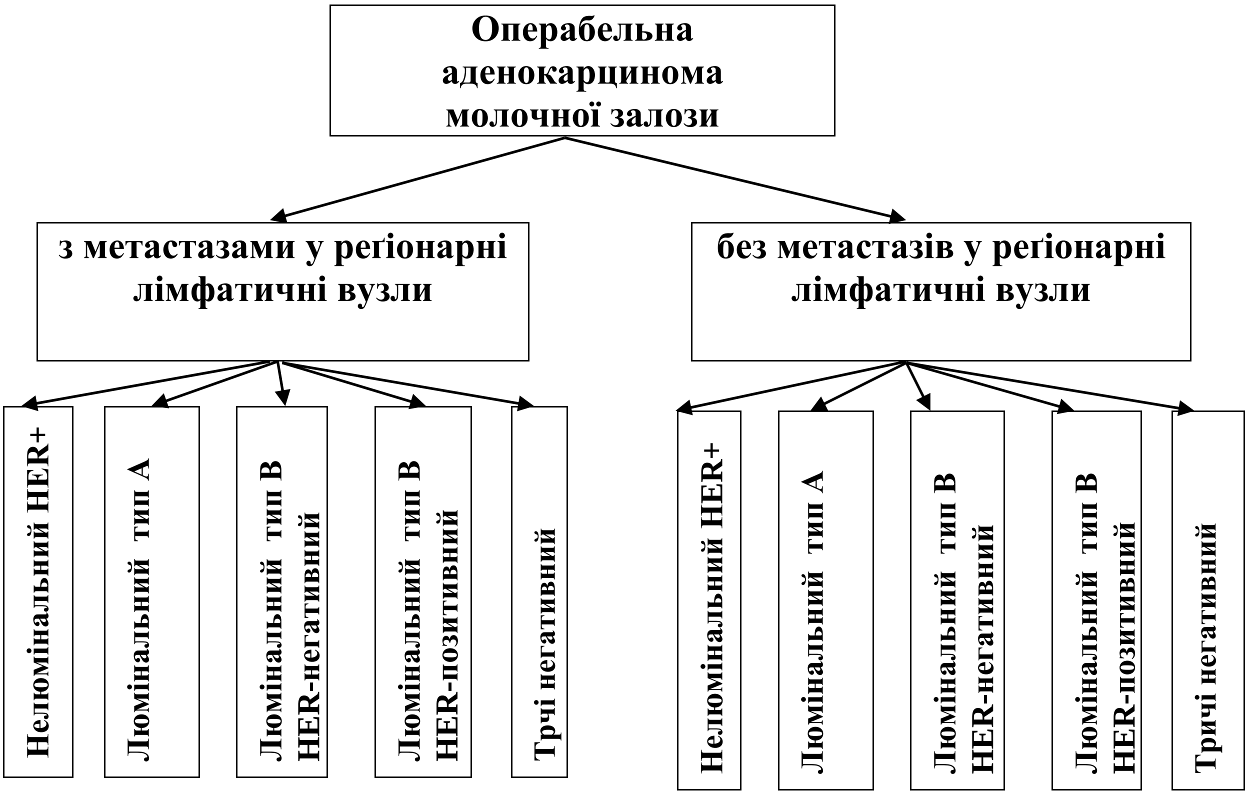


Рис. 2.1. Розподіл пацієнток на групи та підгрупи, відповідно до молекулярно-біологічного типу РМЗ.

Перша N0 група дослідження була представлена пацієнтками з РМЗ без метастазів в іпсилатеральні пахвові лімфовузли, друга N1 група дослідження – пацієнтками з РМЗ з метастазами тільки в іпсилатеральні пахвові лімфовузли.

Як видно з рис. 2.1, кожна група включала 5 підгруп:

люмінальний А-підгрупа першої N0 групи (n=10), люмінальний А-підгрупа другої N1 групи (n=3);

люмінальний В HER2–-підгрупа першої N0 групи (n=10), люмінальним В HER2–-підгрупа другої N1 групи (n=9);

люмінальний В HER2+-підгрупа першої N0 групи (n=10), люмінальний В HER2+-підгрупа другої N1 групи (n=9);

нелюмінальний HER2+-підгрупа першої N0 групи (n=8), нелюмінальний HER2+-підгрупа другої N1 групи (n=8);

та потрійний негативний РМЗ-підгрупа першої N0 групи (n=8), потрійний негативний РМЗ-підгрупа другої N1 групи (n=8).

Відповідно до групи та підгруп молекулярно-біологічного типу РМЗ вивчали кількісні характеристики, особливості локалізації, спів локалізації, морфології CD68+ і CD163+ клітин. Зразки РМЗ характеризували за патогістологічними рисами/особливостями. Виконували підрахунок CD68+ і CD163+ клітин у метастазах для другої групи.

Кореляційні зв’язки між кількісними показниками CD68+, CD163+ ПАМ, CD68+/CD163+ пропорцією ПАМ та ІГХ характеристиками РМЗ і G-ступенем проводили на повному масиві учасниць, групи N0+N1, а також для окремих підгруп.

Оцінку виживаності в залежності від щільності інфільтрації ПАМ проводили на повній виборці пацієнток, але розподіливши їх на 2 підгрупи, за умовно високою (≥15 клітин на поле зору зб.×280) та низькою (<15) щільністю інфільтрації первинного вогнища РМЗ CD68+ клітинами, та згідно умовного поділу на дві підгрупи: помірний рівень інфільтрації CD163+ клітинами: >3 клітин на поле зору зб.×280, низький рівень – 0-3.

Обраний дизайн дослідження у малих вузькоспеціалізованих групах пацієнтів враховує індивідуальні результати досліджень, відповідає сучасному прогресивному принципу персоналізованої медицини, і дозволяє досягти поставленої мети дисертації.

2.3 Відбір біоптатів.

Маніпуляції з операційним матеріалом проводилися з урахуванням тривалості холодної і теплої ішемії (тепла ішемія визначається як час від моменту зупинки кровопостачання досліджуваної тканини до видалення тканини; холодна ішемія – час від видалення зразка до початку процесу фіксації матеріалу). Стандартизація тривалості періоду холодної ішемії є важливим кроком до коректної оцінки рівня експресії білків, таких як ER, що мають велике клінічне і терапевтичне значення. Час видалення зразка і час початку тривалості холодної ішемії – до 1 години.

Після маркування країв резекції і виконаних надрізів товщиною 5-10 мм, отриманий операційний/біопсійний матеріал фіксували у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну при кімнатній температурі протягом не більше 20-30 хв. після видалення пухлини. Обсяг фіксатора перевищував обсяг фіксованого матеріалу в 10 разів, після чого проводився контроль якості фіксатора (колір фіксатора не змінювався). Дотримувалися оптимальної тривалості фіксації матеріалу для визначення рівня ER, PR і Ki67 та HER2, яка становить для операційного матеріалу – 18-24 год., для біопсії – 6-8 год.

2.4 Визначення гістопатологічних ознак, молекулярно-біологічного типу та G-ступеня РМЗ.

Гістологічну проводку фіксованого біоматеріалу здійснювали у автоматизованих гістопроцесорах (Milestone LOGOS Microwave Hybrid Tissue Processor, Milestone, Italy). Після проводки проводили заливку матеріалу у парафін з виготовленням парафінових блоків за допомогою станцій заливки та виготовлення парафінових блоків Thermo Scientific HistoStar (Thermo Fisher Scientific, USA).

Гістологічні зрізи товищиною 4 мкм виготовляли на напівавтоматизованому ротаційному мікротомі Thermo Scientific HM 340E.

Препарати забарвлювали гематоксиліном та еозином з використанням автоматизованого коверстейнера Dako CoverStainer (Agilent, USA).

Оцінку гістологічного типу РМЗ проводили відповідно до класифікації ВООЗ, 2012 р. та до 8-го перегляду AJCC, 2017 р. [217,218] за допомогою мікроскопу Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, Japan).

Стадію пухлини визначали відповідно до Міжнародної класифікації злоякісних пухлин TNM 7-го видання (2009 р.) [219], і до наказу МОЗ України № 554 від 17.09.2007 року «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Онкологія» [220], а також за клінічними стадіями ВООЗ [221].

Для визначення молекулярного типу РМЗ проводили імуногістохімічне дослідження з визначенням експресії наступних маркерів [222]:

1) ER – естроген-рецептор альфа (DAKO, клон EP1);
2) PR – прогестерон-рецептор (DAKO, клон PgR 636);
3) HER2/neu – онкопротеїн c-erbB-2 (DAKO, поліклональні);
4) Ki-67 – маркер проліферації (DAKO, клон MIB-1).

При ІГХ використовували протоколи відповідно до інструкцій виробника. Підрахунок здійснювався з використанням автоматизованих аналізаторів зображення, що знижує варіабельність результатів оцінки. Контролем слугувала нормальна тканина молочної залози. Позитивним результатом ІГХ-дослідження експресії ER та PR вважався рівень $\geq$ 1%; негативним – результат, коли рівень експресії становить менше 1%.

Для оцінки індексу Ki67 враховували ядерне фарбування, без урахування його інтенсивності, а також тип експресії маркера (перінуклеолярний, нуклеоплазменний, періхромосомний). Підрахунок включав в себе не менше 1000 пухлинних клітин в 3 полях зору при збільшенні ×400. У разі гетерогенності пухлини обиралися ділянки з найбільшим забарвленням.

Оцінка та інтерпретація результатів ІГХ на HER2 проводилися на підставі наступних умов. HER2-статус оцінювали тільки в інвазивному компоненті пухлини. Рак in situ оцінці не підлягав, оскільки подібні структури часто відрізняються різко вираженою позитивною реакцією. Оцінювали тільки фарбування мембрани клітин, цитоплазматичне забарвлення оцінці не підлягало. Проводилось обов'язкове порівняння інтенсивності забарвлення пухлинних і нормальних структур. При яскраво вираженій реакції в нормальних структурах, HER2-статус не оцінювався.

Контролем для кожного циклу ІГХ була нормальна тканина молочної залози.

Оцінку експресії проводили відповідно до протоколу оцінки біомаркерів у зразках, отриманих від пацієнтів з раком грудної залози Американського Коледжу

Патологів (CAP, USA) з урахуванням вимог чек-листу акредитаційної програми CAP 2018 та рекомендацій CAP/ASCO щодо оцінки HER2 [223].

Результати ІГХ-реакції оцінюються за допомогою бальної шкали оцінки 0, 1+, 2+, 3+. Оцінка проводилася з використанням світлового мікроскопа при збільшенні об'єктива 10х і лише в прикордонних випадках 1+/2+ – об'єктива 20х. Пухлини, оцінені як ІГХ 0 або ІГХ 1+ вважаються HER2-негативними, пухлини оцінені як ІГХ 3+ вважаються HER2- позитивними, пухлини, оцінені як ІГХ 2+ мають невизначений HER2-статус і вимагають застосування додаткових методів дослідження, таких як гібридизація in situ. В даний час в якості прикордонного значення для оцінки ІГХ 3+ прийнято однорідне виражене мембранне забарвлення більше 10% клітин інвазивного компоненту пухлини. Ці дані відповідають клінічному трактуванню або значенню результатів ІГХ при РМЗ.

Гістологічний ступінь G РМЗ базується на оцінці утворення канальців/проток, розмірі ядер і їх плеоморфізмі та мітотичній швидкості. Система балів застосовується, коли кожній ознаці привласнюється оцінка від 1 до 3.

Формування тубул: оцінка 1 >75% пухлини складається з тубулярних структур; оцінка 2 – 10-75% пухлини складається з тубулярних структур; оцінка 3 <10% пухлини має тубули.

Розмір ядер: оцінка 1 – маленькі однорідні ядра, схожі на ядра нормального протокового епітелію; оцінка 2 – ядра середнього розміру; оцінка 3 – більше ніж удвічі перевищують розмір нормальних ядер.

Кількість мітозів: оцінка 1 – 0-7 мітозів на 10 полів зору великого збільшення; оцінка 2 – 8-14 мітозів на 10 полів зору великого збільшення; оцінка 3 – більше 15 мітозів.

Підсумкова гістологічна оцінка оцінюється із суми всіх трьох. Бали від 3 до 5 = добре диференційовані (І ступінь); оцінка 6 або 7 = помірно диференційована (ІІ ступінь); і оцінка 8 або 9 = погано диференційована (ІІІ ступінь). Ядерні особливості оцінюються в районі з найбільшим плеоморфізмом. Ядра пухлини порівнюються з ядрами нормальних клітин протокового епітелію в сусідній тканині молочної залози. Ядра підрозділяються на три категорії: 1) ядра низького

ступеню (оцінка 1) невеликі, рівномірні та порівнянні за розмірами з нормальними протоковими епітеліальними клітинами. Хроматин рівномірно дипергований, а ядерця явно непомітні; 2) ядра проміжного ступеня (оцінка 2) у півтора- два рази більше від нормальних епітеліальних ядер; виявляють від легкого до помірного плеоморфізму та невеликі крапкові ядерця; 3) ядра високого ступеня (оцінка 3) мають більш ніж удвічі більший розмір; відзначається ядерний плеоморфізм, везикулярний хроматин та виразні ядерця.

2.5 Імуногістохімічне визначення та оцінка CD68+ та CD163+ клітин.

Проводили за допомогою стрептавідин-пероксидазного методу. Парафінові зрізи товщиною 4-5 мкм, отримані за стандартною технікою автоматизованого циклу патолого-анатомічної лабораторії, депарафінували шляхом занурення у три послідовних посудини з ксилолом на 5 хв., потім у три посудини зі 100˚ спиртом, по 2 хвилини, двічі у 96˚ спирти також по 2 хв., у 70˚ спирт – на 2 хв. і дистильовану воду – також на 2 хв.

Наступним кроком відновлювали антигени у цитратному буфері (pH 6,0) у мікроволновій печі (при потужності ≈600 Вт, 3 цикли по 7 хв. з перервою 1 хв.), охолоджували 20 хв., відмивали у дистильованій воді двічі по 1 хв., та фосфатно-сольовому буфері (ФСБ, pH 7,2-7,4) – 2 хв.

Далі блокували ендогенну пероксидазу реактивом з набору PolyVue HRP/DAB Detection System (For Mouse & Rabbit Primary Antibodies, Diagnostic BioSystems, USA), наносячи 2 краплини на зріз – 5 хв., та відмивали у ФСБ, у трьох послідовних ємностях по 1 хв.

Після чого на парні зрізи наносили мишачі моноклональні антитіла анти-CD68 готові до використання (клон PG-M1, REF PD M065-S, Diagnostic BioSystems, USA) і анти-CD163 (клон 10D6, REF Mob460-01), у розведенні 1:100 у буфері для розведення антитіл (Antibody Diluent, Dako, USA), та інкубували при температурі 4˚C протягом ночі.

Наступним кроком препарати відмивали у ФСБ у трьох послідовних посудинах по 1 хв., та обробляли зрізи 10 хв. нанесеною краплиною реагенту

Polymer penetration Enhancer з набору Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB Detection System (Diagnostic BioSystems, USA) у вологій камері при кімнатній температурі. І знову відмивали у ФСБ тричі по 1 хв.

Далі на зрізи наносили реактив PolyVue HRP Label anti-mouse (Diagnostic BioSystems, USA) на 10 хв., помістивши їх у вологу камеру при кімнатній температурі. І відмивали у ФСБ тричі по 1 хв.

Наступний етап був нанесення проявочного субстрату-хромогену на основі діамінобензидину – DAB stable/Plus, приготованого ex tempore, також з набору реагентів Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB Detection System, витримували 10 хвилин у вологій камері у темряві. Відмивали препарати у трьох послідовних посудинах дистильованої води по 1 хв.

Для контрастування препаратів, їх дозабарвлювали гематоксиліном Майєра – експозиція 2 хв., промивали дистильованою водою, проявляли у ФСБ 3 хв. і піддавали дегідратації, витримуючи по 2 хвилини у послідовних ємностях з 40° спиртом, 70° спиртом, 96° спиртом і двох ємностях з ксилолом. Після чого заключали під покривне скло у кедровий бальзам для оцінки під мікроскопом.

Буфер Antibody Diluent замість первинних антитіл використовували як негативний контроль, тканини лімфовузлів – як позитивний.

Оцінку ІГХ забарвлення проводили шляхом підрахунку CD68+ ПАМ і CD163+ М2-подібних ПАМ під світловим мікроскопом (Біолам, ЛОМО, Росія: об’єктив ×40, окуляр ×7) у 5-17-ти послідовних полях зору кожного зрізу (в залежності від площі зразку), у межах пухлини (а саме, в пухлинних гніздах/кластерах та у пухлинній і навколо пухлинній/перитуморальній стромі).

У підрахунок включали імунопозитивні клітини з морфологією макрофагів.

Мікрофотографії отримували за допомогою мікроскопу Leica DM500, Leica, Германія, зб.×280, 400).

Раніше у публікаціях повідомлялось про різну значимість кількості ПАМ, локалізованих у різних відділах РМЗ, зокрема, окремо в стромі, та їх взаємозв'язок з прогнозом [224,225]. Але при обчисленні окремо в різних ділянках пухлини необхідно виміряти відносний об'єм певних структур на зрізі, що вимагає

додаткових зусиль є досить трудомістким і не дає на практиці швидких результатів [226]. Такий підхід не забезпечить точну репрезентацію клітин, принаймні, через різну кількість міжклітинної речовини в різних ділянках пухлинної строми. Крім того, на деяких ділянках неможливо точно встановити у якій саме структурі: сполучній тканині або паренхімі пухлини, локалізовані імунопозитивні клітини, при ІГХ-дослідженні, оскільки контрастування гематоксиліном забарвлює лише ядра. Розрахунок імунопозитивних макрофагів по відношенню до кількості клітин або ядер у деяких ділянках ділянок також має певні неточності, оскільки розміри атипових клітин відрізняються навіть у межах одного зразка. До того ж, клітинна інфільтрація нагадує структуру тканини. З іншого боку, ПАМ є представником господаря-макроорганізму, і сполучна тканина забезпечує шляхи їх проникнення в пухлину, тому ПАМ обов'язково присутні в цій області. Проте, у ряді зразків ми виявили ділянки пухлинних комплексів (разом із сполучною тканиною), де ПАМ були відсутні або поодинокі (показано в розділі «результати»). Тому був обраний спосіб підрахунку імунопозитивних клітин – на всьому полі зору максимального збільшення (аналогічно до способу підрахунку кількості мітозів пухлини для визначення її G-ступеня).

2.6 Статистичний аналіз.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 5.

При порівняння між групами використано непараметричний метод Манна-Уітні. При порівнянні кількісних показників макрофагів між первинним вогнищем і метастазом використано парний метод Вілкоксона для залежних перемінних.

Для встановлення зв’язків між кількісними показниками CD68+, CD163+ макрофагів та клінічними трактовками ER, PR, Ki67, G-ступенем, а також для перевірки можливих кореляційних відносин між кількісними характеристиками макрофагів у первинній пухлині та у відповідному метастазі, використовували

статистичний метод непараметричної кореляції Спірмена, а також параметричної кореляції Пірсона й лінійну регресію (при нормальному розподілі).

Для оцінки співвідношення CD68+/CD163+ використано T-тести для залежних перемінних та перевірено кореляції між кількісними показниками.

Для емпіричної оцінки змін кількісних показників у групах використано серію комп’ютерних симуляцій у якості моделювання, які забезпечують наближення до справжнього розподілу, що лежить в основі статистики. Використано стандартне відхилення та значення середнього, отримане при обробці вихідних даних, стандартну похибку визначали, приймаючи розподіл Гауса (n=100).

При оцінці виживаності використано статистичний метод порівняння пропорцій □^{2}-теста, або точний критерій Фішера (для умов коли мінімальне значення у пропорціях не досягає 5). Загальну виживаність оцінювали за допомогою статистичного методу Каплан-Майєра.

Значення $p \leq 0{,}05$ вважали статистично значущими для всіх аналізів.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Демографічні та клініко-лабораторні характеристики учасниць дослідження.

Було опрацьовано 250 історії хвороби. Для поглибленого вивчення вибрано 90 пацієнток (перша N0 група – 46 пацієнток, друга N1 група – 44 пацієнтки) та проведено імуногістохімічне дослідження 245 зразків мікропрепаратів, з яких для дисертаційної роботи обрано 101.

Середній вік пацієнток становив 60 років, від 28 до 79. У першій групі – 60 років, від 28 до 79; у другій – 59, від 30 до 76.

Деталізація розподілу пацієнток на групи дослідження згідно віку: умовно до менопаузи і 2 періоди після, наведена у таблиці 3.1, з якої видно, що групи були врівноважені за віком.

Таблиця 3.1

Розподіл хворих за віком на 2 групи дослідження

Вікові періоди в роках	Перша група, N0 (n=46)	Друга група, N1 (n=44)
28-49	12	6
50-69	28	29
> 70	6	9

Нелюмінальний HER2+ тип РМЗ мали 4 особи віком 50-69 років, і по три особи – з інших двох вікових категорій (n=18). Люмінальний А тип РМЗ мав ідентичний розподіл за віком (n=18). Люмінальний В тип мали 21 особа віком 50-69 років, і 9 та 6 – з інших вікових категорій, молодшої і старшої відповідно (n=36). Тричі негативний тип РМЗ (ТН РМЗ) мали 15 осіб віком 50-69 років, і три особи старше 70 років (n=18). Отже, більшість хворих з усіма молекулярно-біологічних типами РМЗ потрапляли у вікову категорію 50-69 років.

Визначення гістологічного варіанту пухлин показало, що рак неспецифікованого типу зустрічався у 72 (80 %) хворих, часточкового типу у 6

(6,67 %), часточково-неспецифікованого типу 3 (3,3 %), муцинозного типу 3 (3,3 %) і рак Педжета у 6 (6,67 %).

Аналіз стадій РМЗ у учасниць дослідження показав перевагу IIB (табл. 3.2)

Таблиця 3.2

Розподіл хворих на злоякісні новоутворення молочної залози за стадією захворювання

Стадія	TNM	Кількісний розподіл хворих
I	T1N0M0	24
IIA	T1N1M0 T2N0M0	21
IIB	T2N1M0	42
IIIA	T2N2M0	3
Всього хворих:		30

Високодиференційований (G1) РМЗ діагностовано в 6 з 90 пацієнток (6,7 %), помірно диференційований (G2) – у 54 (60 %), низькодиференційований (G3) – у 30 (33,3 %) випадках. Наступна таблиця 3.3 підсумовує результати визначення і відповідність підгрупам типів РМЗ учасниць дослідження.

Таблиця 3.3

Індивідуальні дані і розподіл пацієнток на групи та підгрупи за молекулярно-біологічним типом і G ступенем пухлини

Підгрупи дослідження	Перша група, N0					Друга група, N1				
	ER	**PR**	**HER2**	**Ki67**	G	**ER**	**PR**	**HER2**	**Ki67**	G
	%					%				
Нелюмінальний HER2+	0	0	90	40	2	0	0	90	10	2
	0	0	40	60	2	0	0	90	55	3
	0	0	90	0	3	0	0	90	0	2
Люмінальний А	100	100	0	20	2	98	91	26	11	2
	100	0	0	10	1	100	100	0	1	1
	100	100	0	10	2	100	100	0	5	2
Люмінальний В HER–	90	60	0	40	2	100	100	0	30	2
	100	80	0	30	2	100	80	0	40	2
	100	100	30	0	2	90	15	0	40	3

Продовження таблиці 3.3

Люмінальний В HER+	80	80	70	15	2	40	5	40	30	2
	30	30	90	0	2	100	20	90	0	3
	90	90	90	0	2	90	90	90	0	3
Потрійно-негативний	0	0	0	20	2	0	0	0	80	3
	0	0	0	80	3	0	0	0	75	3
	0	0	0	8	3	0	0	0	80	3

Отже, учасниці дослідження були стратифіковано рандомізовані на 2 групи дослідження за віком, верифікованим молекулярно-біологічним типом пухлини, TNM стадією пухлини та її G ступенем, відсутністю (перша група) та наявністю (друга) метастазів в регіональні лімфовузли.

3.2. Порівняння кількісних показників CD68+ та CD163+ клітин у первинних РМЗ між першою N0 групою і другою N1 групою.

У підрозділі представлені результати порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ клітин первинного вогнища в залежності від метастазування у пахвові лімфатичні вузли між двома врівноваженими групами: перша n=46 та друга n=44.

Підрахунок імунопозитивних клітин проводили, як описано у підрозділі 2.5, для статистики використовували дані з усіх полів зору. Середні кількісні показники для кожної групи подані у вигляді медіани та інтерквартильного інтервала (IQR) (табл. 3.4), що обґрунтовано асиметричним, скошеним вправо, розподілом варіаційних рядів (рис. 3.1). (IQR показує середні 50% значень вибірки і дозволяє описати розмах варіацій при асиметричному розподілі без впливу екстремальних значень). Як видно з таблиці, найбільший IQR для CD68+ клітин у другій групі, N1, відображає найширшу варіабельність кількісних показників (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Середні кількісні показники CD68+, CD163+ клітин первинного вогнища РМЗ

	Перша N0 група		Друга N1 група	
	Медіана	IQR	Медіана	IQR
CD68+ клітини	7	8	9	15
CD163+ клітини	4	5	3	6

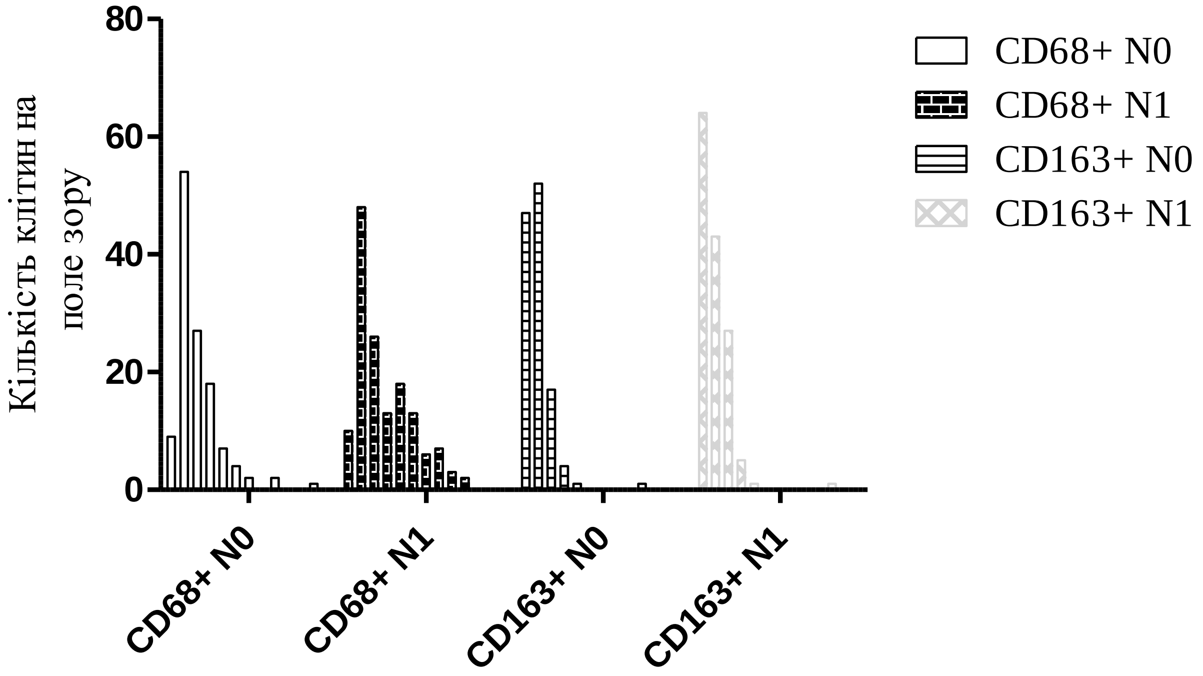


Рис. 3.1. Гістограма розподілу кількісних показників імнопозитивних клітин по частоті.

Результати статистичної обробки *середніх* кількісних показників CD68+ клітин, CD163+ клітин та пропорцій CD68+/CD163+ між групами не досягали достовірних відмін (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Порівняння *середніх* кількісних показників CD68+, CD163+ та їх пропорцій між групами N0 та N1

Показники	Достовірність, p (тест Манна-Уітні)
CD68+ N0 проти CD68+ N1	0,36
CD163+ N0 проти CD163+ N1	0,58
CD68+/CD163+ N0 проти CD68+/CD163+ N1	0,93

Але, при порівнянні підрахованих *даних з усіх полів зору*, яких було 5-17 для кожного препарату, встановлено достовірно більше CD68+ клітин у другій N1 групі з метастазами (рис. 3.2). Співвідношення CD68+/CD163+ в обох групах характеризувалося достовірною перевагою CD68+ клітин, p<0,0001 (рис. 3.2).

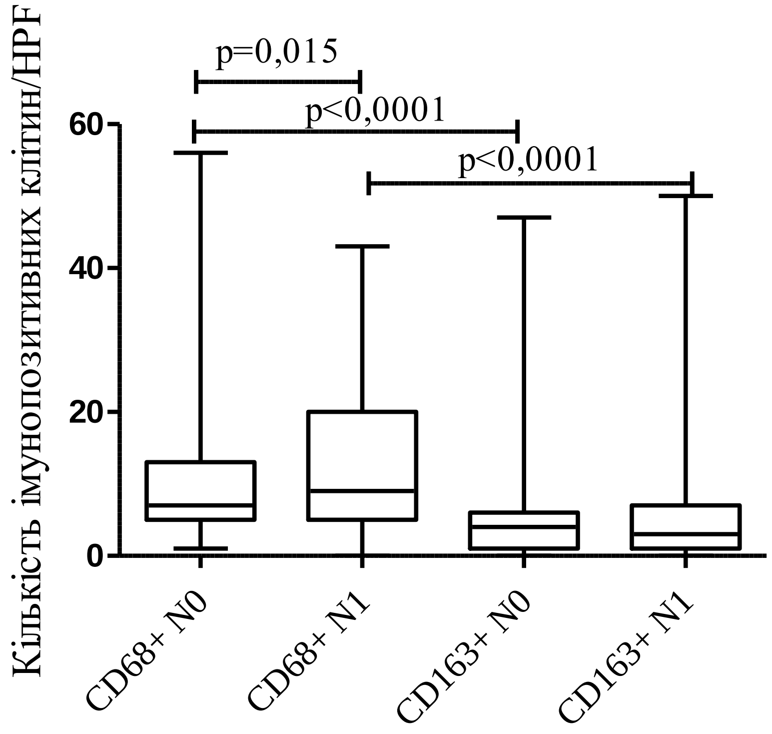


Рис. 3.2. Порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ клітин первинного РМЗ двох груп дослідження: N0 і N1. Методи Манна-Уітні та Вілкоксона (для порівняння CD68+ і CD163+ клітин в межах групи); HPF – поле зору зб.×280.

Достовірні кількісні зміни CD68+ клітин між групами виявлені непараметричним методом, IQR, який становив 15 для CD68+ клітин другої групи показав великий розкид варіації, а розмах кількісних результатів (від 0 до 43) відображає високу імовірність екстремальних значень.

Отже, основним результатом є збільшення кількісних показників CD68+ ПАМ у первинних вогнищах РМЗ за умов метастазів у іпсилатеральних пахвових лімфатичних вузлах [227].

Оскільки для кожного зразку РМЗ визначали молекулярно-біологіний тип за ІГХ характеристики, включаючи Ki67 та G-ступінь, було проведено статистичну

перевірку їх кореляційних взаємовідносин із середніми кількісними показниками CD68+, CD163+ ПАМ та із пропорціями цих клітин всього масиву пацієнтів, без розподілу на групи та підгрупи (n=90). Встановлено достовірність між кількісними показниками CD68+ клітин та Ki67, вираженому у відсотках, та між експресією ER та PR (у клінічній трактовці: позитивна(+) або негативна(–) і CD68+, CD163+, але не пропорцією CD68+/CD163+ (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Кореляційні зв'язки між середніми кількісними показниками CD68+, CD163+ ПАМ, CD68+/CD163+ пропорцією ПАМ та ІГХ характеристиками РМЗ і G-ступенем (аналіз загального масиву учасниць, групи N0+N1)

Пари для перевірки кореляційних відносин	Коефіцієнти кореляції Спірмена/Пірсона	Достовірність
CD68+ та: ER, PR, HER2, G	-0,24; -0,20; -0,28; 0,14	p>0,05
CD68+ та Ki67 (%)	0,38	p=0,04*
CD68+ та ER/PR (клінічне трактування)	-0,42	p=0,02*
CD163+ та ER/PR (клінічне трактування)	-0,47	p=0,009*
CD163+ та: ER, PR, HER2, Ki67, G	-0,33; -0,33; -0,15; 0,20; 0,14	p>0,05
CD68/CD163 та: ER, PR, HER2, Ki67, G	-0,01; 0,06; -0,16; 0,13; -0,08	p>0,05

Встановлені прямі достовірні кореляційні взаємозв'язки між кількістю CD68+ клітин і Ki67, і зворотні кореляційні зв'язки між кількостями CD68+, CD163+ клітин та ER/PR у клінічному трактуванні (див. розд.2) [227].

Виявлені закономірності відносяться до суто пухлинного процессу РМЗ та не мають впливу попереднього лікування, оскільки його розпочинали з оперативного втручання.

3.3. Якісна та кількісна оцінка CD68^{+} та CD163^{+} клітин первинного вогнища люмінальних типів РМЗ з метастазами та без метастазів.

У наступних підрозділах 3.3-3.5 проаналізовано зокрема кількісні характеристики CD68+ та CD163+ клітин в залежності від молекулярно-

біологічних типів РМЗ. Додаткове обґрунтування такого підходу отримано у вигляді достовірних кореляційних зв'язків між кількістю CD68+ клітин і Ki67, і зворотних – між кількостями CD68+, CD163+ клітин та ER/PR, як описано у підрозділі 3.2. Люмінальні типи РМЗ демонструють експресію ER/PR та розподілються на A і B в межах молекулярно-біологічної класифікації. Наводимо результати вивчення кількісних і якісних показників CD68+ та CD163+ клітин відповідно до люмінальних підтипів пухлин і наявності/відсутності метастазів, що має покращити сутність їх діагностичного й патогенетичного значення.

Зразки люмінальних A і люмінальних B РМЗ без метастазів (n=10) і з метастазами (n=10) охарактеризовані: за морфотипом інвазивного росту, особливостями строми (фіброзна, десмопластична, жирова (при інвазії в жирову тканину) та рихла васкуляризована), рівнем лімфоїдної інфільтрації (високий, помірний, слабкий); наявності некротичних осередків (так/ні); ознаками лімфоваскулярної інвазії (пухлинні емболи) (так/ні).

Кількісні показники CD68+ і CD163+ клітин рахували, як описано у підрозділі 2.5, але розподіляли на 3 категорії щільності інфільтрації: низький рівень (до 10 клітин на поле зору), помірний (10-15 клітин) та високий (>15) (для зручності статистичної кореляції). Описували характер розподілу на зразках: локалізація у стромі, гніздах, осередках некрозу, відділах інвазії у жирову тканину; співлокалізацію CD163+ з CD68+. Підсумовані патоморфологічні риси співставляли за допомогою кореляційного статистичного аналізу з кількісними показниками CD68+ і CD163+ клітин.

Зв'язки між рівнями ІГХ-реакції на ER, PR, Ki67, та ступенем G статистично перевіряли на повному масиві зразків люмінальних підтипів РМЗ, без розподілу на підгрупи (n=58).

Позитивна CD68+ та CD163+ ІГХ-реакція спостерігалася по контуру цитоплазми або по всій клітині, рівномірно та/або у вигляді коричневої крапчастості. Імунопозитивні клітини розташовувалися у вигляді скупчень та рівномірно. Представництво імунопозитивних клітин у полі зору мікроскопу залежала від патогістологічних особливостей зразку РМЗ.

Висока експресія ER+ у поєднанні з негативною експресією HER2, визначала люмінальне А походження зразків. Гістологічними рисами підгрупи були належність до інвазивної протокової карциноми з високим та помірним (G 1-2) ступенем диференціювання, наявність фіброзної та масивної десмопластичної строми. Але спостерігалися різні морфологічні особливості пухлин і різний рівень лімфоїдної інфільтрації.

CD68+ клітини розміщувалися по-різному, але у стромі їх присутність була більш регулярна (рис. 3.3), ніж у пухлинних гніздах (відмічена більша чи менша площа гнізд без цих клітин) (рис. 3.4).

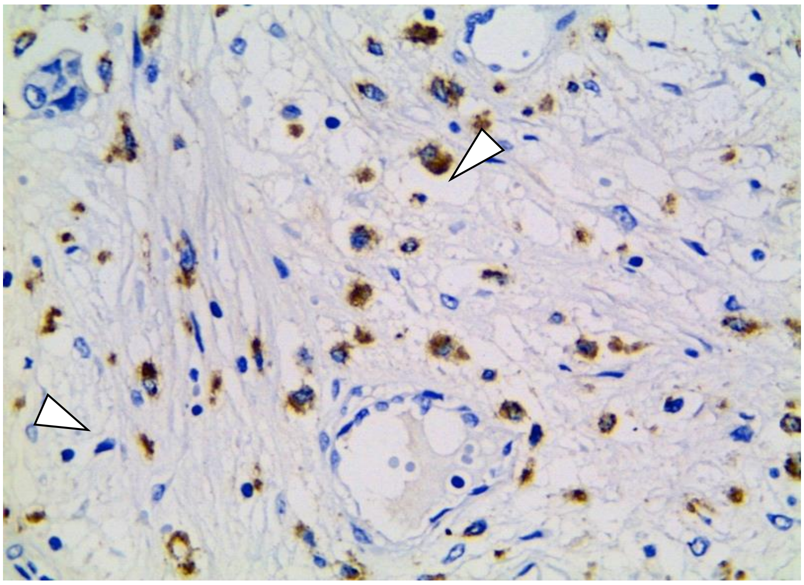


Рис. 3.3. Високе представництво CD68+ клітин (стрілки) у стромі. Біоптат РМЗ люмінального А типу (ER+ PR+ HER2– Ki67–; G2) групи N1; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40.

CD163+ клітини місцями повторювали локалізацію загальної фракції макрофагів, співпадаючи у десмопластичних відділах строми (рис. 3.3, 3.5) у периферичних жирових ділянках (рис. 3.6, 3.7) і та в деяких гніздах (у меншій кількості), та утворюючи «другу лінію інфільтрації» у стромі, на відстані від гнізд.

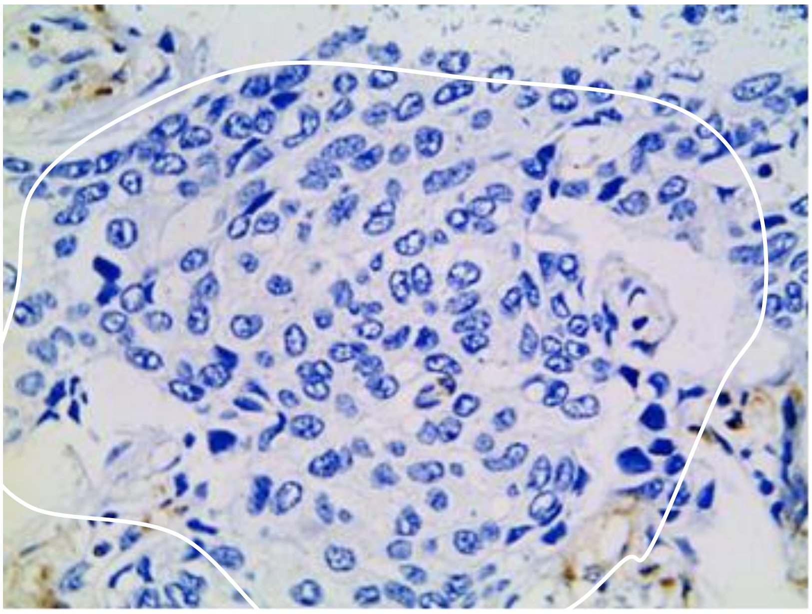


Рис. 3.4. Гнізда пухлини без CD68+ клітин (окреслено). Біоптат РМЗ люмінального А типу (ER+ PR+ HER2– Ki67–; G2) групи N1; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40.

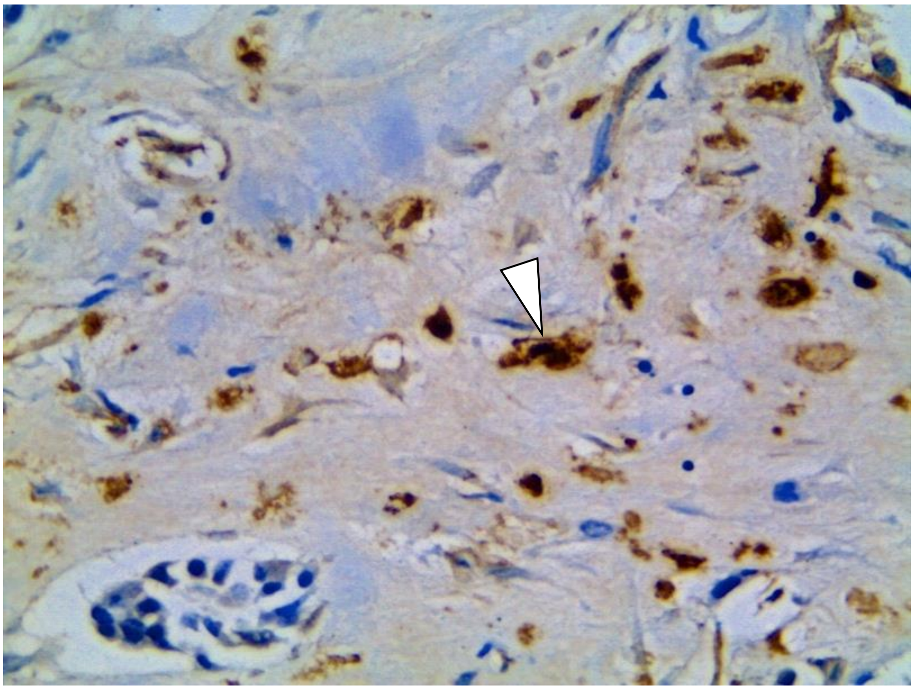


Рис. 3.5. CD163+ клітини у вигляді скупчень (стрілка) зосереджені в десмопластичній стромі. Біоптат люмінального А РМЗ групи N1; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40.

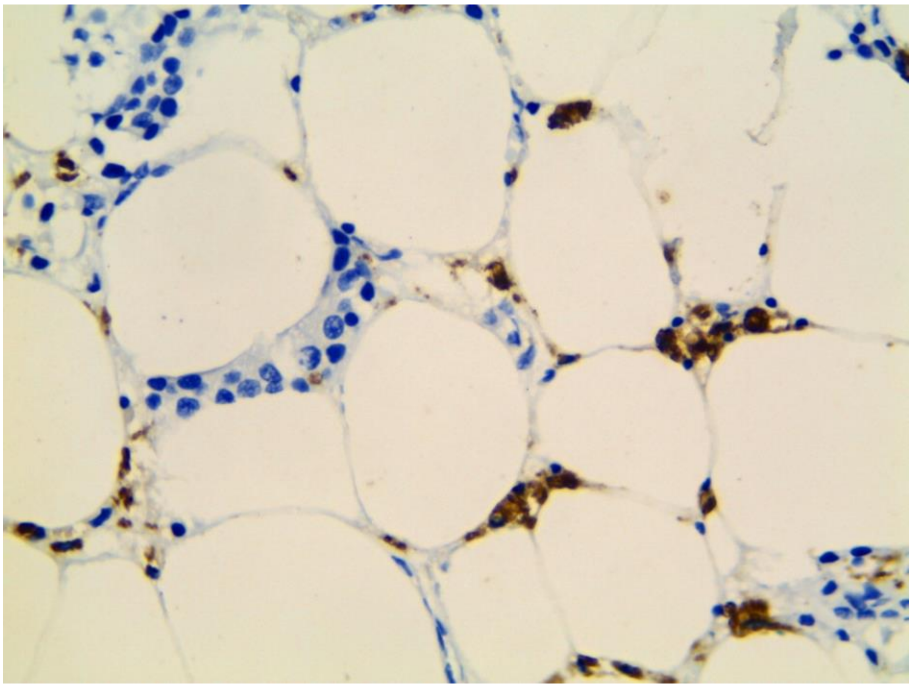


Рис. 3.6. CD68+ клітин у жировій периферичній стромі люмінального А РМЗ групи N0; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40.

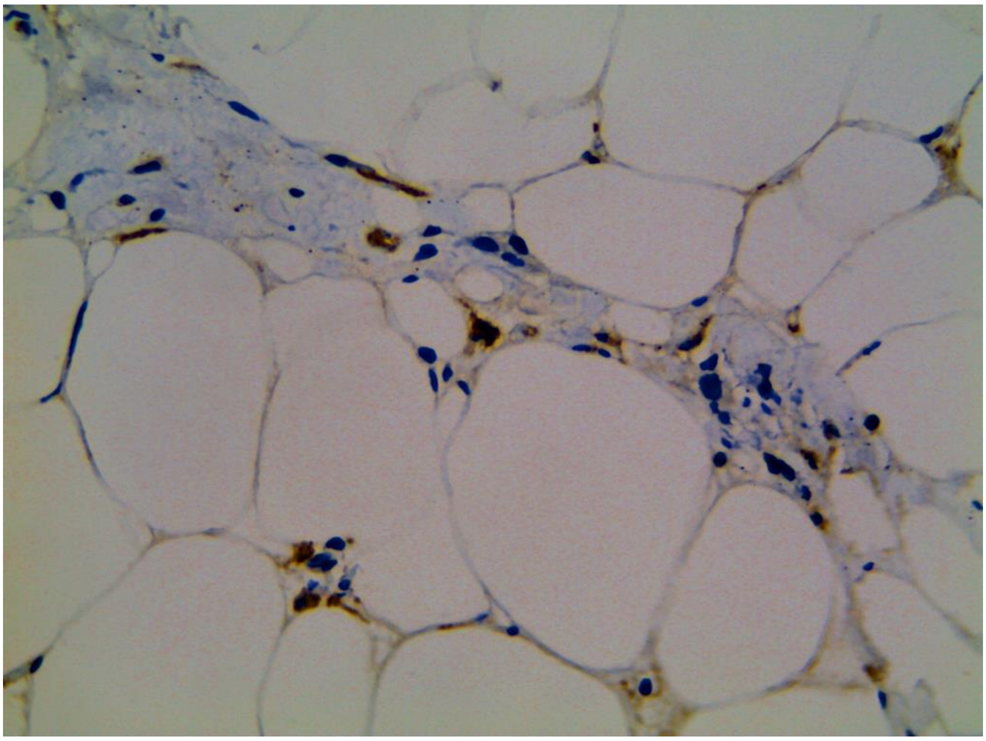


Рис. 3.7. CD163+ клітини, співлокалізовані із CD68+ клітинами у жировій периферичній стромі люмінального А РМЗ групи N0; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40.

У некротичних гніздах відзначена солокалізація лише поодиноких CD163+ з CD68+ клітинами. Отже, у ділянках некрозу чи навколо них зазвичай виявляється висока присутність CD68+ клітин, і їх перевага над CD163+ клітинами.

Повні результати по кожному зразку наведені у таблиці 3.7 для двох груп люмінальний А тип РМЗ.

Таблиця 3.7

Характеристики CD68+ та CD163+ клітин у відповідності до патогістології і характеристик зразків підгруп люмінального А РМЗ першої N0 і другої N1 груп дослідження

Патогістологічний опис						Характеристики імунопозитивних клітин		
Перша N0 група, люмінальний А тип (ER+ PR+/– HER2– Ki67+/–)								
Морфо тип, ІГХ-характеристика зразку	G	Строма	Лімфоїдна інфільтрація	Осередки некрозу	Лімфоваскул. інвазія	**Щільність CD68+ / CD163+клітин, середня кількість на HPF**	Локалізація CD68+ / CD163+клітин	Солокалізація CD68+ і CD163+клітин
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ІПКа ацинарн, солід та криброзн буд ER-100% PR-100% Ki67-20%	2	Фіброзна, фіброзно-жирова, ділянки десмопласичної	Висока	+	-	16,5 висока/ 7,4-низька	Осередки у стромі, жировій, та на фоні пухлинних гнізд	Осередки у стромі по периферії пухлини і «друга лінія»; у ділянці некрозу
Муцинозна ІПКа ER-100% PR-0 Ki67 -10%	1		Низька	-	-	8,8 низька/ 4,3 низька	≈Рівномірно, у стромі та гніздах (рис.)	По периферії пухлини, на межі із жировою та в жировій тканині
ІПКа з лобулярним зразком росту ER-100% PR-100% Ki67-10%	2		Висока	-	-	14,1 помірна/4,9 низька	Скупчення в стромі, жировій (рис.)	У фіброзній стромі, місцями у фіброзно-жировій, і в деяких гніздах
Друга N1група, люмінальний А тип (ER+ PR+ HER2– Ki67–)								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ІПКа солідної будови ER-98% PR-91% Ki67-26%	2	Фіброзна, жирова, десмопластична	Помірна	–	–	9,2 низька/2,9 низька	≈Рівномірно	Скупчення в стромі (10-15), поодинокі на фоні гнізд
ІЛКа ER-100% PR-100% Ki67-1%	1	Фіброзна, десмопластична	Помірна	+	–	23,1 висока/1,7 низька	≈Рівномірно, здебільшого у стромі, в ділянках некрозу	Скупчення в стромі та жировій; поодинокі у гніздах та некротичних ділянках

Продовження таблицы 3.7

ІПКа солідної будови ER-100% PR-100% Ki67-5%	2	Десмопластична, масивна	Помірна	+	–	8 низька/4,7 низька	Нерівномірно, скупчення в стромі, в ділянках некрозу	Скупчення в масивній стромі (до 40 клітин) та ділянках некрозу, поодинокі в гніздах

Примітки. Тут і далі: ІПКа – інвазивна протокова карцинома; ІЛКа – інвазивна лобулярна карцинома; ≈ – наближено; HPF – high-power field; поле зору максимального збільшення об'єкта при мікроскопії і підрахунку клітин, у нашому дослідженні зб.×280.

При порівнянні люмінальних А підгруп (табл. 3.7) за ознакою N0/N1 різких відмінностей не відзначено, хоча чисельність М2 при N0 була *незначно вищою* (7,4; 4,3; 4,9), порівняно з N1 (2,9; 1,7; 4,7), щоправда, це не досягало статистичної достовірності.

До люмінального В HER2– РМЗ зразки відносили за спільними ознаками – знижена експресія PR, та підвищена Ki67, або дещо підвищена експресія HER2. Гістологічні особливості досліджених біоптатів полягали у представництві відділів тонкої рихлої строми у частини зразків, без різниці порівняно між групами N0 та N1, (взагалі морфологія пухлин не мала видатних особливостей у зв’язку з метастазами). Різноманітність морфології за рахунок феномену лобулярної канцеризації додатково підтримує розуміння, що термінальна протоково-лобулярна субодиниця є джерелом походження багатьох внутрішньопротокових карцином [227].

При люмінальному В HER2– РМЗ з боку CD68+ клітин відзначена висока щільність інфільтрації у двох з трьох препаратів першої N0 групи і низька – у всіх препаратах другої N1. CD163+ клітин на всіх зразках було дуже мало – щільність інфільтрації низька в обох групах, а солокалізація відмічена у стромі, в зоні некрозів та, поодинока, у гніздах (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Характеристики CD68+ та CD163+ клітин у відповідності до патогістології і характеристик зразків люмінального В HER2– РМЗ першої N0 і другої N1 груп дослідження

Патогістологічний опис						Характеристики імунопозитивних клітин		
Перша N0 група, люмінальний тип В HER– (ER+ PR+ HER2– Ki67+/ –)								
Морфо тип, ІГХ-характеристика зразку	G	Строма	Лімфоїдна інфільтрація	Осередки некрозу	Лімфоваскул. інвазія	**Щільність CD68+ / CD163+клітин, середня кількість на HPF**	Локалізація CD68+ / CD163+клітин	Солокалізація CD68+ і CD163+клітин
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ІПКа з лобулярним зразком росту ER-90% PR-60% Ki67-40%	2	Рихла васкуляризована і фіброзна	Низька	-	-	5,5 низька/1 низька	≈ Рівномірно	У міждольковій фібозній стромі поодинокі
ІПКа ацинарно-солідної будови з елементами лобулярного росту ER-100% PR-80% Ki67-30%	2	Фіброзна, фіброзно-жирова	Висока	+	+	16,6 висока/1 низька	Осередки у стромі, некротичних ділянках, жировій	Рідкі осередки в стромі
ІПКа ацинарної та солідної будови Ki67 – ER-100% PR-100% Ki67-0% HER2-30%	2		Помірна	+	-	16,9 висока/1 низька	Осередки у стромі, навколо некротичної ділянки, у жировій, рідко на фоні гнізд	Тільки побіля зони некрозу
Друга N1 група, люмінальний тип В HER– (ER+ PR+ HER2– Ki67+)								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ІПКа солідної будови ER-100% PR-100% Ki67-30%	2	Рихла, фіброзна й рубцева	Помірна	+	-	6,7 низька/1 низька	≈ Рівномірно у стромі, жировій, некротичних ділянках, поодиноко в гніздах	Тільки в стромі (поодинокі)
ІПКа солідної будови з лобулярним (кільцеклітинним) зразком інвазивного росту ER-100% PR-80% Ki67-40%	2	Фіброзна, фіброзно-жирова й рубцева у центрі	Низька	-	-	4,3 низька/1 низька	≈ Рівномірно у стромі, жировій, поодиноко в гніздах	В гніздах та стромі (поодинокі)
ІПКа трабекулярної будови ER-100% PR-15% Ki67-40%	3	Рихла і невелика діяка десмопластичної	Низька	-	-	8 низька/1 низька	≈ Рівномірно у стромі та гніздах	Поодинокі у стромі і по периферії гнізд

На всіх зразках люмінального В HER2+ РМЗ, морфологічно, була представлена інвазивна протокова карцинома в її варіаціях, не залежно від

метастазування. Зразки першої групи N0 обов'язково мали ділянки рихлої васкуляризованої строми в окремих пухлинних комплексах.

Особливість підгрупи люмінального B HER2+ N1 – ознаки лімфоваскулярної інвазії на всіх зразках (рис. 3.8: 1).

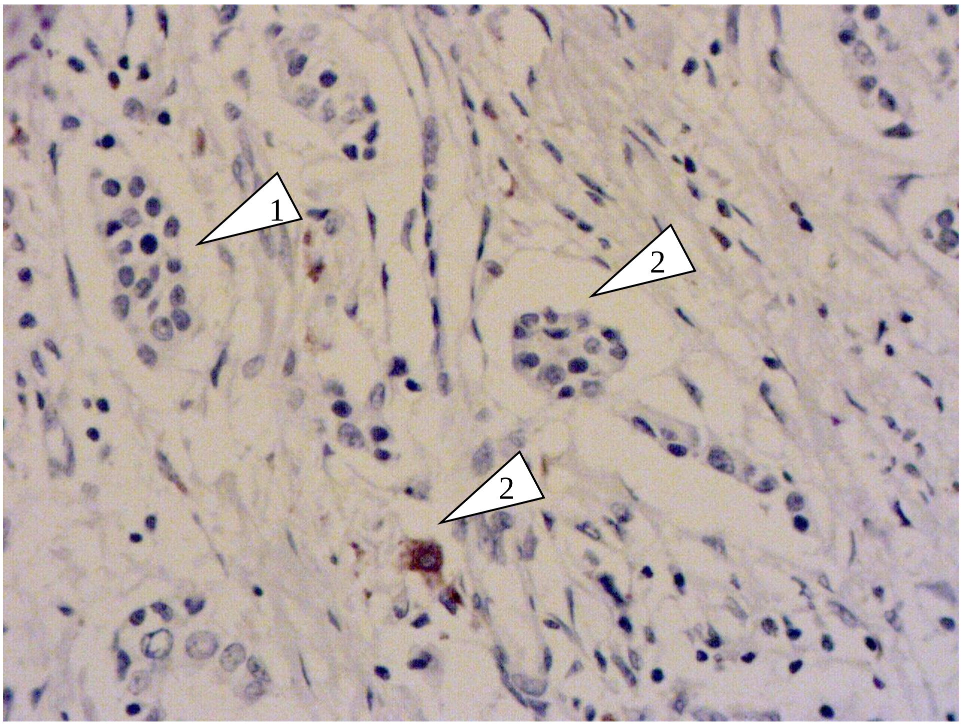


Рис. 3.8. CD68-забарвлення зразку люмінального B HER2+ РМЗ групи N1; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40:

1- лімфоваскулярна інвазія;

2- CD68+ ПАМ.

CD68+ клітини не невисокому рівні, але регулярно були присутні у різних відділах пухлин, хоча і нерівномірно (рис. 3.8: 2): низький рівень інфільтрації на всіх зразках (4,6; 6; 5,6 та 8,2; 2,5; 4,3).

CD163+ клітини дещо збільшуються за кількістю за умов метастазування (0-1 в N0 першій групі дослідження, і 3,4; 1,7; 3 – у N1 другій групі); розміщувалися тільки осередками (рис. 3.9): у стромі і некротизованих відділах, де їх чисельність часто майже співпадала з CD68+ клітинами. У гніздах виявлено поодинокі або були взагалі відсутні.

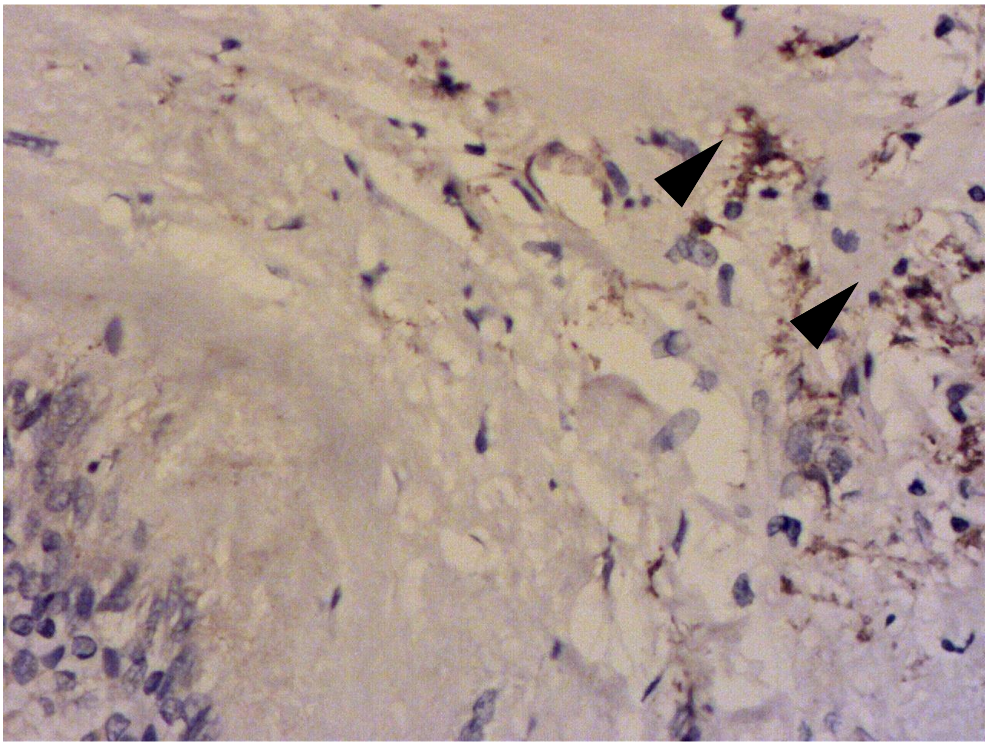


Рис. 3.9. Скупчення CD163+ ПАМ (стрілки) у зразку люмінального В HER2+ РМЗ групи N1; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40.

Описані результати підсумовані у таблиці 3.9.

Отже, морфологія люмінальних пухлин була дуже різноманітна, навіть в межах клінічно розсортованих вузьких типів.

Відносно винятковими патогістологічними характеристиками вирізнялися зразки люмінального В HER2+ РМЗ другої N1 групи, тобто при наявності метастазу у лімфовузлах, – виявлені ознаки лімфоваскулярної інвазії (рис. 3.8: 1).

З іншого боку, універсальними для всіх зразків люмінальних РМЗ були десмопластична реакція строми у вигляді рубцево-подібних її змін (у центральних відділах пухлини, на периферії, у міжкластерних перетинках), фіброзна, фіброзно-жирова строма (при інвазії у жирову тканину); певний рівень лімфоїдної інфільтрації (рис. 3.10: 2), осередки некрозів (рис. 3.10: 1), мікрокальцифікати.

Таблиця 3.9

Характеристики CD68+ та CD163+ клітин у відповідності до патогістології і характеристик зразків люмінального В HER2+ РМЗ першої N0 і другої N1 груп дослідження

Патогістологічний опис						Характеристики імунопозитивних клітин		
Перша N0 група, люмінальний тип В HER+ (ER+/знижений PR+/знижений HER2+ Ki67+/ –)								
Морфо тип пухлини	G	Строма	Лімфоїдна інфільтрація	Осередки некрозу	Лімфоваскул. інвазія	**Щільність CD68+ / CD163+клітин, середня кількість на HPF**	Локалізація CD68+ / CD163+клітин	Солокалізація CD68+ і CD163+клітин
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ІПКа солідно-альвеолярної будови ER-80% PR-80% Ki67-15% HER2 – 70%	2	Переважно фіброзна, є рихла	Помірна	+	-	4,6 низька/1 низька і осередки (8-10)	≈Рівномірно	У периферичній стромі та між альвеолярними кластерами
ІПКа колоїдної будови ER-50% PR-50% Ki67-0% HER2 – 100%	2	Фіброзна, десмопастична, є рихла	Виразна	+	-	6 низька/1 низька і осередки (5)	Скупчення у стромі, некротичних ділянках, жировій Поодинокі у гніздах	Навколо некрозів, у жировій
ІПКа ацинарно-солідної будови ER-100% PR-100% Ki67-0% HER2 – 100%	2	Рихла та фіброзна	Виразна	-	-	5,6 низька/1 низька і осередки (6)	Кілька скупчень у стромі, побіля гнізд	
Друга N1 група, люмінальний тип В HER+								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ІПка альвеолярної будови ER-40% PR-5% Ki67-30% HER2 – 40%	2	Фіброзна, жирова та десмлпластична	Виразна	+	+	8,5 низька/3,4 низька	Зосередження у жировій та некротичних ділянках	У жировій та десмопластичній стромі, поодиноко серед гнізд
ІПКа трабекулярної морфології ER-100% PR-20% Ki67-0% HER2 – 90%	3	Фіброзна і десмопластична	Виразна	+	+	2,5 низька/1,7 низька	Зосередження у некротичних ділянках та жировій тканині	Невеликі нерегулярні зосередження у стромі, серед лімфоїдних клітин
ІПКа трабекулярної морфології ER-100% PR-100% Ki67-0% HER2 – 100%	3	Десмопластична	Виразна	+	+	4,3 низька/3 низька	≈Рівномірно у стромі і прилягають до гнізд	Невеликі нерегулярні зосередження у десмопластичній стромі

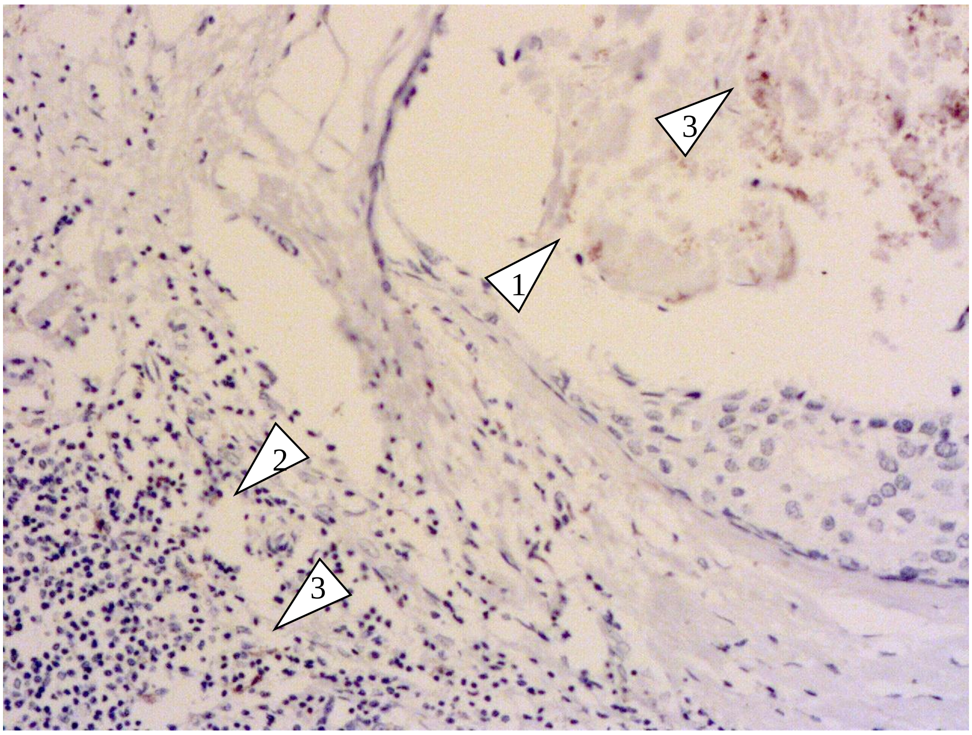


Рис. 3.10. CD68-забарвлення зразку люмінального B HER2+ РМЗ групи N1; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×20:

1 – зона некрозу;

2 – ділянка лімфоцитарної інфільтрації;

3 – CD68+ ПАМ (коричневе забарвлення).

Типова локалізація CD68+ клітин проявлялася у регулярній присутності у стромі на всіх зразках, часом з утворенням зосереджень та/або скупчень. Також, ці клітини розміщувалися у самих гніздах пухлин, або примикали до них, що спостерігалося із різною частотою на різних зразках (це залежало і від загальної чисельності), при цьому завжди відмічалася певна площа гнізд/або пухлинних комплексів без CD68+ клітин (рис. 3.4). Також, типово CD68+ клітини зосереджувалися у зонах некрозу чи навколо них (рис. 3.10: 3). Відповідно, співлокалізацію з CD163+ відмічено в периферичних жирових (рис. 3.6, 3.7) і десмопластичних відділах строми (рис. 3.5) та в деяких гніздах (у меншій кількості), у вигляді другої лінії інфільтрації у стромі (на відстані від гнізд).

Для опису ми наводимо зразок метастазу люмінальної A РМЗ у лімфовузол, щоб також відмітити співлокалізацію CD68+ та CD163+ ПАМ (рис. 3.11, 3.12):

останні солокалізуються з CD68+ у меншій кількості та/або зі слабшою імунореактивністю. На якому помітна також зміна патоморфології пухлини, порівняно з первинними вогнищами.

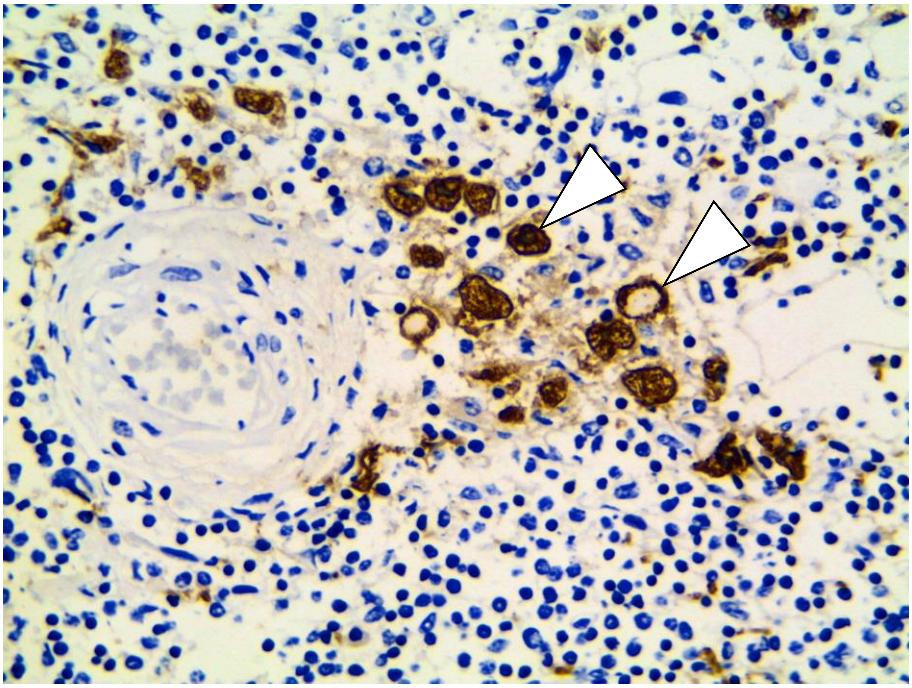


Рис. 3.11. CD68+ клітини зливної/вакуолізованої форми (стрілки) у метастазі лімфовузла люмінального А РМЗ групи N1; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40.

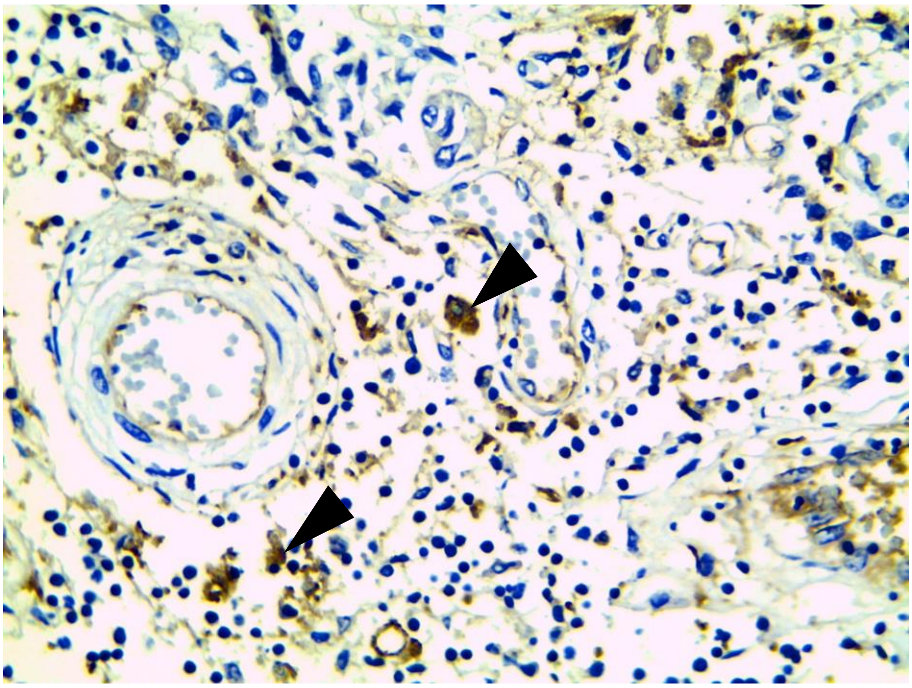


Рис. 3.12. CD163+ клітини регулярної форми (стрілки) у лімфовузлі з метастазом люмінального А РМЗ групи N1; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40.

Стосовно взаємозв’язків між патогістологічними ознаками люмінальних типів РМЗ і CD68+, CD163+ клітинами: кореляційний аналіз виявив зворотний достовірний зв’язок між середніми кількостями CD68+ клітин (але не CD163+) і G-ступенем пухлини, (табл. 3.10). Результати лінійної регресії трактуються наступним чином: зміни кількісних характеристик CD68+ клітин на 23% пояснюється G-ступенем, або при збільшенні G на одиницю, кількість CD68+ клітин знижується на 5±2,3 (p=0,046). Кореляційний аналіз між рівнями експресії ER, PR, Ki67 пухлинами і кількісними показниками CD68+ та CD163+ клітин не показав достовірності (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Результати лінійної регресії середніх кількостей CD68+, CD163+ клітин з G-ступенем, ІГХ-характеристиками зразків всіх люмінальних типів РМЗ

Середня кількість CD68+, CD163+ клітин / Ступінь та ІГХ-характеристика РМЗ	CD68+ клітини	CD163+ клітини
G-ступінь	-4,99 95% CI (-9,89, -0,10)*	0,25 (-0,03, 0,52)
Рівень експресії ER	0,04 (-0,06, 0,14)	0,001 (-0,005, 0,006)
Рівень експресії PR	0,05 (-0,02, 0,13)	9,684e-005 (-0,004, 0,005)
Рівень експресії Ki67	-0,05 (-0,24, 0,15)	-0,01 (-0,015, 0,005)

Примітки: *– достовірний взаємозв’язок; дані у таблиці – β-коефіцієнт і 95% конфіденційний інтервал (95% CI).

Загальний статистичний аналіз всіх люмінальних РМЗ не встановив відмінностей між кількісними показниками CD68+, і CD163+ ПАМ і їх співвідношенням в залежності від метастазування у лімфовузли (рис. 3.13), що може пояснюватися великим розмахом варіації.

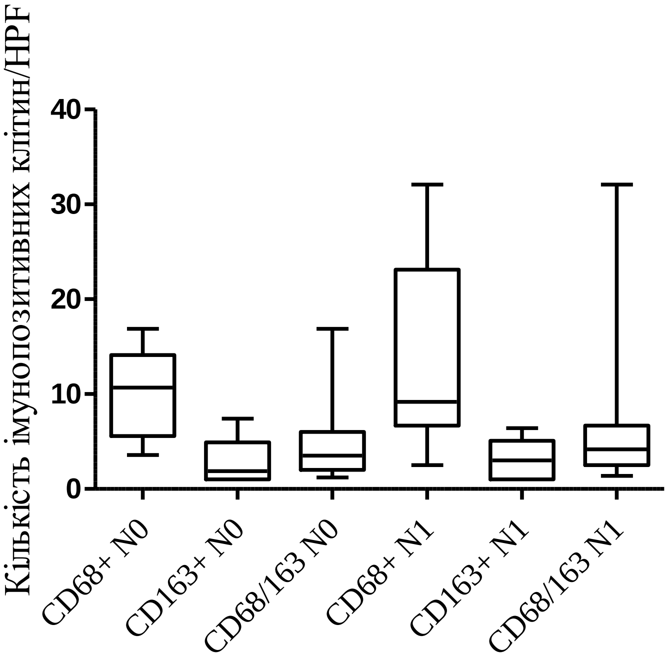


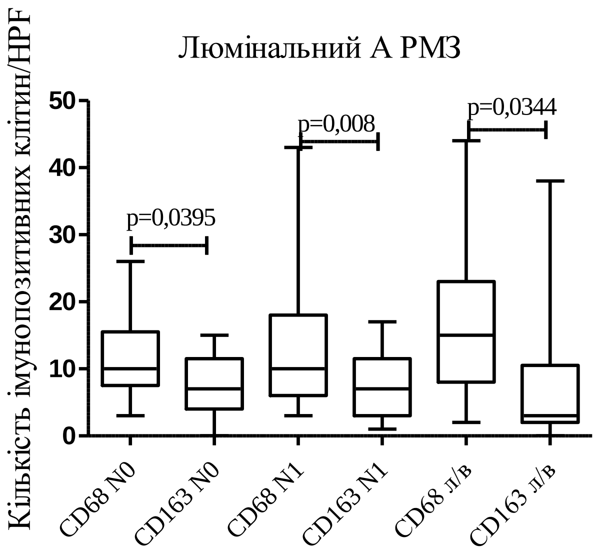
Рис. 3.13. Середні кількості CD68+ та CD163+ клітин та їх співвідношення при люмінальних типах РМЗ N0 та N1 груп. Т-тести не встановили достовірні відміни.

Аналіз індивідуальних середніх кількісних показників CD68+ клітин на кожному зразку перевищували CD163+. Всі досліджені зразки характеризувалися низьким рівнем інфільтрації CD163+ клітинами, однак саме їм були притаманні певні особливості в залежності від типів. По-перше, при люмінальному А середньо-арифметична кількість CD163+ клітин у групі N0 була дещо вищою (7,4; 4,3; 4,9/HPF), порівняно з N1 (2,9; 1,7; 4,7/HPF). По-друге, при люмінальному В HER2+ типі середні показники кількості CD163+ клітин, навпаки, збільшувалися за умов метастазування (0-1 клітина/HPF у першій групі N0, і 3,4; 1,7; 3/HPF – у другій N1 (табл. 3.9).

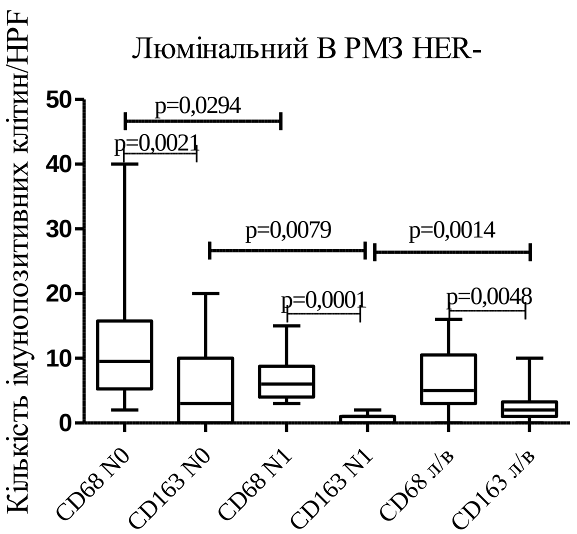
Отже, саме індивідуальна чисельність CD163+ клітин дещо збільшувалася при люмінальних В HER2+ РМЗ у другій N1 групі. Але ці середні кількісні показники не перевищували показників CD163+ клітин, наприклад, при люмінальному А РМЗ N1 (2,9; 1,7; 4,7; табл. 3.7).

Наступним етапом ми проаналізували статистично результати підрахунку з усіх полів зору кожного зразку в межах кожного типу люмінальних РМЗ і метастазів за допомогою більш потужних непараметричних методів (рис. 3.14),

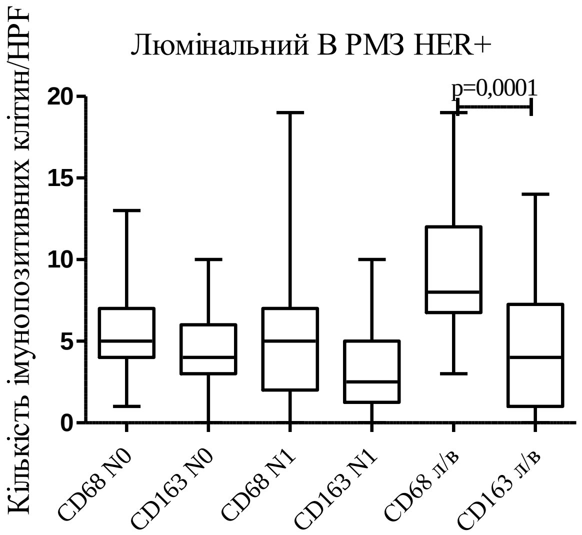
які можуть вловлювати більш точні коливання, порівяно з методами, які усереднюють екстремальні значення.



А.



Б.



В.

Рис. 3.14. Порівняння кількісних показників CD68+, CD163+ ПАМ різних люмінальних РМЗ Методами Манна-Уітні (для незалежних перемінних) та Вілкоксона (для залежних перемінних); N0 – група без метастазів, N1 – з метастазами; л/в – лімфовузли, уражені метастазами; HPF – поле зору зб.×280:

А. Люмінальний А РМЗ.

Б. Люмінальний В HER2– РМЗ.

В. Люмінальний В HER2+ РМЗ.

Отже, статистично обгрунтовані результати. При люмінальному А РМЗ достовірністю характеризувалося лише співвідношення CD68+/CD163+ ПАМ на користь перших, не залежно від метастазування, і аналогічно в метастазах в лімфатичних вузлах [228]. При люмінальному В HER2– РМЗ в метастазуючих зразках кількісні показники CD68+ та CD163+ ПАМ знижувалися, порівняно із зразками не метастазучої РМЗ, і CD163+ ПАМ були представлені у лімфатичних метастазах на вищому рівні, порівняно з первинним вогнищем. При люмінальному В HER2+ РМЗ достовірними виявилися лише підвищене співвідношення CD68+/CD163+ ПАМ в межах зразків метастазів. Достовірних кореляцій між кількісними показниками ПАМ в первинному вогнищі та метастазах не встановлено [228].

Таким чином, в залежності навіть від типу люмінальних РМЗ, а також від метастазування у лімфовузли, визначені ПАМ можуть мати різне представництво.

3.4. Якісна та кількісна оцінка CD68+ та CD163+ клітин первинного вогнища й метастатичних уражень лімфовузлів при нелюмінальному HER2+ РМЗ.

Наведено результати досліджень кількісних характеристик та особливостей локалізації CD68+ і CD163+ клітин, які інфільтрують нелюмінальні HER2+ РМЗ у первинному вогнищі без метастазів і у парних зразках з метастазами у лімфовузли, у зв’язку з патоморфологічними характеристиками цього типу РМЗ. А також результати кореляційних зв’язків між CD68+ і CD163+ клітинами у первинній пухлині та у відповідному метастазі.

Вісім зразків нелюмінального HER2+ РМЗ без метастазів були підгрупою першої N0 групи. І також вісім зразків нелюмінального HER2+ РМЗ з метастазами представляли підгрупу другої N1 групи. У підгрупі першої групи три зразі охарактеризовані як інвазивна протокова карцинома молочної залози солідної будови, та шість зразків – як карцинома Педжета. Всі зразки також характеризувалися імуногістохімічно як позитивні по Ki67.

Перший зразок інвазивної протокової карциноми був представлений атиповими ядрами високого ступеня поліморфізму; масивною фібротичною стромою у центральних відділах зразка; визначною лімфоплазмоцитарною інфільтрацією та наявністю фокусів некрозу. CD68+ клітини розміщувалися рівномірно та зосередженнями (рис. 3.15). У місцях інтенсивної імунореактивності, середня кількість CD68+ клітин становила 10,7 на поле зору, вони мали видовжену й округлу форми з розгалуженнями цитоплазми, локалізувалися переважно у стромі і окремі у пухлинних гніздах. На зразку були представлені також і поля зору, повністю вільні від імунопозитивних клітин, зокрема такими зонами були щільно розташовані осередки пухлинних клітин і відділи строми з високим представництвом волокнистих структур і міжклітинної речовини.

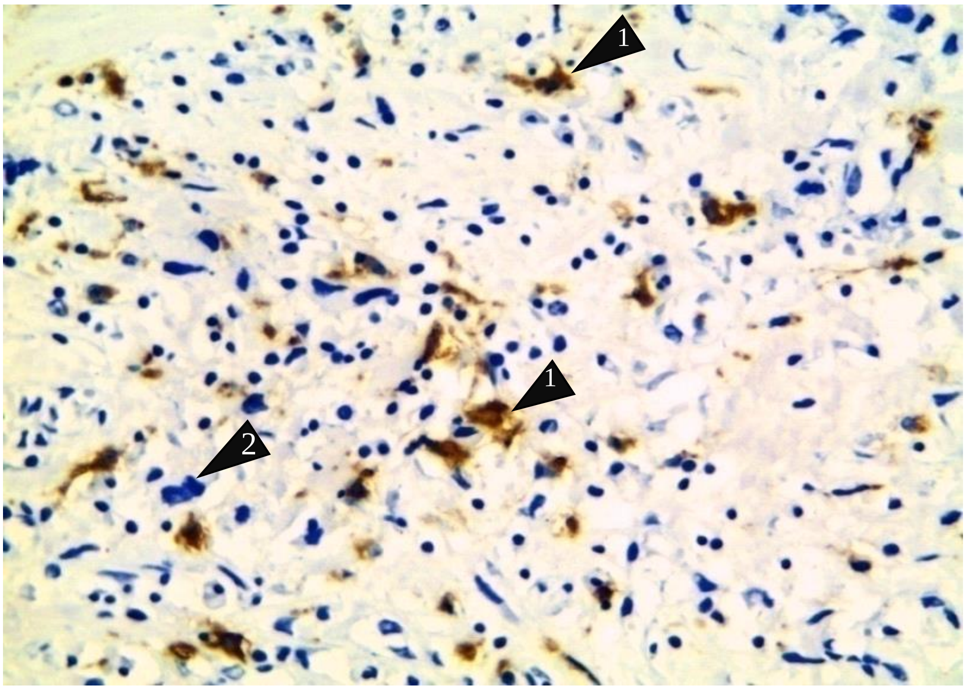


Рис. 3.15. Ділянка з помірним представництвом CD68+ клітин. Зразок нелюмінального HER2+ РМЗ першої N0 групи; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40:

1- CD68+ клітини;

2- атипове ядро.

CD163+ клітини характеризувалися високим ступенем збігу їх розміщення з CD68+ на серійних зрізах, тобто були солокалізовані, але їх кількість була

помітно меншою. Форма клітин була як округлою, так і веретеноподібною (рис. 3.16), імунореактивність – відносно світлішою, порівняно з CD68+. Поодинокі CD163+ клітини були виявлені і в осередках пухлинних клітин. Але переважна їх більшість знаходилася разом з іншими інфільтруючими клітинами лімфоцитарної морфології у стромі. Середня кількість становила 3,1 клітини на поле зору.

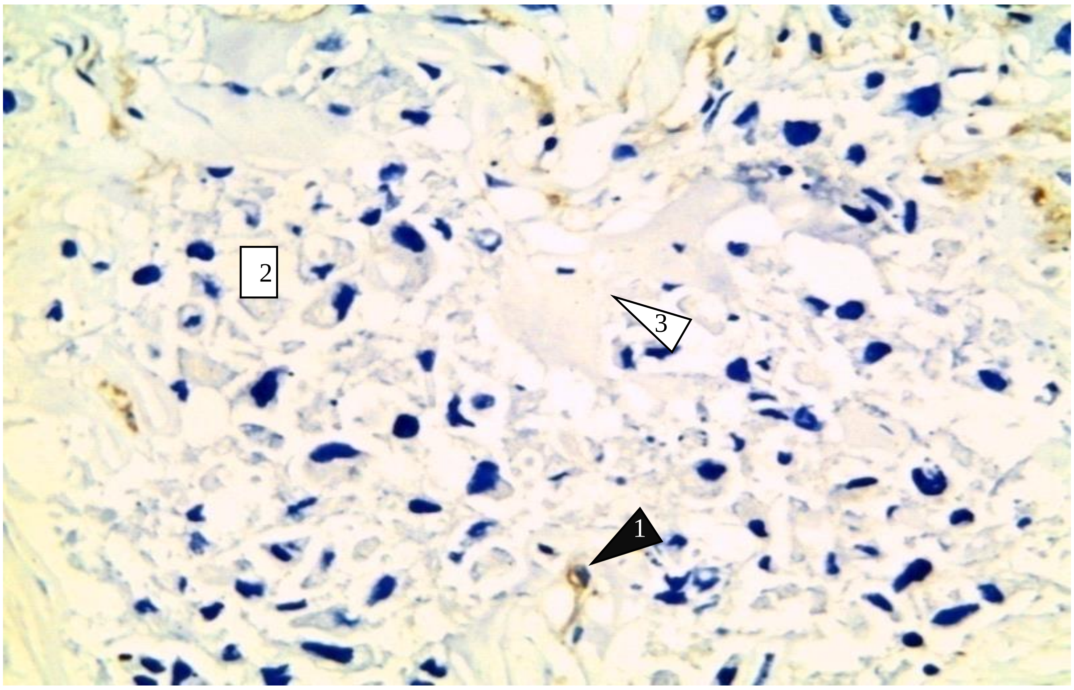


Рис. 3.16. CD163+ клітини у зразку нелюмінального HER2+ РМЗ першої N0 групи; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40:

1- CD163+ клітина;
2- кластери пухлинних клітин з гіперхромними ядрами високого ступеня атипії;
3- фрагмент фіброзної строми.

Інші шість зразків підгрупи були представлені карциномою Педжета. У стромі виявлені ознаки десмопластичної реакції, та більші або менші ознаки запалення у вигляді виразної лімфоїдної інфільтрації. На чотирьох з шести препаратів відмічені фокуси некротичних змін.

Імунопозитивні клітини переважно розміщувалися у стромі, навколо пухлинних осередків. Середні кількісні показники імунопозитивних клітин в первинному РМЗ та метастазах наведено у табл. 3.11. Кількість CD68+ клітин на

більшості полів зору переважала над кількістю CD163+ клітин. Вцілому інфільтрація оцінена як низька, окрім першого зразку.

Таблиця 3.11

Кількісні характеристики імунопозитивних клітин первинної РМЗ нелюмінального HER2+ типу і метастазів

Перша N0 група	Друга N1 група	
	Первинна пухлина	Метастаз
CD68+ клітини:10,7 – помірна; CD163+клітини: 3,1 – слабка	CD68+: 21,6 – щільна CD163+: 6,1 - слабка	CD68+: 13,4 – помірна CD163+: 4,3 - слабка
CD68+: 3,6 – слабка CD163+: 1,9 - слабка	CD68+: 32,1 – щільна CD163+: 0-1 – слабка	CD68+: 6,3 – слабка CD163+: 4,6 – слабка
CD68+: 5,8 – слабка CD163+: 4,8 – слабка	CD68+: 16,2 – щільна CD163+: 4,6 – слабка	CD68+: 6,9 – слабка CD163+: 1-0 – слабка

Примітка. Середня кількість клітин на поле зору відповідала рівню щільності інфільтрації: до 10 клітин – слабка, 10-15 – помірна, >15 – щільна.

Зразки нелюмінального HER2+ РМЗ другої N1 групи представлені препаратами від восьми пацієнток. Два препарата патогістологічно описано як інвазивна карцинома з ознаками плеоморфної лобулярної з метастазом в один з лімфатичних вузлів. (Характерна риса – клітини не мають сполучення між собою). Відмічено численні ділянки з некротичним змінами (у т.ч. і досить обширні). Строма пухлини – з десмопластичною реакцією та фіброзно-жирова. Лімфоїдна інфільтрація – виразна.

Інші шість препарати були представлені інвазивною карциномою солідної або трабекулярної будови.

Спільними рисами всіх препаратів були десмопластична реакція строми, осередки некрозу, наявність мікрокальцифікатів, та виразна запальна реакція у вигляді лімфоплазмацитарної інфільтрації. Ці риси не є видатними і можуть бути притаманні іншим типам РМЗ.

CD68+ клітини на високому рівні інфільтрували пухлинну тканину, розміщуючись навколо та серед гнізд рівномірно й зосередженнями (рис. 3.17), а

також в осередках некрозу. Відмічена їх регулярна присутність в ділянках лімфоїдної інфільтрації.

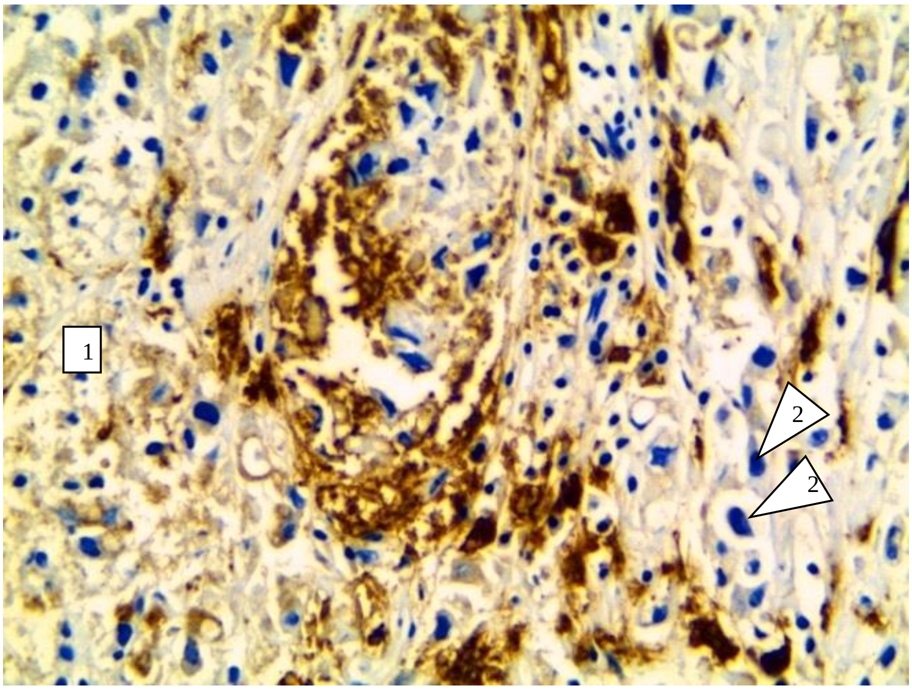


Рис. 3.17. Скупчення CD68+ клітин на межі з відділом некрозу. Зразок нелюмінального HER2+ РМЗ другої N1 групи; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40:

1- ділянка некрозу;
2- ядра пухлинних клітин, які втратили сполучення з оточенням.

CD163+ клітини зустрічалися рідше, ніж CD68+, але чітко повторювали їх локалізацію: навколо та в середині пухлинних гнізд та серед лімфоїдних клітин (рис. 3.18). Також, регулярно ці клітини розташовувалися у фіброзній центральній стромі, на тому ж кількісному рівні, що і CD68+.

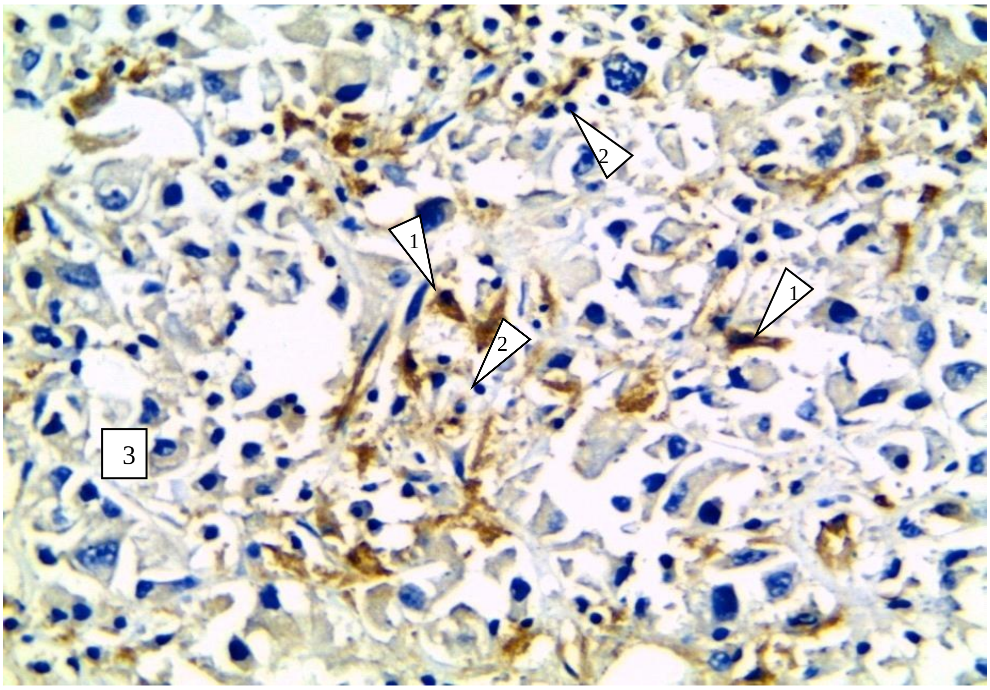


Рис. 3.18. CD163+ у біоптаті РМЗ. Зразок нелюмінального HER2+ РМЗ другої N1 групи; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40:

1- імунопозитивні клітини;

2- лімфоїдні клітини

3- пухлинні гнізда.

Отже, у другій групі, зареєстрований високий рівень інфільтрації CD68+ і низький CD163+ клітинами на всіх зразках первинних пухлин. CD68+ клітини утворювали осередки суцільної інфільтрації гнізд та навколишньої строми. CD163+ клітини були з ними солокалізовані: або точно, але у меншій кількості, або переважно у стромі і побіля некротичних ділянок. Отже, більшість скупчень саме у пухлинних гніздах могла відповідати подвійній імунореактивності [229].

Зразки метастазів у лімфовузлах гістологічно показали, що атипові клітини відрізняються від первинних вогнищ у той чи іншій мірі (що продемонстровано на рис. 3.17, 3.18 (первинна РМЗ) і рис. 3.19, 3.20 (метастаз).

CD68+ клітини рівномірно та скупченнями інфільтрували метастаз лімфовузлів, і були присутні як у стромі (рис. 3.19: 1), так і гніздах (рис. 3.19: 2). Угрупування відмічали частіше по периферії пухлини. В середньому інфільтрація

оцінена як низька (табл. 3.8), однак у зосередженнях імунопозитивні клітини нараховували до 40 клітин на поле зору в окремих зразках.

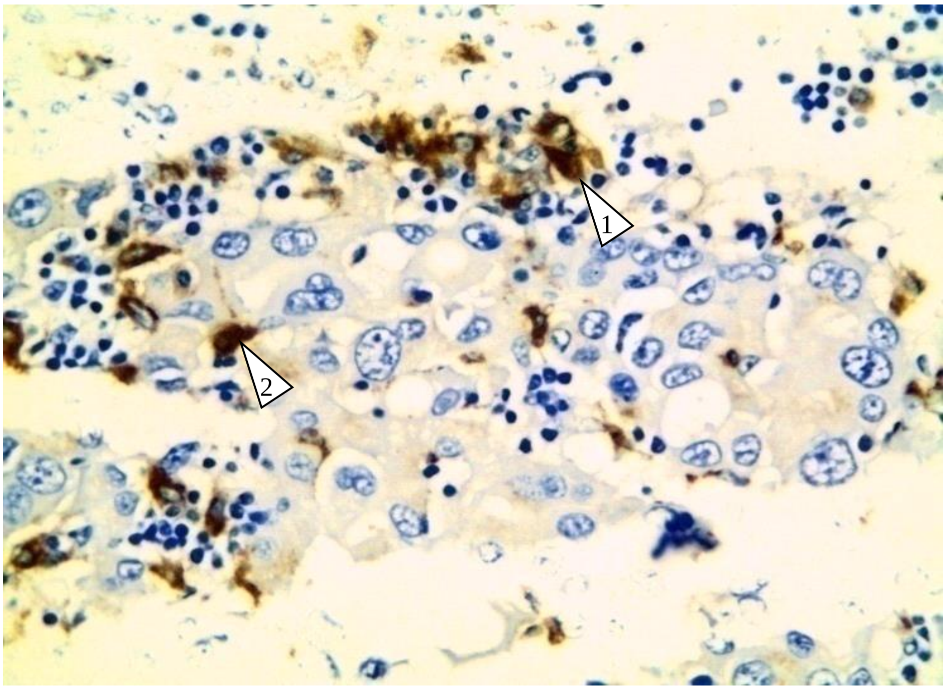


Рис. 3.19. CD68+ клітини навколо (1) та в межах пухлинного гнізда у метастазі лімфовузла (2). Біоптат лімфатичного вузла; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40.

CD163+ клітини досить точно повторювали локалізацію і форму CD68+ клітин у стромі (рис. 3.20: 1) і у гніздах пухлини (рис. 3.20: 2), але були представлені меншою кількістю чи навіть поодиноко (серед щільно розташованих пухлинних гнізд – майже відсутні). Хоча в межах візуально збереженої лімфоїдної тканини лімфовузлів утворювали зосередження до 6-10 клітин на поле зору.

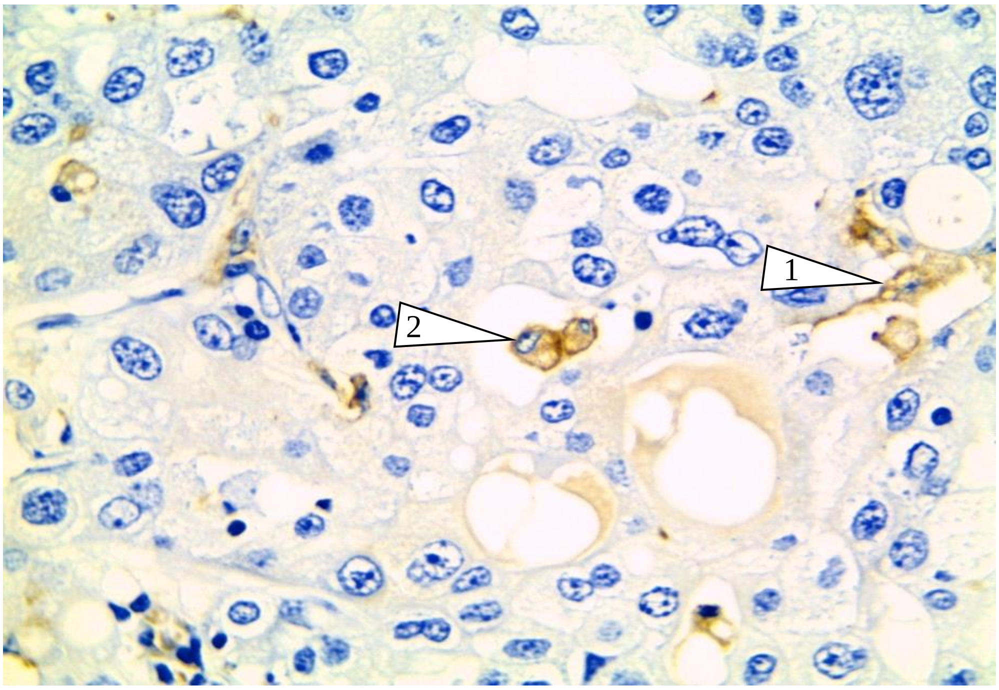


Рис. 3.20. CD163+ клітини у метастазі лімфовузла. Зразок лімфатичного вузла; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40:

1- CD163+ клітини локалізовані у стромі;

2- CD163+ клітини локалізовані у гнізді пухлини.

Отже, метастази РМЗ виявляли іншу патогістологію, характеризувалися помітно нижчим рівнем інфільтрації CD68+ клітинами, відрізнялися за рівнями інфільтрації CD163+ клітин, порівняно з первинною пухлиною [229].

Визначна знахідка при порівнянні нелюмінальних типів РМЗ N0 та N1 груп – це підвищення представництва CD68+ клітин за умов метастазування: від слабкого рівня інфільтрації (середні кількості в зразках першої групи: 10,7; 3,6; 5,8) до умовно високого (21,6; 32,1; 16,2 – у другій). Кількість CD163+ не змінювалася помітно: від 3,1, 1,9; 4,8 (у першій N0 групі) до 6,1; 0-1, 4,6 (N1).

Статистичне порівняння непараметричними методами (Манна-Уітні – для незалежних і Вілкоксона для парних перемінних) середніх кількісних показників CD68+ клітин і CD163+ клітин між двома групами, та між кількостями у первинному вогнищі і парних метастазах та кореляційний аналіз не показали достовірності. Тож, наступним етапом ми аналізували всі числові дані, з кожного поля зору, яких було від 7 до 12 на препарат. Цей підхід показав статистично

достовірне збільшення кількості CD68+ клітин у другій, N1, групі (p<0,0001, тест Манна-Уітні) та достовірне зменшення кількості CD68+ клітин у метастазах, порівняно з первинним РМЗ (p<0,0001, тест Вілкоксона) (рис. 3.21). Але не підтвердив достовірності відмінності кількостей CD163+ клітин, і кореляцій між первинним вогнищем і метастазами.

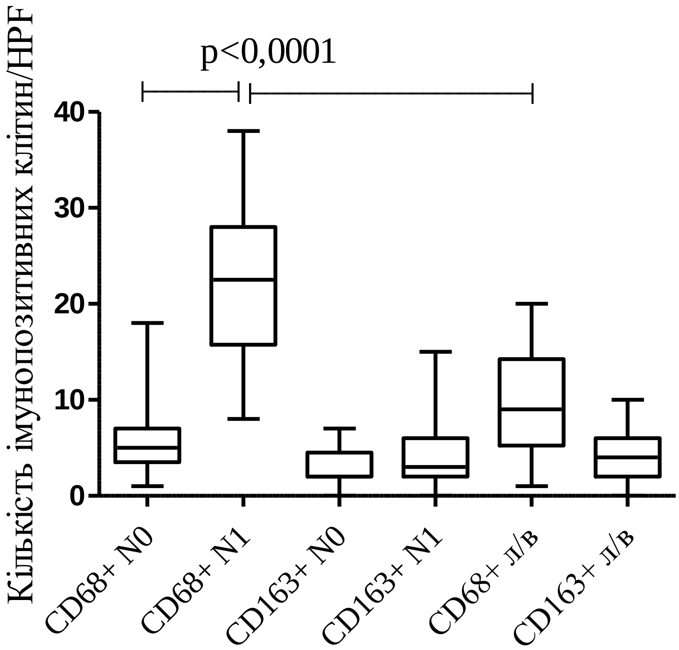


Рис. 3.21. Достовірні результати статистичного порівняння кількостей CD68+ та CD163+ клітин при нелюмінальних типах РМЗ N0 та N1 груп методами Манна-Уітні – для незалежних і Вілкоксона – для парних перемінних.

І третім етапом статистичної обробки було проведено комп'ютерне моделювання, для чого, на основі реальних даних, отримали по 100 симульованих і порівняли їх (Манна-Уітні – для незалежних і Вілкоксона для парних перемінних), в результаті підтвердилася достовірно більша кількість CD68+ клітин, і отримано підвищення CD163+ клітин у первинному РМЗ у другій N1 групі, порівняно з першою (p<0,0001), а також визначено достовірно меншу кількість CD68+ клітин (p<0,0001) і CD163+ клітин (p=0,0013) у метастазах, відносно первинних вогнищ та не підтверджена кореляція між кількостями у первинних вогнищах і метастазах другої N1 групи (рис. 3.22).

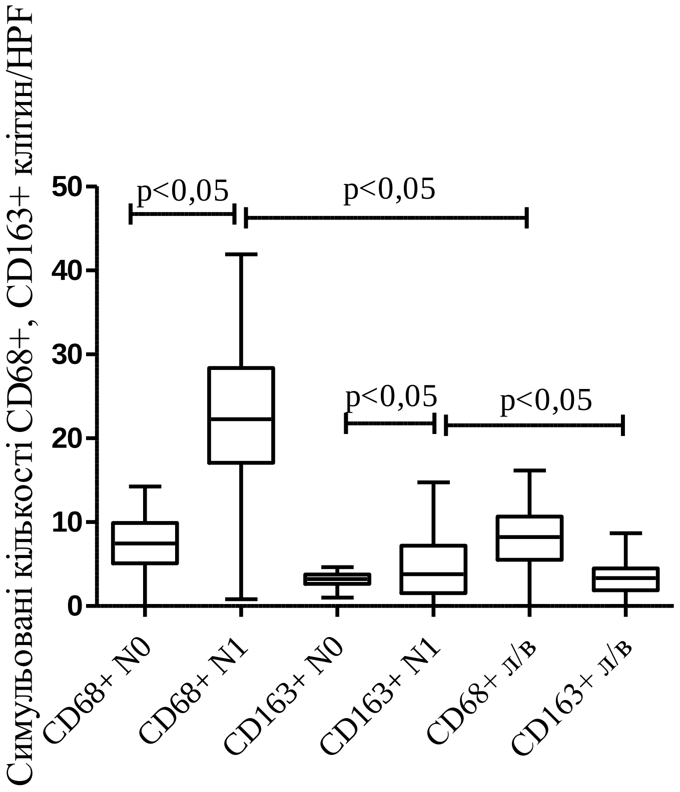


Рис. 3.22. Результати статистичної симуляції і порівняння кількостей CD68+ та CD163+ клітин при нелюмінальних типах РМЗ N0 та N1 груп та в метастазах в лімфатичних вузлах методами T-тестів для незалежних і парних перемінних.

Результати дослідження показали достовірне зменшення кількості CD68+ клітин у метастазах, порівняно з первинними РМЗ. Але в межах візуально збереженої лімфоїдної тканини лімфовузлів, навколо метастазів, CD68+ клітини утворювали помітні зосередження (рис. 3.19: 1; рис. 3.23).

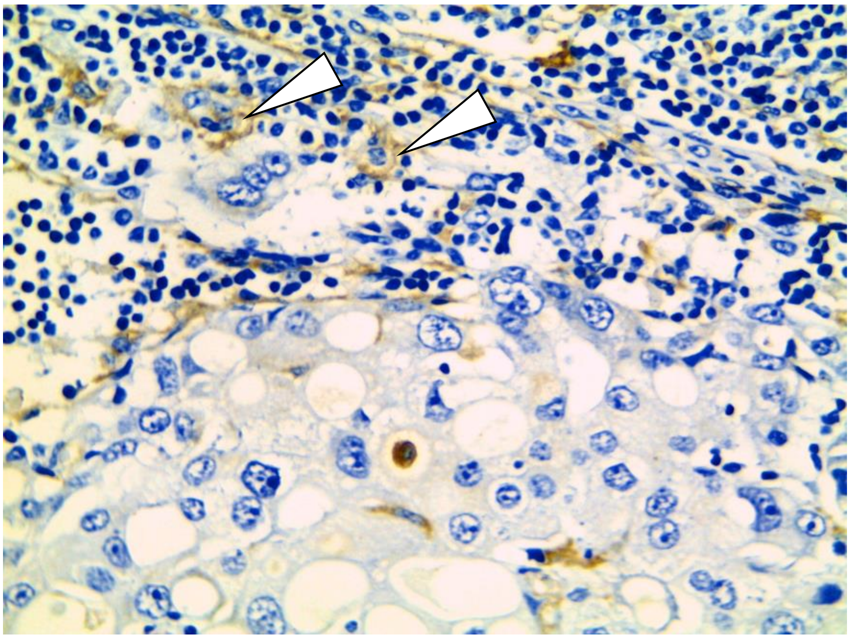


Рис. 3.23. Локалізація CD68+ клітини на межі з вогнищем метастазу лімфовузла. Зразок лімфатичного вузла; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40:

Вцілому щодо патогістологічного опису РМЗ, відмічена морфологічна різноманітність первинних РМЗ у межах одного типу, а також відмінності між первинним осередком та метастазами у лімфовузли. Але спільними рисами всіх препаратів були десмопластична реакція строми, фокуси/осередки некрозу, наявність мікрокальцифікатів та більші, або менші, ознаки запалення у вигляді лімфоплазмацитарної інфільтрації. В принципі, ці риси не є унікальними і можуть бути притаманні буль-якому типу РМЗ.

3.5. Якісна та кількісна оцінка CD68+ та CD163+ клітин первинного вогнища й метастатичних уражень лімфовузлів при потрійному негативному РМЗ.

У підрозділі наведені патоморфологічні характеристики зразків пухлин та метастазів, та результати дослідження CD68+ і CD163+ клітин у підгрупах ПН РМЗ, порівняння кількісних характеристик, а також кореляційні відносини між кількісними характеристиками макрофагів у первинній пухлині та у відповідному метастазі в іпсилатеральні пахвові лімфовузли для другої N1 групи.

Патоморфологічна характеристика першої групи ПН РМЗ-підгрупи. Представлено зразком інвазивної протокової карциноми молочної залози переважно трабекулярної будови, та 4 зразками – солідної будови, які різнилися між собою G2-3 ступенями диференціювання, перший зразок мав ознаки лімфоваскулярної інвазії, трі зразки – характеризувалися надзвичайно маленькими пухлинними гніздами, які нагадують численні емболи, як при запальному РМЗ. Дещо спільними описовими характеристиками для зразків, окрім ІГХ ER– PR– HER2–, була строма з масивними фібротичними змінами, часом з крововиливами, ознаками некрозу у тій чи іншій мірі, та виразною лімфоплазмоцитарною інфільтрацією.

CD68+ клітини щільно і різко нерівномірно розподілялися на препаратах всіх зразків, утворювали власні осередки у стромі, гніздах, та ділянках некрозу, де набували незвичайної зливної та/або вакуолізованої форми (рис. 3.24). У стромальних відділах CD68+ клітини мали переважно видовжену форму.

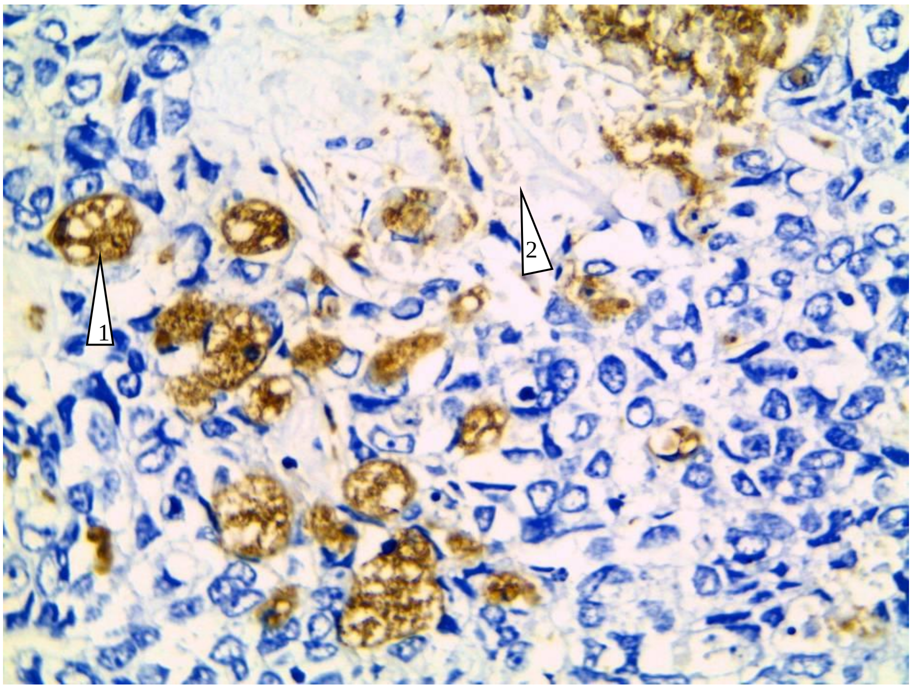


Рис. 3.24. CD68+ клітин у біоптаті ПН РМЗ першої N0 групи; контрастування: гемалаун Майєра, об. ×40: CD68+ клітин зливної форми з вакуолізацією (1) серед кластеру пухлинних клітин поблизу некротичної ділянки (2).

CD163+ клітин на препаратах було помітно менше ніж CD68+ (рис. 3.25). Відзначена їх регулярна локалізація у фіброзній стромі, навколо гнізд серед лімфоїдного інфільтрату, у пухлинних гніздах та вогнищах некрозу.

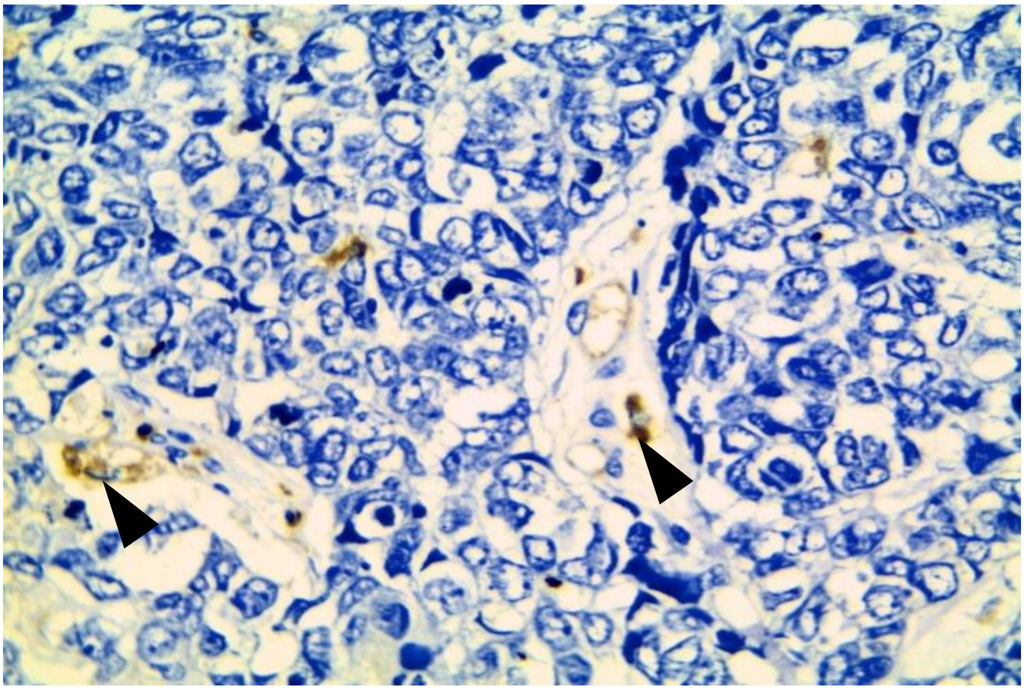


Рис. 3.25. CD163+ клітини розміщені у стромі (стрілки) ПН РМЗ першої N0 групи; контрастування гемалаун Майєра, об.×40.

Отже, CD163+ клітини наближено повторювали чисельність CD68+ клітин у фіброзній стромі, а у гніздах і некротичних ділянках були присутні у меншій кількості, особливо на третьох препаратах, де їх кількість обчислена як поодинокі (0-1) на поле зору [230].

Патоморфологічна характеристика другої N1 групи ПН РМЗ-підгрупи. Групу склали 9 зразків інвазивних протокових карцином солідної і солідно-альвеолярної морфології, і 9 зразків відповідних метастазів у регіональні, іпсилатеральні, лімфовузли. Зразки первинної РМЗ описані як G3 ступеню диференціювання, морфологічно та ІГХ однорідні (ER– PR– HER2– Ki67+) з обов’язковою присутністю осередків некрозу, фіброзною та фіброзно-жировою стромою і щільною лімфоїдною інфільтрацією.

На всіх препаратах відзначено високе представництво CD68+ клітин (рис. 3.26), які розміщувалися нерівномірно та утворювали скупчення у вигляді незвичайних крупних зливних форм у гніздах, на межі з жировою тканиною, та в осередках некрозу. CD163+ клітин було помітно менше, співлокалізувалися з CD68+ клітинами переважно у стромі (рис. 3.27) й осередках некрозу.

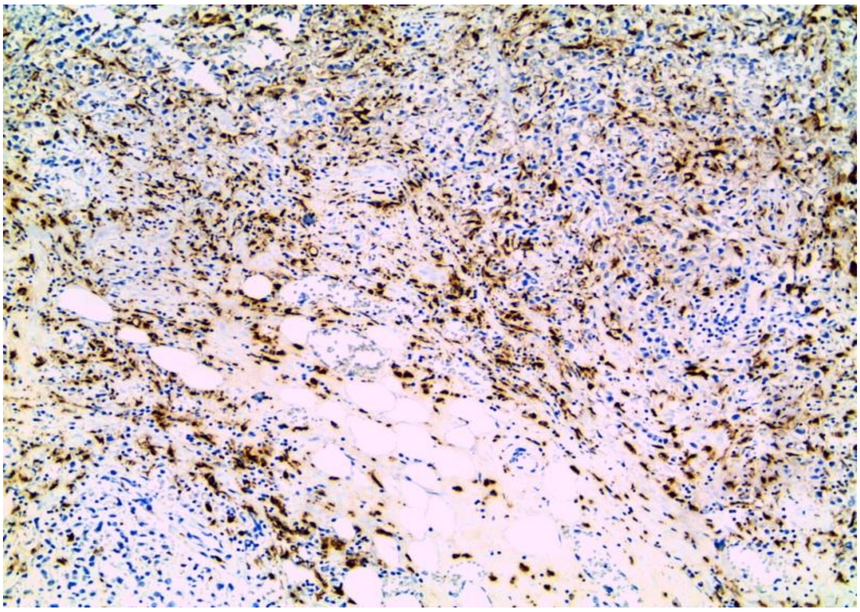


Рис. 3.26. Щільна інфільтрація CD68+ клітинами зразку ПН РМЗ другої N1 групи; контрастування гемалаун Майєра, об.×4.

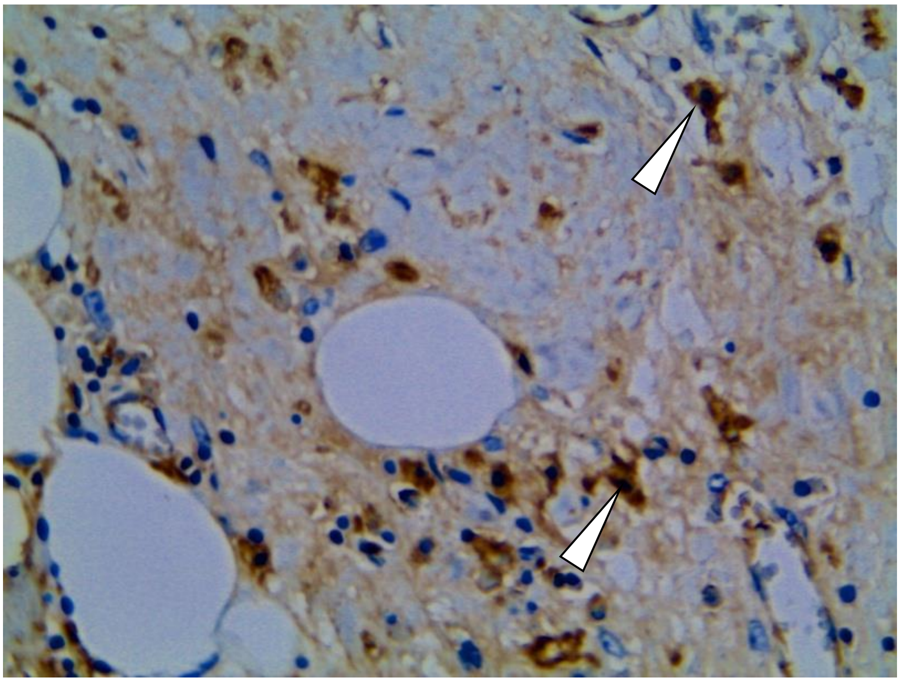


Рис. 3.27. CD163+ клітини округлої форми (стрілки) з розгалуженнями цитоплазми, розміщені у стромі первинного осередку ПН РМЗ другої N1 групи; контрастування гемалаун Майєра, об.×40.

Патоморфологічна характеристика метастазів у лімфовузлах. Метастази були представлені великими округлими світлими атиповими ядрами, ніжною або помірно розвиненою стромою, яку із різною щільністю інфільтрували лімфоцити. Шість з девяти зразків мали частково гістологічно збережену тканину лімфовузлів. На всіх препаратах зареєстровані ознаки некрозу в гніздах метстазу.

CD68+ клітини щільно і нерівномірно інфільтрували метастази. Зосереджувалися у стромі і в межах численних, некротично-змінених гнізд. Найщільніші зосередження відмічені у зонах некрозу, на межі з лімфатичною тканиною (рис. 3.28), або в синусах.

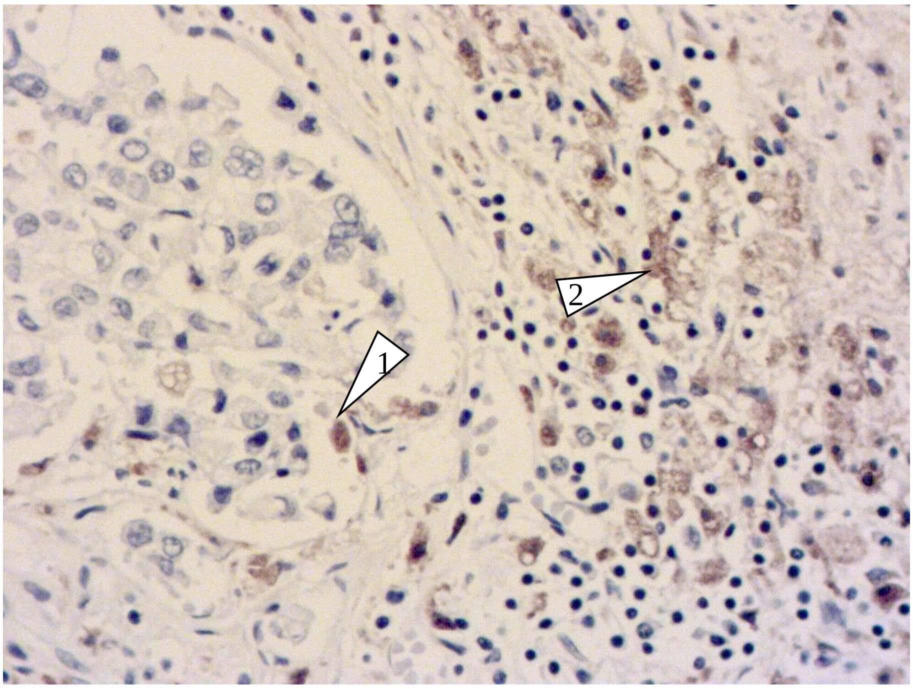


Рис. 3.28. Локалізація CD68+ ПАМ у зразку лімфатичного вузла з метастазом ПН РМЗ другої N1 групи; контрастування гемалаун Майєра, об.×40:

1- CD68+ ПАМ серед кластеру пухлинних клітин;
2- CD68+ ПАМ у зоні некрозу.

CD163+ ПАМ розміщувалися у стромі і гніздах, приблизно рівномірно, мали видовжену форму, на помітно нижчому рівні, ніж CD68+ клітини. На трьох з девяти препаратів відзначено нерівномірний розподіл CD163+ клітин: скупчення у зонах некрозу відповдали кількісним показникам CD68+ клітин.

Отже, патоморфологія метастазів відрізнялася від первинного вогнища РМЗ і між собою, спільною ознакою була обов'язкова присутність ділянок некрозу в метастазах [230].

Таким чином, патогістологічно зразки первинного вогнища ПН РМЗ мали свої унікальні особливості такі як площа строми, щільність представництва у ній резидентних непухлинних та інфільтруючих клітин, а також деякі риси морфології пухлинних клітин, які не обчислювали кількісно, внаслідок обмеженого числа учасниць дослідження. Спільні описові характеристики включали десмопластичну реакцію, виразну запальну реакцію (у вигляді щільної лімфоплазмоцитарної інфільтрації) та ознаки некрозу у тій чи іншій мірі. А всі зразки метастазів характеризувалися обов'язковою присутністю ділянок некрозу.

Визначено поєднане розміщення CD68+ і CD163+ ПАМ у фіброзній стромі і некротичних ділянках пухлин. Відповідно, у пухлинних гніздах розміщувалися переважно CD68+ ПАМ. У першій N0, групі, схоже, саме ці клітини утворювали власні осередки у гніздах (враховуючи, що на одному із зразків CD163+ ПАМ були лише поодинокі), і набували зливної та/або вакуолізованої форми (рис. 3.24). Аналогічна картина відмічена і у другій N1 групі ПН РМЗ-підрупі. Отже, частина пухлинних комплексів у первинних вогнищах і метастазах були інфільтровані скупченнями тільки CD68+ ПАМ, які не повторювали CD163+ (рис. 3.25).

У лімфовузлах з метастазами ми відзначили досить точну, у т.ч. і в кількісному відношенні, співлокалізацію CD68+ і CD163+ ПАМ у зонах некрозу пухлинних клітин. В інших відділах масивного представництва CD68+ ПАМ: пухлинній стромі, гніздах, та на межі із залишками лімфатичної тканини, CD163+ ПАМ було помітно менше.

Середньоарифметичні узагальнені результати підрахунку імунопозитивних клітин наведені у табл. 3.12.

Таблиця 3.12

Кількісні характеристики імунопозитивних клітин первинного вогнища потрійного негативного РМЗ і метастазів

Перша N0 група		**Друга N1 група**			
		Первинна пухлина		**Метастаз**	
CD68+ клітини	CD163+ клітини	CD68+ клітини	CD163+ клітини	CD68+ клітини	CD163+ клітини
12,5	5,1	23,5	5,1	24,6	17,0
11,4	6,0	22,3	5,1	9,4	6,8
12,5	1,0	26,6	6,4	19,0	9,5

Примітка. Наведені дані у вигляді середньоарифметичної кількості клітин/HPF.

Статистична обробка середніх показників кількості CD68+ ПАМ і CD163+ ПАМ між двома групами, між кількостями макрофагів у первинному вогнищі і парних метастазах не досягала достовірності. Тож для нівелювання малої кількості пацієнток у групах, наступним кроком ми провели порівняння всієї сукупності цифрових результатів, підрахованих по кожному полю зору високого розрішення (від 7 до 10 на препарат).

Встановлено достовірне збільшення кількості CD68+ клітин та CD163+ клітин в первинному РМЗ у другій N1 групі з метастазами, зменшення CD68+ клітин у метастазах в лімфатичних вузлах, порівняно з первинним вогнищем (рис. 3.29) та зворотне кореляційне відношення помірної сили між CD163+ клітинами в первинних вогнищах і метастазах (кореляція Спірмена: p=0,0024, r=-0,627). Кореляційні зв’язки з боку кількостей CD68+ клітин в первинних вогнищах і метастазах не досягали достовірності (кореляція методом Спірмена: p=0,375, r=0,204) (табл. 3.12, рис. 3.29).

Таблиця 3.12

Підсумки статистичного порівняння кількостей CD68+ та CD163+ ПАМ при потрійному негативному РМЗ N0 та N1 груп та лімфатичних метастазах

Показники які порівнюють	**Результат та достовірність**	**Статистичний метод**
CD68+ПАМ у межах РГЗ групи N1 порівняно з групою N0	Збільшення*, p<0,0001	Манна-Уітні
CD163+M2 у межах РГЗ групи N1 порівняно з групою N0	Збільшення*, p<0,0005	
CD68+ПАМ у метастазах, порівняно з первинними РГЗ	Зменшення*, p=0,0473	Парний метод Вілкоксона
CD163+M2 у метастазах, порівняно з первинними РГЗ	Недостовірні зміни, p=0,2961	
Кореляція між кількостями CD68+ПАМ у первинних РГЗ і метастазах	Недостовірна, p=0,375, r=0,204	Кореляція Спірмена
Кореляція між кількостями CD163+ПАМ у первинних РГЗ і метастазах	Зворотна*, помірна, p=0,0024, r=-0,627	

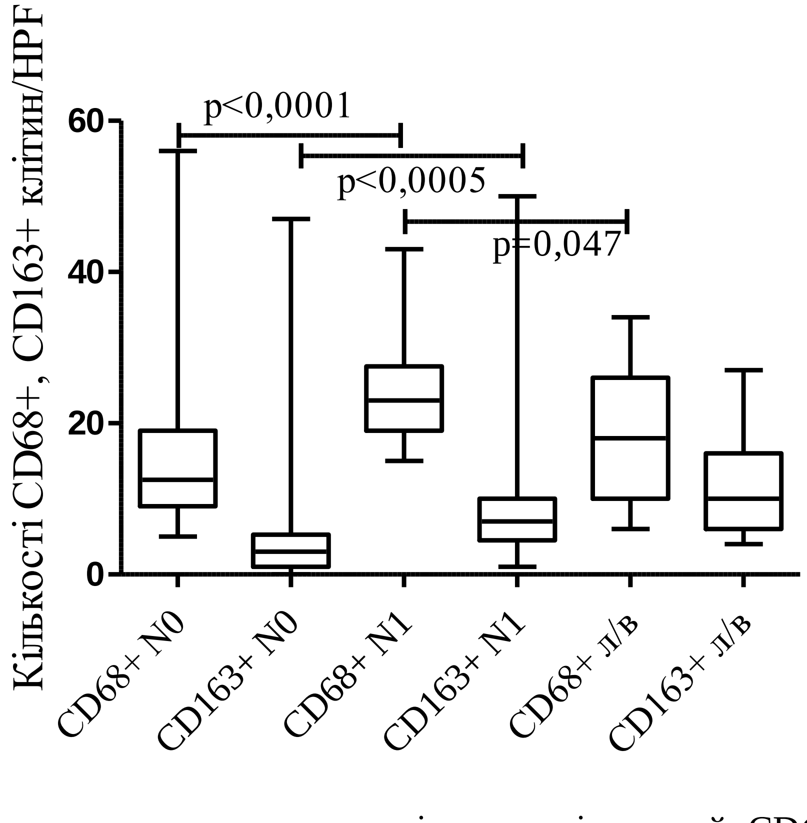


Рис. 3.29. Результати статистичного порівняння кількостей CD68+ та CD163+ клітин при ПН РМЗ N0 та N1 груп та в метастазах у лімфатичних вузлах методами Т-тестів для незалежних і парних перемінних.

Наступним кроком ми провели емпіричну оцінку кількісних показників CD68+ та CD163+ клітин через серію комп’ютерних симуляцій, які забезпечують наближення до справжнього розподілу, що лежить в основі статистики. Результати підтвердили достовірність попередніх результатів статистичної обробки індивідуальних даних з усіх полів зору, а також додали достовірність у збільшення чисельності CD163+ клітин у метастазах, порівняно з первинним ПН РМЗ другої N1 групи, відмінили достовірність кореляцій між кількостями CD68+ клітин у первинних РМЗ та метастазах (кореляція Пірсона: p=0,086, r=0,17) та перетворили зворотній кореляційний зв’язок між кількісними показниками CD163+ клітин у первинних РМЗ та метастазах на слабкий прямий (кореляція Пірсона: p=0,019, r=0,23) (табл. 3.14, рис. 3.30).

Таблиця 3.14

Результати емпіричної оцінки статистично-симульованих даних

Показники які порівнюють	**Достовірність**	**Статистичний метод**	**Сила ефекту (95% довірчий інтервал)**
CD68+ПАМ ГРЗ групи N1 порівняно з N0	Збільшення*, p<0,0001	Т-тест	-12,4 – (-11,59)
CD163+M2 РГЗ групи N1 порівняно з N0	Збільшення*, p<0,0001		-2,21 – (-1,24)
CD68+ПАМ у метастазах, порівняно з первинними вогнищами РГЗ	Зменшення*, p<0,0001	Парний Т-тест	5,328 – 7,916
CD163+M2 у метастазах, порівняно з первинними вогнищами РГЗ	Збільшення*, p<0,0001		-6,517 – (-4,516)
Кореляція між кількостями CD68+ПАМ у первинних вогнищах РГЗ і метастазах	Недостовірна, p=0,086, r=0,17	Кореляція Пірсона	-0,03 – 0,36
Кореляція між кількостями CD163+ПАМ у РГЗ і метастазах	Достовірна*, пряма, слабка, p=0,019, r=0,23		0,039 – 0,412

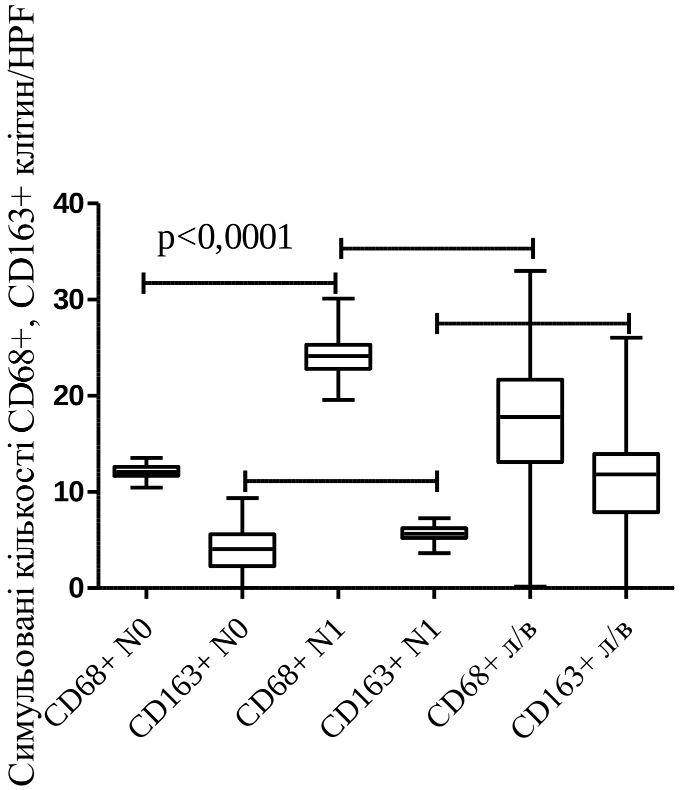


Рис. 3.30. Результати статистичної симуляції і порівняння кількостей CD68+ та CD163+ клітин при при ПН РМЗ N0 та N1 груп та в метастазах у лімфатичних вузлах методами Т-тестів для незалежних і парних перемінних. Всі зазначені на графіку порівняння мають p<0,0001.

Отже, при ПН РМЗ, на основі аналізу індивідуальних результатів, встановлено достовірне збільшення кількості CD68+ та CD163+ клітин у первинних пухлинах другої N1 групи – тобто за умов метастазування у регіональні лімфовузли. Порівняно з первинним вогнищем ПН РМЗ другої N1 групи, у відповідних метастазах виявлено достовірні зменшення кількісних показників CD68+ клітин, та кореляції між CD163+ клітинами первинних вогнищ і метастазів [230].

3.6. Аналіз зв'язку рівнів інфільтрації первинної РМЗ CD68+ та CD163+ клітинами з післяопераційним прогнозом.

У підрозділі представлено результати оцінки відношення кількісних показників CD68+ CD163+ клітин до післяопераційного прогнозу/виживаності

пацієнток з 5 молекулярно-біологічними типами карциноми молочної залози протягом 4 років спостереження.

Первинні результати підрахунку імунопозитивних клітин подано у табл. 3.15.

Таблиця 3.15

Середні кількісні характеристики CD68+ CD163+ клітин які інфільтрують первинне вогнище РМЗ кожної пацієнтки (середня кількість на поле зору зб.×280)

ІГХ тип РГЗ	Перша N0 група		Друга N1 група	
	CD68+ клітини	CD163+клітини	CD68+клітини	CD163+клітини
Нелюмінальний HER2+	10,7	3,1	21,6	6,1
	3,6	1,9	32,1	1
	5,8	4,8	16,2	4,6
Люмінальний А	16,5	7,4	9,2	2,9
	8,8	4,3	23,1	1,7
	14,1	4,9	8	4,7
Люмінальний Б HER–	5,5	1	6,7	1
	16,6	1	4,3	1
	19,6	1	8	1
Люмінальний Б HER+	4,6	1	8,5	3,4
	6	1	2,5	1,7
	5,6	1	4,3	3
ПН РМЗ	12,5	5,1	23,5	5,1
	11,4	6,0	22,3	5,1
	12,5	1,0	26,6	6,4

Загалом, кількісні характеристики показали, що в усіх випадках чисельність CD68+ клітин перевищувала CD163+. Всі клітини звичайно утворювали більші або менші осередки чи скупчення, що залежало від виразності строми, щільності пухлинних гнізд, наявності вогнищ некрозу та інших морфологічних, дуже індивідуальних, характеристик зразків (рис. 3.31, 3.32).

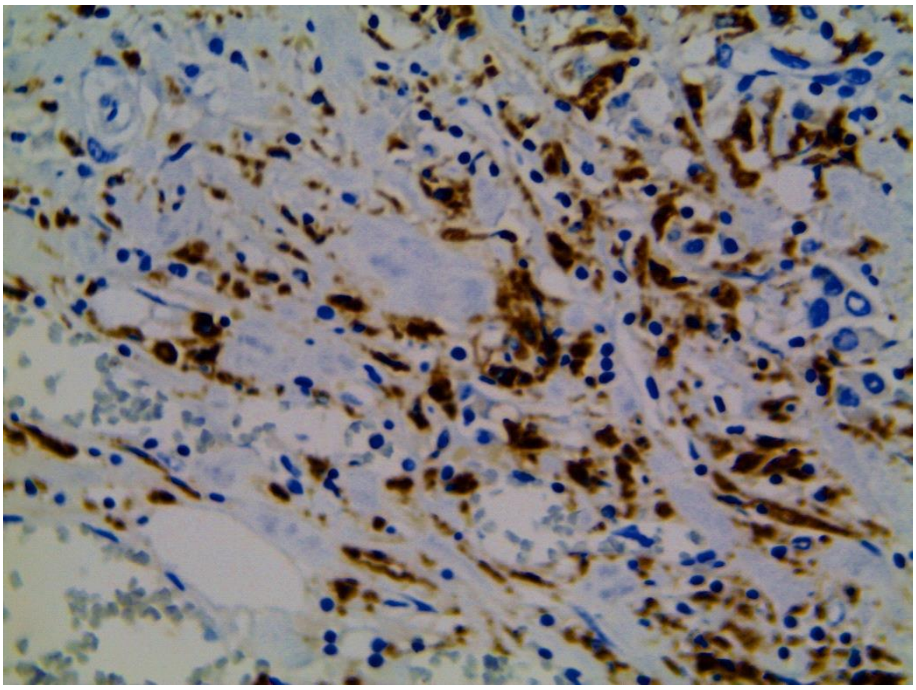


Рис. 3.31. Щільна інфільтрація CD68+клітинами зразку ПН РМЗ другої N1 групи; контрастування гемалаун Майєра, об.×40.

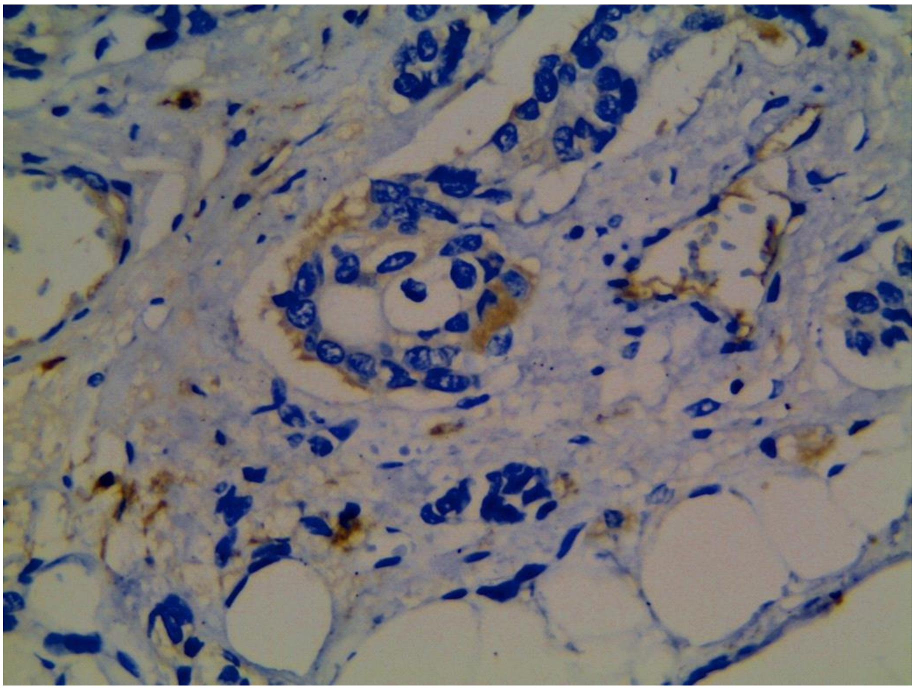


Рис. 3.32. Помірна щільність інфільтрації CD163+ клітинами зразку люмінального А РМЗ першої N0 групи; контрастування гемалаун Майєра, об.×40.

Для статистичного аналізу рівнів інфільтрації імунопозитивними клітинами і післяопераційного виживаності, учасниць дослідження розподілили на 2 підгрупи, за умовно високою (≥15 клітин на поле зору зб.×280) та низькою (<15) щільністю інфільтрації первинного вогнища РМЗ CD68+ клітинами. У підгрупі з високим рівнем інфільтрації померла одна особа, виживання 89%, у підгрупі з низькою – дві (виживаність 83%), різниця не досягала достовірності (рис. 3.33, p=0,81, лог-ранк тест). При порівняні пропорцій 1/10 і 2/20, кумулятивна смертність у підгрупах не досягала достовірної різниці.

Рис. 3.33. Пропорції виживаності і рівень інфільтрації первинного РМЗ CD68+ клітинами (тест Каплан-Майєра).

Для з'ясування зв'язку щільності інфільтрації РМЗ CD163+ клітинами і виживаності пацієнток, умовний поділ на дві підгрупи повели наступним чином: помірний рівень інфільтрації: >3 клітин на поле зору зб.×280, низький рівень – 0-3. У підгрупі з помірним рівнем інфільтрації померли дві особи (виживаність – 81%), у підгрупі – з низькою – одна (виживаність – 91%), що при порівнянні не досягає статистичної достовірності (p=0,94, лог-ранк тест, рис. 3.34) і потребує подальших спостережень для висновку, але принципово співпадає з концепцією, що відносно вища інфільтрація первинного вогнища М2-подібними Мф несе негативний прогноз [21].

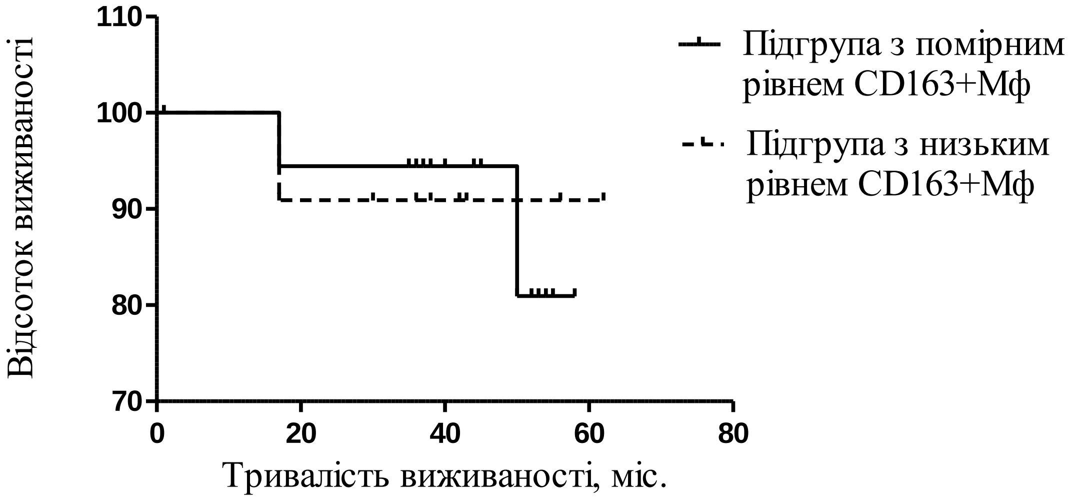


Рис. 3.34. Пропорції виживаності і рівень інфільтрації первинного РМЗ CD163+ клітинами (тест Каплан-Майєра).

При порівнянні пропорцій кумулятивної смертності: 2/18 (11%) (підгрупа з помірною щільністю інфільтрації) проти 1/12 (8%) (підгрупа з низькою), відміни також не досягли статистичної достовірності, p=0,8.

Таким чином, при перевірці кореляції щільності інфільтрації первинного РМЗ CD68+ і CD163+ клітинами з післяопераційною виживаністю у врівноважених групах показано зворотний, але статистично недостовірний зв'язок [231].

Таким чинном, представництво і локалізація імунопозитивних клітин були пов'язані з патогістологічними особливостями зразків РМЗ, його молекулярно-біологічним типом і статусом метастазування. При люмінальному А РМЗ достовірністю характеризувалося співвідношення CD68+/CD163+ ПАМ на користь CD68+, не залежно від метастазування, і, аналогічно, в метастазах лімфатичних вузлів. При люмінальному В HER2– РМЗ в метастазуючих зразках кількісні показники CD68+ та CD163+ ПАМ знижувалися, порівняно із зразками РМЗ без метастазів, а CD163+ ПАМ були представлені у лімфатичних метастазах на вищому рівні, порівняно з первинним вогнищем. При люмінальному В HER2+

РМЗ достовірність підтверджена лише для переваги CD68+ над CD163+ ПАМ в межах метастазів (p=0,0001). При нелюмінальному HER2+ РМЗ встановлено достовірне збільшення кількості CD68+ клітин у другій, N1 групі та достовірне зменшення кількості CD68+ клітин у метастазах, порівняно з первинним РМЗ. При ПН РМЗ встановлено достовірне збільшення кількості CD68+ та CD163+ ПАМ в первинному РМЗ у другій N1 групі з метастазами, зменшення CD68+ клітин у метастазах в лімфатичних вузлах, порівняно з первинним вогнищем, та зворотне кореляційне відношення помірної сили між CD163+ ПАМ в первинних вогнищах і метастазах (кореляція Спірмена: p=0,0024, r=-0,627).

Результати досліджень, висвітлені у цьому розділі, опубліковані в наступних працях [227,228,229,230,231].

РОЗДІЛ 4
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Комплексна роль імунної системи у виникненні, рості, елімінації і метастазуванні пухлн є об’єктом підвищеної уваги науковців. Знання імунних механізмів дає можливість створити клінічно прогностичні маркери прогресування захворювання, а також мішені для терапії онкопатолгії.

Відомо, що ПАМ при РМЗ можуть мати прогностичне значення, що показано і для РМЗ в клінічних дослідженнях з досить великим числом учасниць [24,28,172,224].

Серед ПАМ, як вважає сучасна домінуюча концепція, присутні як антипухлинні М1, так і пропухлинні М2 макрофаги. Дослідження на проточному цитометрі [22] виявили, що ПАМ, зібрані із пахвових судин від пацієнток із запальним РМЗ (дещо іншим зразком, ніж у власному дослідженні), характеризувалися підвищеною секрецією TNF-α, MCP-1 CCL2, ІЛ-10 та ІЛ-8, на відміну від ПАМ, виділених від пацієнток з незапальним РМЗ. Це дослідження важливе, тому, що показало змішаний цитокіновий профіль М1/М2, за рахунок секреції TNF-α та ІЛ-10, відповідно. Секреція TNF-α пов'язана з підвищеною проліферацією, ростом, інвазією та метастазами злоякісних новоутворень.

Для визначення ПАМ використовують наступні маркери: рівень експресії MHCII, *Cox2*, *Nos2* та *IL-12* [159], CD 68 та CD206 [166], NOS2a/iNOS, IL-7R (для M1), CD36 та CD163 (для M2) [228], CD206, CD163, HLA-DR, CD14, PD-1 [229], CD68 і стабілін-1 RS1 [161], iNOS та CD163 [167] CD68, HLA-DRIIα, CD163; M1 або M2 цитокіни (відповідно IFN-γ, IL-4 і IL-10), для проточної цитометриї CD14, CD16, CD64, CD86, CD200R та CD163, для імуносорбентного методу IL-6, IL-8, IL-10, моноцитарний колоніє-стимулюючий фактор M-CSF) і для зимографії MMP-9 [28]. Отже, CD68 і CD163 маркери використовувались в різних дослідженнях для визначення ПАМ при РМЗ методом ІГХ [25,27,184]. Але функціональний фенотип цих клітин мало обговорюється.

CD68 та CD163 є членами сімейства скавенджер рецепторів (поглиначів), типовими функціями яких є видалення клітинного сміття, сприяння фагоцитозу та

залучення макрофагів. CD68 є маркером диференціації гемопоетичних клітин лінії моноцитів/макрофагів. В основному він локалізується в пізньому ендосомному компартменті в Мф та дендритних клітинах, з обмеженою експресією на клітинах, які знаходяться у стані спокою [235,236]. CD68 відіграє незначну роль у зв'язуванні та поглинанні окислених ліпопротеїдів та апоптотичних клітин макрофагами [237]. Оскільки CD68-рецептор макрофагів може сприяти підтримці запалення [29], можливо, серед цієї субпопуляції ПАМ присутні представники функціонального типу M1. З іншого боку, деякі скавенджер рецептори не тільки на вищому рівні експресовані в M2 Мф, порівняно з M1, але також сприяють програмі поляризації цих клітин. CD163 сприяє розвитку протизапального фенотипу M2 Мф. Він може секвеструвати і, таким чином, інактивувати прозапальні молекули, такі як TNF-пов'язаний слабкий індуктор апоптозу (TWEAK) [15], і послаблює пошкодження, пов'язані з гемоглобіном [238]. Отже вірогідно, що Мф з фенотипом CD163+ відображає функціонально M2. Базуючись на цих даних, ми досліджували CD68+ та CD163+ ПАМ, вважаючи їх за морфологічні еквіваленти M1 та M2-подібних макрофагів. Поляризація Мф у запальний, або антизапальний фенотип може бути важливим моментом моніторингу активності захворювання [239]. Деякі факти свідчать, що CD68 можуть експресувати інші, немієлоїдні клітини при раку [184]. Також, неспецифічна CD163+ імунореактивність виявлялася в окремих зразках уздовж стінок судин, і на окремих пухлинних клітинах, що підтверджено в літературих джерелах [240] та було враховане при підрахунку імунопозитивних ПАМ у власному дослідженні.

Усі виявлені закономірності щодо власних результатів відносяться до пухлинного процесу, не мають впливу будь-якого лікування, оскільки його розпочинали з оперативного втручання.

Виконуючи мікроскопічне дослідження, для підрахунку брали імунопозитивні макрофаги як у стромі, так і у пухлинних гніздах, тому що локалізація макрофагів залежить від наявності гіпоксичних регіонів у пухлині [241], а також внаслідок неможливості на ряді препаратів точно віднести локалізацію клітин до строми або пухлинного гнізда. Якщо проводити

підрахунок клітин окремо в різних відділах пухлини, необхідно вимірювати відносну площу тих чи інших структур на препараті, що потребує більших затрат і не дає достовірних результатів [226]. Такий підхід не гарантує точність підрахунку, як мінімум внаслідок різної кількості міжклітинної речовини у різних відділах пухлинної строми. Розрахунок макрофагів у співвідношенні до кількості клітин/ядер на певній площі зрізу також не позбавлений неточностей, тому що розміри атипових клітин відрізняються навіть в межах одного зразку, крім того, круглоклітинний інфільтрат надає враження тканинної структури. З іншого боку, ПАМ є представниками макроорганізму господаря і шляхи їх потрапляння до пухлини, цілком зрозуміло, забезпечує сполучна тканина, тому, у цьому відділі, ПАМ присутні обов'язково. Тим не менше, на ряді препаратів ми виявляли ділянки пухлинних комплексів (разом із сполучною тканиною), де ПАМ були відсутні, або поодинокі. Тому було обрано спосіб підрахунку імунопозитивних клітин – на все поле зору у послідовних полях (до речі, саме таким способом підраховують кількість мітозів пухлини для визначення її G-ступеню), який може бути діагностичним експрес-методом, при надійній клінічній інтерпретації *індивідуальних* показників кількості CD68+ та CD163+ ПАМ. Але у групі N1, з метастазами, великий розмах кількісних результатів CD68+ ПАМ (від 0 до 43) відображав високу імовірність екстремальних значень. Тож, трактування персональних даних стосовно кількості CD68+ПАМ та CD163+M2-подібних макрофагів поки не пристосоване до рутинного клінічного використання.

Імунна система відіграє важливу роль у прогресуванні раку. У солідних пухлинах 5-40% маси пухлини представлені ПАМ, і це співвідношення корелює з негативним прогнозом залежно від типу пухлини. Можливо у пухлині, яка прогресує більшість, або всі ПАМ подібні до M2-макрофагів [28]. На відміну від M1, що володіють прозапальною та протипухлинною активністю, M2-макрофаги є імуносупресивними, сприяють реконструкції міжклітинного матриксу, а отже, сприяють росту пухлини [21]. Тим не менше, роль ПАМ не повністю з'ясована при прогресуванні РМЗ. Тому, дослідження взаємозв'язків між певними характеристиками РМЗ та ПАМ є важливим для розуміння локальних функцій цих клітин та наслідків, таких як метастазування. Тому, одним із завдань роботи

було з'ясувати взаємозв'язок між кількісними показниками CD68+ та CD163+ ПАМ при РМЗ та при РМЗ з метастазами у регіональні лімфовузли, при цьому використавши врівноважені за молекулярно-біологічними типами (а також за TNM стадією та G ступенем) групи дослідження.

Раніше показано, що висока щільність інфільтрації РМЗ CD68+ ПАМ сприяє інвазії та лімфатичному метастазуванню РМЗ і має негативну кореляцію з прогнозом для пацієнток [172]. У власній роботі при статистичному порівнянні кількісних результатів двох груп дослідження, підрахованих *даних з усіх полів зору,* встановлено достовірно більшу кількість CD68+ клітин, але не CD163+, у другій N1 групі (p=0,015), порівняно з першою N0 (підрозділ 3.2), що узгоджується з висновками процитованого дослідження.

Але, оскільки ми припускали, що серед CD68+ ПАМ має місце представництво прозапальних M1 Мф, то їх збільшення при метастазуванні у лімфовузли не узгоджується з клінічними дослідженнями, які демонструють, що CD163+ ПАМ сприяють метастазуванню при РМЗ [242], щоправда, ці дослідження враховували кількість CD163+ ПАМ біномінально: як високу та низьку, і не визначали кількість CD68+ ПАМ при цьому. Пояснення може полягати у тому, що як мінімум частина CD68+ ПАМ у нашому дослідження могли функціонально бути M2, як це показано при інших патологіях [243], а також, що частина ПАМ можливо були подвійно позитивними [235], що прослідковане і у власному дослідженні, при спостереженні співлокалізації CD68+ та CD163+ ПАМ, як описано далі.

Спостереження про домінування кількісних показників CD68+ клітин над CD163+ ПАМ в обох групах (p<0,0001, рис. 3.2) узгоджується з попередніми припущеннями про частину ПАМ з подвійним позитивним фенотипом.

Оскільки молекулярно-біологічний тип РМЗ визначався згідно даних про експресію ER, PR, HER2 і включав Ki67 та G-ступінь, було перевірено кореляційні взаємовідносини із середніми кількісними показниками CD68+, CD163+ та співвідношенням клітин всього масиву пацієнток (без розподілу на групи). Сигналізація через ER та PR при РМЗ відіграє важливу роль у прогресуванні хвороби [74]. У роботі [225] виявлена кореляція CD163+

макрофагів, які локалізуються саме у пухлинній стромі з негативним статусом по ER та PR. Аналогічні взаємозв'язки виявляють і інші автори [242]. Що співпадає з нашими знахідками: встановленою зворотною кореляцією між CD68+, CD163+ ПАМ та клінічним значенням ER/PR ($p=0{,}02$ та $p=0{,}009$, відповідно).

Рівень експресії Ki-67 дозволяє оцінити проліферативний потенціал пухлини, оскільки виявляє клітини, що знаходяться в процесі підготовки до поділу і в фазі мітозу. Біологічне обґрунтування можливого взаємозв'язку Ki-67 й ПАМ – останні здатні вливати на проліферативний потенціал пухлини [244]. Ми виявили прямі достовірні кореляційні взаємозв'язки між кількістю CD68+ ПАМ і Ki67 ($p=0{,}04$). Не виключено, що проліферація пухлини і кількість CD68+ ПАМ синергічно відображають її прогресування, враховуючи функції М1 макрофагів (як субпопуляції CD68+ ПАМ), такі як очищення некротичних ділянок [130]. Разом із власними результатами про достовірне збільшення CD68+ ПАМ (але не CD163+М2) при метастазуванні, кореляція їх з Ki67 може передбачати пропухлинний потенціал саме М1-подібних ПАМ. Результати нещодавнього дослідження in vitro свідчать про те, що продукція макрофагами ІЛ-1β відіграє важливу роль у міграції клітин РМЗ та їх адгезійної здатності до клітин крові та лімфатичних ендотеліальних клітин та їх трансміграції [23,245]. М1 макрофаги, у свою чергу, добре відомі як визначне джерело ІЛ-1 [23].

Інші автори у дослідженні з більшим числом учасниць, виявили позитивну кореляцію Ki67 з кількістю CD163+ макрофагів, розміщених саме в пухлинній стромі [225], що пояснюється властивостями М2 макрофагів такими як забезпечення васкуляризації та імуносупресія [159,242], а також частково узгоджується з власними спостереженнями типової локалізації CD163+ ПАМ у стромі пухлини.

Всі ці дані відображають не до кінця вирішене питання функції CD68+ та CD163+ ПАМ при РМЗ. Деякі автори вважають, що на початкових етапах розвитку пухлини сприятливим для розвитку пухлини є активність М1-макрофагів, а на пізніх – М2 [244], за іншими даними, М1 клітинам приписують суто антипухлинну тумороцидну активність [30].

Знайдені в нашій роботі взаємозв’язки відображають залежність молекулярно-біологічних типів РМЗ і кількісних показників зокрема CD68+ ПАМ. І, повертаючись до встановлених великих розмахів кількісних результатів ПАМ (табл. 3.4, рис. 3.1) та кореляційних взаємовідносин, ми провели аналіз в межах молекулярно-біологічними типами пухлин.

Люмінальні А і В типи РМЗ демонструють експресію генів, пов'язаних з естрогенними рецепторами (ER), і мають кращий прогноз безрецидивного виживання, ніж HER2-збагачені та базально-подібні підтипи, які зазвичай є ER-негативними. Тому їх аналізували разом, врівноважено розподіливши на 2 підгрупи: без метастазів та з метастазами в регіональні лімфовузли, згідно дизайну дослідження.

Оскільки в великій кількості дослідженнь повідомляють про зв’язок саме локалізації ПАМ з прогнозом безрецидивного виживання [225], ми також детально проаналізували локалізацію CD68+ і CD163+ ПАМ.

Типовою локалізацією CD68+ і CD163+ ПАМ була строма пухлини, у різній кількості ПАМ виявлялися у пухлинних гніздах. Також типово чисельність CD68+ перевищувала CD163+ ПАМ, що може пояснюватися обраними маркерами – CD68 – для всіх макрофагів, CD163 – для М2-подібних. Відповідно, солокалізацію CD163+ ми відмічали в периферичних жирових і десмопластичних відділах строми та в деяких гніздах (у меншій кількості), у вигляді другої лінії інфільтрації у стромі (на відстані від гнізд). Огляд [244] відображає що по-різному активовані ПАМ постійно знаходяться у різних за оксигенацією регіонах пухлин. На моделі аденокарциноми молочної залози показано що MHC-II^{low} ПАМ, які експресують М2-асоційовані маркери (а саме IL-4Rα, стабілін-1, CD204 і CD206) виявлені у гіпоксичних відділах, у той час як MHC-II^{high} ПАМ, з М1-подібним фенотипом, знаходяться у відділах з нормальним рівнем кисню. Тож, фенотип макрофагів значно пов’язаний з гіпоксичним середовищем (а саме некротичними і бідно васкуляризованими ділянками). Більшість солідних пухлин містять відділи гіпоксії як наслідок аномальної васкуляризації та високої метаболічної активності. Отже, рекрутуючись у пухлину, макрофаги потрапляють у некротичні ділянки, можливо за рахунок переривання хемотактичної відповіді після де-

фосфорилювання VEGFR і CCR2 під впливом мітоген-активованої протеїнкінази фосфатази (MKP-1).

Також у нашому дослідженні регулярно спостерігалися ділянки гнізд/пухлинних кластерів, де всі імунопозитивні ПАМ були відсутні (рис. 3.4), що можна пояснити, як мінімальне прогресуванням пухлинного поділу.

Згідно відомих 4 базових функцій макрофагів in vivo, а саме: розпізнання антигенів, загоєння, знищення/пригнічення патогенів та презентація епітопу [146], локалізація CD68+ ПАМ (серед яких, ми припускаємо присутні М1-подібні Мф) у гніздах пухлин пояснюється співлокалізацією з некротизованими або дистрофічними пухлинними клітинами, але також це може бути проявом функції антипухлинного захисту М1-клітинами [146], фагоцитозу або злиття CD68+ ПАМ з пухлинними клітинами [115,174]. У власному дослідженні зареєстровано морфологічно фагоцитоз або злиття CD68+ ПАМ з пухлинними клітинами у метастазах в лімфовузлах (рис. 3.8).

Локалізацію CD163+ М2-подібних ПАМ у щільній волокнистій десмопластичній стромі (рис. 3.5) можна трактувати, як реалізацію процесу «загоєння». Розпізнаючи антиген, макрофаги отримують (від власного організму) сигнали, які індукують їх для відновлення тканин й міжклітинної матриці – функція, яка переважає при М2-поляризації [155]. Підхід функціональної морфології у трактуванні результатів дозволяє помітити вищезгадані стандартні функції М2, про які сучасні поглиблені огляди майже не згадують, описуючи надзвичайні можливості ПАМ. Не виключено, що надмірне відкладення/утворення строми може просто захищати пухлину від імунного нагляду і погіршувати проникнення ліків, як це відбувається наприклад, при протоковій карциномі підшлункової залози [246].

Опис локалізації ПАМ, як зазначалося, був прив’язаний до морфології люмінальних пухлин, яка була дуже різноманітна, навіть в межах клінічно розсортованих вузьких типів, як детально описано у табл. 3.7-3.9. Люмінальний РМЗ має неоднорідні морфологічні прояви [247]. Люмінальний А (ER+/HER2–) є найбільш поширеним люмінальним підтипом і становить приблизно 40-70% усіх випадків РМЗ. Він має високий рівень експресії генів, пов'язаних з ER, низьку

експресію кластеру HER2 та пов'язаних з проліферацією генів. Передбачає низький гістологічний клас і кращий прогноз, ніж люмінальний В підтип [248,249].

Кількості CD68+ ПАМ в мікрооточенні РМЗ (неуточненого типу) за даними [172] мають показники – 61,14±23,76/на поле зору великого збільшення (на 100 випадків РМЗ), і підраховані у ділянках максимального представництва цих клітин. У власному дослідженні використано підрахунок у послідовних полях зору, тому отримані менші кількосі, зокрема для люмінальних РМЗ у даній роботі. Дослідження [24] показали, що висока інфільтрація ПАМ достовірно асоційована з негативним статусом по рецепторам гормонів, а CD163+ – з ER-негативними низькодиференційованими протоковими карциномами молочної залози [28]. Вищезазначені дані дають пояснення меншій кількості ПАМ, визначених нами у люмінальних типах РМЗ. Оскільки при люмінальних типах РМЗ ми не виявили статистично значущих відмінностей в рівнях інфільтрації CD68+, і CD163+ ПАМ в залежності від метастазів у лімфовузли, то аналізували індивідуальні дані.

Важливо, що при порівнянні між N0 N1 групами, у яких було порівну представлено по 5 молекулярно-біологічних типів РМЗ (що описано вище та у підрозділі 3.2), при розвитку метастазів кількісні показники CD68+ клітин зростали! Але при люмінальному В HER2– РМЗ індивідуальні кількісні показники CD68+ ПАМ знижувалася при метастазуванні (табл. 3.8). Отримані нами результати відрізняються від досліджень [26], де при такому ж самому типі РМЗ більше число $CD68^{+}RS1^{+}$ Мф у мікрооточенні солідних структур було пов’язане з підвищеним ризиком метастазування у лімфовузли. Що може пояснюватися різними відділами РМЗ, взятими для підрахунку клітин.

При люмінальному А і люмінальному В HER2+ чисельність CD163+ ПАМ в залежності від метастазів змінювалися протилежно: у першому випадку зменшувалася, у другому – збільшувалася (табл 3.7 і табл. 3.9), що може пояснюватися як мінімум відносно специфічною морфологією всіх зразків люмінального В HER2+ РМЗ другої N1 групи, де виявлені ознаки лімфоваскулярної інвазії. Отримані нами дані підтверджуються дослідженням [165], де на моделі карциноми молочної залози у мишей показано, що саме М2-макрофаги були джерелом продукції епідермального фактора росту (EGF) і були

здатні до активації сигналізації через EGF-рецептор на пухлинних клітинах, експресія HER2 пухлиною і присутність M2 ПАМ можуть знаходитися у прямій залежності, якщо вважати CD163+ ПАМ M2 типом.

З наведеними даними узгоджується і знахідка, що при люмінальному В HER2– РМЗ на всіх зразках, не залежно від підгрупи N0/1, зустрічалися лише поодинокі CD163+ ПАМ. Отже, окрім HER2 і M2, інші фактори також сприяють метастазуванню. Різнонаправлені зміни чисельності Мф, що інфільтрують люмінальні типи РМЗ, в залежності від метастазування, також можуть пояснювати статистичну недостовірність змін середніх значень.

Отже, в залежності від метастазування у лімфовузли, CD163+ клітини можуть мати різне представництво при різних типах люмінальних РМЗ, що встановлено у нашому дослідженні. Отримані нами статистично достовірні дані про переважання CD68+ ПАМ над CD163+ на люмінальних А (p=0,0395 p=0,008, p=0,0344 для груп N0, N1 та метастазів в лімфовузлах, відповідно) та В HER2– зразках (p=0,0021, p=0,0001, p=0,0048), та, головне, зниження CD68+ і CD163+ ПАМ в метастазуючих зразках люмінального В HER2– РМЗ (p=0,0294, p=0,0079, відповідно), але не для В HER2+ (рис. 3.14), підкреслють взаємозв’язки між типом пухлини і ПАМ.

Ознаки лімфоваскулярної інвазії, згідно морфологічних досліджень, притаманні мікропапілярній карциномі, яка складає 1.5-2.5% [232], а за іншими джерелами – 6% від інвазивних карцином [62]. Кілька досліджень припускають, що макрофаги сприяють інтравазації – ключовому аспекту метастатичного поширення пухлинних клітин [244]. І у нашому дослідженні, збільшена чисельність CD163+ ПАМ в індивідуальних люмінальних В HER2+ пухлинах співпадає зі спостереженнями лімфоваскулярної інвазії.

Важливими чинниками, визначеними в нашому дослідженні та які підкреслюють доцільність персоніфікованого підходу є: різні тренди змін CD68+ і CD163+ ПАМ в залежності від метастазування у повних (з представництвом всіх молекулярно-біологічнх типів) N0 та N1 групах (збільшення CD68+ ПАМ), виокремлених люмінальних N0 та N1 підгрупах (відсутність єдиного тренду) і навіть в межах люмінальних типів (достовірне зниження CD68+ і CD163+ ПАМ

при метастазуванні люмінального В HER2– РМЗ; індивідуальні зниження середніх показників CD163+ ПАМ при метастазуванні люмінального А, і підвищення при метастазуванні люмінального В HER2+). Ці дані демонструють зв'язки між молекулярно-біологічним типом РМЗ, представництвом у них ПАМ та лімфатичним метастазуванням.

Дстовірні кореляції між кількісними показниками ПАМ в первинному вогнищі та при метастазах при всіх люмінальних РМЗ не встановлено. Це означає, що лімфатичне метастазування не є пасивним переносом клітин, а супроводжується численними змінами [90,91,102], які розпізнаються макрофагами, і у яких ці клітини беруть участь. Імунне запалення є важливим компонентом прогресування пухлини, і запальні клітини розглядаються як обов'язковий учасник прогресування [оглянуто у 93,107-109]. Це дає підстави вважати функцію М1 макрофагів при онкогенезі та метастазуванні порушеною. Цікавим питанням є стан вартових макрофагів, коли з під їх нагляду вислизають перші пухлинні клітини. Можливо вади функціонування Мф і призводять до онкогенезу?

Як згадувалося вище, ПАМ здатні вливати на проліферативний потенціал пухлини [244]. На підтвердження цих даних, ми встановили зворотно-пропорційний зв'язок між G-ступенем люмінальних типів РМЗ і кількістю CD68+ ПАМ (табл. 3.10). Таким чином, припускається зв'язок CD68+ ПАМ з прогресуванням люмінальних РМЗ, а CD163+ ПАМ – з лімфатичним метастазуванням.

Нелюмінальний HER2+ РМЗ, у якого відсутній рецептор гормону, становить 25% - 30% РМЗ і має різні клініко-патологічні характеристики, відповідь на лікування та прогноз, що демонструє підвищену здатність до ранніх метастазувань та стійкість до лікування [250]. Його зразки аналізували виокремлено із загального масиву, порівнюючи 2 врівноважені підгрупи: без метастазів та з метастазами в регіональні лімфовузли, згідно дизайну дослідження. Аналіз ґрунтувався на індивідуальних даних пацієнток і у статистичний підрахунок включали числові дані з 5 полів зору кожного препарату. Також ретельно аналізували патоморфологічні особливості зразків для встановлення зв'язків з локалізацією ПАМ.

Охарактеризована нами патоморфологічна різноманітність нелюмінального РМЗ та відмінності між первинним джерелом та метастазами в лімфовузли, поряд із спільними рисами (десмопластична реакція строми, фокуси/осередки некрозу, наявність мікрокальцифікатів, ознаки запалення у вигляді лімфоплазмацитарної інфільтрації) не є унікальними і може бути притаманна будь-якому молекулярно-біологічному типу РМЗ. Відомо, що нелюмінальні пухлини, спільні за міоепітеліальним походженням, розвиваються у лобулярні і протокові гістологічні види [232]. Огляд [251] на основі аналізу, зокрема, досягнень генетичних методів, додає розуміння *міжпухлинної і внутрішньопухлинної гетерогенності* при РМЗ. Гетерогенність традиційно вважається найбільшим бар'єром у лікуванні онкопатології: РМЗ складається з кількох субклонів з різними соматичними мутаціями, копіями ряду аберацій та хромосомних реаранжувань. Клональна конкуренція і селективний тиск з боку мікросередовища і терапії призводить до динамічних змін цих субклонів. Таке поширене явище як некроз в межах пухлини (у кількісних характеристиках та відносному розподілі у протокових карциномах in situ та в інвазивних компонентах) вважається незалежним морфологічним прогностичним фактором при РМЗ [232]. Відомо, що деякі інвазивні протокові карциноми мають виражений запальний інфільтрат, що складається в основному із зрілих лімфоцитів, а таож із плазматичних і тучних клітин, гістіоцитів, нейтрофілів. Лімфоцити це переважно CD8+ цитотоксичні супресорні Т-клітини. Вплив запальної реакції на прогноз наразі вважається не з’ясованим остаточно: різні дослідження показали зв’язок з кращим або гіршим прогнозом безрецидивного виживання [232]. Не дивлячись на спільні риси РМЗ, наприклад, стосовно десмопластичної реакції строми, позаклітинна матриця також дуже різнилася серед зразків різних пацієнтів з РМЗ [252].

Як зазначалося вище, для РМЗ незалежно від молекулярно-біологічного типу і на більшому числі хворих, висока щільність інфільтрації РМЗ CD68+ ПАМ сприяє інвазії та лімфатичному метастазуванню РМЗ, має негативну кореляцію з прогнозом для пацієнток [172], високу прогностичну цінність [253]. Аналогічна закономірність виявлена у власному дослідженні для вузької підгрупи

нелюмінального HER2+ РМЗ: достовірне збільшення CD68+ ПАМ, але не CD163+ клітин при регіональному метастазуванні (p<0,0001), що характеризувати збільшення саме М1-типу ПАМ і їх сприяння метастазуванню, як це передбачається для інших пухлин [254]. Але йде в розріз із клінічними дослідженнями, в яких відображено, що CD163+ ПАМ сприяють метастазуванню при РМЗ, хоча автори не виділяють молекулярно-біологічні типи РМЗ [237]. Ці ж самі автори відзначають, що наявність високих рівнів саме CD163+ ПАМ частіше спостерігається при HER2+, та потрійному негативному РМЗ, і пов'язане з ознаками агресивних пухлин, зокрема з інвазією судин. Що частково співпадає з власними результатами стосовно описаних вище зразків метастатичних люмінальних В HER2+ РМЗ. Хоча інвазія пухлини може бути і незалежним прогностичним чинником РМЗ [255].

Аналіз особливостей локалізації ПАМ при нелюмінальному HER2+ РМЗ показав відносну перевагу CD68+ ПАМ саме в межах пухлинних гнізд, що припускає їх певну роль у безпосередній взаємодії з пухлинними клітинами. Тоді як типова локалізація CD163+ ПАМ переважала у стромі і біля некротичних ділянок (де їх кількісні характеристики співпадали з CD68+ ПАМ), як обговорено і для люмінальних типів РМЗ.

Результати нашого дослідження показали зменшення кількості CD68+ ПАМ (p<0,0001, тест Вілкоксона, рис. 3.21) у метастазах в лімфовузли, порівняно з первинними РМЗ. В межах візуально збереженої лімфоїдної тканини лімфовузлів, навколо метастазів, ПАМ утворювали одиничні зосередження. Інші автори повідомляють, що в уражених метастазами лімфовузлах щільність інфільтрації ПАМ достовірно нижча, ніж в незайманих парних, що говорить про зв'язок кількісних характеристик ПАМ з метастазуванням [172]. Враховуючи те, що в лімфовузлах кількість CD68+ ПАМ зменшувалася, порівняно з первинними вогнищами РМЗ, а також кореляція не була підтверджна, можливо припустити, що їх роль відрізняється від первинних вогнищ. Аналогічні припущення роблять і інші автори [172]. Крім того, пояснення кількісних змін і відсутності кореляцій між первинним вогнищем і метастазами може полягати у зміні молекулярно-

біологічного типу пухлини в метастазах [56] та іншими механізмами внутріпухлинної гетерогенності [251].

Таким чином, обраний індивідуальний підхід у трактуванні результатів досліджень є виключно важливим при РМЗ і відповідає вимогам майбутнього.

Потрійний негативний РМЗ – естроген-, прогестерон- і HER2-рецептор негативний, часто вражає молодших жінок і звичайно має гірший прогноз, порівняно з іншими типами. Недавній огляд [256] показав, що не дивлячись на інтенсивне вивчення лейкоцитів, які інфільтруюють пухлину, та їх підгруп (CD8 + і Т рег), жоден з цих показників не являється практично значимим, хоча ПН РМЗ відрізняється від інших типів, зокрема, клітинним складом імунного інфільтрату з прогностичною достовірністю. Склад підтипів макрофагів відрізняється при ПН РМЗ від інших типів РМЗ. Стюарт та ін. (2012) [233] показали, що базально-подібні клітини РМЗ мають більшу здатність, стимулювати диференціювання макрофагів у клітинних культурах та індукують поляризацію фенотипів M1 та M2, створюючи популяцію макрофагів, відмінних від популяції, утвореної під впливом клітин РМЗ менш агресивного типу. Ми аналізували зразки ПН РМЗ виокремлено із загального маси зразків, порівнюючи 2 врівноважені підгрупи: без метастазів та з метастазами в регіональні лімфовузли, згідно дизайну дослідження. Аналіз ґрунтувався на індивідуальних даних пацієнток і у статистичний підрахунок включали числові дані з 7 - 10 полів зору кожного препарату. Також ретельно аналізували патоморфологічні особливості зразків для встановлення зв'язків з локалізацією ПАМ.

Патоморфологічні особливості ПН РМЗ (протяжність строми, щільність представництва у ній резидентних непухлинних та інфільтруючих клітин, риси морфології пухлинних клітин), як і спільні характеристики (десмопластична реакція, щільна лімфоплазмоцитарна інфільтрація, ознаки некрозу в первинній пухлині та лімфатичних метастазах) досліджувалися і раніше [247]. В літературних даних наведена значна інфільтрація ПАМ у гіпоксичних/некротичних ділянках пухлин, за рахунок хемокінів (CCL2, CCL5, VEGF, CSF-1, семафорин 3А (SEMA3A), ендотелін, еотаксин та онкостатин M), з наступною пропухлинною дією через фактор транскрипції HIF1a, який викликає

експресію великого набору генів, пов'язаних з ангіогенезом, такими як VEGF [241], що передбачає М2-подібну поляризацію ПАМ в цих відділах. З іншого боку, експериментальне дослідження карциноми легень на моделі у мишей по збільшенню оксигенації пухлини, не змінювало у ній ні кількості, ні співвідношення M1/M2, але специфічно знижувало експресію генів, чутливих до гіпоксії та ангіогенну активність М2 ПАМ (MHC-II (lo) [155]. Це пояснює наші знахідки співлокалізації CD68+ та CD163+ ПАМ у гістологічно-візуалізованих зонах некрозу, де можливо ПАМ реалізують і М1, і М2-функції.

Одне з головних спостережень дослідження – частина гнізд/пухлинних комплексів у первинних вогнищах ПН РМЗ і метастазах були інфільтровані скупченнями тільки CD68+ ПАМ (які не повторювали CD163+ ПАМ), а отже були можливо, М1-подібними макрофагами (рис. 3.24). У першій групі, N0, схоже, саме ці клітини утворювали власні осередки у гніздах, і набували зливної та/або вакуолізованої форми, що може відображати їх активність (рис. 3.24). Контакт пухлинних клітин з макрофагами може сприяти інвазії: та спільній міграції цих клітин, уздовж волокон матриксу й інтравазують також разом, що доводить наявність в зразках поєднання ендотеліоцита, макрофага і пухлинної клітини [257]. Підхід функціональної морфології, застосований у нашому дослідженні, дозволяє припустити, що саме М1-подібні ПАМ найбільше контактують з пухлинними гніздами, що може складати передумови просування, або метастазування пухлини у первинному вогнищі. Механізмом, що лежить в основі може бути злиття Мф і пухлинних клітин [174].

Лімфатичні метастази можуть бути переважним способом поширення для РМЗ, а лімфатичні шляхи є не лише пасивними магістралями, але і полегшують активний відбір пухлинних клітин до місцевих та дистальних лімфатичних вузлів за допомогою сигналізації CCL21-CCR7; сприяють виживанню метастазуючих ракових стовбурних клітин за рахунок сигналізації CXCL12-CXCR4, та змінюють запальну відповідь господаря, яка порушує імунний нагляд за пухлиною [93]. Порівняно з первинним вогнищем, у відповідних метастазах ми виявили зменшення кількісних показників CD68+ ПАМ, щоправда порогове (p=0,047) (рис. 3.29), та кореляційне співвідношення між кількостями CD163+ ПАМ

первинного вогнища і метастазу (кореляція Спірмена: p=0,0024, r=-0,627) (табл. 3.12); в основі останнього може лежати сумісна міграція пухлинних клітин і макрофагів [257], але не виключені інші механізми [172].

Аналіз співлокалізації CD68+ і CD163+ ПАМ у лімфатичних метастазах показав зосередження в некротичних ділянках CD163+ ПАМ, а навколо метастазу й у його стромі та гніздах – зосередження CD68+ ПАМ, що також може свідчити на користь розподілу М2/М1 функцій. Не виключено, що в лімфовузлах функція М1 ПАМ (фагоцитоз та антигенпрезентація) пригнічені, виходячи з їх кількісного зменшення порівняно з первинним вогнищем і припущення інших авторів [172]. Серед виявлених нами CD163+ ПАМ у метастазах можлива перевага проангіогенних TIE2^{+}/CD31^{+}Мф з пропухлинним потенціалом, що також відмічено і в роботі інших дослідників [258]. Отримані дані вкладаються у загальноприйняту концепцію, що М1 ПАМ мають антипухлинний потенціал, а М2 – пропухлинний, що також відмічено і у нашому дослідженні. В обговоренні і підсумках ми базувалися на результатах статобробки первинних результатів з кожного поля зору, які підтвердили емпіричною оцінкою статистичного моделювання. При метастазуючих ПН РМЗ встановлено збільшення кількості CD68+ ПАМ ($p<0,0001$) та CD163+ ПАМ ($p<0.0005$) (рис. 3.29), що узгоджується з результатами досліджень цього напрямку із більшим числом учасників, і підтверджує роль ПАМ, зокрема їх підрозділу – М2-подібних макрофагів, як сприятливих для розвитку пухлини [224]. Несприятливий прогноз при ПН РМЗ пов'язаний з високою щільністю інфільтрації ПАМ [187], та з вищим ризиком дистантних метастазів [259]. Отже, ці дані підтверджують, що підвищення чисельності CD68+ ПАМ, як мінімум за рахунок подвійно позитивної (з CD163+) частини ПАМ, сприяє метастазуванню ПН РМЗ.

Недавні дослідження із створенням комп'ютерної обчислювальної моделі ПН РМЗ [260] продемонстрували, що відносно мала кількість макрофагів (щоправда без розподілу на М1/М2) посилює ріст пухлини, більша – здатна гальмувати. Аналізуючи ці дані, виникає запитання про кількісні характеристики субтипів ПАМ вцілому при РМЗ.

Отримані нами результати не надають точні діагностичні або прогностичні значення CD68+ ПАМ чи CD163+ для використання у клінічній практиці, хоча їх кількісні коливання достовірні, але враховані індивідуально і доповнюють відомості щодо патогенетичного внеску. Важливість опрацювання індивідуальних данних підтверджена і іншими дослідниками, які показали, що при ПН РМЗ склад ПАМ, очевидно, різниться між індивідуальними зразками [256].

Основний підсумок нашої роботи полягає в тому, що, на відміну від люмінальних типів РМЗ в індивідуальних зразках, які при метастазуванні характеризувалися порівняно меншими середніми кількостями CD163+ ПАМ: тип А (табл 3.7), порівняно збільшеною середньою кількістю CD163+ ПАМ: тип В HER2+ (табл. 3.9), та достовірним зниженням CD68+ та CD163+ ПАМ: тип В HER2– (рис. 3.14), а також на відміну від нелюмінального HER+ РМЗ, при якому при метастазуванні збільшувалася чисельність CD68+ ПАМ, $p<0,0001$ (рис. 3.21), ПН РМЗ, за умов лімфатичного метастазування, характеризується збільшенням CD68+ і CD163+ ПАМ ($p<0,0001$, $p<0,0005$). Ці дані підтверджують взаємозв’язок ПАМ відповідних фенотипів (і вірогідно функціональних типів М1 і М2) та молекулярно-біологічного типу РМЗ.

Важливим аспектом є визначення можливих функціональних особливостей ПАМ при онкопатології. Як припускається, ПАМ при РМЗ можуть мати функції як М1 так і М2-подібні [22], морфологічним еквівалентом яких ми припустили є CD68+ і CD163+ ПАМ. Раніше встановлено, що TNF-α стимулює рухливість клітин РМЗ та інвазію шляхом апрегуляції матриксних металопротеїназ та індукції сигнальних шляхів c-Jun N-термінальних кіназ (JNK) та ядерного фактору капа бі (NF-κB) [261], що може пояснювати внесок М1 ПАМ у прогресування пухлин. У будь-якому разі, реалізація функцій М1 ПАМ, широко відома, як антипухлинна [262], не відновлює імунний нагляд, оскільки у всіх зразках РМЗ ми спостерігали присутність двох фенотипів ПАМ за умов розвинених пухлин, як з метастазами так і без. Стосовно ж пропухлинного внеску CD163+, отримані результати переважно вкладаються в сучасну концепцію, хоча їх кількісні зміни відповідно до лімфатичного метастазування відзначали не при всіх типах РМЗ.

Тому, інфільтрація ПАМ РМЗ залежить від молекулярно-біологічного типу РМЗ, від метастазування, а також має значні індивідуальні коливання.

Подвійна функція рецептору CD163 на Мф: зв'язування комплексів Hp – Hb, що стимулює індукцію гемоксигенази-1 (HO-1) [202], що постачає залізо для фероптозу пухлини [203], і зв'язування TWEAK, яка може запобігти стимуляції пухлини [208], говорить про можливу і антипухлинну роль CD163+ M2-подібних ПАМ. Ці дані підтверджують сучасні уявлення про функціонування макрофагів, як ключових клітини для обробки метаболічних сигналів мікрооточення [15,16].

Експресія скавенджер-рецепторів CD68 і CD163 макрофагами є певними сенсорами на навантаження мікросередовища такими метаболітами як окислені ліпопротеїни низької щільності і гемоглобін-гаптоглобінові комплекси, а фероптоз – процес у який залучені ліпіди і залізо- пов'зує CD68 і CD163. Переважно залізо-залежне накопичення продуктів перекисного окислення ліпідів вважається головним некротичним чинником у фероптотичному процесі. І, беручи до уваги дані літератури, CD68 і CD163 Мф можуть очищувати мікрооточення пухлини від цих метаболітів, заважаючи фероптозу. Зрештою, фероптоз, як вважають, служить критичним бар'єром для розвитку раку [оглянуто у 205] в тому числі і РМЗ [263].

Окремим питанням є відсутність і CD68+ і CD163+ ПАМ в більшій або меншій частині пухлинних кластерів, що відзначено у всіх досліджуваних зразках, і, враховуючи, що CD68+ вважають загальним маркером для всіх макрофагів [183], виникає питання у присутні в цих зонах макрофаги взагалі. Якщо припустити що ні, то, очевидно, що не вся пухлина сканується макрофагами і частина вислизає з під їх впливу, що, у свою чергу може розцінювати, як первинний вплив пухлин на ПАМ.

Аналіз зв'язку кількісних показників первинної РМЗ CD68+ та CD163+ ПАМ з прогнозом безрецидивного виживання був одним із завдань роботи, яке вирішене після 4-річного спостереження пацієнток двох груп дослідження, згідно дизайну. Застосовано статистичний метод Каплан-Майєра, який має назву виживаності або виживання фігурально, оскільки базується на експоненціальній кривій і функції, яку вона описує для аналізу даних до часу подій.

Відносно вищий рівень інфільтрації CD163+ ПАМ корелював із зниженням виживання, що не досягало достовірності, проте вкладається у загальну концепцію про негативний прогноз інфільтрації пухлин саме М2-подібними Мф [21]. Попередні дослідження демонструють, що підвищена щільність макрофагів у біопсіях хворих на РМЗ до лікування корелює зі зниженням безрецидивного та загального виживання [172]. У літературі обговорюються свідоцтва того, що і М1, і М2 Мф мають пропухлинні властивості: на ранніх стадіях трансформації М1-подібні ПАМ, за рахунок виробництва реактивних форм кисню і азоту, можуть потенційно підвищувати швидкість мутацій епітеліальних клітин і, таким чином, прискорювати пухлинний процес; у розвинутих пухлинах Мф демонструють альтернативно активовані функції М2, включаючи продукцію імуносупресивних факторів (ІЛ-10 і TGF-β), які здатні активно пригнічувати антипухлинну імунну відповідь, продукують фактори росту і перебудовують матрицю, підтримуючи ріст пухлинних клітин і посилюючи інвазію [23]. Тим не менше, у дослідженні, присвяченому вивченню локалізації макрофагів у пухлинах молочної залози людини, високе представництво CD68+ Мф в просвітах протокових пухлин корелювало зі зменшенням метастазів у лімфатичних вузлах [161], можливо відображаючи певну протидію пухлинному процесу.

Інші дослідження, з більшим числом учасниць (n=100), виявили що високий рівень інфільтрації CD68+ ПАМ тканини пухлин був достовірно пов’язаний з гіршим прогнозом, порівняно з відносно низьким рівнем інфільтрації [172], але ці результати не скориговані за молекулярно-біологічними різновидами РМЗ.

У нашому дослідженні відзначено, що і CD68+, і CD163+ ПАМ групувалися у різних відділах пухлини і їх локалізація дуже залежала від сполучнотканинних структур пухлини, доречи, майже всі зразки РМЗ, зокрема люмінального, характеризувалися виразною десмопластичною реакцією [228]. Тож, імовірно, ПАМ є важливими регуляторами вироблення та ремоделювання міжклітинного матриксу в мікрооточенні пухлин, що досліджено менше, але є прямим відображенням стандартних функцій Мф [23,146]. Це твердження опосередковано підтверджується даними, що гістологічна локалізація ПАМ у

різних відділах РМЗ кореляційно пов'язана з ризиками метастазування та прогнозом [26, 225].

За більш ранніми даними літератури, і M1, і M2 ПАМ при РМЗ здатні пригнічувати проліферацію Т-клітин, проявляючи імуносупресію і пропухлинну дію [159]. Інші дані повідомляють про здатність не усіх ПАМ пригнічувати проліферацію CD8 Т-клітин [160]. Отже, деякі функції ПАМ, швидше за все, є універсальними (рекрутування, локалізація, ремоделювання матриксу), тоді як інші властивості (специфічні взаємодії з іншими інфільтруючими клітинами) можуть залежати від досліджуваної моделі пухлини [23]. Ці висновки можуть пояснювати знахідки доказів негативного впливу різних, але не всіх субпопуляцій ПАМ на прогноз при РМЗ, і отже, залишають припущення про захисну роль деяких з них у поєднанні з індивідуальними особливостями пухлини.

У підсумку, одна з причин, що пояснює відсутність статистично достовірних результатів при аналізі виживаності серед усіх пацієнток, без розподілу на групи і підгрупи – це великий індивідуальний розмах кількісних показників CD68+ і CD163+ ПАМ, як у зв'язку з молекуляно-біологічним типом пухлини, продемонстрованим вище, так і з їх статусом лімфатичного метастазування.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене нове вирішення наукового питання про залежність кількісних показників інфільтрації CD68+ та CD163+ ПАМ первинного вогнища РМЗ та метастазів лімфовузлів від його молекулярно-біологічного типу.

1. Кількісні показники CD68+ ПАМ переважали над CD163+ ПАМ (p=0,015) в обох N0 і N1, врівноважених за молекулярно-біологічними типами РМЗ, групах дослідження. У групі з метастазами кількісні показники CD68+ ПАМ підвищувалися (p<0,0001), але мали великий розмах індивідуальних значень. Разом із кореляцією між CD68+, CD163+ ПАМ та ER/PR (p=0,02 та p=0,009, відповідно), а також між кількістю CD68+ ПАМ і Ki67 (p=0,04) (що встановлена на повній виборці), ці знахідки дозволяють прослідити взаємозв'язки між ПАМ та типом РМЗ.

2. При люмінальному А РМЗ (ER+, PR+, HER2-, Ki67≤15%) збільшення кількісних показників CD68+ ПАМ над CD163+ ПАМ в 2-3 рази (p=0,0395, p=0,008), в первинних вогнищах груп N0 і N1, а також в метастазах лімфатичних вузлів, обумовлює менш агресивний перебіг, порівняно з іншими типами раку РМЗ, а також високу ступінь диференціації пухлини, та потребує ендокринної терапії для блокування рецепторів ER і PR.

3. При люмінальному В HER2+ РМЗ (ER+, PR+, HER2+, Ki67- будь який) відмічено вірогідне підвищення CD68+ ПАМ лише в метастазах лімфовузлів.

4. При люмінальному В HER2- РМЗ (ER+, PR+, HER2-, Ki67>15%) зниження кількості CD68+ ПАМ (p=0,0294) в первинному вогнищі групи N1 і високі показники CD 163+ ПАМ в метастазах лімфатичних вузлів свідчить про інфільтрацію CD 163+ клітинами метастазів лімфатічних вузлів та про підвищений показник Ki-67, що потребує проведення не тільки ендокринної терапії (враховуючі позитивні рецептори на ER, PR), але і поліхіміотерапії для пригнічення проліферації.

5. При нелюмінальному HER2+ РМЗ (ER-, PR-, HER2+, Ki67 – будь який) виявлене достовірне збільшення кількості CD68+ ПАМ ($p<0,0001$) порівняно з CD163+ клітинами в 1.5-4 рази в первинних вогнищах групи N0 і N1, а також в метастазах лімфатичних вузлів, не знижує агресивність пухлини, що вимагає проведення поліхіміотерапії для блокування сигналу через HER 2.

6. При потрійному негативному РМЗ (ER-, PR-, HER2-, Ki67 – будь який) не дивлячись на переважання CD68+ ПАМ над CD163+ ПАМ в первинних вогнищах обох груп, а також в метастазах лімфатичних вузлів 1.5-4 рази, збільшення кількісних показників CD163+ ПАМ в метастазах лімфатичних вузлів порівняно з первинними вогнищами в 1,5-3,0 рази, вказує на переважання М2 макрофагів, що сприяють метастазуванню і вимагає проведення тільки хіміотерапії через відсутність (ER, PR, HER2) інших сигналів стимуляції росту пухлини.

7. Відносно вищий рівень інфільтрації первинних вогнищ РМЗ CD163+ ПАМ корелював із зниженням виживаності (81%) для повної вибірки пацієнток.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. У якості додаткової характеристики РМЗ рекомендовано визначення особливостей кількісних показників інфільтрації CD68+ та CD163+ ПАМ первинного вогнища РМЗ в великих групах пацієнтів для подальшого впровадження в клінічну імунологію та онкоімунологію.

2. Визначення кількісних показників CD68+ над CD163+ПАМ в первинних вогнищах і в метастазах лімфовузлів та різному перебігу захворювання в залежності від молекулярно-біологічного підтипу РМЗ, можливо використовувати у якості додаткових характеристик первинних вогнищ та метастазів РМЗ.

3. Рекомендовано систему моніторингу рівня інфільтрації первинних вогнищ CD163+ПАМ, яка може корелювати із зниженням виживаності пацієнтів і використовуватися в подальшому для прогнозу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015;65(2):87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.

2. Мерабишвили ВМ. Эпидемиология и выживаемость больных раком молочной железы. Вопросы онкологии. 2013;59(3):314-9.

3. Андріїв АВ, Романчук ВР, Крижанівська АЄ. Особливості епідеміології та клініко-морфологічних характеристик раку молочної залози у хворих із різних екологічних зон Івано-Франківської області. Онкологія. 2015;17(3):156-61.

4. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300. DOI: 10.3322/caac.20073.

5. Федоренко ЗП, Гулак ЛО, Михайлович ЮЙ, Горох ЄЛ, Рижов АЮ, Сумкіна ОВ, та ін. Рак в Україні, 2018–2019 [Інтернет]. Київ: Бюлетень Національного канцер-реєстру України № 21. 2020 [цитовано 2021 Січ 20]. Доступно: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_21/index.htm.

6. Тамм ТИ, Олейник ГА, Прокопюк АВ, Садчикова МВ, Винник ЮА. Особенности патогенеза и лечения рака молочной железы в работах современных онкологов. ScienceRise: Medical Science. 2020;3(36):13-9. DOI: 10.15587/2519-4798.2020.204109.

7. Семиглазов ВФ, Палтуев РМ, Семиглазов ВВ, Дашян ГА, Семиглазова ТЮ, Криворотько ПВ, и др. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы St. Gallen-2015, адаптированные экспертами Российского общества онкомаммологов. Опухоли женской репродуктивной системы. Лечение. 2015;(3):43-60.

8. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2008 May;109(1):123-39. DOI: 10.1007/s10549-007-9632-6.

9. Phipps AI, Chlebowski RT, Prentice R, McTiernan A, Stefanick ML, Wactawski-Wende J, et al. Body size, physical activity, and risk of triple-negative and estrogen receptor-positive breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 Mar;20(3):454-63. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0974.

10. Phipps AI, Buist DS, Malone KE, Barlow WE, Porter PL, Kerlikowske K, et al. Reproductive history and risk of three breast cancer subtypes defined by three biomarkers. Cancer Causes Control. 2011 Mar;22(3):399-405. DOI: 10.1007/s10552-010-9709-0.

11. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. J Clin Oncol. 2008 Mar 10;26(8):1275-81. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.4147.

12. Dignam JJ, Dukic V, Anderson SJ, Mamounas EP, Wickerham DL, Wolmark N. Hazard of recurrence and adjuvant treatment effects over time in lymph node-negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2009 Aug;116(3):595-602. DOI: 10.1007/s10549-008-0200-5.

13. Dual role of immune cells in the tumor microenvironment [Internet]. San Jose, CA, 95131, USA: BD Life Sciences; 2018 [cited 2020 Dec 2]. Available from: https://www.bdj.co.jp/biosciences/support/pdf/23_20563_Dual_Role_of_Immune_Cells_in_the_Tumor_Microenvironment_Poster.pdf?multicolor-app.

14. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. Genes Dev. 2018;32(19-20):1267-1284. DOI:10.1101/gad.314617.118.

15. Nelson MC, O’Connell RM. MicroRNAs: At the Interface of Metabolic Pathways and Inflammatory Responses by Macrophages. Front Immunol. 2020 Aug 14;11:1797. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01797.

16. de Goede KE, Driessen AJM, Van den Bossche J. Metabolic Cancer-Macrophage Crosstalk in the Tumor Microenvironment. Biology (Basel). 2020 Nov 7;9(11):380. DOI: 10.3390/biology9110380.

17. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity. 2013 Apr 18;38(4):792-804. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.04.004.

18. Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. Immunol Rev. 2014 Nov;262(1):36-55. DOI: 10.1111/imr.12223.

19. Yang Z, Ming XF. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. Front Immunol. 2014 Oct 27;5:533. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00533.

20. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. Front Immunol. 2014 Oct 27;5:532. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00532.

21. Mills CD, Lenz LL, Harris RA. A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. Cancer Res. 2016 Feb 1;76(3):513-6. DOI: 10.1158/0008-5472.

22. Mohamed MM, El-Ghonaimy EA, Nouh MA, Schneider RJ, Sloane BF, El-Shinawi M. Cytokines secreted by macrophages isolated from tumor microenvironment of inflammatory breast cancer patients possess chemotactic properties. Int J Biochem Cell Biol. 2014 Jan;46:138-47. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.11.015.

23. Brady NJ, Chuntova P, Schwertfeger KL. Macrophages: Regulators of the Inflammatory Microenvironment during Mammary Gland Development and Breast Cancer. Mediators Inflamm. 2016 Jan 17;2016:4549676. DOI: 10.1155/2016/4549676.

24. Zhao X, Qu J, Sun Y, Wang J, Liu X, Wang F, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. Oncotarget. 2017 May 2;8(18):30576-30586. DOI: 10.18632/oncotarget.15736.

25. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 21;109(8):2796-801. DOI: 10.1073/pnas.1104303108.

26. Tashireva LA, Denisov EV, Gerashchenko TS, Pautova DN, Buldakov MA, Zavyalova MV, et al. Intratumoral heterogeneity of macrophages and fibroblasts in breast cancer is associated with the morphological diversity of tumor cells and contributes to lymph node metastasis. Immunobiology. 2017 Apr;222(4):631-640. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.11.012.

27. Komohara Y, Ohnishi K, Takeya M. Possible functions of CD169-positive sinus macrophages in lymph nodes in anti-tumor immune responses. Cancer Sci. 2017 Mar;108(3):290-295. DOI: 10.1111/cas.13137.

28. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Mönkkönen J, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. Breast Cancer Res. 2015 Aug 5;17(1):101. DOI: 10.1186/s13058-015-0621-0.

29. Tariq M, Zhang J, Liang G, Ding L, He Q, Yang B. Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer. J Cell Biochem. 2017 Sep;118(9):2484-2501. DOI: 10.1002/jcb.25895.

30. Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. Histol Histopathol. 2018 Feb;33(2):133-145. DOI: 10.14670/HH-11-916.

31. Gionfriddo G, Plastina P, Augimeri G, Catalano S, Giordano C, Barone I, et al. Modulating Tumor-Associated Macrophage Polarization by Synthetic and Natural PPARγ Ligands as a Potential Target in Breast Cancer. Cells. 2020 Jan 10;9(1):174. DOI: 10.3390/cells9010174.

32. Augimeri G, Gelsomino L, Plastina P, Giordano C, Barone I, Catalano S, et al. Natural and Synthetic PPARγ Ligands in Tumor Microenvironment: A New Potential Strategy against Breast Cancer. Int J Mol Sci. 2020 Dec 19;21(24):9721. DOI: 10.3390/ijms21249721.

33. Kim IS, Gao Y, Welte T, Wang H, Liu J, Janghorban M, et al. Immuno-subtyping of breast cancer reveals distinct myeloid cell profiles and immunotherapy resistance mechanisms. Nat Cell Biol. 2019 Sep;21(9):1113-1126. DOI: 10.1038/s41556-019-0373-7.

34. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. Lab Invest. 2017;97(1):4-13. DOI: 10.1038/labinvest.2016.116.

35. Song L, Lee C, Schindler C. Deletion of the murine scavenger receptor CD68. J Lipid Res. 2011 Aug;52(8):1542-50. DOI: 10.1194/jlr.M015412.

36. Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. J Leukoc Biol. 2000 Jan;67(1):97-103.

37. Tiainen S, Tumelius R, Rilla K, Hämäläinen K, Tammi M, Tammi R, et al. High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. Histopathology. 2015 May;66(6):873-83. DOI: 10.1111/his.12607.

38. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity. 2010 May 28;32(5):593-604. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.

39. Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, editors. Cancer Epidemiology and Prevention. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2006. Chapter, Colditz GA, Baer HJ, Tamimi RM. Breast cancer; p. 995-1012.

40. Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, Stefanick ML, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. J Natl Cancer Inst. 2013 Apr 17;105(8):526-35. DOI: 10.1093/jnci/djt043.

41. Engin A. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. Adv Exp Med Biol. 2017;960:571-606. DOI: 10.1007/978-3-319-48382-5_25.

42. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. Int J Epidemiol. 2005 Apr;34(2):405-12. DOI: 10.1093/ije/dyh414.

43. Cronin KA, Ravdin PM, Edwards BK. Sustained lower rates of breast cancer in the United States. Breast Cancer Res Treat. 2009 Sep;117(1):223-4. DOI: 10.1007/s10549-008-0226-8.

44. Youlden DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. Cancer Epidemiol. 2012 Jun;36(3):237-48. DOI: 10.1016/j.canep.2012.02.007.

45. Adami HO, Kalager M, Valdimarsdottir U, Bretthauer M, Ioannidis JPA. Time to abandon early detection cancer screening. Eur J Clin Invest. 2019 Mar;49(3):e13062. DOI: 10.1111/eci.13062.

46. Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? Nat Rev Cancer. 2006 Jan;6(1):75-83. DOI: 10.1038/nrc1784.

47. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Aug;19(8):1893-907. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0437.

48. Ito Y, Ioka A, Tanaka M, Nakayama T, Tsukuma H. Trends in cancer incidence and mortality in Osaka, Japan: evaluation of cancer control activities. Cancer Sci. 2009 Dec;100(12):2390-5. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01311.x.

49. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. DOI: 10.1038/35021093. PMID: 10963602.

50. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Mol Oncol. 2011 Feb;5(1):5-23. DOI: 10.1016/j.molonc.2010.11.003.

51. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J Clin Oncol. 2009 Mar 10;27(8):1160-7. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1370.

52. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res. 2004 Aug 15;10(16):5367-74. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0220. PMID: 15328174.

53. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a

relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. PLoS Med. 2010 May 25;7(5):e1000279. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000279.

54. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. J Clin Oncol. 2009 Mar 10;27(8):1168-76. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1024.

55. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2009 May 20;101(10):736-50. DOI: 10.1093/jnci/djp082.

56. Falck AK, Fernö M, Bendahl PO, Rydén L. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases--aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomised trial. BMC Cancer. 2013 Nov 25;13:558. DOI: 10.1186/1471-2407-13-558.

57. Сивак ЛА, Верьовкіна НО, Лялькін СА. Прогностичні фактори при раку грудної залози. Сучасний стан проблеми. Клінічна онкологія. [Інтернет]. 2014;16(4) [цитовано 2020 Листоп 15]. Доступно: https://www.clinicaloncology.com.ua/article/12844/

58. Щепотин ИБ, Зотов АС, Любота РВ. Молекулярные типы рака грудной железы, определенные на основе иммуногистохимических маркеров: клинико-биологические особенности и прогноз течения. Клінічна онкологія. [Інтернет]. 2012;4(8) [цитовано 2020 Верес 8]. Доступно: https://www.clinicaloncology.com.ua/article/5913/

59. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Panel members. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. Ann Oncol. 2009 Aug;20(8):1319-29. DOI: 10.1093/annonc/mdp322.

60. Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year

survival: an overview of the randomised trials. Lancet. 2005 May 14-20;365(9472):1687-717. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0.

61. Joensuu H, Pylkkänen L, Toikkanen S. Long-term survival in node-positive breast cancer treated by locoregional therapy alone. Br J Cancer. 1998 Sep;78(6):795-9. DOI: 10.1038/bjc.1998.581.

62. Abdelmessieh P, Katz J. Breast Cancer Histology. Medscape [Internet]. 1994-2021 by WebMD LLC. 2018 [updated May 24 2018, cited 2020 June 25]. Available from: https://emedicine.medscape.com/article/1954658-overview.

63. Мнихович МВ. Внутрипротоковые пролиферативные поражения молочной железы: вопросы морфологической диагностики. Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова [Інтернет]. 2010;(3):168-174. [цитовано 2021 Січ 30]. Доступно: https://cyberleninka.ru/article/n/vnutriprotokovye-proliferativnye-porazheniya-molochnoy-zhelezy-voprosy-morfologicheskoy-diagnostiki.

64. Бабенко ВІ, Сидоренко МІ, Филенко БМ, Ройко НВ, Новосельцева ТВ. Морфологічий аналіз поєднаного раку молочної залози та раку яєчника. [Інтернет]. 8Лис2019;19(3) [цитовано 2021 Січ30]: 113-6. Available from: https://visnyk-umsa.com.ua/index.php/journal/article/view/132.

65. Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. PET Clin. 2018 Jul;13(3):325-338. DOI: 10.1016/j.cpet.2018.02.004.

66. Yiannakopoulou ECh. Pharmacogenomics of breast cancer targeted therapy: focus on recent patents. Recent Pat DNA Gene Seq. 2012 Apr;6(1):33-46. DOI: 10.2174/187221512799303118.

67. de la Mare JA, Contu L, Hunter MC, Moyo B, Sterrenberg JN, Dhanani KC, et al. Breast cancer: current developments in molecular approaches to diagnosis and treatment. Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2014 May;9(2):153-75. DOI: 10.2174/15748928113086660046.

68. Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RH. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. Maturitas. 2008 Sep-Oct;61(1-2):141-50. DOI: 10.1016/j.maturitas.2008.11.010.

69. Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. J Pathol. 2011 Jan;223(2):307-17. DOI: 10.1002/path.2808.

70. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. Science. 2008 Nov 28;322(5906):1377-80. DOI: 10.1126/science.1164266.

71. Godin-Heymann N, Ulkus L, Brannigan BW, McDermott U, Lamb J, Maheswaran S, et al. The T790M «gatekeeper» mutation in EGFR mediates resistance to low concentrations of an irreversible EGFR inhibitor. Mol Cancer Ther. 2008 Apr;7(4):874-9. DOI: 10.1158/1535-7163.

72. Heinrich MC, Maki RG, Corless CL, Antonescu CR, Harlow A, Griffith D, et al. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. J Clin Oncol. 2008 Nov 20;26(33):5352-9. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.7461.

73. Lange CA, Sartorius CA, Abdel-Hafiz H, Spillman MA, Horwitz KB, Jacobsen BM. Progesterone receptor action: translating studies in breast cancer models to clinical insights. Adv Exp Med Biol. 2008;630:94-111.

74. Carroll JS, Hickey TE, Tarulli GA, Williams M, Tilley WD. Deciphering the divergent roles of progestogens in breast cancer. Nat Rev Cancer. 2017 Jan;17(1):54-64. DOI: 10.1038/nrc.2016.116.

75. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M. et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. Nature Genetics. 2013 Dec;45(12):1439-1445. DOI: 10.1038/ng.2822.

76. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A, Soussan-Gutman L, Jeselsohn R, et al. D538G mutation in estrogen receptor-α: A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. Cancer Res. 2013 Dec 1;73(23):6856-64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1197.

77. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. Sci Transl Med. 2015 Nov 11;7(313):313ra182. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac7551.

78. Chandarlapaty S, Chen D, He W, Sung P, Samoila A, You D, et al. Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial. JAMA Oncol. 2016 Oct 1;2(10):1310-1315. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.1279.

79. Fowler AM, Salem K, DeGrave M, Ong IM, Rassman S, Powers GL, et al. Progesterone Receptor Gene Variants in Metastatic Estrogen Receptor Positive Breast Cancer. Horm Cancer. 2020 Apr;11(2):63-75. DOI: 10.1007/s12672-020-00377-3.

80. Cenciarini ME, Proietti CJ. Molecular mechanisms underlying progesterone receptor action in breast cancer: Insights into cell proliferation and stem cell regulation. Steroids. 2019 Dec;152:108503. DOI: 10.1016/j.steroids.2019.108503.

81. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol. 1984 Oct;133(4):1710-5.

82. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. Lancet Oncol. 2010 Feb;11(2):174-83. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70262-1.

83. Dowsett M, Nielsen TO, A’Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. J Natl Cancer Inst. 2011 Nov 16;103(22):1656-64. DOI: 10.1093/jnci/djr393.

84. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, Goncalves R, Sanati S, Creighton CJ, et al. Ki67 Proliferation Index as a Tool for Chemotherapy Decisions During and After Neoadjuvant Aromatase Inhibitor Treatment of Breast Cancer: Results From the American College of Surgeons Oncology Group Z1031 Trial (Alliance). J Clin Oncol. 2017 Apr 1;35(10):1061-1069. DOI: 10.1200/JCO.2016.69.4406.

85. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987 Jan 9;235(4785):177-82. DOI: 10.1126/science.3798106.

86. Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. Cancer Res. 1991 Feb 1;51(3):944-8.

87. Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. J Clin Oncol. 1993 Oct;11(10):1936-42. DOI: 10.1200/JCO.1993.11.10.1936.

88. Yao M, Fu P. Advances in anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer. Chin Clin Oncol. 2018 Jun;7(3):27. DOI: 10.21037/cco.2018.05.04.

89. Cox TR, Gartland A, Erler JT. The pre-metastatic niche: is metastasis random? Bonekey Rep. 2012 May 2;1:80. DOI: 10.1038/bonekey.2012.80.

90. Harper KL, Sosa MS, Entenberg D, Hosseini H, Cheung JF, Nobre R, et al. Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2^{+} mammary cancer. Nature. 2016 Dec 22;540(7634):588-592. DOI: 10.1038/nature20609.

91. Hosseini H, Obradović MMS, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. Nature. 2016 Dec 22;540(7634):552-558. DOI: 10.1038/nature20785.

92. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. Cell. 2012 Jan 20;148(1-2):349-61. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.025.

93. Chitty JL, Filipe EC, Lucas MC, Herrmann D, Cox TR, Timpson P. Recent advances in understanding the complexities of metastasis. F1000Res. 2018 Aug 1;7:F1000 Faculty Rev-1169. DOI: 10.12688/f1000research.15064.2.

94. Pandya P, Orgaz JL, Sanz-Moreno V. Actomyosin contractility and collective migration: may the force be with you. Curr Opin Cell Biol. 2017 Oct;48:87-96. DOI: 10.1016/j.ceb.2017.06.006.

95. Timpson P, McGhee EJ, Morton JP, von Kriegsheim A, Schwarz JP, Karim SA, et al. Spatial regulation of RhoA activity during pancreatic cancer cell invasion driven by mutant p53. Cancer Res. 2011 Feb 1;71(3):747-57. DOI: 10.1158/0008-5472.

96. Brabletz T. To differentiate or not--routes towards metastasis. Nat Rev Cancer. 2012 May 11;12(6):425-36. DOI: 10.1038/nrc3265.

97. Huo CW, Chew G, Hill P, Huang D, Ingman W, Hodson L, et al. High mammographic density is associated with an increase in stromal collagen and immune cells within the mammary epithelium. Breast Cancer Res. 2015 Jun 4;17(1):79. DOI: 10.1186/s13058-015-0592-1.

98. McConnell JC, O'Connell OV, Brennan K, Weiping L, Howe M, Joseph L, et al. Increased peri-ductal collagen micro-organization may contribute to raised mammographic density. Breast Cancer Res. 2016 Jan 8;18(1):5. DOI: 10.1186/s13058-015-0664-2.

99. Cooks T, Pateras IS, Jenkins LM, Patel KM, Robles AI, Morris J, et al. Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. Nat Commun. 2018 Feb 22;9(1):771. DOI: 10.1038/s41467-018-03224-w.

100. Linde N, Casanova-Acebes M, Sosa MS, Mortha A, Rahman A, Farias E, et al. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. Nat Commun. 2018 Jan 2;9(1):21. DOI: 10.1038/s41467-017-02481-5.

101. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. Nat Med. 2001 Feb;7(2):192-8. DOI: 10.1038/84643.

102. Wei JC, Yang J, Liu D, Wu MF, Qiao L, Wang JN, et al. Tumor-associated Lymphatic Endothelial Cells Promote Lymphatic Metastasis By Highly Expressing and Secreting SEMA4C. Clin Cancer Res. 2017 Jan 1;23(1):214-224. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0741.

103. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature. 2001 Mar 1;410(6824):50-6. DOI: 10.1038/35065016.

104. Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. J Natl Cancer Inst. 2001 Nov 7;93(21):1638-43. DOI: 10.1093/jnci/93.21.1638.

105. Kim M, Koh YJ, Kim KE, Koh BI, Nam D, Alitalo K, et al. CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. Cancer Res. 2010 Dec;70(24):10411-21. DOI: 10.1158/0008-5472.

106. Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Schittek B, Rassner G, et al. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. Br J Dermatol. 2002 Jul;147(1):62-70. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2002.04867.x.

107. Aebischer D, Iolyeva M, Halin C. The inflammatory response of lymphatic endothelium. Angiogenesis. 2014 Apr;17(2):383-93. DOI: 10.1007/s10456-013-9404-3.

108. Shields JD, Kourtis IC, Tomei AA, Roberts JM, Swartz MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. Science. 2010 May 7;328(5979):749-52. DOI: 10.1126/science.1185837.

109. Tewalt EF, Cohen JN, Rouhani SJ, Guidi CJ, Qiao H, Fahl SP, et al. Lymphatic endothelial cells induce tolerance via PD-L1 and lack of costimulation leading to high-level PD-1 expression on CD8 T cells. Blood. 2012 Dec 6;120(24):4772-82. DOI: 10.1182/blood-2012-04-427013.

110. Sleeman JP. The metastatic niche and stromal progression. Cancer Metastasis Rev. 2012 Dec;31(3-4):429-40. DOI: 10.1007/s10555-012-9373-9.

111. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. Cancer Cell. 2002 Oct;2(4):289-300. DOI: 10.1016/s1535-6108(02)00153-8.

112. Cox TR, Rumney RMH, Schoof EM, Perryman L, Høye AM, Agrawal A, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. Nature. 2015 Jun 4;522(7554):106-110. DOI: 10.1038/nature14492.

113. Lluis F, Cosma MP. Cell-fusion-mediated somatic-cell reprogramming: a mechanism for tissue regeneration. J Cell Physiol. 2010 Apr;223(1):6-13. DOI: 10.1002/jcp.22003.

114. Oren-Suissa M, Podbilewicz B. Cell fusion during development. Trends Cell Biol. 2007 Nov;17(11):537-46. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.09.004.

115. Lu X, Kang Y. Cell fusion as a hidden force in tumor progression. Cancer Res. 2009 Nov 15;69(22):8536-9. DOI: 10.1158/0008-5472.

116. Duelli D, Lazebnik Y. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. Nat Rev Cancer. 2007 Dec;7(12):968-76. DOI: 10.1038/nrc2272.

117. Rappa G, Mercapide J, Lorico A. Spontaneous formation of tumorigenic hybrids between breast cancer and multipotent stromal cells is a source of tumor heterogeneity. Am J Pathol. 2012 Jun;180(6):2504-15. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.02.020.

118. El Hallani S, Colin C, El Houfi Y, Idbaih A, Boisselier B, Marie Y, et al. Tumor and endothelial cell hybrids participate in glioblastoma vasculature. Biomed Res Int. 2014;2014:827327. DOI: 10.1155/2014/827327.

119. He X, Li B, Shao Y, Zhao N, Hsu Y, Zhang Z, et al. Cell fusion between gastric epithelial cells and mesenchymal stem cells results in epithelial-to-mesenchymal transition and malignant transformation. BMC Cancer. 2015 Jan 30;15:24. DOI: 10.1186/s12885-015-1027-1.

120. Dittmar T, Schwitalla S, Seidel J, Haverkampf S, Reith G, Meyer-Staeckling S, et al. Characterization of hybrid cells derived from spontaneous fusion events between breast epithelial cells exhibiting stem-like characteristics and breast cancer cells. Clin Exp Metastasis. 2011 Jan;28(1):75-90. DOI: 10.1007/s10585-010-9359-3.

121. Xu MH, Gao X, Luo D, Zhou XD, Xiong W, Liu GX. EMT and acquisition of stem cell-like properties are involved in spontaneous formation of tumorigenic hybrids between lung cancer and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. PLoS One. 2014 Feb 6;9(2):e87893. DOI: 10.1371/journal.pone.0087893.

122. Fidler IJ, Kim SJ, Langley RR. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. J Cell Biochem. 2007 Jul 1;101(4):927-36. DOI: 10.1002/jcb.21148.

123. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. Cancer Metastasis Rev. 2007 Jun;26(2):225-39. DOI: 10.1007/s10555-007-9055-1.

124. Yoshimura H, Dhar DK, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S, et al. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. Clin Cancer Res. 2004 Dec 15;10(24):8554-60. DOI: 10.1158/1078-0432.

125. Chen A, Sceneay J, Gödde N, Kinwel T, Ham S, Thompson EW, et al. Intermittent hypoxia induces a metastatic phenotype in breast cancer. Oncogene. 2018 Aug;37(31):4214-4225. DOI: 10.1038/s41388-018-0259-3.

126. Pickup MW, Laklai H, Acerbi I, Owens P, Gorska AE, Chytil A, et al. Stromally derived lysyl oxidase promotes metastasis of transforming growth factor-β-deficient mouse mammary carcinomas. Cancer Res. 2013 Sep 1;73(17):5336-46. DOI: 10.1158/0008-5472.

127. Vennin C, Chin VT, Warren SC, Lucas MC, Herrmann D, Magenau A, et al. Transient tissue priming via ROCK inhibition uncouples pancreatic cancer progression, sensitivity to chemotherapy, and metastasis. Sci Transl Med. 2017 Apr 5;9(384):eaai8504. DOI: 10.1126/scitranslmed.aai8504.

128. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J Exp Med. 1968 Sep 1;128(3):415-35. DOI: 10.1084/jem.128.3.415.

129. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. Science. 2013 Nov 22;342(6161):1242974. DOI: 10.1126/science.1242974.

130. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. Front Immunol. 2014 Oct 17;5:514. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00514.

131. Dey A, Allen J, Hankey-Giblin PA. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. Front Immunol. 2015 Jan 22;5:683. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00683.

132. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity. 2003 Jul;19(1):71-82. DOI: 10.1016/s1074-7613(03)00174-2.

133. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science. 2007 Aug 3;317(5838):666-70. DOI: 10.1126/science.1142883.

134. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. Nature. 2011 Jun 8;475(7355):222-5. DOI: 10.1038/nature10138.

135. Кайдашев ИП. Поляризация макрофагов и регуляция иммунного ответа (обзор литературы и собственных исследований). Журн Нац акад мед наук України [Інтернет]. 2017;23(1-2) [цитовано 2020 Серп 09]:9-22. Доступно: http://nbuv.gov.ua/UJRN/jnamnu_2017_23_1-2_4.

136. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. 2008 Dec;8(12):958-69. DOI: 10.1038/nri2448.

137. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2005 Dec;5(12):953-64. DOI: 10.1038/nri1733.

138. David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. Nat Rev Neurosci. 2011 Jun 15;12(7):388-99. DOI: 10.1038/nrn3053.

139. Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. J Leukoc Biol. 2002 Jul;72(1):101-6.

140. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. Clin Dev Immunol. 2012;2012:948098. DOI: 10.1155/2012/948098.

141. Grinberg S, Hasko G, Wu D, Leibovich SJ. Suppression of PLCbeta2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype. Am J Pathol. 2009 Dec;175(6):2439-53. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090290.

142. Tao S, Zhao Z, Zhang X, Guan X, Wei J, Yuan B, et al. The role of macrophages during breast cancer development and response to chemotherapy. Clin Transl Oncol. 2020 Nov;22(11):1938-1951. DOI: 10.1007/s12094-020-02348-0.

143. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep. 2014 Mar 3;6:13. DOI: 10.12703/P6-13.

144. Wang Q, Ni H, Lan L, Wei X, Xiang R, Wang Y. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. Cell Res. 2010 Jun;20(6):701-12. DOI: 10.1038/cr.2010.52.

145. Biswas SK, Lewis CE. NF-κB as a central regulator of macrophage function in tumors. J Leukoc Biol. 2010 Nov;88(5):877-84. DOI: 10.1189/jlb.0310153.

146. Mills CD, Thomas AC, Lenz LL, Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity. Front Immunol. 2014 Dec 4;5:620. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00620.

147. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage polarization in inflammatory diseases. Int J Biol Sci. 2014 May 1;10(5):520-9. DOI: 10.7150/ijbs.8879.

148. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol. 2018 Sep;233(9):6425-6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.

149. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol. 2000 Jun 15;164(12):6166-73. DOI: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.

150. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. Cell. 2009 Jul 23;138(2):271-85. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.046.

151. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. Sci Transl Med. 2010 Dec 22;2(63):63ra94. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001375.

152. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. Cell. 2010 Apr 2;141(1):39-51. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.014.

153. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. Trends Immunol. 2012 Mar;33(3):119-26. DOI: 10.1016/j.it.2011.12.001.

154. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. Cell. 2006 Jan 27;124(2):263-6. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.007.

155. Laoui D, Van Overmeire E, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Raes G. Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. Front Immunol. 2014 Oct 7;5:489. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00489.

156. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. Science. 2014 May 23;344(6186):921-5. DOI: 10.1126/science.1252510.

157. Fukuda D, Aikawa E, Swirski FK, Novobrantseva TI, Kotelianski V, Gorgun CZ, et al. Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 3;109(27):E1868-77. DOI: 10.1073/pnas.1116889109.

158. Ye YC, Zhao JL, Lu YT, Gao CC, Yang Y, Liang SQ, et al. NOTCH Signaling via WNT Regulates the Proliferation of Alternative, CCR2-Independent Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma. Cancer Res. 2019 Aug 15;79(16):4160-4172. DOI: 10.1158/0008-5472.

159. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, van den Bossche J, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. Cancer Res. 2010 Jul 15;70(14):5728-39. DOI: 10.1158/0008-5472.

160. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CM, Pryer N, et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. Cancer Cell. 2014 Nov 10;26(5):623-37. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.09.006.

161. Buldakov M, Zavyalova M, Krakhmal N, Telegina N, Vtorushin S, Mitrofanova I, et al. CD68+, but not stabilin-1+ tumor associated macrophages in gaps of ductal tumor structures negatively correlate with the lymphatic metastasis in human breast cancer. Immunobiology. 2017 Jan;222(1):31-38. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.09.011.

162. Ahn J, Schatzkin A, Lacey JV Jr, Albanes D, Ballard-Barbash R, Adams KF, et al. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. Arch Intern Med. 2007 Oct 22;167(19):2091-102. DOI: 10.1001/archinte.167.19.2091.

163. Mor G, Yue W, Santen RJ, Gutierrez L, Eliza M, Berstein LM, et al. Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 1998 Dec;67(5-6):403-11. DOI: 10.1016/s0960-0760(98)00143-5.

164. Mitrofanova I, Zavyalova M, Riabov V, Cherdyntseva N, Kzhyshkowska J. The effect of neoadjuvant chemotherapy on the correlation of tumor-associated macrophages with CD31 and LYVE-1. Immunobiology. 2018 Jun-Jul;223(6-7):449-459. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.10.050.

165. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. Cancer Cell. 2009 Aug 4;16(2):91-102. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.06.018.

166. Hollmén M, Roudnicky F, Karaman S, Detmar M. Characterization of macrophage--cancer cell crosstalk in estrogen receptor positive and triple-negative breast cancer. Sci Rep. 2015 Mar 17;5:9188. DOI: 10.1038/srep09188.

167. Honkanen TJ, Tikkanen A, Karihtala P, Mäkinen M, Väyrynen JP, Koivunen JP. Prognostic and predictive role of tumour-associated macrophages in HER2 positive breast cancer. Sci Rep. 2019 Jul 29;9(1):10961. DOI: 10.1038/s41598-019-47375-2.

168. Araujo JM, Gomez AC, Aguilar A, Salgado R, Balko JM, Bravo L, et al. Effect of CCL5 expression in the recruitment of immune cells in triple negative breast cancer. Sci Rep. 2018 Mar 20;8(1):4899. DOI: 10.1038/s41598-018-23099-7.

169. Svensson S, Abrahamsson A, Rodriguez GV, Olsson AK, Jensen L, Cao Y, et al. CCL2 and CCL5 Are Novel Therapeutic Targets for Estrogen-Dependent Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2015 Aug 15;21(16):3794-805. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0204.

170. Cao H, Huang Y, Wang L, Wang H, Pang X, Li K, et al. Leptin promotes migration and invasion of breast cancer cells by stimulating IL-8 production in M2 macrophages. Oncotarget. 2016 Oct 4;7(40):65441-65453. DOI: 10.18632/oncotarget.11761.

171. Li K, Wei L, Huang Y, Wu Y, Su M, Pang X, et al. Leptin promotes breast cancer cell migration and invasion via IL-18 expression and secretion. Int J Oncol. 2016 Jun;48(6):2479-87. DOI: 10.3892/ijo.2016.3483.

172. Yang J, Li X, Liu X, Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Jun 1;8(6):6656-64.

173. Ding J, Jin W, Chen C, Shao Z, Wu J. Tumor associated macrophage × cancer cell hybrids may acquire cancer stem cell properties in breast cancer. PLoS One. 2012;7(7):e41942. DOI: 10.1371/journal.pone.0041942.

174. Gast CE, Silk AD, Zarour L, Riegler L, Burkhart JG, Gustafson KT, et al. Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival. Sci Adv. 2018 Sep 12;4(9):eaat7828. DOI: 10.1126/sciadv.aat7828.

175. Zhang LN, Huang YH, Zhao L. Fusion of macrophages promotes breast cancer cell proliferation, migration and invasion through activating epithelial-mesenchymal transition and Wnt/β-catenin signaling pathway. Arch Biochem Biophys. 2019 Nov 15;676:108137. DOI: 10.1016/j.abb.2019.108137.

176. Zhu Z, Zhu X, Yang S, Guo Z, Li K, Ren C, et al. Yin-yang effect of tumour cells in breast cancer: from mechanism of crosstalk between tumour-associated macrophages and cancer-associated adipocytes. Am J Cancer Res. 2020 Feb 1;10(2):383-92.

177. Odegaard JI, Chawla A. The immune system as a sensor of the metabolic state. Immunity. 2013 Apr 18;38(4):644-54. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.04.001.

178. Carmona-Fontaine C, Deforet M, Akkari L, Thompson CB, Joyce JA, Xavier JB. Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. Proc Natl Acad Sci USA. 2017 Mar 14;114(11):2934-9. DOI: 10.1073/pnas.1700600114.

179. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature. 2014 Sep 25;513(7519):559-63. DOI: 10.1038/nature13490.

180. Wenes M, Shang M, Di Matteo M, Goveia J, Martín-Pérez R, Serneels J, et al. Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis. Cell Metab. 2016 Nov 8;24(5):701-715. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.09.008.

181. Kim SB, Ahn JH, Kim J, Jung KH. A phase 1 study of a heterologous prime-boost vaccination involving a truncated HER2 sequence in patients with HER2-expressing breast cancer. Mol Ther Methods Clin Dev. 2015 Sep 30;2:15031. DOI: 10.1038/mtm.2015.31.

182. Tedesco S, Bolego C, Toniolo A, Nassi A, Fadini GP, Locati M, et al. Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. Immunobiology. 2015 May;220(5):545-54. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.12.008.

183. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. Annu Rev Immunol. 2005;23:901-44. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816.

184. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Müller A, et al. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. Scand J Immunol. 2008 May;67(5):453-63. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x.

185. Yang L, Wang F, Wang L, Huang L, Wang J, Zhang B, et al. CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients. Oncotarget. 2015 Apr 30;6(12):10592-603. DOI: 10.18632/oncotarget.3547.

186. Ni C, Yang L, Xu Q, Yuan H, Wang W, Xia W, et al. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective

study and meta-analysis. J Cancer. 2019 Jul 23;10(19):4463-4472. DOI: 10.7150/jca.33914.

187. Wang J, Chen H, Chen X, Lin H. Expression of Tumor-Related Macrophages and Cytokines After Surgery of Triple-Negative Breast Cancer Patients and its Implications. Med Sci Monit. 2016 Jan 11;22:115-20. DOI: 10.12659/msm.895386.

188. Litviakov N, Tsyganov M, Larionova I, Ibragimova M, Deryusheva I, Kazantseva P, et al. Expression of M2 macrophage markers YKL-39 and CCL18 in breast cancer is associated with the effect of neoadjuvant chemotherapy. Cancer Chemother Pharmacol. 2018 Jul;82(1):99-109. DOI: 10.1007/s00280-018-3594-8.

189. Yu X, Guo C, Fisher PB, Subjeck JR, Wang XY. Scavenger Receptors: Emerging Roles in Cancer Biology and Immunology. Adv Cancer Res. 2015;128:309-64. DOI: 10.1016/bs.acr.2015.04.004.

190. Alessandrini F, Pezzè L, Ciribilli Y. LAMPs: Shedding light on cancer biology. Semin Oncol. 2017 Aug;44(4):239-253. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2017.10.013.

191. Strojnik T, Kavalar R, Zajc I, Diamandis EP, Oikonomopoulou K, Lah TT. Prognostic impact of CD68 and kallikrein 6 in human glioma. Anticancer Res. 2009 Aug;29(8):3269-79.

192. Shabo I, Svanvik J. Expression of macrophage antigens by tumor cells. Adv Exp Med Biol. 2011;714:141-50. DOI: 10.1007/978-94-007-0782-5_7.

193. Maniecki MB, Etzerodt A, Ulhøi BP, Steiniche T, Borre M, Dyrskjøt L, et al. Tumor-promoting macrophages induce the expression of the macrophage-specific receptor CD163 in malignant cells. Int J Cancer. 2012 Nov 15;131(10):2320-31. DOI: 10.1002/ijc.27506.

194. Steinert G, Schölch S, Niemietz T, Iwata N, García SA, Behrens B, et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. Cancer Res. 2014 Mar 15;74(6):1694-704. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1885.

195. Shabo I, Midtbö K, Andersson H, Åkerlund E, Olsson H, Wegman P, et al. Macrophage traits in cancer cells are induced by macrophage-cancer cell fusion and

cannot be explained by cellular interaction. BMC Cancer. 2015 Nov 20;15:922. DOI: 10.1186/s12885-015-1935-0.

196. Hassani K, Olivier M. Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2013 May 2;7(5):e2185. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002185.

197. Li W, Liang RR, Zhou C, Wu MY, Lian L, Yuan GF, et al. The association between expressions of Ras and CD68 in the angiogenesis of breast cancers. Cancer Cell Int. 2015 Feb 7;15(1):17. DOI: 10.1186/s12935-015-0169-1.

198. Meng Y, Beckett MA, Liang H, Mauceri HJ, van Rooijen N, Cohen KS, et al. Blockade of tumor necrosis factor alpha signaling in tumor-associated macrophages as a radiosensitizing strategy. Cancer Res. 2010 Feb 15;70(4):1534-43. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2995.

199. Yang L, Dai F, Tang L, Le Y, Yao W. Macrophage differentiation induced by PMA is mediated by activation of RhoA/ROCK signaling. J Toxicol Sci. 2017;42(6):763-771. DOI: 10.2131/jts.42.763.

200. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. CD133 molecule [Homo sapiens (human)] – Gene – NCBI. [Internet]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA; [updated on 29-Jen-2021; cited 2021 Feb 02]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=9332.

201. Madsen M, Møller HJ, Nielsen MJ, Jacobsen C, Graversen JH, van den Berg T, et al. Molecular characterization of the haptoglobin.hemoglobin receptor CD163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. J Biol Chem. 2004 Dec 3;279(49):51561-7. DOI: 10.1074/jbc.M409629200.

202. Naito Y, Takagi T, Higashimura Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. Arch Biochem Biophys. 2014 Dec 15;564:83-8. DOI: 10.1016/j.abb.2014.09.005.

203. Kwon MY, Park E, Lee SJ, Chung SW. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. Oncotarget. 2015 Sep 15;6(27):24393-403. DOI: 10.18632/oncotarget.5162.

204. Sun X, Ou Z, Chen R, Niu X, Chen D, Kang R, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. Hepatology. 2016 Jan;63(1):173-84. DOI: 10.1002/hep.28251.

205. Lu B, Chen XB, Ying MD, He QJ, Cao J, Yang B. The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response. Front Pharmacol. 2018 Jan 12;8:992. DOI: 10.3389/fphar.2017.00992.

206. Mansfield AS, Heikkila P, von Smitten K, Vakkila J, Leidenius M. The presence of sinusoidal CD163(+) macrophages in lymph nodes is associated with favorable nodal status in patients with breast cancer. Virchows Arch. 2012 Dec;461(6):639-46. DOI: 10.1007/s00428-012-1338-4.

207. Shabo I, Stål O, Olsson H, Doré S, Svanvik J. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. Int J Cancer. 2008 Aug 15;123(4):780-6. DOI: 10.1002/ijc.23527.

208. Bover LC, Cardó-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, Takeya M, et al. A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. J Immunol. 2007 Jun 15;178(12):8183-94. DOI: 10.4049/jimmunol.178.12.8183.

209. Michaelson JS, Burkly LC. Therapeutic targeting of TWEAK/Fnl4 in cancer: exploiting the intrinsic tumor cell killing capacity of the pathway. Results Probl Cell Differ. 2009;49:145-60. DOI: 10.1007/400_2008_18.

210. Moreno JA, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Orbe J, Páramo JA, et al. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. Atherosclerosis. 2009 Nov;207(1):103-10. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.033.

211. Cheng E, Whitsett TG, Tran NL, Winkles JA. The TWEAK Receptor Fn14 Is an Src-Inducible Protein and a Positive Regulator of Src-Driven Cell Invasion. Mol Cancer Res. 2015 Mar;13(3):575-83. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0411.

212. Yin J, Liu YN, Tillman H, Barrett B, Hewitt S, Ylaya K, et al. AR-regulated TWEAK-FN14 pathway promotes prostate cancer bone metastasis. Cancer Res. 2014 Aug 15;74(16):4306-17. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3233.

213. Etzerodt A, Rasmussen MR, Svendsen P, Chalaris A, Schwarz J, Galea I, et al. Structural basis for inflammation-driven shedding of CD163 ectodomain and tumor necrosis factor-α in macrophages. J Biol Chem. 2014 Jan 10;289(2):778-88. DOI: 10.1074/jbc.M113.520213.

214. Högger P, Sorg C. Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Nov 9;288(4):841-3. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5845.

215. Kneidl J, Löffler B, Erat MC, Kalinka J, Peters G, Roth J, et al. Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus via binding of specific fibronectin peptides. Cell Microbiol. 2012 Jun;14(6):914-36. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01766.x.

216. No JH, Moon JM, Kim K, Kim YB. Prognostic significance of serum soluble CD163 level in patients with epithelial ovarian cancer. Gynecol Obstet Invest. 2013;75(4):263-7. DOI: 10.1159/000349892.

217. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. Breast Care (Basel). 2013 May;8(2):149-54. DOI: 10.1159/000350774.

218. Koh J, Kim MJ. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. Korean J Radiol. 2019 Jan;20(1):69-82. DOI: 10.3348/kjr.2018.0231.

219. Bertero L, Massa F, Metovic J, Zanetti R, Castellano I, Ricardi U, et al. Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why? Virchows Arch. 2018 Apr;472(4):519-531. DOI: 10.1007/s00428-017-2276-y.

220. Наказ МОЗ України № 554 від 17.09.2007 року «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «онкологія» [Інтернет].

[оновлено 2015 Чер 30; цитовано 2021 Січ 31]. Доступно: https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0554282-07#Text.

221. Sellers AH. The clinical classification of malignant tumours: the TNM system. Can Med Assoc J. 1971 Oct 23;105(8):836.

222. Jones RL, Constantinidou A, Reis-Filho JS. Molecular Classification of Breast Cancer. Surg Pathol Clin. 2012 Sep;5(3):701-17. DOI: 10.1016/j.path.2012.06.008.

223. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol. 2018 Jul 10;36(20):2105-2122. DOI: 10.1200/JCO.2018.77.8738.

224. Yang M, Li Z, Ren M, Li S, Zhang L, Zhang X, et al. Stromal Infiltration of Tumor-Associated Macrophages Conferring Poor Prognosis of Patients with Basal-Like Breast Carcinoma. J Cancer. 2018 Jun 6;9(13):2308-2316. DOI: 10.7150/jca.25155.

225. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. BMC Cancer. 2012 Jul 23;12:306. DOI: 10.1186/1471-2407-12-306.

226. Автандилов ГГ. Медицинская морфометрия. Руководство. Москва: Медицина; 1990. 384 с.

227. Aikian AZ, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Immunological features of macrophages associated with metastasis of primary breast carcinoma into regional lymph nodes. Bulletin of problems in biology and medicine. 2020;3(157):269-74. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-269-274.

228. Айкян АЗ, Шинкевич ВІ, Кайдашев ІП. Характеристика інфільтрації $CD68^+$ та $CD163^+$ макрофагами первинного вогнища та метастатичних уражень регіонарних лімфовузлів при люмінальних інвазивних карциномах грудної залози в залежності від їх імунофенотипу. Світ медицини та біології. 2018;4(66):15-22. DOI: 10.26724/2079-8334-2018-4-66-15-22.

229. Aikian AZ, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Quantitative assessment of CD68+ AND CD163+ macrophages in the primary focus and metastatic lesions of regional lymph nodes in non-luminal her2-positive invasive breast carcinoma. Wiadomosci Lekarskie. 01 Oct 2019, 72(10):1861-1865.

230. Айкян АЗ, Кайдашев ІП. Кількісна характеристика CD68+ та CD163+ макрофагів в первинному вогнищі та в метастатичних ураженнях регіонарних лімфовузлів при потрійно-негативній інвазивній карциномі грудної залози. Вісник проблем біології і медицини. 2018. 2(147):313-9. DOI: 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-313-319.

231. Aikian AZ, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Analysis of association between the density of infiltration in primary carcinoma of the mammary gland by tumor-associated macrophages and postoperative prognosis. The Medical and ecological problems. 2019:23(1-2):3-7. DOI: 10.31718/mep.2019.23.1-2.01.

232. Ramnani D. WebPathology [Internet]. [updated 2021 Jan 8; cited 2021 Jan 24]. Available from: Case=289.

233. Stewart DA, Yang Y, Makowski L, Troester MA. Basal-like breast cancer cells induce phenotypic and genomic changes in macrophages. Mol Cancer Res. 2012 Jun;10(6):727-38. DOI: 10.1158/1541-7786.

234. Gok Yavuz B, Gunaydin G, Gedik ME, Kosemehmetoglu K, Karakoc D, Ozgur F, et al. Cancer associated fibroblasts sculpt tumour microenvironment by recruiting monocytes and inducing immunosuppressive PD-1^{+} TAMs. Sci Rep. 2019 Feb 28;9(1):3172. DOI: 10.1038/s41598-019-39553-z.

235. Jiang Z, Shih DM, Xia YR, Lusis AJ, de Beer FC, de Villiers WJ, et al. Structure, organization, and chromosomal mapping of the gene encoding macrosialin, a macrophage-restricted protein. Genomics. 1998 Jun 1;50(2):199-205. DOI: 10.1006/geno.1998.5327.

236. Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is

identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Oct 10;92(21):9580-4. DOI: 10.1073/pnas.92.21.9580.

237. Wilkinson K, El Khoury J. Microglial scavenger receptors and their roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Int J Alzheimers Dis. 2012;2012:489456. DOI: 10.1155/2012/489456.

238. Schaer DJ, Alayash AI, Buehler PW. Gating the radical hemoglobin to macrophages: the anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor. Antioxid Redox Signal. 2007 Jul;9(7):991-9. DOI: 10.1089/ars.2007.1576.

239. Sima C, Glogauer M. Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. Periodontol 2000. 2013 Oct;63(1):80-101. DOI: 10.1111/prd.12032.

240. Beranek JT. CD68 is not a macrophage-specific antigen. Annals of the Rheumatic Diseases. 2005 Feb;64(2):342-3.

241. Aras S, Zaidi MR. TAMeless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. Br J Cancer. 2017 Nov 21;117(11):1583-1591. DOI: 10.1038/bjc.2017.356.

242. Klingen TA, Chen Y, Aas H, Wik E, Akslen LA. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. Human Pathology. 2017 Nov;69:72-80. DOI: 10.1016/j.humpath.2017.09.001.

243. Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. PLoS One. 2013 Nov 15;8(11):e80908. DOI: 10.1371/journal.pone.0080908.

244. Kim IS, Zhang XH. One microenvironment does not fit all: heterogeneity beyond cancer cells. Cancer Metastasis Rev. 2016 Dec;35(4):601-29. DOI: 10.1007/s10555-016-9643-z.

245. Storr SJ, Safuan S, Ahmad N, El-Refaee M, Jackson AM, Martin SG. Macrophage-derived interleukin-1beta promotes human breast cancer cell migration and

lymphatic adhesion in vitro. Cancer Immunol Immunother. 2017 Oct;66(10):1287-94. DOI: 10.1007/s00262-017-2020-0.

246. Long KB, Gladney WL, Tooker GM, Graham K, Fraietta JA, Beatty GL. IFNγ and CCL2 Cooperate to Redirect Tumor-Infiltrating Monocytes to Degrade Fibrosis and Enhance Chemotherapy Efficacy in Pancreatic Carcinoma. Cancer Discov. 2016 Apr;6(4):400-13. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1032.

247. Завьялова МВ, Телегина НС, Вторушин СВ, Перельмутер ВМ, Слонимская ЕМ, Денисов ЕВ, и др. Особенности морфологического строения люминального а типа рака молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2013;(1):38-41.

248. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer: Principles & practice of oncology: Primer of the molecular biology of cancer. 2nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, Health; 2015. 536 p.

249. Allison KH. Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. Am J Clin Pathol. 2012 Dec;138(6):770-80. DOI: 10.1309/AJCPIV9IQ1MRQMOO.

250. Silva LCFF, Arruda LSM, David Filho WJ, Cruz FJSM, Trufelli DC, Del Giglio A. Hormone receptor-negative as a predictive factor for pathologic complete response to neoadjuvant therapy in breast cancer. Einstein (Sao Paulo). 2019 Jan 21;17(1):eAO3434. DOI: 10.31744/einstein_journal/2019AO3434.

251. Song JL, Chen C, Yuan JP, Sun SR. Progress in the clinical detection of heterogeneity in breast cancer. Cancer Med. 2016 Dec;5(12):3475-88. DOI: 10.1002/cam4.943.

252. Natrajan R, Sailem H, Mardakheh FK, Arias Garcia M, Tape CJ, Dowsett M, et al. Microenvironmental Heterogeneity Parallels Breast Cancer Progression: A Histology-Genomic Integration Analysis. PLoS Med. 2016 Feb 16;13(2):e1001961. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001961.

253. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. J Clin Pathol. 2012 Feb;65(2):159-63. DOI: 10.1136/jclinpath-2011-200355.

254. Hedbrant A, Wijkander J, Seidal T, Delbro D, Erlandsson A. Macrophages of M1 phenotype have properties that influence lung cancer cell progression. Tumour Biol. 2015 Nov;36(11):8715-25. DOI: 10.1007/s13277-015-3630-9.

255. Klingen TA, Chen Y, Stefansson IM, Knutsvik G, Collett K, Abrahamsen AL, et al. Tumour cell invasion into blood vessels is significantly related to breast cancer subtypes and decreased survival. J Clin Pathol. 2017 Apr;70(4):313-9. DOI: 10.1136/jclinpath-2016-203861.

256. Stovgaard ES, Nielsen D, Hogdall E, Balslev E. Triple negative breast cancer - prognostic role of immune-related factors: a systematic review. Acta Oncol. 2018 Jan;57(1):74-82. DOI: 10.1080/0284186X.2017.1400180.

257. Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, Wang Y, Guo P, Qian BZ, et al. Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. Cancer Discov. 2015 Sep;5(9):932-43. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0012.

258. Kim OH, Kang GH, Noh H, Cha JY, Lee HJ, Yoon JH, et al. Proangiogenic TIE2(+)/CD31 (+) macrophages are the predominant population of tumor-associated macrophages infiltrating metastatic lymph nodes. Mol Cells. 2013 Nov;36(5):432-8. DOI: 10.1007/s10059-013-0194-7.

259. Yuan ZY, Luo RZ, Peng RJ, Wang SS, Xue C. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. Onco Targets Ther. 2014 Aug 21;7:1475-80. DOI: 10.2147/OTT.S61838.

260. Norton KA, Jin K, Popel AS. Modeling triple-negative breast cancer heterogeneity: Effects of stromal macrophages, fibroblasts and tumor vasculature. J Theor Biol. 2018 Sep 7;452:56-68. DOI: 10.1016/j.jtbi.2018.05.003.

261. Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C, Balkwill FR. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. J Immunol. 2005 Jul 15;175(2):1197-205. DOI: 10.4049/jimmunol.175.2.1197.

262. Yang M, Ma B, Shao H, Clark AM, Wells A. Macrophage phenotypic subtypes diametrically regulate epithelial-mesenchymal plasticity in breast cancer cells. BMC Cancer. 2016 Jul 7;16:419. DOI: 10.1186/s12885-016-2411-1.

263. Ma S, Henson ES, Chen Y, Gibson SB. Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells. Cell Death Dis. 2016 Jul 21;7(7):e2307. DOI: 10.1038/cddis.2016.208.

Додатки

Додаток 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Айкян АЗ**, Шинкевич ВІ, Кайдашев ІП. Характеристика інфільтрації $CD68^+$ та $CD163^+$ макрофагами первинного вогнища та метастатичних уражень реґіонарних лімфовузлів при люмінальних інвазивних карциномах грудної залози в залежності від їх імунофенотипу. Світ медицини та біології. 2018;4(66):15–22. DOI: 10.26724/2079-8334-2018-4-66-15-22. (*Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).*

2. **Айкян АЗ**, Кайдашев ІП. Кількісна характеристика CD68+ та CD163+ макрофагів в первинному вогнищі та в метастатичних ураженнях реґіонарних лімфовузлів при потрійно-негативній інвазивній карциномі грудної залози. Вісн. проблем біології і медицини. 2018;2(147):313–9. DOI: 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-313-319. *(Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).*

3. **Aikian AZ**, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Analysis of association between the density of infiltration in primary carcinoma of the mammary gland by tumor-associated macrophages and postoperative prognosis. The Medical and ecological problems. 2019;23(1-2):3–7. DOI: 10.31718/mep.2019.23.1-2.01. *(Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, узагальнення отриманих результатів, підготовка тексту статті).*

4. **Aikian AZ**, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Immunological features of macrophages associated with metastasis of primary breast carcinoma into regional lymph nodes. Bulletin of problems in biology and medicine. 2020;3(157):269–74. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-269-274. (*Участь здобувача полягає у проведенні*

клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті).

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus.

5. **Aikian AZ**, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Quantitative assessment of CD68+ AND CD163+ macrophages in the primary focus and metastatic lesions of regional lymph nodes in non-luminal her2-positive invasive breast carcinoma. Wiadomosci Lekarskie (Poland). 2019;72(10):1861–5. (*Участь здобувача полягає у проведенні клінічних досліджень, заборі матеріалу для подальших лабораторних досліджень, аналізі отриманих даних, написанні статті*).

Додаток 2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Головний лікар
Полтавського обласного клінічного
онкологічного диспансеру
Полтавської обласної ради
_____________________ О. Я. Вовк
«___»_______________20___ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиції для впровадження: Роль М1 та М2 макрофагів у імунопатогенезі аденокарциноми молочної залози при наявності або відсутності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

Установа-розробник: Українська медична стоматологічна академія, 36011 м. Полтава, вул. Шевченка 23, кафедра внутрішньої медицини № 3 з фтизіатрією.

Джерела інформації:

1. Aikian AZ, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Quantitative assessment of CD68+ AND CD163+ macrophages in the primary focus and metastatic lesions of regional lymph nodes in non-luminal her2-positive invasive breast carcinoma. Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland : 1960), 01 Oct 2019, 72(10):1861-1865.

Базова установа, яка проводить впровадження: Полтавський обласний клінічний онкологічний диспансер Полтавської обласної ради, хірургічне відділення.

Термін впровадження: жовтень 2019 – листопад 2020 р.

Форма впровадження: в лікувальний і діагностичний процес.

Зауваження та пропозиції: зауважень та пропозицій немає.

Відповідальний за впровадження:

зав. відділення Кир'ян В.М.

Додаток 3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Головний лікар
КП «Кременчуцького обласного
онкологічного диспансеру
Полтавської обласної ради»
___________________ В. В. Севідов
«____»___________20___ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиції для впровадження: Роль М1 та М2 макрофагів у імунопатогенезі аденокарциноми молочної залози при наявності або відсутності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

Установа-розробник: Українська медична стоматологічна академія, 36011 м. Полтава, вул. Шевченка 23, кафедра внутрішньої медицини № 3 з фтизіатрією.

Джерела інформації:

1. Айкян АЗ, Шинкевич ВІ, Кайдашев ІП. Імунологічні особливості макрофагів пов'язані з метастазуванням первинної карциноми грудної залози у регіональні лімфовузли. Вісник проблем біології і медицини. 2020;3(157):269-274. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-269-274.

Базова установа, яка проводить впровадження: КП «Кременчуцький обласний онкологічний диспансер Полтавської обласної ради» , хірургічне відділення

Термін впровадження: жовтень 2020 – листопад 2020 р.

Форма впровадження: в лікувальний і діагностичний процес.

Зауваження та пропозиції: зауважень та пропозицій немає.

Відповідальний за впровадження:

зав. відділення Жадько В.В.

Додаток 4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Української медичної стоматологічної академії
д.мед.н., професор
________________ І. П. Кайдашев
«___»______________20___ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиції для впровадження: Роль M1 та M2 макрофагів у імунопатогенезі аденокарциноми молочної залози при наявності або відсутності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

Установа-розробник: Українська медична стоматологічна академія, 36011 м. Полтава, вул. Шевченка 23, кафедра внутрішньої медицини № 3 з фтизіатрією.

Джерела інформації:

1. Айкян АЗ, Шинкевич ВІ, Кайдашев ІП. Характеристика інфільтрації CD68+ та CD163+ макрофагами первинного вогнища та метастатичних уражень регіонарних лімфовузлів при люмінальних інвазивних карциномах грудної залози в залежності від їх імунофенотипу. Світ медицини та біології. 2018;4(66):15–22. DOI: 10.26724/2079-8334-2018-4-66-15-22.
2. Айкян АЗ, Кайдашев ІП. Кількісна характеристика CD68+ та CD163+ макрофагів в первинному вогнищі та в метастатичних ураженнях регіонарних лімфовузлів при потрійно-негативній інвазивній карциномі грудної залози. Вісник проблем біології і медицини. 2018;2(147):313-9. DOI 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-313-319.

Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра внутрішньої медицини № 3 з фтизіатрією Української медичної стоматологічної академії (ухвалено на засіданні кафедри протоколом №10 від 19 XII 2019р.)

Термін впровадження: жовтень 2018 – листопад 2019 р.

Форма впровадження: в навчальний процес – матеріали лекцій та пратичних занять та у наукову роботу кафедри.

Зауваження та пропозиції: зауважень та пропозицій немає.

Відповідальний за впровадження:
завідувачка кафедри внутрішньої медицини
№ 3 з фтизіатрією Української медичної
стоматологічної академії к.мед.н.,
доцент О. А. Борзих

Додаток 5

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Української медичної стоматологічної академії
д.мед.н., професор
_________________ І. П. Кайдашев
«____» ________________20___ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиції для впровадження: Роль М1 та М2 макрофагів у імунопатогенезі аденокарциноми молочної залози при наявності або відсутності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

Установа-розробник: Українська медична стоматологічна академія, 36011 м. Полтава, вул. Шевченка 23, кафедра внутрішньої медицини № 3 з фтизіатрією.

Джерела інформації:

1. Aikian AZ, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Quantitative assessment of CD68+ AND CD163+ macrophages in the primary focus and metastatic lesions of regional lymph nodes in non-luminal her2-positive invasive breast carcinoma. Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland : 1960), 01 Oct 2019, 72(10):1861-1865.
2. Айкян АЗ, Кайдашев ІП. Кількісна характеристика CD68+ та CD163+ макрофагів в первинному вогнищі та в метастатичних ураженнях регіонарних лімфовузлів при потрійно-негативній інвазивній карциномі грудної залози. Вісник проблем біології і медицини. 2018;2(147):313-9. DOI 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-313-319.
3. Aikian AZ, Shynkevych VI, Kaidashev IP. Analysis of association between the density of infiltration in primary carcinoma of the mammary gland by tumor-associated macrophages and postoperative prognosis. The Medical and ecological problems. 2019:23(1-2):3-7. https://doi.org/10.31718/mep.2019.23.1-2.01.

Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра онкології та радіології з радіаційною медициною Української медичної стоматологічної академії (ухвалено на засіданні кафедри протоколом № 2 від 9 вересня 2018 р.)

Термін впровадження: жовтень 2018 – листопад 2019 р.

Форма впровадження: в навчальний процес – матеріали лекцій та пратичних занять та у наукову роботу кафедри.

Зауваження та пропозиції: зауважень та пропозицій немає.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри онкології
та радіології з радіаційною медициною
Української медичної
стоматологічної академії д.мед.н.,
професор В. П. Баштан

Додаток 6

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Головний лікар
КНП «Мелітопольського
онкологічного диспансеру»
Запорізької обласної ради
_________________ О. А. Рябіков
«___» _______________20___ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиції для впровадження: Роль M1 та M2 макрофагів у імунопатогенезі аденокарциноми молочної залози при наявності або відсутності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

Установа-розробник: Українська медична стоматологічна академія, 36011 м. Полтава, вул. Шевченка 23, кафедра внутрішньої медицини № 3 з фтизіатрією.

Джерела інформації:

1. Айкян АЗ, Шинкевич ВІ, Кайдашев ІП. Характеристика інфільтрації CD68+ та CD163+ макрофагами первинного вогнища та метастатичних уражень регіонарних лімфовузлів при люмінальних інвазивних карциномах грудної залози в залежності від їх імунофенотипу. Світ медицини та біології. 2018;4(66):15–22. DOI: 10.26724/2079-8334-2018-4-66-15-22.

Базова установа, яка проводить впровадження: КНП «Мелітопольський онкологічний диспансер» Запорізької обласної ради , хірургічне відділення

Термін впровадження: вересень 2018 – листопад 2020 р.

Форма впровадження: в лікувальний і діагностичний процес.

Зауваження та пропозиції: зауважень та пропозицій немає.

Відповідальний за впровадження:

зав. відділення Позняков О. В.