

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: 618.19-006.6-091.8:616.379-008.64(043.2)

BRÎNZA Dumitru

**MANIFESTĂRILE LOCALE ALE IMUNITĂȚII CELULARE
ÎN CARCINOMUL MAMAR LA PACIENȚII CU DIABET
ZAHARAT DE TIP2**

311.02 – ANATOMIE PATOLOGICĂ

Teză de doctor în științe medicale

Chișinău, 2026

Teza a fost elaborată în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie și Laboratorului de morfologie din IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Școala doctorală în domeniul Științe medicale.

Conducător

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

Conducător prin cotutelă

Stratan Valentina,
dr. șt. biol., conf. cerc.

Membrii comisiei de îndrumare:

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

Rogojinaru Mariana,
dr. șt. med.

Harea Dumitru,
dr. șt. med., conf. univ.

Susținerea va avea loc la 26.06.2026, ora 14:00, în incinta USMF „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 205 în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului Nr 7 din 05.05.2026.

Componenta Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

Președinte:

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

Membrii:

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

Stratan Valentina,
dr. șt. biol., conf. cerc.

Referenți oficiali:

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

Alexa Zinaida,
dr. șt. med., conf. univ.

Izbaș Doina,
dr. șt. med.

Raica Marius,
dr., prof. univ.

Autor

Brînza Dumitru

CUPRINS

CUPRINS	3
Lista abrevierilor.....	5
Lista figurilor.....	6
Lista tabelelor	7
Introducere.....	8
1. CARCINOMUL MAMAR ASOCIAT CU DIABETUL ZAHARAT – PATOLOGII CU EVOLUȚIE COMPLEXĂ ȘI INTERACȚIUNI BIOLOGICE INCOMPLET ELUCIDATE.....	17
1.1. Imunitatea celulară în stroma carcinomului mamar.	19
1.2. Profilul molecular al carcinomului mamar.	30
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	39
2.1. Metodologia generală a cercetării	39
2.2. Materialul de studiu	39
2.3. Metode histologice și imunohistochimice	40
2.4. Metode de evaluare a markerilor.....	45
2.5. Analiza statistică.....	46
3. CARACTERISTICA MORFOLOGICĂ A GLANDELOR MAMARE ÎN CONDIȚII DE NORMĂ ȘI PATOLOGIE	47
3.1. Morfologia glandei mamare în normă.	47
3.2. Structura carcinomului mamar, în absența dereglărilor metabolismului glucidic.....	49
3.3. Morfologia carcinomului mamar asociat cu diabet zaharat.	53
3.4. Studiul comparativ al morfologiei tumorilor mamare	57
4. INFLUENȚA DIABETULUI ZAHARAT ASUPRA MICROMEDIULUI TUMORAL.....	60
4.1. Identificarea expresiei CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56, CD68 în glanda mamară intactă.....	60
4.2. Evaluarea imunității celulare locale și a potențialului angiogen în stroma tumorilor de tip NST.....	63
4.3. Caracteristica cantitativă a markerilor vizați în carcinomul mamar asociat cu DZT2	73
4.4. Evaluarea corelațiilor dintre markerii imunității celulare și potențialului angiogen în tumorile mamare cu și fără DZT2 asociat.	82
5. CARACTERIZAREA EXPRESIEI MARKERILOR HORMONALI (ER, PR), HER2 ȘI Ki67 ÎN GLANDA MAMARĂ INTACTĂ ȘI ÎN CARCINOMUL MAMAR	86
5.1. Caracteristica cazurilor de control.....	86
5.2. Tumorile mamare fără DZT2 asociat	87
5.3. Fenotipul tumorilor mamare NST asociate cu DZT2	90
5.4. Caracteristica comparativă a tumorilor mamare, cu și fără asocierea DZT2.....	93
5.5. Structura și fenotipul molecular al carcinomului mamar.....	94
6. INFLUENȚA DEREGLĂRILOR METABOLICE DIN DZT2 ASUPRA STATUTULUI IMUN CELULAR LOCAL DIN CARCINOMUL MAMAR	95

CONCLUZII GENERALE	110
RECOMANDĂRI PRACTICE	111
Bibliografie.....	112
Lista anexelor	131
INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII.....	163
CURRICULUM VITAE.	167

Lista abrevierilor

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	American Society of Clinical Oncology
AT	Cellular atypia
BiHC	T-cell-engaging bispecific recombinant antibody
BRCA	Breast cancer susceptibility genes
CAFs	Cancer-associated fibroblasts
CD	Cluster of differentiation
CGM	Breast cancer
CI	Confidence interval
CK	Cytokeratin
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DCIS	Ductal carcinoma in situ
DZ	Diabetes mellitus
DZT2	Type 2 diabetes mellitus
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Estrogen receptor
ESR1/ESR2	Estrogen receptor gene 1 and 2
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
TF	Tubule formation
HE	Hematoxylin and eosin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IHC	Immunohistochemistry
IS	Intensity score
LNM	Lymph node metastasis
LVI	Lymphovascular invasion
MHC	Major histocompatibility complex
MC	Mitotic count
NK	Natural killer cell
NST	No special type
PD-1	Programmed cell death protein 1
PI3K/AKT	PI3K–AKT signaling pathway
PNI	Perineural invasion
pN	Pathological nodal status
PR	Progesterone receptor
PS	Proportion score
pT	Pathologic tumor stage
SD	Standard deviation
TAMs	Tumor-associated macrophages
TDLU	Terminal ductal-lobular unit
TGF	Transforming growth factor
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes
TM	Tumor
TME	Tumor microenvironment
TNF	Tumor necrosis factor
TS	Total score
WHO	World health organization

Lista figurilor

Figura 1. Carcinoame mamare de tip NST. Celule tumorale imunomarcate pentru ER și PR.	43
Figura 2. Carcinoame mamare ductal invaziv de tip NST. Celule tumorale imunomarcate pentru HER2	44
Figura 3. Structura histologică a glandei mamare în lotul de control, la paciente vârstnice. Modificări involutive ductale și glandulară asociată cu scleroză vasculară.. ..	48
Figura 4. Structura histologică a glandei mamare în lotul de control, la paciente vârstnice.....	49
Figura 5. Nodul limfatic axilar ipsilateral în carcinom mamar	50
Figura 6. Carcinoame mamare de tip NST	51
Figura 7. Imagini reprezentative (H&E și IHC: CD3, CD4, CD8, CD34, CD45) în glanda mamară intactă.	62
Figura 8. Imagini IHC reprezentative pentru CD56 și CD68 în glanda mamară intactă.....	63
Figura 9. Repartizarea limfocitelor CD3 ⁺ în carcinomul mamar.	64
Figura 10. Repartizarea limfocitelor CD4 ⁺ în carcinomul mamar.	66
Figura 11. Repartizarea limfocitelor T citotoxice CD8 ⁺ în carcinomul mamar.	66
Figura 12. Distribuția densității microvasculare (CD34) în carcinomul mamar	67
Figura 13. Repartizarea limfocitelor CD45 ⁺ în carcinomul mamar.....	69
Figura 14. Repartizarea limfocitelor CD56 ⁺ în carcinomul mamar.....	70
Figura 15. Repartizarea limfocitelor CD68 ⁺ în carcinomul mamar.....	72
Figura 16. Repartizarea numerică a principalelor subpopulații celulare imunofenotipice în carcinomul mamar.....	72
Figura 17. Repartizarea limfocitelor CD3 ⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.....	73
Figura 18. Repartizarea limfocitelor CD4 ⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.	74
Figura 19. Repartizarea limfocitelor CD8 ⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.	76
Figura 20. Distribuția densității microvasculare (CD34) în carcinom asociat cu DZT2.	77
Figura 21. Repartizarea limfocitelor CD45 ⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.....	78
Figura 22. Repartizarea limfocitelor CD56 ⁺ în carcinoamele mamare asociate cu DZT2	79
Figura 23. Repartizarea limfocitelor CD68 ⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.	80
Figura 24. Repartizarea numerică a principalelor subpopulații celulare imunofenotipice în carcinomul mamar asociate cu DZT2	81
Figura 25. Glandă mamară în normă. Celule tumorale imunomarcate pentru ER și PR.....	87

Lista tabelelor

Tabelul 1. Criteriile de evaluare a gradului histologic în carcinomul mamar	40
Tabelul 2. Caracteristica anticorpilor, sistemelor de demascare și vizualizare utilizate în studiu	41
Tabelul 3. Evaluarea expresiei ER și PR după Allred	42
Tabelul 4. Evaluarea supraexpresiei HER2.....	43
Tabelul 5. Caracteristica specimenelor prelevate după diagnosticul morfologic și imunohistochimic	45

Introducere

Actualitatea și importanța problemei abordate. Maladiile oncologice și endocrine reprezintă o provocare pentru medicina contemporană, reflectând o dinamică îngrijorătoare în ceea ce privește prevalența și incidența acestora, care sunt într-o continuă creștere. În oncologie, cancerul de glandă mamară se distinge drept lider al neoplaziilor depistate la femei, cu o incidență globală de 11.4%, aproape similară în Republica Moldova, unde aceasta atinge o rată de 11.9% [1]. Această statistică nu doar că subliniază amploarea problemei, dar pune în evidență și nevoia acută de a dezvolta strategii eficiente de prevenție și tratament.

Microambianța tumorală reprezintă un element crucial în patogeniza cancerului de sân și este caracterizată printr-o funcționare defectuoasă a diverselor tipuri celulare, incluzând macrofage, fibroblaste, celule endoteliale și leucocite [2, 3]. Această interacțiune complexă dintre celulele tumorale și microambianța lor contribuie la progresia și metastazarea neoplaziei. Considerată la moment un factor esențial în carcinogeneză, inclusiv mamară, inter-relațiile în cauză prezintă caracteristici complexe și multifactoriale, care sunt influențate de contextul genetic și fenotipic al tumorii. Conform lui Weber *et al.* (2006), stroma tumorii nu doar că manifestă o semnătură genetică distinctă în funcție de fenotipul carcinomului, dar joacă și un rol activ în promovarea transformărilor neoplazice [4].

Carcinomul de glandă mamară (CGM) este raportat în literatura de specialitate drept o tumoră cu calități imunogene, sugerând astfel importanța cuantificării infiltratului limfocitar în cadrul rapoartelor histopatologice [5–7]. Prezența unui număr semnificativ de limfocite în tumoare, în special de limfocite T cu funcție citotoxică, CD8⁺, este adesea interpretată drept un indicator al unui răspuns imun activ îndreptat contra neoplasmului. Totuși, specificitatea și eficacitatea acestui răspuns imun variază în funcție de particularitățile biologice ale tumorii și de compoziția infiltratului imun tumoral. În acest context, celulele imune implicate în răspunsul antitumoral joacă totodată un rol esențial în inițierea și perpetuarea inflamației cronice, proces recunoscut drept un mecanism central în patogeniza diabetului zaharat de tip 2 (DZT2). Conform datelor din literatura de specialitate, particularitățile procesului inflamator sunt strâns corelate cu activitatea funcțională a celulelor imune și cu interacțiunile acestora cu componentele stromale, în special cu celulele adipoase [8–10].

Imunitatea înăscută reprezintă prima linie de apărare a organismului, având un caracter rapid și nespecific, și implică diverse populații celulare, precum macrofagele, neutrofilele, celulele dendritice și alte celule ale sistemului imun, care recunosc agenții patogeni și răspund prin mecanisme de fagocitoză și prin secreția de mediatori inflamatori [11]. Un aspect esențial îl reprezintă capacitatea acestor celule de a menține echilibrul homeostatic între activarea imună necesară în prezența unui stimul patogen și mecanismele de reglare supresivă, a căror disfuncție

poate favoriza apariția reacțiilor autoimune. Ambele procese sunt recunoscute ca având un rol important în carcinogeneză, inclusiv în dezvoltarea și progresia carcinomului mamar.

Diabetul zaharat reprezintă o problemă majoră de sănătate publică la nivel global, afectând aproximativ 10% din populație și prezentând o tendință de creștere constantă, în special în rândul populației vârstnice [12–14]. În context geriatric, acesta prezintă particularități clinico-biologice distincte, fiind predominant reprezentat de DZT2, caracterizat printr-o evoluție progresivă și un risc crescut de complicații, în special în absența unui management terapeutic adecvat [15–17].

Activarea celulelor imune în stromă este declanșată de o serie de factori metabolici, endocrini, biochimici și celulari pro-inflamatori. Acești factori includ, dar nu se limitează la citokine pro-inflamatorii, factori de stres oxidativ și metaboliți lipidici [18,19]. Drept exemplu, limfocitele T, frecvent identificate în țesutul celulo-adipos al glandei mamare, prezintă un subiect de interes sporit în cercetarea legată de inflamația sistemică și DZT2. Studiile realizate de McLaughlin *et al.* (2014) asupra profilului celulelor T în țesutul adipos, au pus în evidență implicarea acestora în dezvoltarea rezistenței la insulină și inflamației sistemice [20].

În concluzie, datele acumulate în domeniile oncologiei și endocrinologiei evidențiază existența unei relații complexe și bidirecționale între DZT2 și carcinogeneză. Studiile axate pe interacțiunile dintre celulele imune, în special limfocitele T, și țesutul adipos în contextul diabetic susțin ipoteza unei interdependențe strânse între mecanismele imunologice și cele metabolice. Totodată, interacțiunile dintre celulele tumorale și microambianța tumorală, incluzând fibroblastele, macrofagele și limfocitele T, sunt recunoscute ca factori determinanți ai progresiei tumorale, metastazării și răspunsului terapeutic în carcinomul mamar. Cu toate acestea, în pofida rolului bine documentat al imunității în carcinogeneză, până în prezent lipsesc date cantitative sistematizate privind caracteristicile locale ale infiltratului imun celular în carcinomul mamar, atât în formele dezvoltate solitar, cât și în cele asociate diabetului zaharat de tip 2. Această lacună de cunoaștere justifică necesitatea unor investigații aprofundate, orientate spre elucidarea relațiilor dintre statusul imun local, metabolismul glucidic și procesele carcinogenetice. În contextul creșterii continue a morbidității, abordările multidisciplinare și inovatoare în cercetarea și managementul cancerului mamar asociat diabetului zaharat de tip 2 devin imperativ necesare.

Scopul acestei lucrări a constat în studierea carcinomului mamar invaziv de tip ductal asociat cu DZT2 în vederea evaluării profilului molecular al tumorii și statusului imun celular local.

Obiectivele studiului:

1. Analiza comparativă a modificărilor morfologice ale glandei mamare în postmenopauză și ale carcinomului mamar invaziv de tip NST, în funcție de prezența DZT2;
2. Evaluarea statusului imun celular local prin cuantificarea subpopulațiilor leucocitare ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45^+$, $CD56^+$) și a macrofagelor $CD68^+$, în țesutul mamar non-neoplazic și tumoral, la paciente cu și fără DZT2;
3. Determinarea potențialului angiogen local prin analiza expresiei markerului CD34 în carcinomul mamar, în funcție de asocierea cu DZT2;
4. Caracterizarea fenotipului molecular tumoral prin evaluarea expresiei markerilor ER, PR, HER2 și Ki67, la paciente cu și fără DZT2;
5. Stabilirea corelațiilor statistice dintre statusul imun celular local, angiogeneză și fenotipul molecular tumoral, în vederea evidențierii influenței DZT2 asupra a microambianței tumorale.

Metodologia cercetării științifice. Specimenele biologice și datele clinice ale pacientelor au fost selectate din arhiva fișelor medicale și a blocurilor histopatologice ale IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova, Serviciul de Anatomie Patologică. Fragmentele tisulare prelevate au fost fixate în soluție de formalină tamponată 10%, cu un pH de 7.2-7.4 (6 – 36 ore). Prelucrarea țesuturilor a inclus etapele de deshidratare, eliminarea agenților de deshidratare și infiltrarea în parafină, utilizând BioWax Plus 56/58 (Biognost, HR). Ulterior, au fost obținute secțiuni tisulare cu grosimea de 3–5 μm utilizând microtomul Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary Microtome (Sakura, Japonia). Secțiunile destinate colorației cu hematoxilină–eozină (HE) au fost montate pe lame de sticlă standard, iar cele utilizate pentru analiza imunohistochimică (IHC) au fost aplicate pe lame de sticlă pretratate cu adeziv tisular 3-aminopropil-trietoxisilan (S3003, Dako, Danemarca), urmate de uscarea la 59°C timp de 8 ore. Evaluarea histopatologică a tumorilor a fost realizată prin examinarea secțiunilor colorate cu hematoxilină–eozină (HE), în vederea identificării și evaluării componentelor morfologice relevante pentru studiu. Profilul molecular al tumorilor a fost stabilit prin tehnici imunohistochimice, utilizând un sistem automatizat Dako Autostainer Link 48 (Dako Colorado, Inc., Ft. Collins, SUA) și un panel de anticorpi specifici pentru ER, PR, HER2, Ki67, CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56 și CD68.

Deparafinarea secțiunilor a fost efectuată cu ajutorul sistemului PT Link (Dako Colorado, Inc.), utilizând soluție tampon preîncălzită, iar demascarea antigenică a fost realizată prin incubare în soluție Target Retrieval Solution (EnVision™ FLEX, K8000) timp de 60 de minute. Ulterior, secțiunile au fost supuse unui proces de rehidratare prin trecerea succesivă prin băi de alcool etilic cu concentrații descrescătoare (100%, 90% și 70%) timp de câte două minute, urmat de rehidratare în apă timp de cinci minute.

Pentru blocarea activității peroxidazice endogene, secțiunile au fost tratate timp de cinci minute cu soluția Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (S2023, Dako). Contracolorarea nucleilor a fost realizată cu hematoxină Mayer, modificată după Lille (HMM500, ScyTek Laboratories). La final, preparatele histologice au fost deshidratate manual prin serii crescătoare de alcool etilic (70–100%), clarificate cu xilol și montate utilizând mediul de montare BioMount New (Biognost, BMN)

Datele obținute au fost înregistrate într-o bază de date MS Excel 2016 și au fost analizate statistic cu ajutorul programului SPSS. Acestea au inclus calculul mediei, deviației standard, medianei, intervalului intercuantilic și intervalului de variație (*range*: valoarea minimă și maximă), precum și coeficientului de corelație Spearman/Pearson. Diferențele dintre variabile au fost evaluate folosind testele Mann-Whitney U și t-Student, cu o semnificație statistică stabilită la $p \leq 0.05$. Cercetarea a fost desfășurată la Catedra de histologie, citologie și embriologie, Laboratorul de morfologie din cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova. Protocolul studiului a fost aprobat de Comitetul de Etică al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (nr. 7/ 70/ 12.11.2021).

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute. În cadrul cercetării a fost realizată o analiză comparativă a statusului imun celular local în carcinomul mamar la pacienți cu și fără diabet zaharat de tip 2, fiind evidențiate, în premieră, modificări semnificative ale infiltratului imun tumoral în contextul dereglărilor metabolice. S-a demonstrat, că DZT2 influențează compoziția și distribuția subpopulațiilor leucocitare ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD68^+$), determinând un profil imun caracterizat prin reducerea răspunsului citotoxic și intensificarea componentelor pro-tumorale. Totodată, au fost identificate corelații specifice între statusul imun celular, angiogeneză ($CD34$) și markerii moleculari tumorali (ER, PR, HER2, Ki67), evidențiind rolul DZT2 în remodelarea a microambianței tumorale.

Problema științifico-aplicativă soluționată. Prezenta cercetare vizează elucidarea modificărilor sistemului imun celular local în carcinomul mamar și analiza influenței diabetului zaharat de tip 2 asupra mecanismelor locale de apărare din micromediul tumoral.

Studiul realizat confirmă ipoteza inițial formulată, potrivit căreia dereglările metabolice sistemice caracteristice diabetului zaharat de tip 2 influențează semnificativ microambianța tumorală, determinând modificări ale statusului imun celular local în carcinomul mamar invaziv de tip ductal. Prin evaluarea cantitativă a componentelor vasculare ($CD34$), a subpopulațiilor de limfocite T ($CD3$, $CD4$, $CD8$) și a altor populații celulare imune ($CD45$, $CD56$, $CD68$) din compartimentele stromale intra- și peritumorale, cercetarea oferă date originale privind posibilele mecanisme prin care DZT2 modulează procesele carcinogenetice.

Rezultatele obținute evidențiază necesitatea unui management integrat al pacienților cu carcinom mamar, în special în contextul asocierii cu DZT2, și fundamentează propuneri de adaptare a protocoalelor terapeutice și de monitorizare. Impactul aplicativ și clinic al studiului este semnificativ, având potențialul de a contribui la optimizarea strategiilor terapeutice și la îmbunătățirea calității vieții pacienților. Prin furnizarea unor date relevante privind dinamica factorilor imuni în condiții de comorbiditate oncologică și metabolică, cercetarea oferă un suport științific valoros pentru practicieni, cercetători și factori decizionali din domeniul sănătății, facilitând adoptarea unor decizii clinice informate în managementul neoplasmelor asociate diabetului zaharat de tip 2.

Valoarea aplicativă a lucrării. Rezultatele obținute prezintă un aport semnificativ pentru optimizarea managementului clinic și terapeutic al pacienților cu carcinom mamar, în special în contextul asocierii cu comorbidități metabolice, precum DZT2. Studiul contribuie la aprofundarea înțelegerii mecanismelor prin care dereglările metabolice și răspunsul imun, independent sau concomitent, influențează procesele carcinogenetice, oferind premise pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice personalizate.

Datele obținute demonstrează că DZT2, prin modificările sale metabolice specifice, poate induce alterări ale imunității celulare locale în micromediul carcinomului mamar, evidențiind potențialul de a influența practicile clinice curente. În acest context, rezultatele studiului pot contribui la adaptarea protocoalelor de tratament și monitorizare, cu impact pozitiv asupra prognosticului și calității vieții pacienților.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

1. DZT2 constituie un factor activ de remodelare a microambianței tumorale în carcinomul mamar, influențând semnificativ statusul imun celular local și dinamica procesului tumoral. Dereglările metabolice sistemice caracteristice DZT2, precum hiperglicemia și inflamația cronică, modulează interacțiunile dintre celulele neoplazice epiteliale și structurile stromale, favorizând mecanisme implicate în progresia neoplazică.
2. Din punct de vedere histopatologic, asocierea DZT2 cu carcinomul mamar se corelează cu dimensiuni tumorale mai mari, evidențiind totodată o relație strânsă între gradul histologic și activitatea mitotică, ceea ce sugerează o interdependență accentuată a acestor factori de agresivitate tumorală în contextul metabolic diabetic.
3. DZT2 determină modificări semnificative ale profilului infiltratului limfocitar T în carcinomul mamar, caracterizate printr-o tendință de reducere a densității limfocitelor T citotoxice CD8⁺ intratumorale, în special în tumorile de grad înalt (G3), precum și prin slăbirea corelației dintre subpopulațiile CD3⁺ și CD8⁺. Aceste modificări sugerează un răspuns imun antitumoral compromis, compatibil cu o stare de imunosupresie accentuată în contextul diabetic. În plus, în

prezența DZT2, CD3it corelează pozitiv cu vârsta pacientelor, scorul Nottingham și expresia HER2, în timp ce CD4it prezintă o corelație negativă cu expresia ER.

4. DZT2 favorizează infiltrarea macrofagelor CD68⁺ în microambianța tumorală, atât la nivel intratumoral, cât și peritumoral. Densitatea intratumorală a macrofagelor CD68⁺ corelează pozitiv cu extinderea nodală (pN), iar populația peritumorală CD68⁺ se corelează pozitiv cu activitatea mitotică și dimensiunea tumorală (pT), susținând rolul pro-tumoral al macrofagelor în carcinomul mamar asociat diabetului zaharat.

5. În contextul DZT2 se evidențiază o disfuncție a celulelor endoteliale progenitoare CD34⁺, cu alterarea angiogenezei tumorale. Spre deosebire de pacientele non-diabetice, la care vascularizația intratumorală CD34it corelează pozitiv cu agresivitatea tumorală, la pacientele cu DZT2 se constată corelații negative între CD34it și gradul histologic, scorul Nottingham și indicele de proliferare Ki67, sugerând existența unei angiogeneze ineficiente, favorizând dezvoltarea unei microambianțe hipoxice.

6. Din perspectivă moleculară, deși DZT2 nu modifică distribuția subtipurilor moleculare ale carcinomului mamar, acesta influențează relațiile dintre markerii hormonal și cei de proliferare. În context diabetic se accentuează corelația pozitivă dintre HER2 și Ki67 și se evidențiază o corelație negativă semnificativă între expresia PR și Ki67, menținându-se totodată o coexpresie puternică ER-PR. Aceste interacțiuni sugerează un potențial comportament biologic mai agresiv al tumorilor HER2⁺ și o activitate proliferativă mai redusă a tumorilor PR⁺ în context metabolic diabetic.

7. DZT2 se asociază cu o acumulare crescută de celule CD56⁺ la nivel peritumoral, densitatea acestora corelând negativ cu activitatea mitotică și expresia HER2 și pozitiv cu vascularizația intratumorală (CD34it). Aceste rezultate evidențiază rolul complex al celulelor CD56⁺ în reglarea mecanismelor imune de la periferia tumorii și influența lor asupra angiogenezei în microambianța tumorală modificată de diabet.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele obținute au fost implementate în activitatea științifică a Laboratorului de morfologie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, precum și în activitatea practică a Secției de Anatomie Patologică a IMSP Institutul Oncologic.

Aprobarea rezultatelor: Rezultatele obținute și ideile de bază ale tezei au fost prezentate și discutate în cadrul următoarelor reuniuni științifice:

- National Scientific Conference with International Participation „Cells and tissues transplantation. Actualities and perspectives. The 3rd edition”, dedicată aniversării a 80 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (Chișinău, 2025);

- Conferința Națională Științifico-Practică cu participare internațională „Istoria, actualități și perspective ale serviciului de anatomie patologică în Republica Moldova” (Chișinău, 2025);
- Congresul Național de Oncologie, ediția VI (Chișinău, 2025);
- Congresul aniversar „80 de ani de inovație în sănătate și educație medicală” (Chișinău, 2025);
- 2nd International Cappadocia Scientific Research Congress (Nevşehir, Turcia, 2022);
- 2nd International Siirt Conference on Scientific Researches (Siirt, Turcia, 2022);
- ISPEC 13th International Conference on Engineering & Natural Sciences (Burdur, Turcia, 2022);
- 4th International Congress of Multidisciplinary Studies in Medical Sciences (Antalya, Turcia, 2022);
- 3rd International Conference on Medical & Health Sciences (Bingöl, Turcia, 2021);
- Conferința „Integrare prin cercetare și inovare” (Chișinău, 2021);
- II International Halich Congress on Multidisciplinary Scientific Research (Istanbul, Turcia, 2021);
- International Harran Health Sciences Congress-III (Şanlıurfa, Turcia, 2021);

Rezultatele acestui studiu au fost discutate și aprobate la ședința Catedrei de histologie, citologie și embriologie a USMF „Nicolae Testemițanu” (proces verbal Nr 8, din 12.02.2026) și Seminarului științific de profil 311. ANATOMIE ȘI MORFOLOGIE; 351. MEDICINĂ INTERDISCIPLINARĂ (proces verbal din 01.04.2026).

Publicații la tema tezei.

La tema tezei au fost publicate 40 lucrări științifice, dintre care 3 articole în reviste internaționale, 4 în reviste naționale și 33 rezumate în materialele conferințelor științifice naționale și de peste hotare.

Sumarul compartimentelor tezei.

Lucrarea include lista tabelor, lista figurilor, lista abrevierilor, introducere, 6 capitole, 5 concluzii generale și 7 recomandări practice. Bibliografia cuprinde 330 surse, fiind urmată de 16 anexe, informații despre valorificarea rezultatelor cercetării, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului.

În **Introducere** au fost descrise în sumar actualitatea și importanța problemei abordate în teză (particularitățile imunității celulare locale în carcinomul mamar la pacientele cu diabet zaharat de tip 2 și impactul acestei comorbidități), scopul și obiectivele studiului, metodologia generală de cercetare, noutatea științifică, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, precum și menționarea aprobării rezultatelor obținute.

Capitolul 1. Carcinomul mamar asociat cu diabetul zaharat – patologii cu evoluție complexă și interacțiuni biologice incomplet elucidate. În acest capitol a fost realizată o analiză amplă a datelor din literatura de specialitate privind etiopatogenia carcinomului mamar și a diabetului zaharat de tip 2, cu accent pe interconexiunile cunoscute dintre aceste două patologii. Totodată, au fost examinate rolul imunității celulare în tumori, precum și structura și funcțiile microambianței tumorale, incluzând componentele celulare (limfocite T, macrofage, celule NK) și vasculare. O atenție deosebită a fost acordată modului în care DZT2, prin dereglările metabolice și statusul proinflamator cronic, poate modula răspunsul imun local și caracteristicile micromediului tumoral (*tumor microenvironment* – TME), contribuind la carcinogeneză și la progresia tumorală. De asemenea, au fost identificate principalele controverse existente în literatura de specialitate și domeniile care necesită investigații suplimentare.

Capitolul 2. Materiale și metode cercetare. Acest capitol a fost dedicat design-ului studiului, cu descrierea loturilor de cercetare (paciente cu carcinom mamar invaziv de tip ductal NST cu și fără DZT2, și un grup de control cu țesut mamar neafectat), a criteriilor de includere și excludere. Au fost detaliate metodele de prelevare și procesare a materialului tisular (fixare, parafinare, secționare), tehnicile histologice uzuale (colorația HE) și imunohistochimice (panelul de anticorpi anti- ER, PR, HER2, Ki67, CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56, CD68), incluzând protocoalele de demascare și vizualizare. De asemenea a fost descris modul de cuantificare a markerilor și metodele de analiză statistică a datelor obținute.

Capitolul 3. Caracteristica morfologică a glandelor mamare în normă și patologie. În cadrul acestui capitol a fost realizată o caracterizare morfologică detaliată a glandei mamare neafectate (grupul de control), urmată de analiza particularităților histopatologice ale carcinomului mamar la pacientele fără DZT2 și, comparativ, la cele cu diabet asociat. Ulterior, a fost efectuată o evaluare imunohistochimică amplă a statusului imun celular local și a potențialului angiogen, prin analiza expresiei markerilor CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56 și CD68 în glanda mamară intactă, precum și în compartimentele intra- și peritumorale ale carcinomului mamar, în ambele grupuri de paciente.

De asemenea, au fost investigate interrelațiile, exprimate prin corelații statistice, dintre markerii imunității celulare și ai angiogenezei și caracteristicile clinico-patologice (grad histologic, stadiu, invazie), respectiv moleculare (ER, PR, HER2, Ki67) ale tumorilor, fiind realizată o analiză comparativă detaliată menită să evidențieze influența specifică a diabetului zaharat de tip 2 asupra microambianței tumorale.

Capitolul 4. Influența DZT2 asupra micromediului tumoral. Inițial, am realizat o evaluare imunohistochimică amplă a statusului imun celular local și a potențialului angiogen, descriind expresia markerilor CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56, CD68 în glanda mamară

intactă și în compartimentele intra- și peritumorale ale carcinomului mamar la ambele grupuri de paciente. De asemenea, au fost evaluate interrelațiile (corelațiile statistice) dintre markerii imunității celulare, potențialul angiogen și caracteristicile clinico-patologice (grad, stadiu, invazie) și moleculare (ER, PR, HER2, Ki67) ale tumorilor, cu o analiză comparativă detaliată pentru a evidenția influența specifică a DZT2.

Capitolul 5. Caracteristica expresiei markerilor hormonal (ER, PR) HER2 și Ki67 în glanda mamară intactă și carcinomul mamar. Capitolul vizează evaluarea expresiei receptorilor hormonal, HER2 și Ki67 în glanda mamară al femeilor aflate în postmenopauză, precum și în carcinomul mamar, la paciente cu și fără DZT2.

Lucrarea se finalizează cu un capitol de **Discuții**, în cadrul căruia a fost analizată în detaliu influența dereglărilor metabolice caracteristice diabetului zaharat de tip 2 asupra statusului imun celular local în carcinomul mamar. A fost realizată o sinteză comprehensivă a rezultatelor obținute privind profilul imun și molecular al tumorilor asociate diabetului zaharat de tip 2, fiind discutat modul în care prezența diabetului poate modifica structura tumorală și interacțiunile dintre markerii biologici, cu evidențierea implicațiilor potențiale asupra agresivității tumorale și a răspunsului la terapie.

De asemenea, a fost efectuată o analiză comparativă a tumorilor mamare dezvoltate în absența și în prezența diabetului zaharat de tip 2, prin integrarea datelor obținute în cadrul studiului cu rezultatele raportate în literatura de specialitate.

Cuvinte cheie: carcinom mamar, profil hormonal, HER2, Ki67, DZT2, imunitate locală, T limfocite, macrofage.

1. CARCINOMUL MAMAR ASOCIAT CU DIABETUL ZAHARAT – PATOLOGII CU EVOLUȚIE COMPLEXĂ ȘI INTERACȚIUNI BIOLOGICE INCOMPLET ELUCIDATE

Cancerul constituie o patologie complexă cu impact major asupra sănătății publice, care poate afecta indivizi indiferent de vârstă, sex, apartenență etnică sau localizare geografică. Dintre neoplaziile maligne, cancerul de sân reprezintă una dintre cele mai frecvente forme, fiind caracterizat prin proliferarea necontrolată a celulelor cu origine primară la nivelul glandei mamare. Această entitate nozologică prezintă particularități histopatologice, moleculare și clinico-imagistice distincte, care reflectă comportamentul biologic agresiv specific procesului neoplazic malign. Conform estimărilor GLOBOCAN 2018, incidența cancerului mamar este de aproximativ 10%, atât la nivel global cât și în Republica Moldova [1,21]. În contextul patologiilor cronice netransmisibile, numeroase dovezi științifice evidențiază existența unor mecanisme patogenetice comune între bolile neoplazice și afecțiunile metabolice. Dereglările metabolice sistemice, inflamația cronică de grad scăzut, stresul oxidativ și disfuncțiile microvasculare reprezintă elemente convergente implicate atât în inițierea și progresia procesului neoplazic, cât și în evoluția diabetului zaharat. În acest cadru, diabetul zaharat se conturează nu doar ca o afecțiune metabolică distinctă, ci și ca un factor cu potențial rol modulator asupra dezvoltării, evoluției și prognosticului anumitor tipuri de cancer.

În acest context al interacțiunii dintre patologiile cronice sistemice și mecanismele metabolice dereglate, diabetul zaharat se definește ca o afecțiune metabolică cronică, complexă și eterogenă, determinată de alterări genetice și/sau dobândite ale secreției de insulină, precum și de rezistența celulelor periferice la acțiunea acestui hormon. Patologia se caracterizează prin perturbări sistemice majore ale metabolismului glucidic, lipidic, proteic și ionic, asociate frecvent cu disfuncții ale sistemului imun. Complicațiile cronice ale diabetului zaharat implică afectarea progresivă a multiplelor țesuturi și organe, mecanismul patogenetic central fiind reprezentat de disfuncția microcirculatorie indusă de hiperglicemia cronică persistentă. Această condiție are un impact semnificativ, afectând aproximativ 9% din populație la nivel global și național [13,21,22].

În cadrul comorbidităților metabolice, diabetul zaharat reprezintă o condiție frecvent întâlnită la femeile recent diagnosticate cu cancer al glandei mamare. Studiile efectuate de Wang *et al.* (2020) au demonstrat o creștere a riscului de dezvoltare a diabetului zaharat la femeile aflate în postmenopauză și recent diagnosticate cu carcinom mamar primar [23]. Această corelație este susținută și de alte cercetări, cum ar fi cele efectuate de Cazet *et al.* (2010), care au explorat asocierea statistică dintre markerii metabolismului glucidic și cancerul mamar [24]. Mai mult, Zhu și Qu (2022) au prezentat dovezi privind relația dintre diabetul zaharat și cancer, subliniind mecanismele subiacente care asociază aceste două afecțiuni [25]. Asocierea dintre diabetul zaharat

și neoplazii a fost documentată și în cazul altor localizări tumorale, nu doar la nivelul glandei mamare, conform studiului realizat de Halámková *et al.* (2021), care au examinat impactul diabetului zaharat asupra dezvoltării tumorilor secundare la pacienții cu cancer colorectal [26]. Cercetarea efectuată de Vincent și Yaghootkar (2020) a adus contribuții remarcabile în înțelegerea cauzelor genetice în diabetul de tip 2 și cancer, punând în evidență mecanisme comune și influențe reciproce [27].

Diabetul zaharat cuprinde mai multe subtipuri etiopatogenice, dintre care cele mai frecvent întâlnite sunt diabetul zaharat de tip 1, DZT2 și diabetul zaharat gestațional [13,21]. Această afecțiune se caracterizează prin niveluri ale glicemiei bazale peste 5,6 mmol/l în sângele periferic [21].

Atât diabetul zaharat, cât și cancerul mamar exercită un impact major asupra morbidității și mortalității populației generale. Cancerul mamar reprezintă cea mai frecventă neoplazie malignă la sexul feminin, cu o incidență în creștere odată cu înaintarea în vârstă, fiind predominant diagnosticat după vârsta de 50 de ani [23]. În mod similar, incidența diabetului zaharat crește odată cu înaintarea în vârstă, fapt ce subliniază necesitatea unei monitorizări riguroase și a unei gestionări adecvate a stării de sănătate în rândul acestor grupuri populaționale [13]. Aceste observații sunt susținute de rezultatele cercetărilor realizate de Wang *et al.* (2020), care au evidențiat o creștere a riscului de dezvoltare a diabetului zaharat în contextul asocierii dintre statusul postmenopauzal și cancerul de sân [23]. Situația descrisă evidențiază existența unor interconexiuni complexe între cele două afecțiuni și necesitatea unei abordări integrate în prevenția și tratamentul lor.

În prezent, sunt descrise multiple sisteme de clasificare ale carcinomului mamar; cu toate acestea, în practica morfologică curentă, clasificarea patologică postchirurgicală reprezintă standardul utilizat în evaluarea primară a acestei neoplazii. Această clasificare are un rol esențial în asigurarea unei colaborări eficiente între medicii anatomopatologi și clinicieni, întrucât sistemul TNM constituie un limbaj standardizat care facilitează stabilirea diagnosticului și elaborarea strategiilor terapeutice adecvate [28].

În cadrul clasificării TNM, componenta de stadializare primară „T” descrie dimensiunea tumorii, fiind precedată de prefixul „c” pentru stadiul clinic sau „p” pentru stadiul patologic/postchirurgical. Notarea „Tis” corespunde carcinomului ductal *in situ*, în absența invaziei. Ulterior, tumorile sunt încadrate de la T1 la T4, în funcție de dimensiunea acestora (de la sub 2 cm până la peste 5 cm), precum și de gradul de implicare a peretelui toracic și a tegumentelor [29].

Similar cu clasificarea „T”, stadializarea implică și caracteristica nodulilor limfatici, cu categorii variind de la N0 la N3 [29]. N0 indică absența implicării nodulilor limfatici, în timp ce categoria N1 desemnează prezența metastazelor la nivelul nodulilor limfatici axilare ipsilaterale

de nivel I–II, mobile. N2 se referă la metastaze în nodulii limfatici axilare ipsilaterale de nivel I–II, fixate clinic sau aglomerate, sau la afectarea nodulilor limfatici mamari interni ipsilaterali detectate clinic, în absența metastazelor axilare evidente clinic. Categoria N3 indică metastaze la nivelul nodulilor limfatici de nivel III (infraclaviculari, ipsilaterali), precum și afectarea nodulilor limfatici mamari interni ipsilaterali asociată cu metastaze axilare de nivel I–II sau a nodulilor limfatici supraclaviculari ipsilaterali. În ceea ce privește evaluarea metastazelor, stadializarea „M” include prezența sau absența metastazelor, clasificate ca M0 sau M1 [29].

1.1. Imunitatea celulară în stroma carcinomului mamar

Sistemul imun are un rol fundamental în menținerea homeostaziei tisulare, iar disfuncțiile sale contribuie semnificativ la inițierea și progresia proceselor neoplazice [30–32]. Acest complex de mecanisme celulare este crucial în lupta organismului împotriva evoluției tumorale.

Conform cercetărilor lui Law *et al.* (2017), celulele imune infiltrate în tumori reprezintă ținte importante pentru dezvoltarea imunoterapiei cancerului mamar [33]. Această opinie este susținută și de studiul lui Koeck *et al.* (2017), care au explorat influența celulelor stromale și a citokinelor derivate din micromediul tumoral asupra subpopulațiilor limfocitare CD3⁺CD8⁺ infiltrate în tumoare [34].

Mecanismele imunologice implicate în carcinogeneză sunt mediate de multipli factori a microambianței tumorale, incluzând celulele rezidente și migratoare ale țesutului conjunctiv, precum și componentele vasculare și conținutul acestora. Componentele menționate pot exercita efecte sinergice sau antagoniste ori pot avea un comportament imunologic silențios pe parcursul dezvoltării tumorale, așa cum a fost descris în lucrările lui Bates *et al.* (2018) și Glajcar *et al.* (2019), care au analizat compoziția infiltratelor de celule T în stroma tumorală și posibilele mecanisme de evitare în carcinogeneză [35,36].

În opinia lui Li *et al.* (2021) micromediul tumoral reprezintă un element de interes major cu implicații semnificative în dezvoltarea strategiilor de tratament [37]. Acest fapt subliniază repetat necesitatea unei înțelegeri aprofundate a imunității celulare și a rolului său în progresia și tratamentul cancerului mamar. Imunitatea celulară în tumorile mamare reprezintă un domeniu complex și diversificat, implicând o varietate largă de celule imune, împărțite în 15 subseturi diferite, așa cum au fost caracterizate de Klopfenstein *et al.* (2021) [38]. Această diversitate celulară reflectă complexitatea problemei și multiplele moduri prin care sistemul imun poate răspunde la prezența tumorii. Răspunsul imun asociat tumorii poate fi organizat în două tipare principale: un tipar stromal, caracterizat prin prezența infiltratului inflamator la nivelul stromei peri- și intratumorale, și un tipar intratumoral, definit prin infiltrarea directă a parenchimului tumoral de către celulele imune. Populațiile leucocitare implicate în aceste tipare pot fi identificate

și cuantificate prin colorații histologice de rutină, precum hematoxilină–eozină (HE), precum și prin tehnici imunohistochimice (IHC) [39–41].

Limfocitele constituie populația leucocitară cel mai frecvent analizată la nivel intra- și peritumoral. În literatura de specialitate infiltratul stromal este reprezentat preponderent de limfocitele care se află în stromă, dar nu intră în contact direct cu celulele tumorale. Pe de altă parte, poate fi întâlnit și infiltratul limfocitar intratumoral, cu vizualizarea contactului direct dintre celule, fără implicarea stromei, așa cum a fost descris de Salgado *et al.* (2015) [42]. În ceea ce privește cancerul mamar, nu există o opinie unică ce ține de conținutul limfocitar intra- și peritumoral, iar rezultatele existente sunt contradictorii, având la bază profilul molecular diferit și metodele de cuantificare. După Hendry *et al.* (2017), mai frecvent este descris conținutul intratumoral în carcinoamele Triplu-negative și HER2 pozitive [43]. Diversitatea opiniilor existente subliniază complexitatea și importanța înțelegerii imunității celulare în contextul cancerului mamar, precum și necesitatea unor metode standardizate pentru evaluarea infiltratelor limfocitare.

Prin urmare, evaluarea infiltratului limfocitar stromal în cancerul mamar se realizează pe baza unor criterii specifice, dintre care pot fi menționate:

1. Conform recomandărilor formulate de Salgado *et al.* (2015), evaluarea infiltratului limfocitar necesită utilizarea unor puteri de mărire adecvate pentru o observare detaliată, fiind considerate optime mărimi cuprinse între 20-40x [42];
2. Potrivit Hendry *et al.* (2017), consistența și calitatea secțiunilor de țesut fixat în formalină și inclus în parafină sunt esențiale pentru realizarea unei evaluări precise, grosimea optimă a secțiunilor fiind de 4–5 μm. [43];
3. Pruneri *et al.* (2017) au indicat a fi necesară evaluarea tuturor celulelor mononucleare, inclusiv a limfocitelor și celulelor plasmatică [44];
4. Folosirea markerilor imunohistochimici este absolut necesară pentru acuratețea experimentelor [43];
5. Indicarea tipului de infiltrat: circumferențial minim, parțial, subtotal și total. După Salgado *et al.* (2015) aceasta este important pentru determinarea gradului de implicare a tumorii [42].

Totuși, infiltratul leucocitar este un factor variabil în tumorile maligne ale glandei mamare, fiind mai accentuat în cancerul Triplu-negativ, HER2 pozitiv și mai redus în tumorile hormon pozitive. Rolul infiltratului este semnificativ, chiar dacă prezența acestuia este mai puțin discutată comparativ cu alte caracteristici tumorale [45–47].

Limfocitele T. CD3 reprezintă o proteină esențială pentru funcționarea celulelor T, având un rol crucial în activarea acestora [48,49]. Aceasta reprezintă o proteină transmembranară complexă, prezentă pe suprafața celulelor T și formează un complex cu receptorul celulelor T (TCR). CD3

constă din patru izoforme distincte de proteine de membrană: CD3-delta (δ), CD3-epsilon (ϵ), CD3-gamma (γ) și CD3-zeta (ζ). Aceste subunități se organizează într-un complex care include trei seturi de dimeri: CD3-epsilon-delta, CD3-epsilon-gamma și CD3-zeta-zeta. Cunoașterea acestora devine importantă, fiindcă deficiențele de structură a CD3, în special în subunitățile delta și epsilon, pot conduce la probleme în diferențierea limfocitelor T. După Fischer *et al.* (2005) aceste deficiențe afectează profund imunitatea celulară și pot avea multiple repercusiuni clinice [50].

În contextul oncologic, CD3 a fost studiat pentru implicarea sa în diferite tipuri de cancer. De exemplu, în cancerul de prostată, CD3 a fost identificat ca un factor prognostic în predicția dezvoltării de metastaze [51]. După Mao *et al.* (2013) în carcinomul colorectal, prezența limfocitelor CD3⁺ a fost asociată cu o supraviețuire mai îndelungată [52].

Evaluarea infiltratului tumoral cu CD3, în special a peptidelor legate de CD3, precum iRGD-antiCD3, este un domeniu de cercetare emergent și promițător în tratamentul cancerului. iRGD-antiCD3 facilitează infiltrarea tumorală cu limfocite și este considerat o țintă potențială pentru terapia antitumorală [53–55]. Aceste peptide au fost studiate în combinație cu alți markeri imunohistochimici în tumorile gastrice, colorectale și pulmonare.

Studiile recente sugerează că, infiltratul peritumoral format de celulele T CD3⁺, reprezintă un factor prognostic mai bun. Inițial, Li *et al.* (2017) au raportat, că prezența infiltratului limfocitar tumoral (TILs), în special cu celule T CD3⁺, corelează pozitiv cu supraviețuirea pacienților, ceea ce subliniază importanța determinării subpopulațiilor limfocitare în tumori. Însă ulterior, Li *et al.* (2020) au declarat că odată cu creșterea numerică a limfocitelor T în infiltrat, sporește gradul de invazie al tumorii în diverse tipuri de cancer, inclusiv mamar [56]. Rezultatele prezentate de Hiraoka *et al.* (2016) sugerează că prezența infiltratelor limfoide în zona peritumorală indică faptul că sistemul imun este activat însă ineficace contra tumorii [57]. Mai mult, conform lui Werner *et al.* (2021) infiltratele limfocitare trebuie să fie asociate cu o activitate imunologică sporită, fapt ce poate fi utilizat pentru a influența răspunsul la tratamentele imunoterapeutice. Într-un mod similar, Kim *et al.* (2019) au observat că infiltratele cu limfocite CD8⁺ în cancerul pulmonar au fost predominant limitate la stromă, ceea ce sugerează că microambianța tumorală joacă un rol crucial în modularea interacțiunilor dintre limfocitele T CD3⁺ și celulele neoplazice [58]. Această observație poate fi relevantă și pentru cancerul mamar, unde interacțiunile complexe dintre celulele T și celulele stromale, nestudiate încă, pot modula răspunsul imun și progresia tumorii, consolidând importanța cercetării acestui mediu dinamic. Yu *et al.* (2015) au subliniat că prezența limfocitelor T în tumoră, inclusiv CD3⁺, este asociată cu un prognostic mai bun în cancerul mamar, evidențiind importanța formării unui infiltrat mai consistent TILs după terapia neoadjuvantă [59]. Aceste date sunt în acord cu observațiile lui Mao *et al.* (2016), care sugerează că TILs CD3⁺ pot

fi utilizați ca indicatori prognostici, completând astfel importanța evaluării conținutului de celule T CD3⁺ în cazul examenului histologic [60]. Conform datelor prezentate de Nair-Gupta *et al.* (2020) reiese, că prezența celulelor T CD3⁺ în tumoră corelează cu o activitate imunologică sporită, fapt ce poate îmbunătăți răspunsul la imunoterapiile bazate pe inhibitori în punctele *checkpoint* ale mitozei [61]. Similar, datele prezentate de Liang *et al.* (2020) susțin ideea că o densitate mai mare de CD3⁺ este asociată cu un răspuns mai bun la chimioterapia neoadjuvantă [62].

Un alt aspect important al microambianței tumorale reprezintă expresia PD-L1 de către celulele tumorale și numărul de celulele T CD3⁺ infiltrate. Parra *et al.* (2016) au demonstrat că în cancerul pulmonar non-microcelular, combinația dintre expresia PD-L1 și densitatea celulelor CD3⁺ poate fi utilizată pentru a identifica subtipuri distincte de microambianță tumorală. Acest model ar putea fi extrapolat și la cancerul mamar, unde astfel de caracteristici ar putea avea implicații majore în stratificarea pacienților și în selectarea strategiilor de tratament personalizat [63].

Aceste constatări se aliniază cu dovezile anterioare care subliniază rolul important al infiltratului CD3⁺ în microambianța tumorală al cancerului mamar. De exemplu, Kim *et al.* (2022) au evidențiat că expresia antigenelor B7-H3 și B7-H4 este negativ corelată cu densitatea infiltratului CD3⁺ și CD8⁺, indicând o posibilă suprimare a activității celulelor T la prezența acestor molecule [64]. În completare, Taki *et al.* (2015) au demonstrat potențialul terapeutic al anticorpilor specifici care vizează CD3, indicând că activarea directă a celulelor T prin intermediul CD3 poate spori acțiunea citotoxică împotriva celulelor tumorale [65]. Rezultatele prezentate permit să presupunem, că celulele T CD3⁺ au un rol cheie în modularea răspunsului imun, fapt ce poate fi utilizat și în optimizarea strategiilor terapeutice. Drept exemplu, studiile lui Tchou *et al.* (2017) indică, că injectarea intratumorală a celulelor T CAR poate stimula semnificativ răspunsul imun contra tumorii în cancerul mamar [66].

Rolul subclaselor de limfocite T este intens studiat în diverse neoplasme. Recent, Hillen *et al.* (2021) au grupat neoplasmele melanocitare spitzoide în funcție de conținutul infiltratului inflamator tumoral, definivând 6 subtipuri: CD3⁺/CD8⁺ și CD3⁺/CD4⁺ (din limfocite T), CD68⁺ (macrofage), CD3⁺/TIA-1⁺ (limfocite T citotoxice), CD3⁺/pan B⁺ (limfocite B) și CD138⁺ (plasmocite) [67]. Această diferențiere descrie natura complexă a imunității celulare intratumorale, posibilă și în cazul altor neoplasme. În cancerul colorectal, după Barbosa *et al.* (2021), infiltratul limfocitar CD3, CD8 și FoxP3 pozitiv a fost asociat cu un prognostic favorabil de supraviețuire. Interesant este că infiltratul pozitiv la FoxP3 în marginea de rezecție a fost, de asemenea, asociat cu un prognostic favorabil, sugerând o implicare activă în patogeneza cancerului [68].

După Koeck *et al.* (2017) un rol important în dezvoltarea microambianței tumorale îl are și raportul CD3/CD8 al limfocitelor T [34]. Diminuarea a CD3 poate indica la o reducere a infiltratului inflamator tumoral și poate fi interpretată ca o deficiență în răspunsul imun limfocitar tumoral [69]. Evidențierea rolului infiltratului limfocitar CD3 în aceste procese sugerează, că un răspuns imun robust poate avea un impact semnificativ asupra evoluției tumorii. Există studii care ilustrează complexitatea și importanța răspunsului imun în contextul cancerului mamar, în special în cazurile de regresie spontană [70–72]. Acest fenomen rar este atribuit diferitor mecanisme, iar studiile în cauză subliniază importanța înțelegerii pârgiilor imune în lupta împotriva cancerului mamar.

Infiltratul intratumoral limfocitar (TILs) în cancerul mamar frecvent a fost caracterizat prin determinarea a două tipuri de celule, CD4⁺ și CD8⁺. Aceste celule au fost descrise drept esențiale pentru răspunsul imun al organismului împotriva tumorilor. Deși prezența limfocitelor în cauză a fost identificată în diverse studii, a rămas incert mecanismul de acțiune a acestora, în special în contextul diabetului zaharat, o afecțiune metabolică cronică, influențată de mecanismele imune și capabilă, la rândul său, să modifice răspunsul imun și evoluția tumorală [73]. Prin urmare, infiltratul limfocitar stromal în cancerul mamar este considerat drept marker prognostic și predictiv, în special în cazurile de cancer Triplu-negativ și HER2 pozitiv [46,74–76]. Acest tip de infiltrat, alcătuit din subclase limfocitare localizate în stroma tumorii joacă un rol crucial în modularea răspunsului imun al organismului la prezența tumorii. Studiile în domeniu ne permit să presupunem că prezența acestor celule în stroma tumorii poate oferi informații valoroase despre evoluția bolii și răspunsul la tratament.

Cazurile la care este prezent infiltratul limfocitar stromal tumoral prezintă, în general, un răspuns terapeutic superior comparativ cu cei la care acesta este absent. Studiile realizate de Bărbosu Angelis *et al.* (2020) și Goff *et al.* (2021) au demonstrat că prezența infiltratului limfocitar stromal în tumorile mamare poate constitui un indicator al eficacității terapeutice [77,78]. Cu toate acestea, identificarea și caracterizarea specifică a subgrupurilor limfocitare infiltrate și relația lor cu tipurile diferite de tumori rămân a fi neclare.

Compoziția limfocitară din tumorile mamare este complexă și variază în funcție de localizarea infiltratului. Studiul lui Verma *et al.* (2020) a evidențiat că predominanța celulelor CD4⁺ în zona extratumorală și a limfocitelor CD8⁺ în zona intratumorală este mai accentuată în tumorile de grad G3 și hormon negative. Această observație sugerează, că tipul și localizarea celulelor limfocitare ar putea influența agresivitatea și răspunsul tumorii la tratament. De exemplu, prezența crescută a celulelor CD8⁺ în interiorul tumorii ar putea indica un răspuns imun mai activ, în timp ce predominanța limfocitelor CD4⁺ în aria extratumorală poate fi asociată cu o activitatea mai eficientă a răspunsului imun [79].

Modificările genetice la nivelul CTLA-4, în special variantele CTLA-4c.49A și CTLA-4c.-319 în limfocitele T efectoare CD4⁺, sunt de un interes deosebit pentru domeniul oncologiei și imunologiei. Studiul efectuat de Gu-Trantien *et al.* (2013) subliniază, că anumite variante genetice ale CTLA-4 pot crește susceptibilitatea la dezvoltarea tumorilor maligne. Acest lucru a fost marcat ca relevant în cazul cancerului mamar, cervical și cel hepatocelular [80]. Rezultatele în cauză sugerează, că mutațiile sau polimorfismul genelor care codifică CTLA-4 pot influența modul în care sistemul imunitar interacționează cu celulele tumorale. În mod specific, variantele CTLA-4c.49A și CTLA-4c.-319 ar putea reduce capacitatea sistemului imunitar de a suprima proliferarea celulelor tumorale, crescând astfel riscul de expansiune a tumorii. Aceste modificări genetice nu numai că sunt semnificative pentru înțelegerea susceptibilității la cancer, dar pot avea și implicații prognostice importante, sugerând că profilul genetic al unui individ poate susține dezvoltarea neoplasmului și influența răspunsului la tratament [80]. Astfel, analiza genetică a CTLA-4 și a altor gene implicate în reglarea imunității ar putea oferi informații valoroase pentru personalizarea terapiilor oncologice și pentru dezvoltarea unor strategii preventive mai eficiente în cazurile cu risc genetic crescut.

Celulele CD8⁺, cunoscute și sub denumirea de limfocite T citotoxice, reprezintă un element esențial al imunității celulare, având un rol determinant în modularea și eficiența răspunsului imun antitumoral, prin recunoașterea și eliminarea celulelor neoplazice. Multiple studii recente au subliniat importanța acestor celule în modularea răspunsului la chimioterapie și la tratamentele țintite în imunoterapie [81–85]. Este dovedit că, celulele CD8⁺ recunosc și distrug celulele canceroase prin identificarea antigenilor tumorali specifici prezenți pe suprafața acestora. În opinia autorilor, prezența unui infiltrat dens de celule CD8⁺ în tumoră după chimioterapie poate fi considerat drept un răspuns mai bun la tratament. Acest lucru se datorează faptului că chimioterapia induce moartea celulelor tumorale, eliberând antigeni care stimulează celulele CD8⁺ să atace și mai eficient tumoarea. Efectele benefice ale celulelor CD8⁺ în tratamentul tumorilor au fost evidențiate în numeroase tipuri de neoplasm, inclusiv în cancerul mamar, colorectal și melanom. Capacitatea limfocitelor T CD8⁺ de a recunoaște și elimina celulele tumorale le conferă un rol central atât ca țintă terapeutică în strategiile de imunoterapie, cât și ca marker prognostic relevant în evoluția bolilor neoplazice. În contextul imunoterapiei, celulele CD8⁺ sunt deosebit de importante, deoarece multe terapii imune vizează activarea și amplificarea răspunsului acestor celule. De exemplu, inhibitorii punctelor de control imun (cum ar fi inhibitorii PD-1 și CTLA-4) pot elimina frânele impuse de celulele tumorale asupra celulelor CD8⁺, permițându-le să atace mai eficient neoplasmul [86]. Corelarea populației de limfocite T, atât peri-, cât și intratumorale, are o importanță semnificativă în contextul tratamentului oncologic, în special pentru cancerul mamar. Studiul efectuat de Terranova-Barberio *et al.* (2020) a evidențiat, că prezența și distribuția acestor

celule imune în și în jurul tumorilor pot fi indicatori critici ai răspunsului la tratament și pot avea implicații prognostice [83].

Limfocitele T peritumorale se localizează în țesuturile din jurul tumorii și pot avea un rol crucial în limitarea răspândirii tumorii. Pe de altă parte, limfocitele T intratumorale sunt celule imune care au pătruns în țesutul tumoral, iar prezența lor este considerată drept indicator al unui răspuns imun activ și eficient împotriva neoplasmului [84]. La moment, există opinii precum că evaluarea cantitativă a acestor tipuri de populații limfocitare poate oferi informații valoroase referitor la natura răspunsului imun al organismului față de tumoare [85]. Drept exemplu, un număr semnificativ de limfocite T intratumorale ar putea indica un răspuns imun robust și prin urmare, un prognostic mai favorabil. În contrast, un număr scăzut de limfocite T intratumorale, chiar și în prezența unui număr mare de limfocite T peritumorale, ar putea sugera o capacitate redusă a sistemului imunitar de a lupta eficient împotriva tumorii.

Raportul dintre populațiile de limfocite T peri- și intratumorale s-a dovedit a fi important și în cazul carcinomului mamar. Conform rezultatelor prezentate de Banin-Hirata *et al.* (2018), prezența unui număr mare de limfocite T intratumorale în tumoare a fost asociată cu un răspuns mai bun la chimioterapie și imunoterapie, precum și cu un prognostic general mai bun. Mai mult, astfel de rezultate nu sunt izolate, fiind raportate în mod consecvent în literatura de specialitate. În literatura de specialitate sunt prezentate date precum că, infiltratul limfocitar este un factor de prognostic independent, favorabil pentru tratamentul tumorilor mamare [87,88]. Aceste cercetări sugerează că prezența unui infiltrat limfocitar bogat, în anumite contexte, poate fi un semn al unui răspuns imun eficient, care contribuie la o evoluție mai favorabilă a bolii și la un răspuns mai bun la tratament. Totuși există și excepții. Banin-Hirata *et al.* (2018) au subliniat, că tumorile HER2 pozitive, infiltrate intens cu limfocite au tendința de a avea un prognostic mai rezervat și un potențial mai mare de metastazare comparativ cu cele care prezintă o cantitate redusă de limfocite [89]. Constatarea respectivă evidențiază caracterul ambivalent al rolului limfocitelor în context tumoral și subliniază complexitatea fenomenului, a cărui înțelegere necesită o evaluare integrată a caracteristicilor biologice tumorale și a distribuției subpopulațiilor limfocitare.

Cele relatate permit să presupunem, că evaluarea distribuției și densității limfocitelor T atât în interiorul, cât și în jurul tumorilor mamare poate juca un rol important în personalizarea tratamentului și în îmbunătățirea rezultatelor clinice.

Angiogeneza (celule CD34⁺) este un alt factor important care influențează gradul de proliferare al tumorii și prognosticul. Expresia CD34 în cancerul mamar reprezintă un subiect de interes major pentru înțelegerea angiogenezei în cadrul procesului de carcinogeneză. Studiul efectuat de Catteau *et al.* (2013) a explorat acest aspect, concentrându-se pe expresia periductală a CD34 în țesutul stromal din carcinomul ductal al sânului. Rezultatele sugerează, că există o

variație semnificativă în ceea ce privește expresia markerului CD34. Aceasta sugerează o alterare variată a structurii vasculare în țesutul afectat de tumoare, indicând posibile modificări în arhitectura vaselor și în mecanismele de vascularizare [90]. Pe de altă parte, studiul anterior condus de Teo *et al.* (2002) care a avut ca scop evaluarea densității vasculare în tumorile mamare a concluzionat, că numărul vaselor nu depinde de stadiul tumorii, având cote similare în DCIS (carcinom ductal *in situ*) și carcinoamele avansate [91]. Mai mult, acești cercetători au constatat că proliferarea vasculară nu este direct corelată cu gradul histologic al tumorii. Această descoperire poate fi considerată drept una semnificativă deoarece contrazice presupunerea comună, precum că o densitate vasculară mai mare este asociată cu un grad mai înalt de agresivitate tumorală. În plus, apare suspiciunea că alți factori, în afară de densitatea vasculară, pot influența dezvoltarea tumorii. Aceste rezultate contradictorii subliniază necesitatea unor evaluări suplimentare, mai detaliate a rolului angiogenezei în evoluția și tratamentul cancerului mamar.

Studiul efectuat de Frangou *et al.* (2005) a pus în evidență o creștere semnificativă a vascularizării în tumorile mamare avansate, în special în cele cu un grad de diferențiere scăzut. Această observație indică faptul, că angiogeneza poate avea un rol crucial în evoluția și progresia cancerului de sân, deoarece acest proces nu numai că furnizează nutrienții necesari creșterii tumorale, dar poate facilita și metastazarea prin oferirea unei căi pentru diseminarea celulelor canceroase. Astfel, o înțelegere mai aprofundată a angiogenezei în tumorile mamare poate oferi indicii importante și pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice țintite [92].

Multiplele cercetări existente la moment, prezintă că CD34 nu este doar un marker vascular, ci poate servi și ca un indicator prognostic valoros în cancerul mamar avansat, în special în subtipul Bazal-like [93–95]. Densitatea CD34 s-a dovedit a fi un criteriu ce corelează cu dimensiunea tumorii, gradul histologic și nivelul de exprimare a receptorilor hormonali, oferind astfel indicii despre agresivitatea tumorii și potențialul său de răspândire. În consecință, evaluarea CD34 ar putea contribui la estimarea prognosticului și la personalizarea planurilor de tratament pentru pacienții cu carcinom mamar.

Cuantificarea și caracterizarea vaselor în stroma tumorală s-a dovedit a fi o metodă importantă pentru evaluarea agresivității tumorii și viitorului prognostic. La ziua de azi, cea mai frecvent utilizată este metoda „*hot spot*” de cuantificare [96]. Totuși important s-a dovedit a fi nu numai numărul vaselor. Verheul *et al.* (2004) au subliniat că există variații în caracteristicile vascularizării tumorale, care pot fi influențate de mai mulți factori, inclusiv de gradul de maturitate al vaselor nou-formate [97]. Imaturitatea acestora poate influența eficacitatea tratamentelor bazate pe inhibarea angiogenezei. De asemenea, specificul de vascularizare al fiecărei tumori poate varia, ceea ce înseamnă că structura și densitatea vaselor de sânge pot varia semnificativ de la o tumoră la alta, influențând astfel răspunsul la tratament și evoluția bolii. Aceste evidențe sugerează ideea

că fiecare tumoare este unică după gradul de vascularizare și necesită o atitudine terapeutică personalizată.

Expresia antigenului CD34 este recunoscută ca marker caracteristic al celulelor stem hematopoietice, fiind totodată prezentă la nivelul unor subpopulații de celule stromale implicate în susținerea microambianței tisulare. Studiile lui Díaz-Flores *et al.* (2014, 2021) subliniază faptul că CD34 este exprimat de celule stromale și progenitoare din diverse tipuri de țesuturi, inclusiv cel adipos și stroma tumorală, ceea ce evidențiază versatilitatea și implicarea acestor celule în dezvoltarea tumorii [98,99]. În completare, Westhoff *et al.* (2020) au demonstrat că celulele stromale CD34⁺ pot fi precursorii fibroblastelor asociate tumorii, care joacă un rol esențial în remodelarea țesutului și progresia cancerului, în special în carcinomul lobular invaziv al sânului. Aceste observații susțin importanța studiului stromei tumorale, fapt ce va oferi noi direcții pentru explorarea mecanismelor prin care microambianța tumorală poate fi considerată drept țintă terapeutică [100].

Conform datelor prezentate de Kishaba *et al.* (2010) rezultă că fibroblastele stromale exprimă atât CD34, cât și α -SMA, ceea ce indică la heterogenitatea complexă nu numai în interacțiunile dintre celule, dar și în structura fiecărei celule asociate tumorii. Datele existente subliniază rolul crucial al celulelor stromale în remodelarea stromei tumorale și dezvoltarea tumorii [101]. Studiul realizat de Tremp *et al.* (2016) sugerează că CD34⁺ poate servi drept marker al stării de imaturitate a celulelor stromale, fiind asociat cu o capacitate replicativă crescută a acestor celule. Această capacitate proliferativă poate contribui semnificativ la progresia tumorilor, evidențiind potențialul celulelor stromale CD34⁺ ca țintă în strategiile terapeutice. Prin urmare, evaluarea expresiei CD34 în celulele stromale din cancerul mamar oferă o perspectivă valoroasă asupra modului în care aceste celule influențează microambianța tumorală și progresia bolii [102].

Datele obținute evidențiază caracterul multifuncțional al celulelor stromale CD34⁺ în stroma glandei mamare neafectate, indicând contribuția acestora la arhitectura și funcționalitatea a microambianței tisulare. Khan *et al.* (2017) au raportat prezența celulelor CD34⁺ în stroma inter- și intralobulară, asociind prezența expresiei difuze drept caracteristică a țesutului neafectat. Cu alte cuvinte, acest aspect histologic sugerează că prezența celulelor CD34⁺ poate constitui un marker al unei stări homeostatice tisulare normale. Astfel, putem presupune, că modificările expresiei CD34 în stroma tumorală va reflecta tranzițiile funcționale care apar odată cu progresia bolii și vor pune în evidență diferența dintre statusul tisular normal și cel patologic [103]. De exemplu, Mamoor (2023) a accentuat că markerul CD34 este diferențiat exprimat în metastazele cerebrale ale cancerului mamar, sugerând un posibil rol al acestui marker în procesele de migrare și invazie celulară, aspecte esențiale pentru progresia tumorală și diseminare [104]. Forsare *et al.* (2022) și Nakagawa *et al.* (2015) au evidențiat că distribuția spațială și conținutul celulelor stromale CD34⁺

pot avea un impact semnificativ asupra caracteristicilor histopatologice ale tumorii, oferind indicii valoroase despre agresivitatea tumorii și prognostic [105,106]. În plus, studiile realizate de Kaçar *et al.* (2011) au demonstrat că prezența celulelor CD34⁺ în stroma tumorală poate reflecta recrutarea celulelor progenitoare circulante, care joacă un rol crucial în procesul de neovascularizare [107].

CD45RO reprezintă un marker pentru celulele T activate, identificat și ca fiind un indicator valoros în predicția evoluției tumorilor solide. Studiul efectuat de Hu și Wang (2017) a demonstrat că o densitate crescută a limfocitelor T CD45RO⁺ la nivel tumoral se corelează cu o rată mai bună de supraviețuire, sugerând că prezența acestor celule reflectă existența unui răspuns imun antitumoral activ și eficient. Această observație s-a dovedit a fi relevantă în cazul unui șir de tumori, inclusiv în neoplaziile cu localizare primară hepatică, colo-rectală, esofagiană, renală și mamară, în special în cele hormon-pozitive [108]. Studiile suplimentare realizate de Peng *et al.* (2010) și Schnellhardt *et al.* (2020) au confirmat importanța celulelor CD45RO pozitive, subliniind că acest marker joacă un rol crucial în evaluarea răspunsului imun și a evoluției tumorilor, fiindcă reflectă un răspuns imun activ la dezvoltarea tumorii și presupune un tratament mai efektiv [109,110].

Figenschau *et al.* (2015) au explorat legătura dintre infiltratele limfocitare și gradul tumorii, constatând că prezența acestor structuri este asociată cu celulele T CD45RO⁺. Această relație sugerează că, în contextul unui răspuns imun activ, caracterizat printr-o infiltrație abundentă cu limfocite T activate, pot fi identificate tumori cu un grad histologic înalt. [111]. Astfel putem concluziona, că CD45RO reprezintă un marker valoros pentru evaluarea răspunsului imun în tumorile solide și pentru predicția prognosticului. Mai mult, extinderea abordărilor conceptuale privind relevanța scorului imun și a expresiei CD45RO în multiple entități neoplazice contribuie la o înțelegere mai profundă a interacțiunilor dintre sistemul imun și a microambianței tumorale, precum și a impactului acestora asupra progresiei și prognosticului bolii.

Fernandes *et al.* (2021) recent au introdus conceptul de "*immunoscore*", care utilizează cuantificarea celulelor CD45RA⁺, CD45RO⁺, CCL20⁺ și CCR6⁺, pentru a prezice evoluția cancerului cervical indus de HPV. Această abordare inovatoare sugerează că analiza detaliată a profilului imun al tumorii poate oferi informații valoroase privind agresivitatea cancerului și răspunsul la tratament, facilitând astfel elaborarea unor strategii terapeutice personalizate [112]. În cancerul mamar, prezența infiltratului tumoral stromal din celule CD45RO⁺ a fost corelată cu riscul crescut de progresie a bolii. Studiul realizat de Smolkova *et al.* (2020) a pus în evidență un număr crescut de celule T activate în tumorile agresive, ceea ce în opinia autorilor sugerează și o posibilă rezistență la tratamentele convenționale [113]. Date contradictorii au prezentat Landskron *et al.* (2017) care au examinat rolul acestui marker în contextul cancerului ovarian concludând

că expresia acestuia este asociată cu o formă mai puțin agresivă a bolii [114]. Într-un studiu recent efectuat de Kwiecień *et al.* (2022), a fost observată o creștere numerică a celulelor marcate cu CD45RO în metastazele pulmonare [115]. Zeitoun *et al.* (2019) au demonstrat că densitatea celulelor CD45⁺ din microambianța tumorală este asociată cu un răspuns imun favorabil și o supraviețuire îmbunătățită la pacienții cu cancer colorectal. Aceste rezultate evidențiază rolul important al CD45 în orchestrarea răspunsului imun antitumoral [30].

Studiile recente au evidențiat rolul complex și uneori contradictoriu al celulelor CD45⁺ în microambianța tumorală, subliniind că acestea pot influența atât răspunsul imun, cât și metabolismul tumoral. Hardy *et al.* (2017) susțin, că interacțiunile dintre fibroblastele asociate tumorii și celulele tumorale pot induce adaptări metabolice ale tumorii, permițându-i să supraviețuiască și să prolifereze [116]. Acest mecanism indică, că celulele CD45⁺ pot avea un impact indirect asupra creșterii tumorale prin modularea interacțiunilor dintre diferitele componente stromale. Ye *et al.* (2022) au evidențiat că CD45⁺ joacă un rol critic în microambianța tumorală, fiind implicat în reglarea atât a răspunsurilor pro-inflamatorii, cât și a celor anti-inflamatorii [117]. Julia *et al.* (2013) au identificat un subset de celule CD45⁺ care co-exprimă și proteine de activare a fibroblastelor, sugerând că acestea sunt macrofage specializate în remodelarea stromei tumorale, un proces care contribuie direct la progresia cancerului [118].

Datele disponibile evidențiază rolul complex al celulelor CD45⁺ în microambianța tumorală. Dötzer *et al.* (2019) au demonstrat că prezența sporită a celulelor CD45⁺ în stroma intratumorală este asociată cu un răspuns imun favorabil și cu o supraviețuire mai bună la pacienții cu cancer colorectal. Aceste afirmații sugerează, că prezența celulelor CD45⁺ poate servi drept marker relevant și în alte tipuri de tumori, inclusiv mamar, având potențialul de a ghida stratificarea prognostică și selectarea strategiilor terapeutice personalizate [119]. Astfel, datele disponibile în prezent, deși parțial contradictorii, sugerează că limfocitele T pot fi activate în contextul expansiunii tumorale; cu toate acestea, impactul final al acestei activări rămâne incert, fiind dependent de originea și tipul neoplasmului. Totuși, aceste studii evidențiază rolul important al CD45RO în evaluarea severității evoluției carcinogenezei și prognosticului.

CD56, reprezintă un marker ce pune în evidență killerii naturali (NK), celule din sistemul imun inerent. Aceste limfocite au capacitatea să identifice celulele alterate, exercitând un rol crucial în stoparea creșterii tumorale. Astfel, s-a constatat că prezența celulelor NK în tumorile renale este sporadică, și caracterizată printr-o expresie variabilă, mai accentuată la nivelul metastazelor [108]. Un studiu realizat de Hong *et al.* (2016) a demonstrat experimental că celulele NK pot inhiba metastazele pulmonare [120]. Totodată, Lee *et al.* (2021) au constatat că diminuarea activității celulelor NK este asociată cu un risc crescut de recurență în cancerul hepatic [121]. La moment există un șir de dovezi referitor la potențialul celulelor NK în tratamentul tumorilor solide,

sugerând că acestea pot prezenta o nouă țintă în terapia neoplasmelor [122,123]. În particular, aceste terapii celulare au reușit în tratamentul tumorilor ginecologice [124]. Totuși există și un șir de evidențe ce pun la îndoială eficacitatea terapiilor bazate pe utilizarea celulelor NK în diverse tipuri de tumori, ceea ce indică la necesitatea continuării cercetărilor în domeniu [125–127].

Rolul celulelor NK în carcinomul mamar încă nu a fost elucidat. Conform lui Yang *et al.* (2019) celulele CD56⁺ pot fi cruciale în determinarea prognosticului pacientelor și a răspunsului la terapie, mai ales la supra-exprimarea HER2 [128]. Toate aceste date sugerează ideea că înțelegerea modului în care celulele NK interacționează cu diferite tipuri de tumori poate contribui la optimizarea abordărilor imunoterapeutice și la îmbunătățirea rezultatelor clinice pentru pacienții cu cancer.

CD68 este considerat un marker specific macrofagelor, celule frecvent descrise în patologia neoplazică [129]. Aceste celule constituie o componentă frecventă a infiltratului imun din majoritatea neoplaziilor, iar diversitatea funcțională a acestor celule, fluctuând între fenotipurile M1 și M2, determină variabilitatea răspunsurilor în contextul tumoral [129–132]. Macrofagele pot adopta fenotipuri distincte, manifestând, în funcție de microambianță, atât activități pro-tumorale, cât și antitumorale [133,134]. Carcinomul mamar, în dependență de subtipul histologic și molecular, este variabil în ceea ce privește infiltratul macrofagal [135–137]. Mai mult, densitatea macrofagelor CD68⁺ este corelată cu stadiul clinic, gradul histologic și răspunsul la terapie [135].

Dincolo de rolul său drept marker al macrofagelor, CD68 este considerat și un indicator al statusului imun în neoplazie. Există opinii că aceste celule pot influența agresivitatea tumorii, răspândirea acesteia și susceptibilitatea la terapie [138,139]. Modularea activității macrofagelor, în special a celor pozitive pentru CD68, este în prezent explorată ca o potențială strategie terapeutică în neoplazii, inclusiv în carcinomul mamar [118,129,132,140]

Interacțiunea dintre diabetul zaharat, macrofage și cancerul mamar este una complexă și neelucidată [141,142]. Modificările metabolice induse de diabet pot influența funcționalitatea macrofagelor în microambianța tumorală, ceea ce poate avea implicații directe asupra evoluției neoplaziei [35,91]. După Hu *et al.* (2019) diabetul zaharat poate modula activitatea macrofagelor, influențând astfel agresivitatea tumorii și răspunsul la terapie [143].

1.2. Profilul molecular al carcinomului mamar

Receptorii pentru estrogeni (ER) mediază efectele biologice ale estrogenilor asupra celulelor. La moment sunt descrise două categorii de receptori estrogenici, în funcție de localizarea lor celular, receptori nucleari și receptori asociați membranei. Ultimii, ER- α și ER- β , sunt frecvent descriși cu lux de amănunt în diverse patologii.

Expresia ER nu este limitată doar la țesutul mamar, fiind frecvent raportată și în patologii hepatice și endometriale, unde s-a demonstrat că joacă un rol important în reglarea proceselor

metabolice și a funcțiilor reproductive [144]. Drept exemplu, Cavener *et al.* (2010) au menționat că semnalizarea prin receptorii ER influențează metabolismul lipidic și sensibilitatea la insulină, procese cruciale în patologia DZ [145]. Astfel putem presupune, că implicarea ER în căile metabolice poate fi deosebit de relevantă pentru înțelegerea modului în care DZT2 poate influența riscul și progresia cancerului mamar.

În țesutul glandei mamare neafectate, ER este exprimat în mod variabil, ceea ce indică că nu toate celulele sunt sensibile la estrogen în același mod, deși majoritatea (60-70%) tumorilor mamare sunt ER⁺ [146]. Expresia acestui marker este esențială pentru menținerea homeostaziei țesutului mamar, iar înțelegerea variațiilor de intensitate și exprimare ar permite prevenirea proliferării necontrolate a celulelor [147]. Datele din literatură sugerează că expresia ER în glanda mamară este limitată la anumite subpopulații de celule epiteliale, iar nivelurile scăzute de expresie a ER sunt corelate cu un risc redus de dezvoltare a cancerului [148]. Celulele epiteliale din glanda mamară sunt specializate și pot fi împărțite în celule bazale și apicale. Ultimele exprimă ER într-o măsură variabilă și sunt cele mai susceptibile la influența hormonală, deoarece receptorii de estrogen reglează multiple procese legate de creștere și proliferare celulară. Expresia restrictivă a receptorilor estrogenici doar la nivelul unor epiteliocite apicale poate contribui la explicarea predispoziției diferențiate a anumitor regiuni glandulare pentru transformarea malignă. Astfel, zonele în care există o expresie diminuată a ER par a fi mai protejate de stimularea excesivă de către estrogen și, implicit, de riscul crescut de dezvoltare a tumorilor.

În dependență de expresia ER, putem clasifica tumorile mamare în ER⁺ și ER negative, fiecare categorie prezentând caracteristici morfologice și clinice diferite. Tumorile ER⁺, exprimă receptorii în cauză și pot răspunde la terapiile hormonale. Totuși, în cazul carcinomului mamar invaziv, se observă adesea o scădere sau chiar o pierdere a expresiei ER, ceea ce sugerează o evoluție către un fenotip mai agresiv al tumorii, caracterizat printr-o capacitate mai mare de a se dezvolta independent de semnalizarea hormonală. Conform studiului lui Erkinüresin *et al.* (2021), expresia receptorului de estrogen în epiteliul mamar neafectat, asociat cu carcinomul ductal invaziv este mai frecvent redusă sau absentă în tumori agresive. Aceasta subliniază faptul că, pe măsură ce cancerul de sân progresează de la stadii inițiale către forme mai avansate și mai invazive, există o tendință de pierdere a sensibilității la estrogen. Acest lucru face ca tumorile ER-e să fie mai dificil de tratat, deoarece nu răspund la remediile care vizează blocarea acțiunii hormonilor estrogeni. [149]. Această pierdere a expresiei ER, după Björner *et al.* (2017) este corelată cu un prognostic mai rezervat și o agresivitate tumorală sporită, subliniind importanța cuantificării ER în managementul cancerului mamar [150].

Un alt aspect important al expresiei ER este influența sa asupra a microambianței tumorale și în special a componentei imune. Jaini *et al.* (2017) sugerează că semnalizarea modulată de ER

poate modula infiltrarea și activitatea celulelor imune [151]. Conform datelor raportate de Katsuta *et al.*(2019), tumorile ER⁺ sunt adesea asociate cu un profil imun favorabil, caracterizat printr-o infiltrare limfocitară crescută și o evoluție biologică mai puțin agresivă [152]. Pe de altă parte, tumorile ER-e, în opinia lui O'Brien *et al.*(2011) tind să dezvolte un mediu cu potențial inhibitor asupra imunității, ceea ce se poate reflecta prin expansiunea acerbă a tumorii [153]. Eterogenitatea a microambianței imune subliniază importanța determinării expresiei ER nu doar în dorința de a caracteriza tumoarea, ci și în contextul înțelegerii dezvoltării rezistenței la terapie. Pe de altă parte, Monteiro *et al.* (2014) au specificat că hormonul în cauză reduce inflamația sistemică, ceea ce poate fi crucial în contextul cancerului, deoarece inflamația cronică este un factor de risc binecunoscut pentru dezvoltarea tumorilor [154]. Această interacțiune dintre estrogeni și sistemul imun după Rose *et al.* (2012) este deosebit de importantă pentru pacienții cu DZT2, care adesea prezintă un profil inflamator accentuat, ceea ce agravează simțitor riscurile asociate carcinomului mamar [155].

Conform datelor prezentate de May *et al.* (2014) rezultă, că estrogenul influențează metabolismul glucozei prin interacțiunea cu receptorii săi, efect soldat cu o îmbunătățire a sensibilității la insulină și reducerea riscurilor de a dezvolta patologii asociate cu DZT2 [156]. Această influență s-a dovedit a fi deosebit de importantă în cazul femeilor în postmenopauză, la care majoritar se determină o diminuare a nivelurilor de estrogen și prin urmare, ceea ce afectează metabolismul glucozei, astfel sporind simțitor riscul de a dezvolta DZT2 și neoplasm mamar [157].

În sumar putem constata, că interacțiunea dintre ER, factorii metabolici și imuni, poate fi esențială pentru înțelegerea influenței DZT2 asupra carcinomului mamar. Astfel expresia ER în patologia mamară devine un factor important care influențează atât biologia tumorii, cât și răspunsul la tratament.

Conform datelor lui Werner *et al.*(2021), un alt hormon cu influență majoră asupra glandelor și tumorilor mamare, este progesteronul, care își exercită funcția asupra celulelor țintă prin receptorii omonimi [158]. Aceștia aparțin clasei receptorilor nucleari și sunt implicați în reglarea unei game largi de procese biologice fundamentale, inclusiv cele asociate diferențierii tisulare și dezvoltării organogene. În prezent, sunt descrise două izoforme principale ale acestui receptor: izoforma PR-A, considerată a avea un rol predominant în controlul expresiei genelor implicate în reglarea proliferării celulare, și izoforma PR-B, care este corelată în principal cu mecanismele de stimulare a creșterii celulare [159].

Conform datelor lui Kim *et al.* (2020), PR este esențial pentru menținerea structurii și funcției glandelor mamare [160]. Totuși, Need *et al.*(2015) consideră că ER și PR prezintă interrelații funcționale strânse: expresia PR în țesutul glandular s-a dovedit a fi dependentă de

nivelurile serice ale estrogenilor [161], iar o interacțiune complexă dintre acești hormoni s-a adevărat a fi crucială în dezvoltarea glandei mamare, inclusiv a componentelor epiteliale și stromale.

Totuși, funcția PR nu se limitează exclusiv la parenchimul mamar, acesta fiind frecvent exprimat la nivelul diverselor organe, cu predilecție al celor ce aparțin sistemului reproductiv. Conform datelor prezentate de Margină *et al.* (2021), la nivel uterin PR exercită un rol crucial în menținerea sarcinii și precum în reglarea ciclului menstrual [162]. După Jaini *et al.* (2017), în ficat PR influențează metabolismul lipidic și glucidic, ambele afectate în cazul DZT2 [151]. Mai mult, conform lui Li *et al.* (2022), PR joacă un rol subtil și foarte important în neuroprotecție [163]. Anterior, Li *et al.* (2020) au evidențiat faptul că activarea receptorului progesteronic (PR) contribuie nu doar la proliferarea cardiomiocitelor, ci și la procesele de regenerare ale acestora, un efect similar fiind descris și în contextul mecanismelor de protecție neuronală [164].

Un alt aspect interesant, ce ține de PR, este influența acestuia asupra răspunsului imun, care devine din ce în ce mai relevant în contextul carcinomului mamar, în special în cazul tumorilor PR⁺. Ples *et al.* (2018) au sugerat, că PR poate modula activitatea celulelor imune, inclusiv a limfocitelor T și a celulelor NK în microambianța tumorală [165]. În opinia lui Luo *et al.* (2023), tumorile PR⁺ par să aibă un profil imun mai favorabil, cu o infiltrare sporită a celulelor imune, ceea ce poate aparent contribui și la un răspuns terapeutic mai bun [166]. Conform datelor lui Godbole *et al.* (2018), receptorul pentru PR acționează sinergic cu ER, iar activarea PR poate modula efectele estrogenului asupra celulelor tumorale [167,168], prin inhibarea invaziei și migrării celulare [169]. Această interacțiune complexă dintre evidențiază în mod constant importanța studierii expresiei și funcției receptorilor hormonalți în contextul patologiei tumorale.

Kim *et al.* (2015) și Godbole *et al.* (2018) consideră că, PR are un rol important și în patogeneză DZT2. Aceste afirmații se bazează pe observația conform căreia, pacienții cu diabet prezintă adesea un profil hormonal alterat, iar aceste modificări pot influența comportamentul carcinomului mamar. În baza datelor existente, rezultă că pacienții cu diabet au un risc sporit de a dezvolta carcinom mamar. Mai mult, expresia PR din tumorile mamare poate influența semnificativ răspunsul la terapiile hormonale și poate constitui o țintă relevantă în dezvoltarea strategiilor terapeutice anti-PR. [170,171]. Aceste considerente sugerează că evaluarea expresiei PR ar putea reprezenta un instrument util în stratificarea riscurilor și în personalizarea strategiilor terapeutice pentru pacienții cu DZT2 și carcinom mamar [168]. Aceste ipoteze sunt raportate și de Godbole *et al.* (2017), care au demonstrat că progesteronul poate inhiba migrarea și invazia celulelor canceroase, chiar și în absența receptorilor PR, ceea ce sugerează existența unor mecanisme alternative de semnalizare mediate de progesteron, fapt ce complică posibilitățile terapeutice antihormonale [171].

Ki67, reprezintă unul dintre cei mai frecvent utilizați markeri al proliferării celulare, care oferă informații valoroase privind gradul de agresivitate tumorală și permite estimarea răspunsului la tratamentele oncologice. Acest marker are sediu nuclear și este exprimat de celulele aflate în ciclul celular, iar nivelul de expresie al acestuia este utilizat pentru evaluarea activității proliferative a tumorilor. Conform unui șir impunător de studii, a fost demonstrat că un indice Ki67 sporit este asociat cu un prognostic mai rezervat în diverse subtipuri de carcinom mamar, cum ar fi în Luminal B, HER2⁺ și Triplu-negativ [172–174]. Khan *et al.* (2018) au determinat că pacienții cu un indice crescut al Ki67 în timpul sau după tratamentul antitumoral au un risc sporit de recidivă [175]. Conform datelor lui Pathmanathan *et al.* (2014), rezultă că scorul Ki67 \geq 14% permite diferențierea tumorilor de tip Luminal A de cele încadrate în subtipul Luminal B/Ki67, având implicații decisive în conduita terapeutică [174]. Mai mult, Ki67 de obicei este analizat împreună cu alți markeri cu valoare prognostică, cum ar fi ER, PR și HER2, ceea ce permite o stratificare mai precisă a pacienților [176]. Conform datelor prezentate de Hashmi *et al.* (2019), un nivel sporit al expresiei Ki67 este asociat cu o expresie redusă a receptorilor hormonal, ceea ce sugerează un comportament mai agresiv al tumorii [177]. Spre exemplu, în carcinomul mamar Triplu-negativ, Ki67 este adesea utilizat drept un indicator al agresivității tumorale și al riscului de recidivă [178,179]. Pe de altă parte, Ki67 nu are exclusiv valoare prognostică, dar poate influența și deciziile terapeutice. Drept exemplu, pacienții cu carcinom mamar HER2⁺ și un indice Ki67 diminuat pot beneficia de tratamente hormonale, cum ar fi tamoxifenul, în loc de chimioterapie [180,181].

Un alt aspect important care trebuie luat în considerare este heterogenitatea expresiei Ki67 în cazul tumorilor mamare. Tokuda *et al.* (2017) au demonstrat, existența unor variații semnificative în expresia Ki67 din diverse regiuni ale aceleași tumori, ceea ce poate complica evaluarea prognostică și interpretarea rezultatelor imunohistochimice [182].

Caracterizând în sumar rolul lui Ki67, putem spune că acesta reprezintă un marker esențial în evaluarea activității proliferative a tumorilor, inclusiv mamare, oferind informații valoroase pentru prognostic și răspunsul la tratament. Nivelul sporit al Ki67 este asociat cu un prognostic mai rezervat și un risc mai mare de recidivă. Heterogenitatea expresiei Ki67 în cadrul tumorilor complică evaluarea acestora, subliniind necesitatea unor metode standardizate de măsurare. Integrarea Ki67 în protocoalele clinice poate contribui la personalizarea și îmbunătățirea tratamentului. Mult mai incertă însă rămâne rolul acestui marker în tumorile asociate cu diabetul.

Cercetările recente au evidențiat asocieri relevante între prezența diabetului zaharat și nivelurile de expresie ale Ki67 în cancerul mamar, sugerând că dereglările metabolice pot avea un impact direct asupra comportamentului biologic al tumorilor. Astfel, studiul realizat de Ali *et al.* (2020) a evidențiat că pacienții cu DZT2 care dezvoltă carcinom mamar prezintă un Ki67 mai

ridicat comparativ cu pacienții fără diabet, ceea ce indică o rată mai mare de proliferare și este considerat un semn distinctiv al unui comportament tumoral agresiv și, prin urmare, al unui prognostic mai nefavorabil [183]. Pe lângă aceste constatări, alte studii, precum cel realizat de Li *et al.* (2018), au evidențiat faptul că diabetul nu influențează doar riscul de apariție a cancerului mamar, ci și multiple caracteristici biologice și clinice ale tumorilor. Astfel au fost descrise modificările metabolice și inflamatorii asociate diabetului zaharat, precum hiperinsulinemia, rezistența la insulină și inflamația cronică sistemică, care individual sau în ansamblu pot favoriza proliferarea celulară și progresia malignă [184].

În mod similar, alte studii au confirmat această asocieră nefastă, subliniind faptul că DZT2 poate influența nu doar riscul de a apariție a cancerului mamar, ci și parametri precum stadiul tumorii la momentul diagnosticării și gradul de agresivitate al acestuia. Aceste date susțin ideea că diabetul nu este doar o condiție metabolică asociată cu cancerul, ci și un factor care poate modifica direct comportamentul tumorii [181,185]. Relația complexă între diabet și expresia Ki67 este susținută și de dovezi care implică utilizarea terapiei antidiabetice în modularea răspunsului tumoral. De exemplu, metformin, un medicament antidiabetic utilizat pe scară largă, a demonstrat potențial antitumoral în studiile preclinice și clinice. Min *et al.* (2020) au demonstrat că metforminul poate reduce nivelurile de expresie a Ki67, sugerând un efect inhibitor asupra proliferării celulare prin mecanisme ce implică diminuarea hiperinsulinemiei [186].

De asemenea, prezența diabetului poate complica managementul clinic al pacientelor cu carcinom mamar. Luo *et al.* (2014) au raportat că femeile cu diabet zaharat prezintă rate mai scăzute de participare la programele de screening pentru carcinom mamar, ceea ce duce adesea la diagnosticarea bolii în stadii mai avansate. Mai mult, tumorile diagnosticate tardiv pot prezenta niveluri mai ridicate de Ki67, ceea ce sugerează un comportament tumoral agresiv și limitează opțiunile terapeutice [187].

Markerul HER2/neu, cunoscut și sub denumirea de ErbB2, reprezintă un receptor transmembranar, cu o greutate moleculară de aproximativ 185 kDa, care nu are un ligand natural identificat, dar care poate forma dimeri cu alți receptori din familia EGFR [188].

În condiții fiziologice, HER2/neu (în continuare HER2) prezintă o expresie scăzută în la nivelul mai multor organe, inclusiv în țesutul glandular mamar [189]. Funcția acestuia constă în activarea unor căi de semnalizare implicate în reglarea creșterii și supraviețuirii celulare [190]. Conform datelor lui Koman *et al.* (2012) receptorul HER2 este implicat în procesele de dezvoltare a țesutului mamar și în menținerea homeostaziei acestuia [191].

În aproximativ 20% din cazurile de carcinom mamar, HER2 prezintă amplificare, fenomen asociat cu creșterea agresivității tumorale [192,193]. Supra-expimarea HER2 este asociată cu stimularea proliferării celulare și creșterea invazivității tumorale, ceea ce corelează cu un

prognostic mai rezervat [194,195]. Rezultate contradictorii au fost raportate de Wuellner *et al.* (2015) care au demonstrat, că celulele tumorale cu o intensitate sporită a expresiei HER2 sunt mai susceptibile la atacul sistemului imunitar prin activarea celulelor T, ceea ce subliniază importanța evaluării expresiei HER2 în contextul terapiei imune [195]

Expresia HER2 nu este uniformă în toate tumorile, iar heterogenitatea prezentării HER2 poate influența răspunsul la tratamentele existente [194,196,197]. Această variabilitate a fost evidențiată și de Yan *et al.* (2011), care au demonstrat, că blocarea interacțiunii dintre HER2 și proteina Hsp90 poate induce degradarea HER2, sugerând posibilitatea dezvoltării unor strategii terapeutice țintite în cazul tumorilor HER2⁺ [198]. De asemenea, studiile recente au pus în evidență faptul, că HER2 poate varia în funcție de subtipul molecular al cancerului mamar, ceea ce complică evaluarea prognostică și deciziile terapeutice [199,200]. Un alt aspect important al expresiei HER2 este prezentat de implicarea acesteia în dezvoltarea rezistenței la terapiile existente. Onsum *et al.* (2013) au documentat faptul că pacienții cu tumori care exprimă forme mutate sau truncate ale HER2 pot dezvolta o rezistență semnificativă la tratament, aspect care subliniază necesitatea evaluării nu doar a nivelului de expresie, ci și a formei structurale a receptorului implicat [194]. Mai mult, evaluarea expresiei HER2 poate fi influențată și de metodele de testare utilizate. Drept exemplu, metoda imunohistochimică deși relativ bine standardizată, prezintă variații semnificative de aplicare și interpretare a rezultatelor în funcție de laboratorul în care este utilizată [201].

Importanța HER2 a fost evidențiată nu doar în carcinomul mamar ci și în alte tipuri de neoplazii, precum cancerul gastric și cel vezical, având implicații statistice semnificative asupra prognosticului și asupra strategiilor terapeutice [202]. Pe lângă efectele directe exercitate asupra celulelor tumorale, HER2 s-a dovedit a avea și funcții suplimentare. Park *et al.* (2010) au demonstrat că HER2 poate modula atât răspunsul imun înăscut, cât și pe cel adaptiv. Autorii au demonstrat, că tratamentele cu anticorpi anti-HER2 depind de activitatea sistemului imun, inclusiv de celulele T citotoxice și de un șir de anticorpi specifici [203,204]. Fuenmayor *et al.* (2010) au concluzionat după experimente *in vitro*, că anticorpii anti-HER2 fuzionați cu produsul de scindare al complementului (C5a) își sporesc efectele citotoxice, facilitând totodată și activarea celulelor imune rezultatul fiind moartea celulelor tumorale [205]. Un alt aspect important este modul în care răspunsul imun poate fi influențat de caracteristicile tumorii. De exemplu, Datta *et al.* (2015) au observat, că răspunsul celulelor Th1 (T-helper tip 1) care este adesea compromis în tumorile HER2⁺, poate fi restabilit prin vaccinarea cu celule dendritice „*pulsed*” („activate antigenic,”) cu HER2 [206]. Astfel, imunoterapia bazată pe vaccinuri care vizează HER2 devine un domeniu atractiv pentru cercetare. Vaccinurile bazate pe peptide derivate din HER2 au demonstrat capacitatea de a induce răspunsuri imune specifice, atât de tip umorale, cât și celular,

împotriva tumorilor HER2⁺. Wang *et al.* (2013) au demonstrat, că vaccinarea cu peptide derivate din HER2 poate stimula răspunsul celulelor T citotoxice (CTL), considerate o verigă esențială în mecanismele de recunoaștere și distrugere a celulelor tumorale [207].

Un alt aspect important al interacțiunii dintre HER2 și răspunsul imun reprezintă influența microambianței tumoral asupra eficienței terapiilor strategiilor terapeutice. Conform rezultatelor prezentate de Mortenson și Fu (2013) rezultă, că celulele tumorale dezvoltă un micromediu cu caracteristici imunosupresoare, capabile de a limita activitatea celulelor T și a altor componente ale sistemului imun [208]. În opinia lui Nguyen-Hoai *et al.* (2012), această imunosupresie poate fi depășită prin utilizarea adjuvanților care stimulează răspunsurile imune, prin activarea celulele Th1 [209].

Studiile recente au evidențiat potențialul anticorpilor bispecifici care vizează simultan HER2 și CD3 în eficientizarea strategiilor terapeutice prin recrutarea celulelor T și stimularea răspunsului imun împotriva celulelor tumorale HER2⁺. Astfel, anticorpul anti-HER2/anti-CD3, denumit BiHC, a demonstrat o activitate citotoxică semnificativă, activând și orientând celulele T către celulele tumorale. Acest mecanism de acțiune evidențiază existența relațiilor dintre HER2 și CD3, capabile de a modula infiltrarea celulelor T în microambianța tumorală și distrugerea celulelor canceroase [210–213]. Mecanismul presupune activarea celulelor T prin intermediul CD3 ceea ce induce o secreție sporită de citokine proinflamatorii, care la rândul său pot modula expresia HER2 de către celulele tumorale. Această modificare a expresiei HER2 poate crea un circuit de *feedback* imunologic, influențând atât comportamentul celulelor tumorale, cât și recrutarea suplimentară a celulelor T în microambianța tumorală [213,214]. Mai mult, prezența celulelor T CD3⁺ în tumoare este documentată ca fiind un factor prognostic pozitiv în cancerul de sân HER2⁺. Studiile efectuate de Okabe *et al.* (2017) și Hou *et al.* (2018) au demonstrat, că densitatea sporită a celulelor T, în special a celor CD8⁺, este corelată cu o rată de supraviețuire mai bună, sugerând că activarea acestora se produce prin intermediul receptorului pan-T (CD3). Această corelație susține relevanța evaluării simultane a expresiei HER2 și CD3 în scopul evaluării riscurilor, identificării pacienților eligibili pentru imunoterapie și personalizării tratamentului [215,216].

Conform opiniei exprimate de Kaplan *et al.* (2012), DZT2 poate fi considerat drept factor de risc pentru dezvoltarea și progresia cancerului, inclusiv a carcinomului mamar [217]. Anterior, Kaplan *et al.* (2011) au afirmat, că femeile cu carcinom mamar în stadiu incipient și diabet prezintă o supraviețuire mai redusă comparativ cu pacientele cu niveluri glicemice normale, sugerând asocieri nefavorabile dintre aceste două patologii. Autorii consideră, că hiperinsulinemia și rezistența la insulină, caracteristici comune ale DZT2, pot stimula proliferarea celulară și astfel pot contribui la progresia tumorilor HER2⁺ [217].

Datele prezentate de Wang *et al.* (2016) sugerează că DZT2 poate influența expresia HER2 și precum și răspunsul la tratamentele anti-HER2. De exemplu, activarea căii PI3K/AKT, frecvent implicată în mecanismele de rezistență la terapiile antitumorale, poate fi modulată de statutul metabolic al pacientului [218]. Mai mult, conform lui Xie *et al.* (2013), rezistența la insulină, caracteristică DZT2, poate influența semnalizarea prin HER2, contribuind astfel la progresia cancerului [219]. Sow *et al.* (2020) sugerează, că inflamația cronică asociată cu DZT2 poate influența expresia receptorului HER2. Inflamația asociată, în opinia autorilor poate activa căi de semnalizare care promovează proliferarea și supraviețuirea celulară, facilitând astfel dezvoltarea tumorilor HER2⁺ [204]. Mai mult, în opinia lui Choi *et al.* (2017), procesele metabolice din DZT2 pot influența negativ răspunsul imun prin diverse mecanisme de evaziune, ceea ce poate duce la o eficiență redusă a tratamentelor imune [220]. Aceste afirmații sunt susținute și de datele prezentate de Wang *et al.* (2013), unde pacienții cu DZT2 care au dezvoltat un răspuns imun robust la HER2 au putut beneficia de terapii adjuvante mai eficiente, cum ar fi inhibitorii punctelor de control imun [207].

Astfel, interacțiunea complexă dintre receptorul HER2 și factorii imunologici influențează atât dezvoltarea tumorală, cât și răspunsul la tratament, în special în cazul carcinoamelor HER2⁺. Deși teoretic stimularea HER2 ar putea activa un răspuns imun antitumoral, neoplasmul dezvoltă adesea mecanisme de evaziune care limitează eficacitatea strategiilor terapeutice. Totuși, cercetările actuale asupra utilizării anticorpilor monoclonali, a combinațiilor de terapii și a vaccinurilor terapeutice oferă perspective promițătoare pentru pacient. În plus, o mai bună înțelegere a variabilității expresiei HER2 și a interacțiunii sale cu factori metabolici, din diverse patologii, inclusiv DZT2 și inflamația cronică poate facilita dezvoltarea unor strategii terapeutice personalizate, capabile să contracareze rezistența la tratament și să îmbunătățească prognosticul pacienților, în special în subtipurile HER2 pozitive.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Metodologia generală a cercetării

Progresele realizate în ultimii ani în domeniul tratamentului cancerului de glandă mamară (CGM) au contribuit semnificativ la îmbunătățirea metodelor de diagnostic și a strategiilor terapeutice, având drept consecință reducerea mortalității asociate acestei neoplazii. Totuși, cancerul mamar rămâne una dintre cele mai frecvente și letale afecțiuni maligne. O problemă cheie în înțelegerea și combaterea acestei boli o reprezintă variația sa celulară și moleculară, mai ales în contextul comorbidităților letale, precum DZT2. Scopul cercetării în cauză a constat în analiza detaliată a manifestărilor imunității celulare locale în carcinomul mamar, punând un accent deosebit pe relația dintre fenotipul molecular al tumorii și microambianța imună locală la pacienții cu DZT2.

Pentru realizarea scopului și obiectivelor, a fost elaborat planul metodologic, care a inclus:

- ✓ argumentarea problemei;
- ✓ elaborarea și aprobarea protocolului de studiu;
- ✓ selectarea și colectarea materialului de studiu;
- ✓ realizarea procedurilor histologice și imunohistochimice;
- ✓ colectarea, analiza și sinteza rezultatelor obținute;
- ✓ elaborarea recomandărilor și aplicarea lor în practică;
- ✓ formularea concluziilor.

Lucrarea a fost realizată în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie și în Laboratorul de morfologie din cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Chișinău, Republica Moldova. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică al Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (avizul favorabil nr.7 din 12.11.2021).

2.2. Materialul de studiu

În calitate de obiect de cercetare au servit piesele histopatologice de glandă mamară prelevate postoperatoriu mastectomie totală în cadrul IMSP Institutul Oncologic din RM pe parcursul anilor 2018-2020. Materialul prelevat, carcinom mamar invaziv de tip ductal NST (*No special type* sau NOS), de la paciente care nu au fost supuse chimioterapiei sau radioterapiei preoperatorii a fost divizat în 2 loturi: lotul I a inclus tumori colectate de la 43 paciente cu tumori mamare fără DZT2 ; lotul II – 29 tumori mamare de la paciente cu DZT2. În calitate de control au servit mostre de glandă mamară (bilateral), prelevate în incinta Centrului de Medicină Legală din RM (2021-2022), de la 30 femei, decedate accidental, materialul fiind prelevat în primele 24 ore după deces.

Cazurile au fost selectate în baza următoarelor criterii de includere și excludere:.

A. Criterii de includere:

- diagnosticul confirmat de cancer de tip ductal NST;
- cu sau fără diagnosticul confirmat de DZT2, în dependență de grup;
- vârsta ≥ 50 ani;

În cazul lotului de control – femei decedate accidental.

B. Criterii de excludere, în cazul grupelor cu tumori:

- pacientele diagnosticate cu diabet zaharat tip 1;
- boli autoimune;
- vârsta până la 50 ani.

Nivelul seric al glicemiei a fost evaluat a jeun, pre-operator (la internare) în sângele venos, prin metoda colorimetrică (analizatorul biochimic Selectra Pro XL, NL) la toate pacientele cu tumori.

2.3 Metode histologice și imunohistochimice

Toate secțiunile au fost colorate inițial prin metoda clasică, cu hematoxină-eozină utilizând hematoxină Harris (HEMH-OT, BioGnost, HR) și eozină (EOYK-OT, BioGnost, HR). Caracteristica histopatologică detaliată a fost realizată după gradul de diferențiere (WHO, ediția 5) și TMN (AJCC, ediția 8) [28,221] (Tabelul 1).

Tabelul 1. Criteriile de evaluare a gradului histologic în carcinomul mamar

Caracteristică		
Gradul de afectare	Cantitativ	Scor
Formarea tubulilor (Ft)		
Majoritatea tumorii	(> 75%)	1
Grad moderat	(10-75%)	2
Puțin sau deloc	(< 10%)	3
Pleomorfismul nuclear (At)		
Celule mici, regulate și uniforme	-	1
Creștere moderată în mărime și variabilitate	-	2
Variație pronunțată	-	3
Figuri mitotice (Mt)		
Numărul de mitoze (la obiectiv N-Plan 40x/0,65 WD-0,44) în 10 HPF	>5 mitoze	1
	6-10 mitoze	2
	< 11	3

Pentru determinarea gradului global al neoplasmului, am sumat scorurile atribuite pentru fiecare criteriu evaluat, rezultând un punctaj total (3 – 9). Gradul tumorii a fost ulterior stabilit conform următorului scor:

Gradul I (bine diferențiat): 3-5 puncte;

Gradul II (moderat diferențiat): 6-7 puncte;

Gradul III (slab diferențiat): 8-9 puncte.

Cazurile au fost examinate de 2 medici morfopatologi independent, iar secțiunile potrivite au fost alese pentru IHC.

În corespundere cu numărul de markeri utilizați în studiu, au fost preparate 11 lame silanate pentru fiecare caz, secțiunile fiind realizate din același bloc, ca și pentru HE.

Tabelul 2. Caracteristica anticorpilor, sistemelor de demascare și vizualizare utilizate în studiu

Anticorpii	Soluția de demascare	Sistemul de vizualizare
ER/ clona 1D5/ RTU/ 20 min	Dako EnVision FLEX target retrieval solution, High pH/ 20 min	Dako EnVision FLEX /HRP/ 20 min
PR/ clona PR 636/ RTU/ 20 min	Dako EnVision FLEX target retrieval solution, High pH/ 20 min	
HER2 / Polyclonal rabbit anti-human c-erbb-2 oncoprotein/ 1:600/ 20 min	Dako EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH/ 20 min	Dako Real™ EnVision™ Detection Kit/ 30 min
Ki67/ clona MIB-1/ RTU/ 30 min	Target Retrieval Solution, High pH, x50, 20 min	Dako EnVision FLEX, HRP, 20 min
CD3/ clona 123C3/ 1:100/ 15 min	Target Retrieval Solution, High pH, x50, 20 min	
CD4/ clona 4B12/ RTU/ 15 min	Target Retrieval Solution, High pH, x50, 20 min	
CD8/ clona C8/144B / RTU/ 15 min	Target Retrieval Solution, High pH, x50, 20 min	
CD68/ clona Pg-M1/ RTU/ 1:2/ 15 min	Target Retrieval Solution, High pH, x50, 20 min	
CD56/ clona 123C3/ RTU/ 30 min	Tris EDTA, High pH, 20 min	
CD34/ clona Trist QBEnd 10/ RTU/ 30min	Dako EnVision™ Flex Target Retrieval Solution, High pH/20 min/	Dako EnVision FLEX+, Mouse, High pH, 30 min
CD45/ 2B11+PD7/26 / 30min		

Notă: RTU – ready to use, min – minute.

Toate procedeele de deparafinare (PT Link (Dako Colorado, USA)), demascare și vizualizare s-au efectuat automat, utilizând Autostainer Link 48 (Dako Colorado, USA). Pentru demascare am utilizat diverși agenți, în dependență de markerul utilizat. Demascarea a fost urmată de 3 băi în etanol de 100%, 90% și 70% de 2 minute fiecare, procedeul fiind finalizat cu rehidratare de 5 minute în apă distilată. Pentru blocarea activității peroxidazei endogene secțiunile au fost

tratate timp de 5 minute cu Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (S2023, Dako, USA). Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxilină Mayer, modificată după Lille (HMM500, ScyTek Laboratories, Inc., USA). Secțiunile histologice au fost deshidratate manual în serii crescute de alcool etilic (70-100%), clarificate cu xilen. Pentru montarea pieselor am folosit soluția BioMount New (BioGnost, HR). Caracteristica detaliată a markerilor utilizați și condițiile de aplicare au fost redată în Tabelul 2.

Cuantificarea expresiei markerilor utilizați în studiu. Evaluarea expresiei receptorilor a fost realizată prin intermediul unei tehnici semi-automate, dezvoltată de Suci *et al.* (2014) [222]. Această metodă constă în cuantificarea celulelor imunomarcate în cel puțin 10 câmpuri vizuale (sau un total de cel puțin 1000 de celule), la obiectiv de 40x, urmată de calculul mediei procentuale. Pentru facilitarea analizei numerice, zonele tumorale au fost fotografiate. Cuantificarea a fost efectuată folosind microscopul Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Germania) și Olympus BX53 (Japonia). Imaginile de ansamblu au fost captate cu AxioZoom.V16, folosind obiectivul PlanNeoFluar Z1x/0,25, camerele video AxioCam MRc (Carl Zeiss, Germania) și foto UC90 (Olympus, Japonia).

Evaluarea expresiei receptorilor pentru ER și PR a fost efectuată după Allred, luând în considerare numărul de celule colorate și intensitatea marcajului [223], conform Tabelul 3.

Tabelul 3. Evaluarea expresiei ER și PR după Allred

Criteriul evaluat	Scorul	Definiție
Proporția (SP)	0	Nici o celulă nu este pozitivă
	1	≤1%
	2	2%–10%
	3	11%–33%
	4	34%–66%
	5	67%–100%
Intensitatea(SI)	0	Negativ
	1	Slab
	2	Intermediar
	3	Puternic

Scorul total (ST) a fost calculat însumând proporția și intensitatea. Cazurile cu scorul 0-2 au fost considerate negative, iar cele cu scorul 3-8 – pozitive (Figura 1).

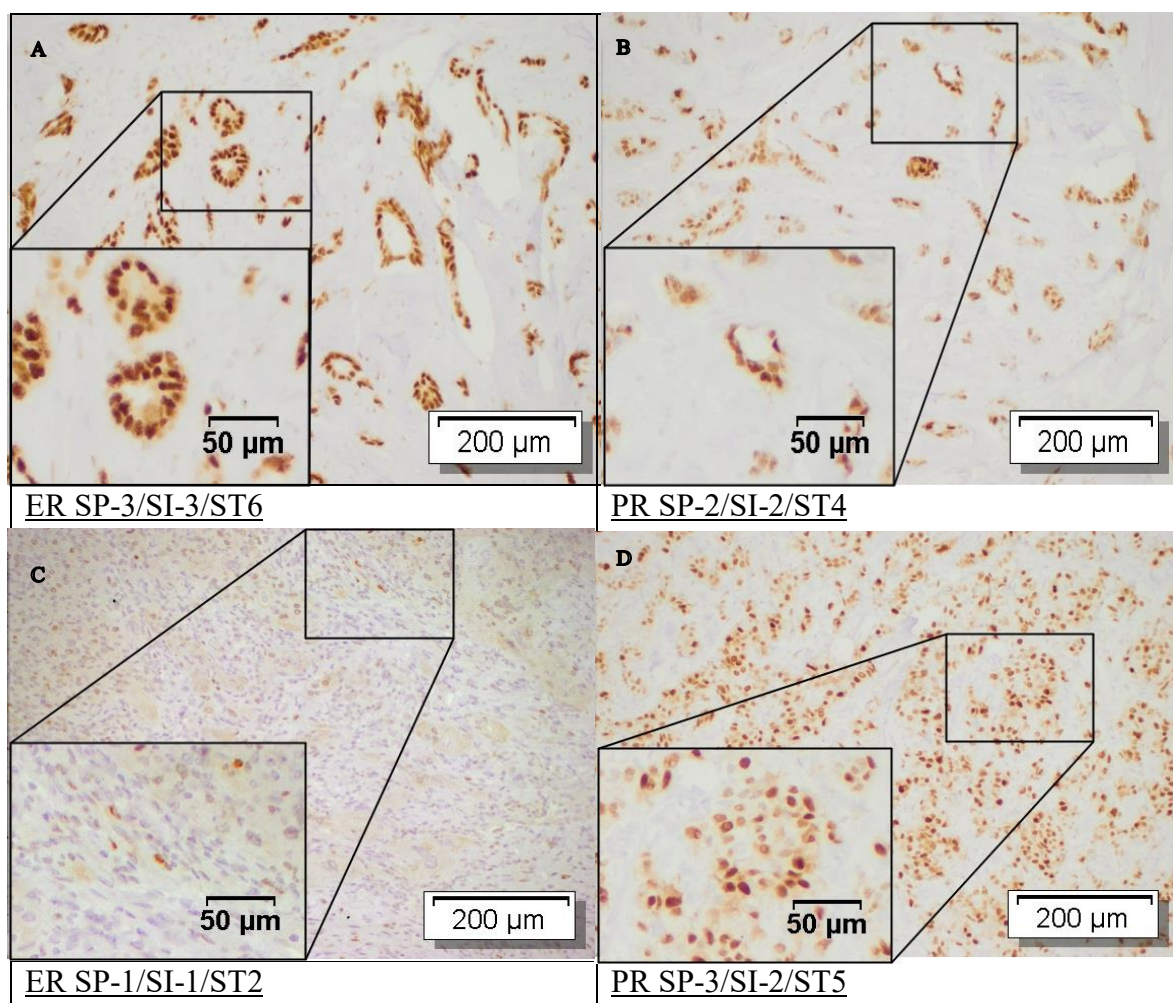


Figura 1. Figura 1. Carcinoame mamare de tip NST. Celule tumorale imunomarcate pentru ER și PR

Notă: SP – proporția celulară, SI - intensitatea colorării nucleare, ST – scor total.
 Colorație IHC, contracolorare cu hematoxină Lille (20x).

Supraexpresia factorului uman de creștere epidermală 2 (HER2) a fost evaluată conform criteriilor expuse în Tabelul 4. În calitate de control extern pozitiv au fost utilizate preparate histologice cu linii celulare de control (Leica Biosystems, Germania), cu scor HER2 pre-determinat (Figura 2).

Tabelul 4. Evaluarea supraexpresiei HER2
 [224]

Scor	Criterii
0	Absența colorării sau colorare incompletă, slabă și abia perceptibilă în <10% din celulele tumorale
1+	Colorare membranară incompletă, slabă și abia perceptibilă în >10% din celulele tumorale
2+	Colorare membranară circumferențială care este incompletă sau slabă/ moderată în >10% din celulele tumorale invazive; sau colorare membranară completă și circumferențială care este intensă în ≤10% din celulele tumorale invazive
3+	Colorare membranară circumferențială, completă și intensă în >10% din celulele tumorale

Tumorile 2+ și 3+ au fost considerate HER2 pozitive. În toate cazurile HER2 pozitive s-au utilizat tehnici de hibridizare *in situ* cromogenă în dublă culoare, cu kitul INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (cat. nr. 800-4422; producător Ventana Medical Systems, Inc., Roche Diagnostics), rulat pe platforma BenchMark ULTRA.

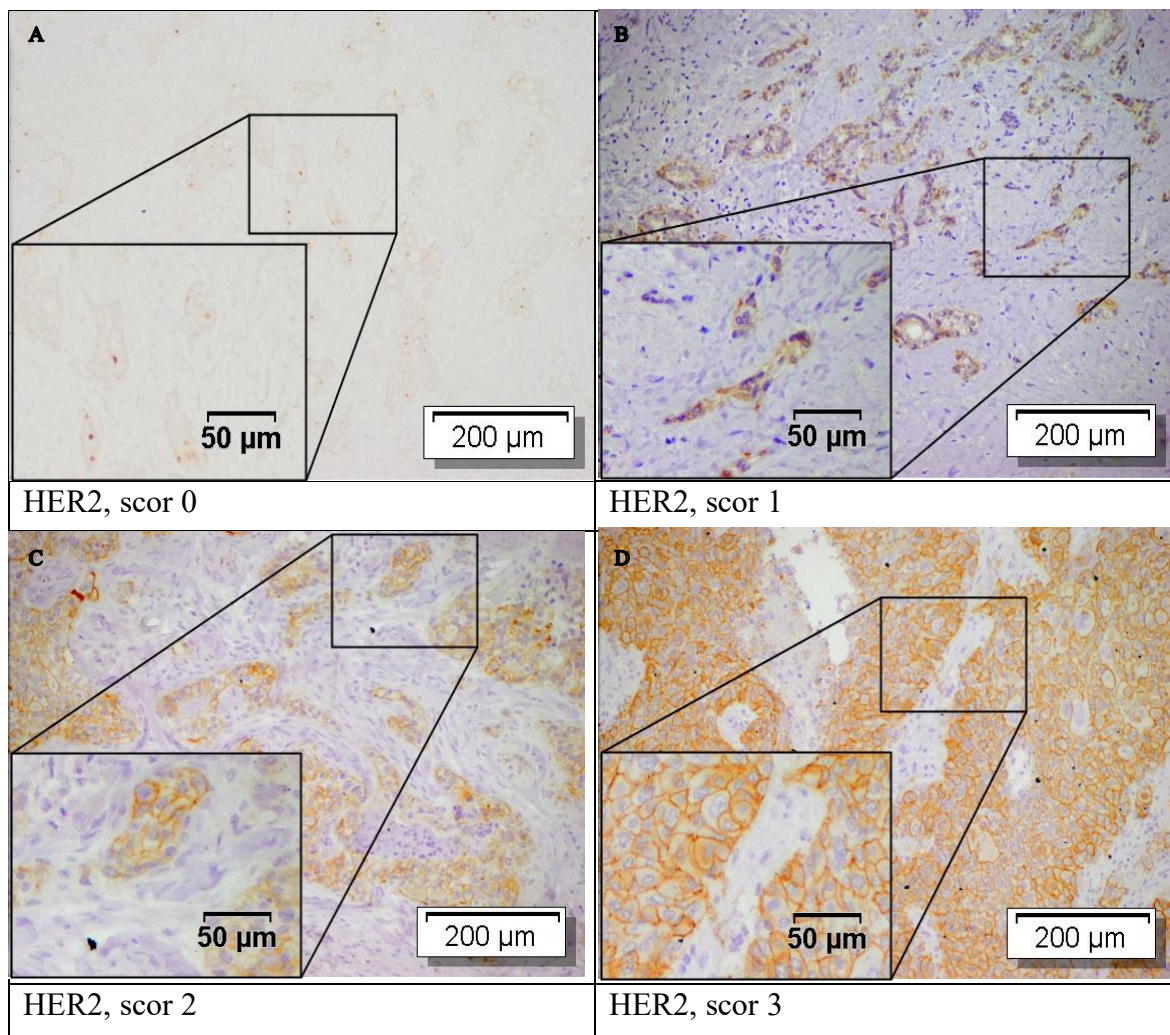


Figura 2. Carcinoame mamare ductal invaziv de tip NST. Celule tumorale imunomarcate pentru HER2.

Notă: Celule tumorale imunomarcate pentru HER2, scor 0 - +3. Colorație IHC, contracolorare cu hematoxilină Lille (20x).

La evaluarea expresiei CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56, CD68 și Ki67 au fost selectate inițial regiunile de interes intra- și peritumorale (CDit/CDpt), alegând-se ariile cele mai reprezentative ale preparatului, inclusiv cele cu grade diferite de imunopozitivitate. Rezultatele au fost prezentate ca media procentuala calculata din 10 câmpuri microscopice / 1000 celule. Pentru markerul Ki67 a fost considerat pragul de pozitivitate $\geq 14\%$. Evaluarea scorurilor imunohistochemice a fost realizata de 2 cercetători independenți, utilizând-se amigdala palatina drept țesut de control pentru validarea reacțiilor. Cazurile cu interpretare discordanta au fost reexaminare prin consens, in vederea diminuării variabilității inter-observator. În baza imunoexpresiei ER, PR, HER2 și Ki67, cazurile au fost atribuite unui anumit subtip molecular (Luminal A, Luminal B/HER2⁺, Luminal B/HER2⁻, HER2⁺, Triplu-negativ) [29], caracteristica detaliată a cărora va fi redată în Capitolul 3. Ulterior, cazurile au fost repartizate pe grupe în funcție de diagnostic, prezența/lipsa DZT2 și subtipului molecular (tabelul 5).

Tabelul 5. Caracteristica specimenelor prelevate după diagnosticul morfologic și imunohistochimic.

Subtipul molecular	CGM (43 cazuri)			CGM + DZT2 (29 cazuri)			Total (72 cazuri)
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	
Luminal A	2 (4.7%)	2 (4.7%)		1 (3.4%)	2 (6.9%)		7 (9.7%)
Luminal B, HER2-		14 (32.5%)	4 (9.3%)		12 (41.3%)	2 (6.9%)	32 (44.4%)
Luminal B, HER2+	1 (2.3%)	3 (7.0%)	5 (11.6%)		5 (17.2%)		14 (19.4%)
HER2+		3 (7.0%)	3 (7.0%)			3 (10.3%)	9 (12.5%)
Triplu-negativ		2 (4.7%)	4 (9.3%)		1 (3.4%)	3 (10.3%)	10 (13.9%)
Total	3 (7%)	24 (55.8%)	16 (37.2%)	1 (3.4%)	20 (68.9%)	8 (27.6%)	72 (100%)

Notă: G1-G3 – gradul de diferențiere al tumorii; CGM – carcinom de glandă mamară; DZT2 – diabet zaharat de tip 2.

2.4. Metode de evaluare a markerilor

Pentru realizarea scopului și obiectivelor cercetării, a fost planificat un studiu observațional, retrospectiv, transversal, comparativ, de tip caz–martor (3 grupe: control, CGM fără DZT2, CGM cu DZT2) care vizează determinarea caracteristicilor clinice, microscopice și imunohistochimice ale tumorilor mamare în asociere sau nu cu DZT2. Calcularea numărului necesar de unități pentru acest studiu s-a bazat pe formula pentru variabile cantitative exprimate prin coeficientul de variație (Cv), recomandată în ghidurile OMS de determinare a dimensiunii eșantionului în studiile de sănătate [225–227]. Formula $n=d \cdot [(Z_{1-\alpha/2} \cdot Cv) / \epsilon]^2$ reprezintă extensia formulei clasice $n_0=[(Z \cdot Cv) / \epsilon]^2$ utilizate pentru variabile cantitative, prin introducerea factorului de design (d) care ține cont de structura pe trei grupe a eșantionului.

Formula utilizată a fost: $n=d \cdot [(Z_{\alpha} \cdot Cv) / \epsilon]^2$

unde n reprezintă numărul de preparate histopatologice;

$Z_{1-\alpha/2}=1,96$ pentru un interval de încredere de 95.0%; În unele surse aceeași valoare este notată simplificat Z_{α} , însă numeric corespunde aceleiași valori de 1.96 pentru un interval de încredere de 95%.

$Cv=0.14$ (14.0%) – coeficientul de variație estimat pe baza datelor preliminare și a valorilor raportate în literatura de specialitate;

$\epsilon=0.05$ – eroarea relativă admisibilă (5.0%);

$d=3$ – design effect, având în vedere existența a trei grupe de preparate.

Introducând aceste valori în formulă, s-a obținut: $n=3 \cdot [(1.96 \cdot 0.14) / 0.05]^2 \approx 90$ de preparate histopatologice.

Ajustând pentru o rată de non-răspuns/non-includere de 10.0%, numărul minim necesar a fost rotunjit la 99 de preparate histopatologice.

2.5. Analiza statistică

În studiu au fost incluse în total 102 preparate histopatologice, repartizate în trei grupe: Grupa 1 – lot de control (mostre de glandă mamară de la femei fără cancer, decedate accidental), n=30; Grupa 2 – carcinom mamar de tip NST fără DZT2, n=43; Grupa 3 – carcinom mamar de tip NST asociat cu DZT2, n=29. Aceasta depășește pragul minim estimat prin calculul dimensiunii eșantionului. Având în vedere că numărul de preparate histopatologice din cele trei grupe nu a fost echilibrat, la evaluarea semnificației statistice a diferențelor dintre grupe s-a utilizat testarea posthoc Bonferroni. Datele colectate au fost inițial consolidate folosind MS Access 2016 și apoi transferate pentru analiză detaliată în SPSS (SPSS Statistics 23.0; IBM, Chicago, IL, USA). În procesul de analiză, au fost determinat indicatori statistici, precum media aritmetică, deviația standard, mediana (Me), intervalul interquantilic (IQR) și intervalul de încredere (CI). De asemenea, în funcție de tipul datelor au fost aplicate testele de corelație a rangurilor (Spearman) sau lineară (Pearson), astfel evaluând gradul de asociere dintre variabilele studiate, considerând semnificativ din punct de vedere statistic valoarea p egală sau mai mică de 0.05. Conform recomandărilor Lovakov și Agadullina (2021) [228], am clasificat puterea de corelare precum:

- Sub 0.12 – corelație extrem de redusă;
- Între 0.12 și 0.24 – corelație redusă;
- Între 0.24 și 0.41 – corelație de nivel mediu;
- 0.41 sau mai mare – corelație semnificativă [228].

Variabilele obținute au fost organizate în grupuri relevante reieșind din obiectivele cercetării. Astfel, am diferențiat subtipurile tumorale de carcinom, cu și fără diabet zaharat, am divizat limfocitele după localizare, intra-tumorală și peri-tumorală etc.

Diferențele dintre grupurile analizate au fost evaluate în funcție de tipul și distribuția datelor, utilizând testul *t* pentru eșantioane independente sau testul Mann–Whitney U, după caz. [229,230].

În sumar:

1. Studiul în cauză a fost realizat pe material biologic (glandă mamară) de la 72 paciente cu carcinom de sân, (43 cazuri) sau în asociere (29 cazuri) cu DZT2. În calitate de control au servit mostre de glandă mamară recoltate de la 30 femei, decedate accidental.
2. Această cercetare a fost concepută ca o analiză morfologică, retrospectivă, având la bază descrierea rezultatelor histologice și imunohistochemice. Studiul a inclus utilizarea colorației histologice standard cu hematoxilină-eozină, precum și un panel extins de 11 markeri imunohistochemici, cu potențial de a caracteriza tumoarea sau imunitatea celulară, precum ER, PR, HER2, Ki67, CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56 și CD68. Descrierea macro-microscopica a fost efectuată în baza recomandărilor OMS (2022) [29]. Pentru cuantificare și scorificare au fost utilizate metodele propuse de Allred *et al.* (1998) și Suciuc *et al.* (2014) [222,223]
3. În dependență de expresia ER, PR, HER2 și Ki67 tumorile au fost grupate în 5 subtipuri moleculare având la bază recomandările OMS [29].
4. Rezultatele au fost sistematizate în MS Access 2016, iar analiza statistică efectuată cu *software*-ul SPSS (versiunea 23.0). Au fost determinate media aritmetica, deviația standard, mediana, intervalele interquantilice, intervalul de variație (*range*: valorile minimă și maximă) și de încredere, corelațiile după Spearman sau Pearson și diferențele dintre grupe după Mann-Whitney U și t-Student.

3. CARACTERISTICA MORFOLOGICĂ A GLANDELOR MAMARE ÎN CONDIȚII DE NORMĂ ȘI PATOLOGIE

Analiza morfologică a glandelor mamare reprezintă un element fundamental în înțelegerea mecanismelor de carcinogeneză mamară, oferind informații esențiale privind arhitectura tisulară normală, modificările structurale induse de procesul neoplazic și factorii care pot influența comportamentul biologic al tumorilor. Conform protocolului de examinare histopatologică în vigoare, caracteristica morfologică a carcinomului mamar evidențiază o serie de parametri histopatologici esențiali, incluzând tipul și gradul histologic, scorul Nottingham, precum și prezența histiocitozei sinusale, hiperplaziei nodulilor limfatici, invaziei limfovaskulare și perineurale. Distincția dintre tumorile bine față de cele slab diferențiate, evaluată prin cuantificarea structurilor tubulare, pleomorfismului nuclear și a activității are o importanță majoră, întrucât contribuie semnificativ la aprecierea prognosticului [231].

Dereglările metabolice asociate diabetului zaharat de tip 2, descrise pe larg în literatura de specialitate, susțin ipoteza conform căreia aceste modificări pot favoriza dezvoltarea și menținerea unei componente inflamatorii în micromediul tumoral. Totodată, nu există date despre influența acestei maladii endocrine asupra caracteristicilor morfologice ale tumorilor mamare.

În cadrul acestui capitol, am prezentat structura histologică a glandelor mamare din grupul de control, precum și morfologia carcinoamelor mamare, analizate atât ca entități izolate, cât și în asociere cu DZT2. Influența diabetului va fi testată și prin stabilirea asocierilor statistice dintre nivelul de glucoză serică și parametrii morfologici al tumorilor.

3.1. Morfologia glandei mamare în normă.

Examinarea parenchimului mamar din lotul de control a evidențiat o serie de particularități morfologice relevante, care reflectă modificările fiziologice asociate procesului natural de dezvoltare și involuție dependent de vârstă. În mostrele colectate au fost determinate un șir de schimbări precum fibroza periductală, involuția glandulară, creșterea proporției țesutului conjunctiv stromal, reducerea cantității de țesut adipos, scleroza vasculară, depuneri de calciu și infiltrate limfocitare discrete

Fibroza periductală a fost determinată în 15 cazuri (50%) din totalul probelor analizate. Gradul fibrozei a fost apreciat ca fiind unul ușor prezentând o distribuție uniformă. Un alt aspect morfologic relevant identificat a fost involuția componentelor glandulare, observată în 11 cazuri, corespunzând unei frecvențe de 36.7%. Acest proces caracterizat prin înlocuirea progresivă a țesutului glandular activ cu țesut conjunctiv, a fost considerat un fenomen fiziologic, reprezentativ pentru senescența țesutului mamar, în contextul vârstei pacientelor de la care au fost recoltate probele (≥ 50 de ani).

În 14 cazuri (46.7%) a fost descrisă o sporire a cantității de țesut conjunctiv stromal. Observația formulată sugerează că, pe măsură ce glandele mamare involuează și își reduc activitatea, acestea sunt înlocuite cu stromă. Fenomenul descris poate fi interpretat drept răspuns adaptativ al organului la reducerea activității glandulare, contribuind la menținerea integrității structurale și susținerii parenchimului mamar.

Micșorarea cantității de țesut adipos a fost constatată în 11 cazuri, reprezentând 36.7% din totalul probelor examinate, ceea ce corespunde procesului natural de involuție asociat vârstei.

Scleroza vasculară a fost descrisă în 13 cazuri, corespunzând unei frecvențe de 43.3%. Modificările asociate au inclus îngroșarea pereților vasculari și/sau reducerea diametrului lumenului vascular. Depunerile de calciu au fost identificate în 11 cazuri (36.7%), fiind considerate markeri frecvenți ai procesului de îmbătrânire a parenchimului mamar și pot apărea în urma microleziunilor repetate sau a unor procese inflamatorii de intensitate redusă, asociate înaintării în vârstă. În contextul îmbătrânirii, eficiența mecanismelor de regenerare tisulară se reduce progresiv, favorizând acumularea depozitelor de calciu, și formarea calcificărilor vizibile la nivel tisular (Figura 3). Deși depunerile nu sunt întotdeauna asociate cu patologia malignă, prezența lor impune monitorizare în practica clinică, întrucât acumularea acestora poate masca sau mima alte leziuni mamare în cadrul investigațiilor imagistice.

Infiltratul limfocitar a fost prezent în 15 cazuri, ceea ce reprezintă 50% dintre cazurile examinate. Intensitatea infiltratului a fost apreciată ca fiind discretă, sugerând o reacție imunologică de grad redus, fără caracteristicile unei inflamații acute, interpretată ca expresie a unui proces de remodelare tisulară asociat înaintării în vârstă (Figura 4).

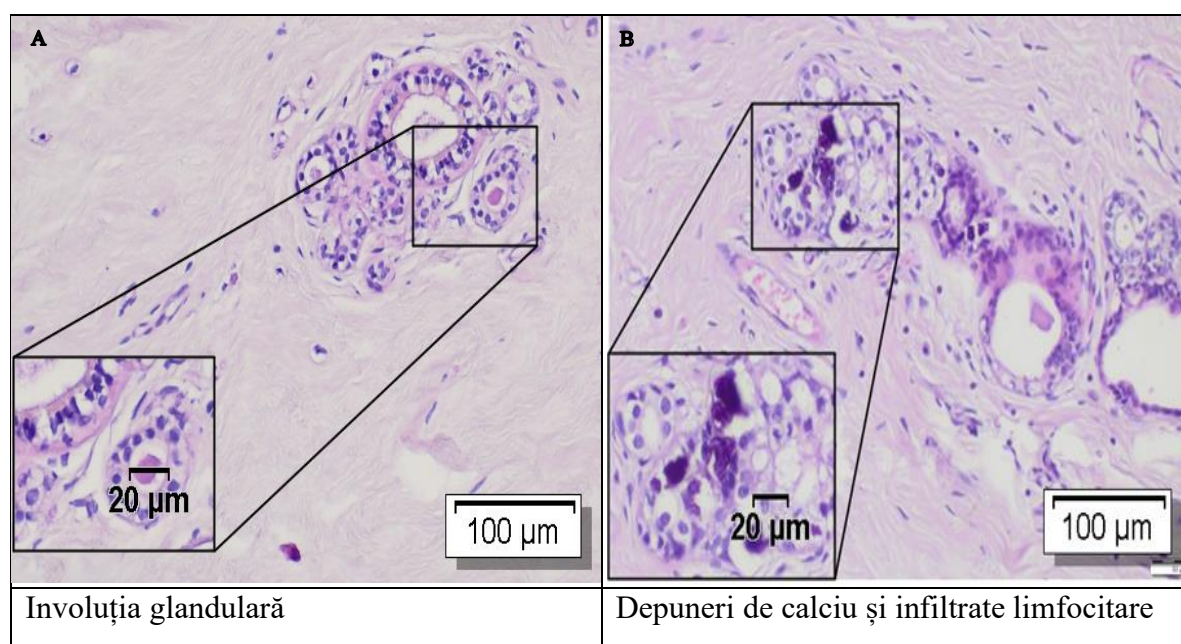


Figura 3. Structura histologică a glandei mamare în lotul de control, la paciente vârstnice. Modificări involutive ductale și glandulară asociată cu scleroză vasculară.

Notă: (A) Fibroza. (B). Calcinate. Colorație HE (10x).

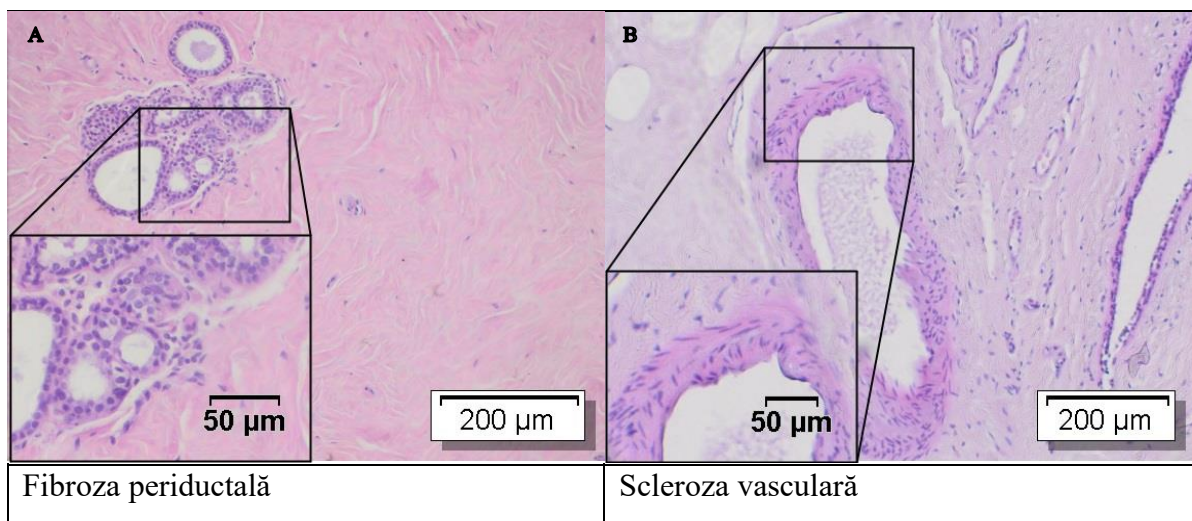


Figura 4. Structura histologică a glandei mamare în lotul de control, la paciente vârstnice.

Notă: (A) Modificări involutive ductale cu creșterea componentei stromale (B). Involuție glandulară asociată cu scleroză vasculară. Colorație HE (20x).

3.2. Structura carcinomului mamar, în absența dereglărilor metabolismului glucidic

În cadrul acestui studiu au fost incluse pacientele diagnosticate cu carcinom mamar de tip NST, cu vârsta medie de 63.7 ± 6.9 ani. Nivelul glicemiei determinate în sângele periferic a constituit 5.04 ± 1.10 mmol/L cu o Me de 4.7 mmol/L. Dimensiunile tumorilor evaluate la examenul macroscopic au variat, într-un interval larg, cuprins între 0.70 – 5.00 cm, media constituind 2.10 ± 0.80 cm cu o Me de 2.0 cm.

• În urma stratificării lotului de studiu în funcție de categoriile de vârstă ale pacientelor am determinat că dimensiunile tumorii variază, precum:

- 51-60 ani: media= 1.98 ± 0.2 cm, Me=2 cm (15 cazuri/ 34.9%);
- 61-70 ani: 2.21 ± 0.3 cm, Me=2.1 (23 cazuri/ 53.5%);
- 71-80 ani: 2.0 ± 0.3 cm, Me=2 (5 cazuri/ 11.6%).

Analiza comparativă preliminară a rezultatelor sugerează că dimensiunile tumorilor mamare tind să fie mai mari la pacientele încadrate în grupa de vârstă 61–70 de ani. Analiza statistică nu a evidențiat diferențe semnificative între grupele de vârstă comparate, valorile p fiind următoarele: 51-60 ani vs 61-70 ani, $p=0.792$; 61-70 ani vs 71-80 ani, $p=0.888$ și 51-60 ani vs 71-80 ani, $p=0.951$. Testul Pearson de asemenea nu a pus în evidență asocieri statistic semnificative dintre vârsta pacientelor și dimensiunea tumorilor prelevate ($r=-0.098$, $p=0.53$).

În urma analizei caracteristicilor tumorale am determinat predominarea valorilor pT1 – 23 de cazuri (53.5%), urmată de pT2 – 18 cazuri (41.9%) și cel mai rar fiind determinat pT3 – 2 cazuri (4.7%). Această distribuție denotă o prevalență a stadiilor incipiente și intermediare de dezvoltare a tumorii în cadrul lotului studiat. Frecvența redusă a categoriei pT3 reflectă o proporție scăzută a tumorilor aflate în stadii avansate de evoluție.

Analiza distribuției cazurilor în funcție de prezența metastazelor în noduri limfatici regionali (pN) a pus în evidență predominarea categoriei pN0 – 20 de cazuri (47.62%). pN1 a fost observată în 10 cazuri (23.81%), indicând o diseminare limitată în noduri limfatici regionali. pN2 și pN3 au fost determinate în 6 cazuri fiecare (14.29%). Caracterizarea cazurilor în funcție de statusul limfonodal a permis concluzionarea, că în studiu au prevalat cazurile fără afectarea regională a nodurilor limfatici.

Ulterior am caracterizat și reacția nodurilor la prezența procesului tumoral. Astfel, hiperplazia foliculară a fost descrisă în 5 cazuri/11.6%, histiocitoza sinusală – în 23 cazuri (53.5%), iar lipomatoza limfonodulară a fost prezentă în 8 cazuri (18.6%) (Figura 5).

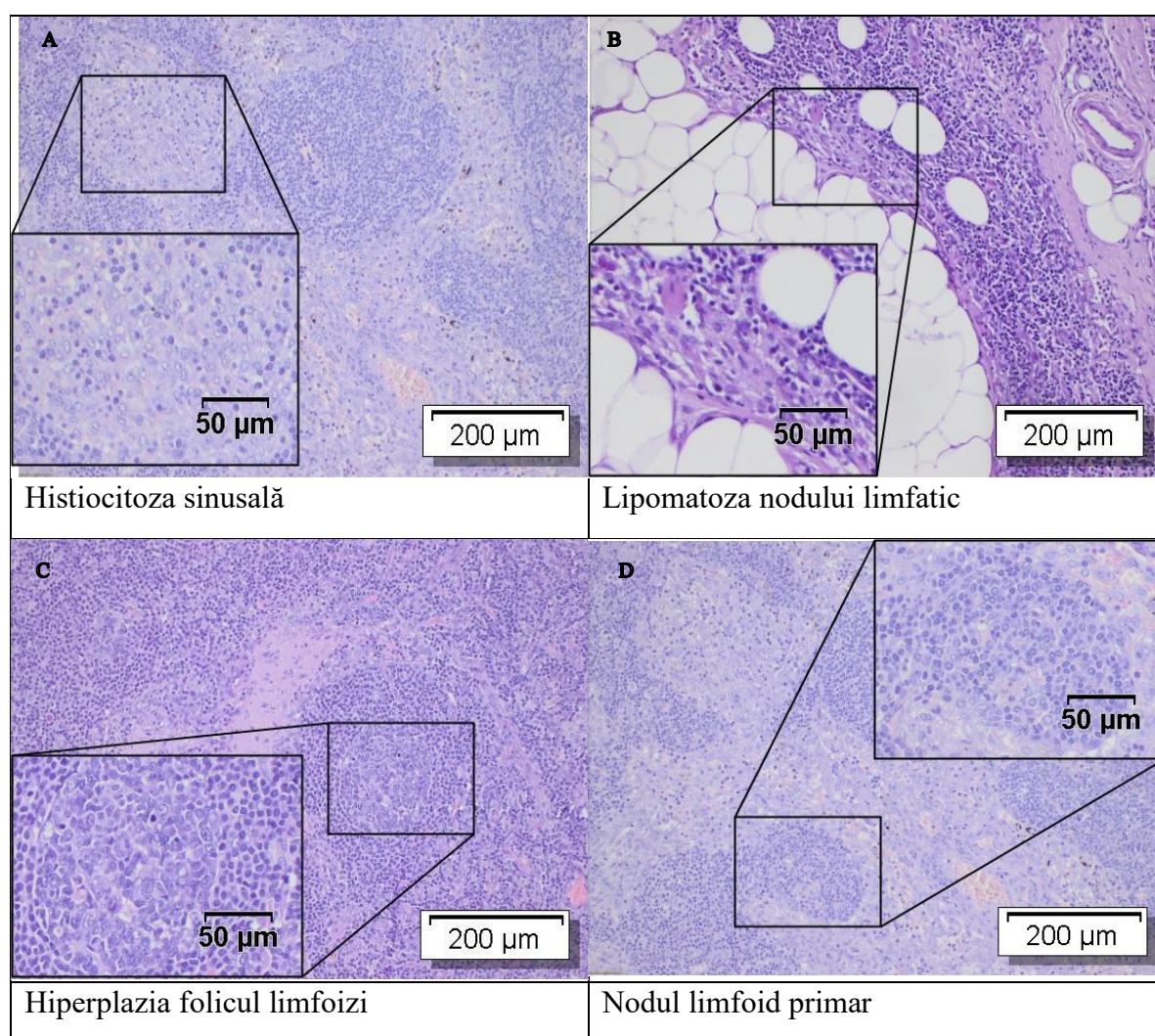


Figura 5. Nodul limfatic axilar ipsilateral în carcinom mamar.

Nota: A – Dilatarea sinusurilor medulare, umplute cu histiocite mari, cu citoplasmă abundentă, ușor eozinofilă, și nucleu rotund sau oval, central. B – Adipocitele mature distribuite difuz în nodul limfatic. C – Nodul limfoid secundar. D – Nodul limfoid primar.

Colorație HE (20x).

Analiza trăsăturilor microscopice ale tumorii, respectiv formarea de tubuli, atipia celulară și activitatea mitotică) realizată conform protocoalelor în vigoare [29] a evidențiat următoarele

aspecte: distribuția scorului pentru formarea de tubuli (Ft) a arătat predominanța gradului 3 în 34 cazuri (79.1%), urmat de gradul 2 – 8 cazuri (18.6%) și gradul 1 – 1 caz (2.3%).

Distribuția cazurilor în funcție de a doua trăsătură microscopică a tumorii, respectiv atipia celulară (At) a pus în evidență prevalența cazurilor At 3 – 29 cazuri (67.4%), urmată de At 2 – 13 cazuri (30.2%) și At 1 – 1 caz (2.3%) (Figura 6).

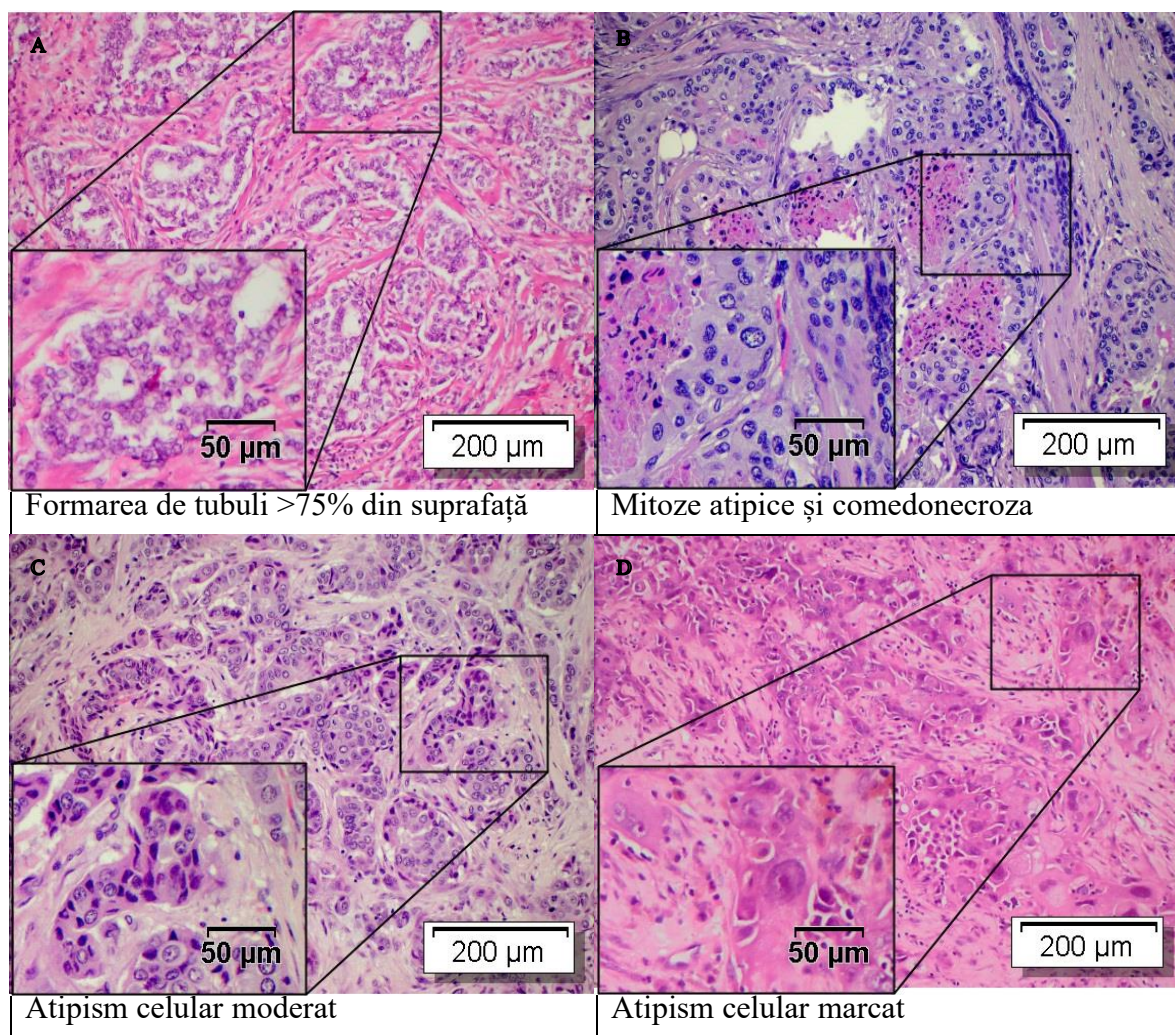


Figura 6. Carcinoame mamare de tip NST.

Notă: (A) Formarea structurilor tubulare tumorale. (B) Activitate mitotică accentuată, cu prezența mitozelor atipice. (C, D) Atipie celulară marcată, caracterizată prin pleomorfism nuclear și modificări de arhitectură celulară. Colorație HE (20x).

La caracterizarea tumorilor după activitatea mitotică am determinat prevalența cazurilor cu Mc de gradul 1 – 21 de cazuri (48.8%), urmată de Mc 2 – 17 cazuri (39.5%) și Mc de gradul 3 – 5 cazuri (11.6%).

Ulterior a fost realizată scorificarea Nottingham și determinarea gradului histopatologic. Cazurile au fost repartizate precum: G1 a fost determinat în 4 cazuri (9.5%), G2 în 22 cazuri (52.4%), iar G3 în 16 cazuri (38.1%). Pentru a determina dacă dimensiunea tumorii depinde de

gradul ei de diferențiere am realizat testul de corelare stabilind asociere pozitivă și semnificativă statistic ($r=0.35$, $p=0.021$), ceea ce sugerează că tumorile agresive au dimensiuni mai mari.

Totodată, a fost formulată ipoteza conform căreia gradul de diferențiere tumorală ar putea fi influențat de vârsta pacienților. Analiza stratificată în funcție de grupele de vârstă incluse în studiu a evidențiat următoarele rezultate:

- Neoplasmele G1 (4 cazuri/ 9.3%) au afectat afectând paciente cu vârste cuprinse între 63 și 70 de ani, media constituind 67 ± 2.3 ani, cu o Me de 67.5;

- Tumorile G2 (23 cazuri/ 53.5%), la paciente cu vârsta medie de 63.6 ± 9.67 ani, cu o Me de 64 ani, vârstele variind între 51-80 ani;

- Carcinoamele G3 (16 cazuri/ 37.2%) au afectat femeile cu vârsta cuprinsă între 54-73 ani, media constituind 63 ± 6.33 ani, cu o Me de 63.5.

În urma realizării testului statistic de asociere am stabilit o corelație foarte slabă și nesemnificativă statistic dintre gradul tumorii și vârsta pacienților ($r_s=0.13$, $p=0.21$).

Analiza comparativă a activității mitotice raportate la gradul de diferențiere a tumorii a permis constatarea prezenței variațiilor semnificative. În cadrul activității mitotice 1, corespunzătoare unui indice scăzut de proliferare celulară, au fost identificate 4 cazuri (9.3%) de tumori G1 și 15 cazuri (34.9%) de carcinoame G2, fără determinarea de tumori G3. Toate cazurile relatate, însumează 44.2% ceea ce indică o tendință a tumorilor mai diferențiate de a manifesta o activitate mitotică redusă, activitatea mitotică de gradul 2, asociată cu un nivel intermediar de diviziune celulară, a fost mai frecventă în tumorile de G2 (6 cazuri/ 13.95%) și G3 (13 cazuri/ 30.2%), fără a fi identificată în tumori G1. Activitatea mitotică de gradul 3, corespunzătoare celui mai înalt nivel de proliferare celulară, a fost identificată într-un număr redus de cazuri, respectiv în 2 tumori G2 (4.65%) și 3 tumori G3 (6.98%), reprezentând în total 11.63% din lotul analizat. Aceste date delimitează o categorie relativ rară, însă relevantă din punct de vedere biologic, sugerând o asociere între gradul tumoral înalt și intensificarea activității proliferative și, implicații potențiale asupra comportamentului biologic mai agresiv al tumorilor. Ipoteza conform căreia un grad scăzut de diferențiere tumorală este asociat cu o activitate mitotică crescută a fost susținută de analiza de corelație, care a evidențiat o asociere pozitivă, semnificativă statistic ($r=0.54$; $p=0.0002$).

De asemenea, în cadrul acestui studiu au fost analizate și alte caracteristici ale agresivității tumorale, precum invazia limfovasculară (LVI) și perineurală (Pn).

Distribuția cazurilor în funcție de prezența invaziei LVI a fost următoarea: LVI0 – 17 cazuri (39.5%), LVI1 – 26 cazuri (60.5%). Aceste date indică faptul că carcinomul NST dezvoltă în majoritatea cazurilor invazie limfovasculară, ceea ce denotă tendința sa acerbă spre diseminare sistemică. Distribuția cazurilor în funcție de prezența invaziei perineurale (Pn) a fost precum: Pn0

– 28 cazuri (65.1%), Pn1 – 15 cazuri (34.9%). Aceste date sugerează că invazia perineurală spre deosebire de cea limfovaculară nu este calea preferată de diseminare a carcinomului mamar.

Urmând protocolul standard de examinare microscopică am evaluat incidența invaziei tumorale în structurile adiacente în dependență de gradul de diferențiere al carcinomului. În cazul tumorilor G1 (4 cazuri) doar 2 cazuri (4.7%) au prezentat invazie limfovaculară, iar un singur caz a fost asociat cu invazie perineurală (2.3%). Este important de menționat, că un caz a prezentat concomitent ambele tipuri de invazie. Din totalul celor 23 de tumori G2, LVI a fost identificată în 15 cazuri (34.9%), iar semne distincte de invazie perineurală au fost observate în 8 cazuri (18.6%), analizate separat. Invazia cumulativă, de tip vascular și perineural, a fost prezentă în 7 cazuri (16.3%). În contrast, dintre cele 16 tumori cu grad de diferențiere G3, caracterizate printr-un nivel scăzut de diferențiere și un potențial biologic mai agresiv, invazia limfovaculară (LVI) a fost identificată în 9 cazuri (20.9%). Invazia limfovaculară și perineurală simultană în tumorile slab diferențiate a fost identificată în 6/14% cazuri.

Astfel, am evidențiat că cel puțin unul dintre tipurile de invazie a fost identificat în aproximativ 27 de cazuri (62.5%). Cazurile caracterizate prin prezența concomitentă a invaziei limfovaculară și perineurale au fost în număr de 14 (32.6%) din total. Eserile de corelare au demonstrat, că între invazia limfovaculară și cea perineurală exista o asociere semnificativă statistic ($r_s=0.492$, $p=0.001$).

Rezultatele în cauză permit să susținem că tumorile G1 au o activitate mitotică și o capacitate invazivă redusă, sugerând un comportament biologic mai puțin agresiv și un prognostic mai favorabil. Carcinoamele G2, care domină numeric, prezintă activitate mitotică de grad mediu și incidențe mai mari de invazie LVI și Pn, corespund definiției de tumori cu agresivitate moderată. Neoplasmale G3 au prezentat cea mai mare capacitate proliferativă și invazivă, cu activitate mitotică intensă și frecvență ridicată a invaziei perineurale și limfovaculară.

În vederea evaluării posibilelor asocieri dintre gradul histologic de diferențiere și caracteristicile de agresivitate tumorală, am realizat testul de corelare. Rezultatele au indicat absența unor asocieri semnificative statistic între gradul de diferențiere și invazia limfovaculară ($r=-0.03$; $p=0.84$), precum și între gradul de diferențiere și invazia perineurală ($r=0.06$; $p=0.71$), sugerând lipsa unei relații relevante din punct de vedere statistic în ambele cazuri.

3.3. Morfologia carcinomului mamar asociat cu diabet zaharat.

În continuare sunt analizate caracteristicile morfologice ale carcinomului mamar în contextul asocierii cu diabetul zaharat, cu scopul de a evidenția particularitățile structurale și histopatologice ale tumorilor dezvoltate pe fond metabolic alterat.

Vârsta medie a pacientelor incluse în acest grup a constituit 64.5 ± 7.9 ani, iar nivelul mediu al glicemiei determinate din sângele periferic a constituit 9.9 ± 3.1 mmol/L, cu o Me de 9.0 mmol/L.

Dimensiunile tumorilor în grupul analizat au variat între 1.0 și 12.0 cm, cu o dimensiune medie de 2.9 ± 2.2 cm și o Me de 2.2 cm. Analiza dimensiunilor tumorale stratificată în funcție de vârsta pacienților a avut următoarea distribuție:

- 51-60 ani: 10 cazuri/ 34.5%, 2.67 ± 1.3 cm;
- 61-70 ani: 15 cazuri/ 51.7%, 2.92 ± 1.5 cm;
- 71-80 ani: 4 cazuri/ 13.8%, 3.1 ± 1.4 cm.

Analiza descriptivă sugerează că pacientele cu carcinom mamar asociat diabetului zaharat, încadrate în grupa de vârstă 71–80 de ani, prezintă tumori cu dimensiuni medii mai mari, această categorie fiind însă numeric mai redusă. Totuși, testul de corelare dintre vârsta pacienților și dimensiunea tumorii a rezultat cu asocieri foarte joase și ne semnificative statistic ($r = -0.04$, $p = 0.84$). Evaluând pT am determinat, că în 13 cazuri (44.8%) caracteristicile corespund la pT1, 12 cazuri (41.4%) la pT2, în 3 cazuri (10.3%) la pT3 și într-un singur caz (3.4%) la pT4. Această distribuție reflectă prevalența stadiilor incipiente și intermediare (pT1 și pT2), care împreună constituie majoritatea cazurilor. Categoriile pT3 și pT4 au fost mai puțin frecvente, sugerând o incidență scăzută a cazurilor cu extensie tumorală avansată.

La evaluarea prezenței metastazelor limfonodale regionale, am determinat 11 cazuri (37.9%) drept pN0, 8 cazuri (27.6%) au fost apreciate ca pN1, 7 cazuri (24.1%) au prezentat o implicare moderată a nodurilor regionali (pN2) și 3 cazuri (10.3%) au fost identificate ca pN3. În sinteză, rezultatele obținute indică prevalența cazurilor pN0 și pN1. reflectând un grad relativ redus de afectare limfonodală regională în carcinomul mamar asociat diabetului zaharat.

Similar cazurilor de carcinom mamar solitar, neasociat diabetului zaharat, am caracterizat reacția nodurilor limfatice regionale la procesul tumoral. Din cele 29 de cazuri studiate, în 6 cazuri (27.6%) a fost descrisă hiperplazia foliculară, în 13 cazuri (44.8%) histiocitoza sinusală și în 7 cazuri (24.1%) au fost determinate semne distincte de lipomatoză limfonodală.

Analiza caracteristicilor microscopice ale tumorilor, realizată conform protocoalelor internaționale în vigoare [231] și bazată pe evaluarea formării de tubuli, a atipiei celulare și a activității mitotice, a evidențiat următoarele aspecte:

- Gradul Ft3 a fost stabilit în 19 cazuri (65.5%), indicând predominanța tumorilor cu formare redusă de structuri tubulare, caracteristică unui nivel scăzut de diferențiere celulară și asociată, în general, cu un comportament tumoral mai agresiv;

- Gradul Ft2 a fost identificat în 8 cazuri (27.6%), formare moderată de structuri tubulare. Frecvența acestor tumori a fost semnificativ mai redusă ($p = 0.001$) comparativ cu Ft3, sugerând că în contextul asocierii neoplasmelor cu diferențiere de grad intermediar sunt mai puțin frecvent întâlnite;

- Gradul Ft1 a fost identificat în 2 cazuri (6.9%), indicând o frecvență foarte redusă a tumorilor cu formare intensă de structuri tubulare, care sunt în general considerate drept bine diferențiate și mai puțin agresive, sunt foarte rar întâlnite în cadrul lotului studiat.

Distribuția cazurilor în funcție de a doua trăsătură microscopică evaluată, respectiv atipia nucleară (At), a pus în evidență o predominanță clară – 21 cazuri (72.4%) a cazurilor At de gradul 3. Această distribuție reflectă o frecvență crescută a unui grad ridicat de atipie celulară, asociat în mod uzual cu un comportament biologic tumoral mai agresiv. Cazurile cu At de gradul 2 au fost descrise în 8 cazuri (27.6%). Trebuie de menționat, că în cadrul acestui studiu nu au fost identificate cazuri cu atipie de gradul 1. Aceste rezultate sugerează că în tumorile asociate diabetului celulele canceroase dezvoltă mai frecvent trăsături celulare agresive.

La caracterizarea activității mitotice am stabilit, că 17 cazuri (58.6%) posedă capacități proliferative reduse, asociate cu gradul Mc1. Alte 7 cazuri (24.1%) au fost evaluate drept tumori cu activitate mitotică moderată (sau Mc2). Cea mai înaltă activitate proliferativă (Mc3) a fost descrisă în 5 tumori (17.2%).

Aplicarea criteriilor Nottingham a evidențiat faptul că, în cazul carcinoamelor mamare de tip NST asociate cu DZT2 a predominat gradul moderat de diferențiere (G2), identificat în 19 cazuri (65,5%). Următorul după frecvență a fost gradul G3 corespunzător tumorilor slab diferențiate a fost stabilit în 8 cazuri (27.6%). La polul opus, gradul G1, caracteristic tumorilor bine diferențiate, a fost cel mai rar întâlnit, fiind identificat în doar 2 cazuri (6.9 %).

La stabilirea asocierilor dintre gradul histopatologic și dimensiunea tumorii am stabilit corelații slabe și ne semnificative din punct de vedere statistic ($r=0.13$, $p=0.48$), ceea ce sugerează că aceste două caracteristici ale neoplasmului nu sunt interdependente.

Analiza datelor a evidențiat următoarele rezultate privind distribuția vârstei pacienților în funcție de gradul histopatologic al tumorii:

- Pentru tumorile G1 (2 cazuri/ 6.9%), vârsta medie a pacientelor a fost de 65 ± 7.1 ani, cu o Me de 65 ani, variind într-un interval cuprins între 60 și 70 ani;

- Pacientele cu carcinoame G2 (19 de cazuri/ 65.5%), au avut vârsta medie de 65 ± 9.4 ani (Me=62 ani), intervalul de vârstă variind între 50 și 86 de ani.

- Carcinoamele G3 (8 cazuri/ (27.6%) au afectat femeile cu vârsta cuprinsă între 57 – 69 ani (63 ± 4 ani, Me=64.5 ani).

Eseul statistic de corelare nu a stabilit corelații semnificative statistic dintre vârsta pacientelor și gradul histopatologic al tumorii la femeile cu diabet ($r=-0.10$, $p=0.593$).

Ulterior a fost analizată distribuția cazurilor în dependență de activitatea mitotică (Mc). Astfel Mc1 a fost descrisă în 2 cazuri (6.9%) de tumori G1 și 15 cazuri (51.7%) de carcinoame G2. Activitatea proliferativă medie (Mc2) a fost raportată în 3 cazuri (10.3%) de tumori G2 și 4

cazuri (13.8%) de neoplasme G3. Cea mai înaltă activitate mitotică (Mc3) a fost identificată într-un caz (3.45%) de carcinom G2 și 4 cazuri (13.8%) de tumori G3. Aceste 2 caracteristici tumorale, respectiv gradul de diferențiere și activitatea mitotică s-au dovedit a fi interdependente, testul de corelare punând în evidență asocieri pozitive, puternice, semnificativ statistic ($r=0.69$, $p=0.0001$). Rezultatele în cauză sugerează că, odată cu agresivitatea tumorii crește și activitatea proliferativă a celulelor.

În cadrul acestui studiu, au fost analizate și alte caracteristici microscopice ale tumorilor, precum invazia limfovaculară (LVI) și invazia perineurală (Pn).

Invasia limfovaculară a fost depistată în 18 cazuri (62.7%), ceea ce sugerează că majoritatea tumorilor asociate cu DZT2 au tendința de a disemina pe cale limfovaculară. În ceea ce privește invazia perineurală, rezultatele indică prezența acesteia doar în 10 cazuri (34.5%), prezența simultană a fost determinată în 8 cazuri (27.6%). Rata înaltă a cazurilor cu invazie limfovaculară indică un risc înalt de diseminare sistemică în rândul pacientelor cu tumori asociate cu DZT2.

Totodată a fost analizată distribuția LVI și Pn în funcție de gradul de diferențiere al tumorii. Astfel, în carcinoamele G1, caracterizate printr-un nivel înalt de diferențiere celulară și un comportament biologic mai puțin agresiv, invazia limfovaculară (LVI) a fost identificată într-un singur caz din totalul de două cazuri analizate. Invasia perineurală nu a fost identificată în tumorile de grad G1, observație concordantă cu tendința generală a neoplasmelor bine diferențiate, inclusiv în contextul asocierii cu DZT2, de a prezenta un potențial invaziv redus. În cazul tumorilor G2, care au dominat numeric lotul de studiu, invazia LVI a fost observată în 12 cazuri (41.4%), în timp ce invazia Pn a fost identificată în 8 cazuri (27.6%). Tumorile G3, cele mai slab diferențiate și caracterizate clinic printr-o agresivitate mai pronunțată, au prezentat invazie LVI în 5 cazuri (17.2%) și Pn în 2 cazuri (6.9%). Aceste rezultate indică faptul că, deși tumorile G3 au o capacitate invazivă crescută, acestea diseminează cu predilecție pe cale limfovaculară. Totuși, testul de corelare nu a stabilit asocieri semnificative statistic dintre gradul de diferențiere al tumorii atât cu LVI ($r=0.03$, $p=0.85$) cât și Pn ($r_s=-0.009$, $p=0.963$). Rezultatele în cauză sugerează că, deși tumorile slab diferențiate tind să dezvolte frecvent invazie LVI și Pn, aceste tipuri de diseminare nu depind, cel puțin statistic de gradul histopatologic. Invasia tumorală pare să fie influențată de alți factori, iar rezultatele subliniază complexitatea comportamentului tumoral și necesitatea studiilor în domeniu.

În ceea ce privește posibila influență a DZT2 reflectată prin valorile crescute ale glicemiei, analiza cantitativă a stabilit, că) pacientele cu tumori de grad G1 au prezentat o valoare medie a glicemiei serice de 9.7 ± 3.5 mmol/L, cu o mediană (Me) de 9.7 mmol/L. În cazul carcinoamelor G2 – nivelul mediu al glicemiei a fost de 9.9 ± 3.1 mmol/L (Me=8.4) iar la pacientele cu neoplasme G3 s-a înregistrat o valoare medie de 10.0 ± 3.2 mmol/L, cu o mediană de 10.3 mmol/L. Totuși,

trebuie de subliniat că testul de corelare nu a atins pragul statistic semnificativ scontat la verificarea asocierilor dintre nivelul seric al glucozei și gradul de diferențiere al tumorii ($r=0.02$, $p=0.88$). Aceasta sugerează că valorile glicemiei nu influențează diferențierea, agresivitatea tumorii și potențialul ei invaziv, toate apreciate prin eseuri clasice.

3.4. Studiul comparativ al morfologiei tumorilor mamare

În cadrul acestui subcapitol a fost pus în evidență modul în care diabetul zaharat poate influența tumorile mamare, iar evidența acestor acțiuni poate fi vizualizată și sau cuantificată de medicul patolog. Rezultatele obținute au dezvăluit diferențe semnificative în caracteristicile tumorale, sugerând un impact potențial al diabetului asupra progresiei bolii.

Astfel, în ceea ce privește dimensiunile tumorale, scontat deși valorile medii au fost mai mari la paciențele cu diabet zaharat, diferența observată nu a atins pragul de semnificație statistică ($p=0.089$). Totuși valoarea p apropiată de nivelul convențional de semnificație $p=0.05$ sugerează existența unei tendințe, indicând o posibilă asociere între diabetul zaharat și creșterea tumorală mai accelerată în carcinomul mamar.

Intervalul de vârstă 61–70 de ani a înregistrat cea mai mare frecvență a cazurilor de carcinom mamar în ambele grupuri analizate, fiind asociat totodată cu dimensiuni tumorale mai mari comparativ cu celelalte categorii de vârstă. Totuși, testele de corelație au prezentat, că vârsta nu influențează în mod semnificativ statistic dimensiunea tumorilor în niciunul dintre grupurile analizate, indicând că factorul de vârstă nu este un predictor relevant al dimensiunii tumorale.

Analiza comparativă a extensiei tumorale (pT) pus în evidență faptul, că în ambele grupuri predomină stadiile incipiente și intermediare (pT1 și pT2). Cu toate acestea, paciențele cu diabet au prezentat o frecvență semnificativ mai mare a tumorilor în stadii avansate (pT3 și pT4), diferența fiind semnificativă statistic ($p=0.035$). În ceea ce privește metastazele nodale (pN), s-a observat o incidență mai mare ($p=0.04$) de cazuri pN0 și pN1, ceea ce indică un grad redus de afectare nodală în majoritatea cazurilor. Incidența mai mare a cazurilor încadrate în categoria pN2 la paciențele cu diabet zaharat ($p=0.016$) poate reflecta un risc crescut de diseminare pe cale limfovasculară în acest grup. Studiul a evaluat, de asemenea, trăsăturile microscopice ale nodurilor limfatice, cum ar fi hiperplazia foliculară, histiocitoza sinusală și lipomatoza limfonodulară. În grupul cu diabet, histiocitoza sinusală a fost cea mai frecventă caracteristică, dar a fost observată în mai puține ($p=0.02$) cazuri comparativ cu paciențele fără diabet. Hiperplazia foliculară și lipomatoza limfonodulară au fost rar întâlnite, dar distribuția lor a fost similară între cele două grupuri ($p=0.67$). Formarea tubulilor (Ft) a fost caracterizată de predominanța gradului Ft3 în ambele grupuri analizate, reflectând un nivel scăzut de diferențiere în majoritatea cazurilor. Prezența Ft 1 a fost extrem de rară, reflectând un număr redus de tumori bine diferențiate.

Analiza atipiei celulare (At) a pus în evidență o frecvență mai mare a gradului At 3 în ambele grupuri, dar pacientele cu diabet au prezentat o incidență mai înaltă ($p=0.025$) de At 2, indicând astfel un profil morfologic ușor diferit.

În ceea ce privește activitatea mitotică (Mc), gradul redus (Mc1) a fost identificat cu o frecvență semnificativ mai mare la pacientele cu diabet zaharat (55.2%) comparativ cu cele fără diabet (41.4%), diferența fiind semnificativă statistic ($p=0.03$). În schimb, activitatea mitotică moderată (Mc 2) a fost predominantă ($p=0.001$) la pacientele fără diabet, cu o proporție de 44.8% comparativ cu 27.6% la cele cu diabet. În cazul activității mitotice crescute (Mc 3), proporția a fost mai mare ($p=0.05$) la pacientele cu diabet (17.2% vs 13.8%). În ansamblu, rezultatele obținute sugerează existența unor diferențe în rata de proliferare celulară, pacientele cu diabet zaharat prezentând o tendință către modificări ale activității mitotice.

Evaluarea distribuției gradului histopatologic a pus în evidență o prevalență a tumorilor G2 în ambele grupuri, ceea ce sugerează o predominanță a neoplasmelor cu agresivitate moderată. Tumorile G3 au fost mai frecvente ($p=0.012$) la pacientele fără diabet (37.2%) comparativ cu cele cu diabet (27.6%), ceea ce poate indica diferențe în comportamentul tumoral dintre cele două grupuri.

Deși s-a observat o asociere descriptivă între gradul histopatologic G3 și dimensiuni tumorale mai mari, analizele statistice nu au evidențiat corelații semnificative, sugerând că dimensiunea tumorală nu este direct dependentă de gradul histopatologic.

Analiza activității mitotice a evidențiat predominanța unui nivel scăzut de proliferare celulară în tumorile de grad G1 și G2, în ambele grupuri studiate, reflectând un profil biologic mai puțin activ din punct de vedere proliferativ. Cu toate acestea, distribuția activității mitotice moderate (Mc 2) și crescute (Mc 3) a relevat diferențe semnificative între pacientele cu diabet și cele fără diabet. Astfel, activitatea mitotică moderată (Mc 2) a fost mai frecvent ($p=0.001$) întâlnită la pacientele fără diabet, cu o proporție de 44.8%, comparativ cu 24.1% la pacientele cu diabet. În schimb, activitatea mitotică crescută (Mc 3) a înregistrat o incidență mai mare ($p=0.05$) la pacientele cu diabet, respectiv 17.2% față de 13.8% la cele fără diabet.

Corelații statistice dintre gradul tumorii și activitatea mitotică a fost depistată în ambele grupuri ($r=0.69$, $p=0.00002$ în DZT2 vs $r=0.65$, $p=0.00015$ fără diabet).

Invazia limfovaculară (LVI) a fost mai frecvent descrisă decât invazia perineurală (Pn) în ambele grupuri. Tumorile G2 și G3 au prezentat o frecvență mai ridicată a invaziei limfovasculare, în timp ce invazia perineurală a fost mai rar identificată, fiind observată cu o incidență mai mare în carcinoamele de grad G2. Corelațiile statistice între gradul tumorii și prezența invaziei LVI și Pn au fost ne semnificative în ambele grupuri, sugerând că alți factori, cum ar fi moleculari, metabolici etc., ar putea influența comportamentul invaziv al carcinoamelor mamare.

În sumar:

1. Morfologia glandei mamare în normă a evidențiat modificări involutive dependente de vârstă (fibroză periductală, involuție glandulară, creșterea componentei stromale, reducerea țesutului adipos, scleroză vasculară, calcificări și infiltrat limfocitar discret), interpretate ca expresii ale proceselor fiziologice de senescență și remodelare tisulară.
2. Carcinoamele mamare de tip NST, indiferent de statusul metabolic, au fost caracterizate prin predominanța stadiilor tumorale incipiente și intermediare (pT1–pT2), a statusului limfonodal pN0–pN1 și a scorurilor histologice sugestive pentru un grad moderat spre redus de diferențiere (Tf3, At3, G2).
3. Activitatea mitotică și gradul histopatologic au prezentat o asociere semnificativă statistic în ambele grupuri, tumorile slab diferențiate (G3) fiind caracterizate prin indici proliferativi mai crescuți, ceea ce confirmă relația dintre agresivitatea tumorală și intensitatea proliferării celulare.
4. Invazia limfovasculară a fost mai frecvent identificată decât invazia perineurală, sugerând că diseminarea pe cale limfovasculară reprezintă mecanismul predominant de extensie tumorală; corelațiile directe dintre gradul histologic și tipul de invazie nu au fost semnificative statistic.
5. Influența diabetului zaharat de tip 2 s-a reflectat prin dimensiuni tumorale medii mai mari, frecvență crescută a stadiilor tumorale avansate (pT3–pT4) și a implicării limfonodale de tip pN2, precum și prin diferențe în distribuția activității mitotice, sugerând un impact al statusului metabolic asupra progresiei tumorale.

4. INFLUENȚA DIABETULUI ZAHARAT ASUPRA MICROMEDIULUI TUMORAL

Importanța acestei cercetări rezidă în înțelegerea microambianței tumorale, care influențează atât progresia cancerului mamar, cât și răspunsul la tratament. Limfocitele, macrofagele (CD68) și celulele endoteliale (CD34), ca și componente ale sistemului imun, au fost identificate drept factori locali esențiali în interacțiunea dintre tumoare și microambianță. Datele controversate atestate în literatura de specialitate, privind densitatea și distribuția acestor celulele stromale, în special în contextul modificărilor metabolice induse de DZT2, sugerează faptul că dinamica și comportamentul procesului neoplazic pot diferi semnificativ [232–234]. În acest context, angiogeneza tumorală, evidențiată prin expresia markerului CD34, precum și activitatea proinflamatorie a macrofagelor, contribuie în mod esențial la stimularea și menținerea vascularizației neoplazice. Investigarea acestor interacțiuni complexe oferă posibilitatea de a înțelege mai bine mecanismele complexe ale procesului neoplazic, inclusiv la nivel de glandă mamară.

Totuși înțelegerea mecanismelor complexe implicate necesită o evaluare inițială la nivelul stromei glandei mamare neafectate.

4.1. Identificarea expresiei CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56, CD68 în glanda mamară intactă

Prezența limfocitelor T CD3⁺ a fost determinată atât intraepitelial, precum și în stroma periductală. Astfel rezultă, că limfocitele T populează ambele zone, însă cu variații cantitative în ceea ce privește densitatea acestora. Astfel conținutul mediu al limfocitelor CD3⁺ la nivelul epitelului intraductal a constituit 21.7±18.5, cu o Me de 16. În zona periductală media acestor limfocite a fost 22.2±15.7 la o Me de 16.5%. Această similaritate (p=0.91) sugerează, că limfocitele T prezintă o distribuție similară în stroma fibroasă și în epiteliu. Cu toate acestea, în pofida distribuției globale comparabile, intervalele de variație au fost mai largi la nivelul epitelului ductal intraepitelial, unde numărul limfocitelor a variat între 0 și 55, comparativ cu zona periductală, care a prezentat o distribuție mai uniformă, cu valori cuprinse între 14 și 54.

În cazul limfocitelor T helper CD4⁺, conținutul mediu a fost de 8.5±6 (Me=8) la nivelul epitelului ductal și comparativ cu 20.2±8.1 (mediana=21) în stroma periductală. Intervalele de variație ale limfocitelor CD4⁺ au fost de 2–16 în epitelul ductal și de 8–28 în stroma conjunctivă periductală. Datele în cauză sugerează că celulele CD4⁺ constituie populația predominantă a infiltratului limfocitar din jurul ductelor. Analiza comparativă a conținutului a evidențiat o densitate semnificativ mai mare de limfocite CD4⁺ în stroma periductală (p=0.011).

La analiza distribuției limfocitelor T supresoare CD8⁺ am determinat un conținut practic similar (p=0.25) în zonele intraepitelială (10.8±6.7, Me=11.5) și periductală (10.2±5.6, Me=8.5).

În ceea ce privește limitele fluctuațiilor numerice, acestea au variat între 2 – 18 în epiteliu și 4 – 17 în zona periductală. Astfel datele sugerează, că populația limfocitelor T CD8⁺ este identică în ambele compartimente histologice analizate, fără o preferință regională evidentă.

Evaluarea expresiei markerului CD34 a fost necesară pentru determinarea gradului de vascularizare în diferite regiuni ale parenchimului mamar. La nivelul epiteliului ductal nu au fost determinate celule CD34⁺, aceea ce sugerează lipsa vascularizării și/sau celulelor stem în această regiune. În schimb, în zona periductală, densitatea medie a vaselor de sânge a fost de 24.8±11.2 (Me=21), indicând la o vascularizare activă și variabilă. Densitatea vasculară în această zonă a variat de la un minim de 16 până la un maxim de 45 vase CD34⁺. Analiza comparativă a conținutului a evidențiat o diferență statistică evidentă între cele două regiuni (p=0.001), atribuibilă absenței totale a vascularizației în epiteliul ductal. Aceste date reflectă o organizare topografică clară a rețelei vasculare, limitată la nivelul stromei periductale.

Analiza expresiei markerului CD45 a fost realizată în vederea evaluării densității infiltratului leucocitar în diferite regiuni ale parenchimului mamar. Intraepitelial, densitatea medie a celulelor CD45⁺ a constituit 30.3±14.2 (Me=31.5), cu variații numerice cuprinse între 13 și 48. În schimb, în zona periductală, densitatea medie a acestor celule a fost de 36.2±13.1 (Me=34.5), cu valori cuprinse între 21 și 60 de celule. Rezultatele obținute sugerează un conținut aparent mai crescut de leucocite la nivel periductal. Totuși, analiza comparativă între cele două compartimente nu a evidențiat o diferență statistic semnificativă (p=0.48), ceea ce indică faptul că variațiile observate pot fi atribuite unei dispersii naturale și nu unei diferențe sistematice. Astfel, distribuția leucocitară rămâne relativ omogenă între compartimentele examinate (Figura 7).

Evaluarea expresiei markerului CD56 a fost necesară pentru vizualizarea celulelor NK. Esecurile imunohistochimice au permis să stabilim, că killerii naturali populează zonele intraepiteliale, numeric constituind 15.3±11.7 (Me=14.5), variind în limitele 0 – 27. Totodată, numărul acestora în stroma periductală a fost evaluat la 5.5±3.7 (Me=6), cu variații numerice între 1 – 11. Aceste rezultate indică la o necesitate sporită a controlului epitelial de către celulele NK. Totuși, analiza comparativă nu a evidențiat diferențe statistic semnificative între cele două compartimente (p=0.14), fapt ce poate fi atribuit variabilității largi a valorilor, cuprinse între 0 și 27 la nivel epitelial.

Markerul CD68 a fost utilizat pentru a pune în evidență macrofagele. Deși acestea sunt în mod clasic considerate celule rezidente ale țesutului conjunctiv, în studiul de față au fost identificate în ambele compartimente analizate, inclusiv la nivel intraepitelial. Astfel, în stroma periductală densitatea medie a constituit 29.5±10.3 (Me=29), conținutul variind între 16 și 41 celule. Totodată, în epiteliu au fost determinate 11.8±8.1 (Me=12.5) celule CD68⁺, conținutul numeric oscilând de la null la 24.

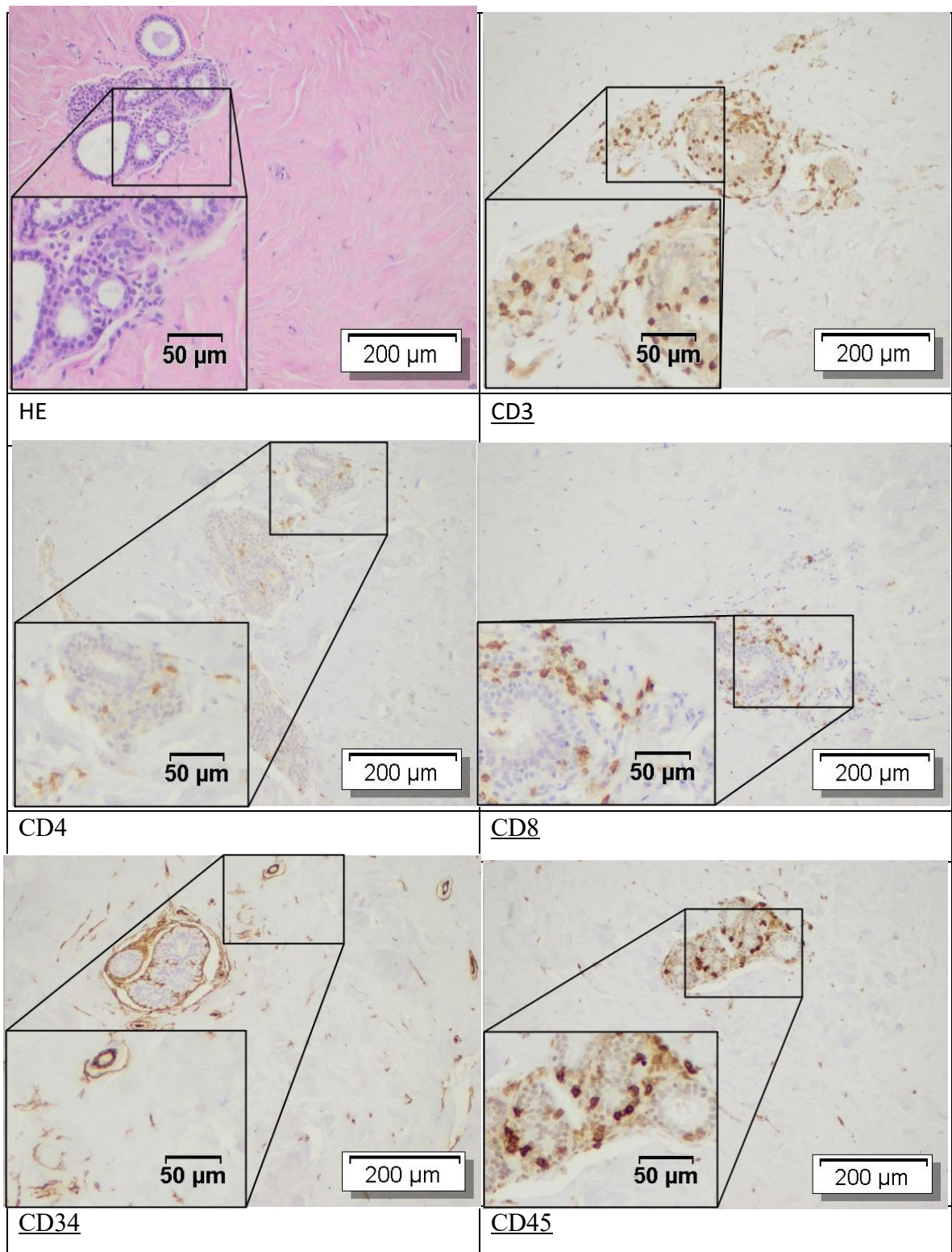


Figura 7. Imagini reprezentative (H&E și IHC: CD3, CD4, CD8, CD34, CD45) în glanda mamară intactă.

Notă. Secțiuni din glanda mamară intactă, CD3, CD4 și CD8 evidențiază limfocite T rare, predominant periductal/ perilobular; CD45 marchează leucocite rare, dispersate; CD34 evidențiază endoteliul vascular al capilarelor și venulelor din stromă.

Colorații: HE, IHC (contracolorare cu hematoxilină Lille), (20x).

Analiza comparativă de distribuție între cele două compartimente nu a evidențiat diferențe statistice semnificative ($p=0.33$). Astfel, deși datele indică o densitate mai mare a macrofagelor în stroma

periductală, aceste rezultate trebuie interpretate cu prudență și nu permit formularea unei concluzii statistice robuste (Figura 8).

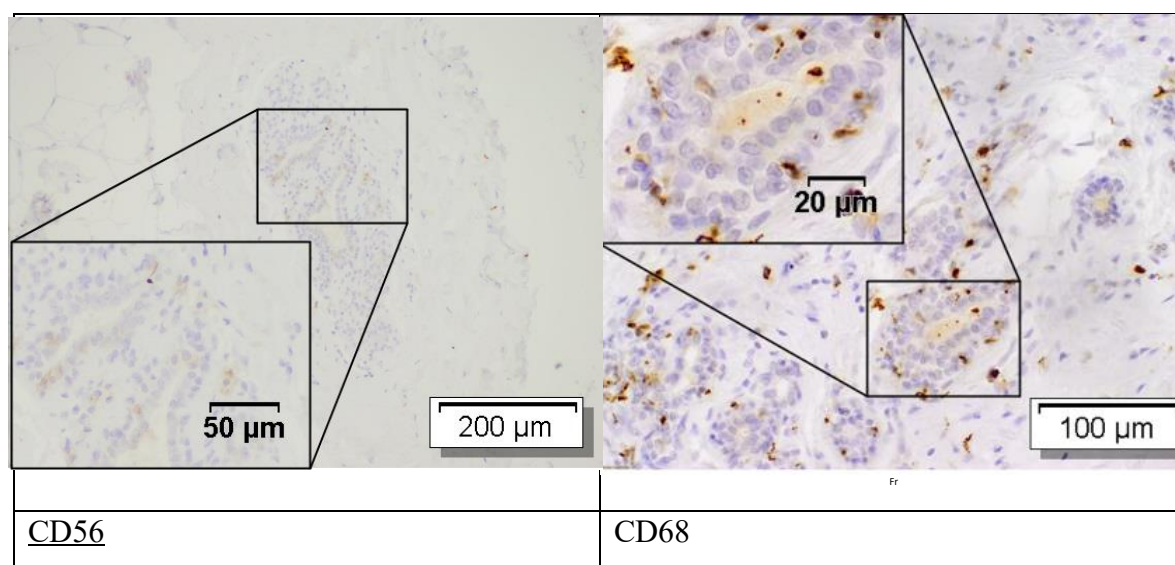


Figura 8. Imagini IHC reprezentative pentru CD56 și CD68 în glanda mamară intactă. Notă. Secțiuni din glanda mamară intactă la CD68 evidențiază macrofage rare, dispersate în stromă și ocazional periductal/ perilobular. CD56 marchează celule NK izolate, fără agregate, predominant stromal/perivascular. Colorație IHC, contracolorare cu hematoxilină Lille (20x).

4.2. Evaluarea imunității celulare locale și a potențialului angiogen în stroma tumorilor de tip NST

Analiza expresiei markerului CD3 în carcinomul mamar a evidențiat variații semnificative ale densității limfocitelor T în funcție de localizarea acestora în parenchimul tumoral. Totodată, la omogenizarea datelor am exclus un caz, care prezenta conținut neobișnuit de mare de limfocite intratumorale CD3⁺ (CD3it=62). Această ajustare a fost necesară pentru a asigura acuratețea statistică și a evita distorsionarea mediei și SD. Astfel rezultatele obținute au constituit 25.1 ± 15.6 . Analizele statistice au relevat existența unor corelații de intensitate moderată între densitatea limfocitelor T la nivel intra- și peritumoral și un set de parametri clinici și clinico-patologici, incluzând gradul tumoral, statusul receptorilor hormonali, indicele proliferativ, nivelul glicemiei, precum și alți factori relevanți evaluați în cadrul studiului. Totodată, circa 16.7 ± 14.8 limfocite CD3 pozitive (Me=14.5) au fost depistate printre celulele canceroase, numeric variind de la 0 la 57. În contrast, densitatea limfocitelor T din zona peritumorală (CD3pt) a fost de 33.6 ± 16.3 (Me=29), cu variații numerice cuprinse între 6 și 72 de celule. Rezultatele obținute susțin ipoteza conform căreia limfocitele T infiltrează cu predilecție stroma peritumorală (Figura 9). Analiza comparativă a densității acestor celule între compartimentele intra- și peritumoral a evidențiat diferențe statistic semnificative ($p=0.05$). Analiza asocierii dintre densitatea limfocitelor T intratumorale (CD3it) și gradul atipiei nucleare a indicat absența unei corelații statistic semnificative, deși valorile obținute s-au situat în proximitatea pragului de semnificație ($r_s=0.08$; $p=0.34$). În schimb, densitatea peritumorală a limfocitelor T CD3⁺ a prezentat asocieri pozitive cu

indicele de proliferare ($r_s=0.32$, $p=0.05$).

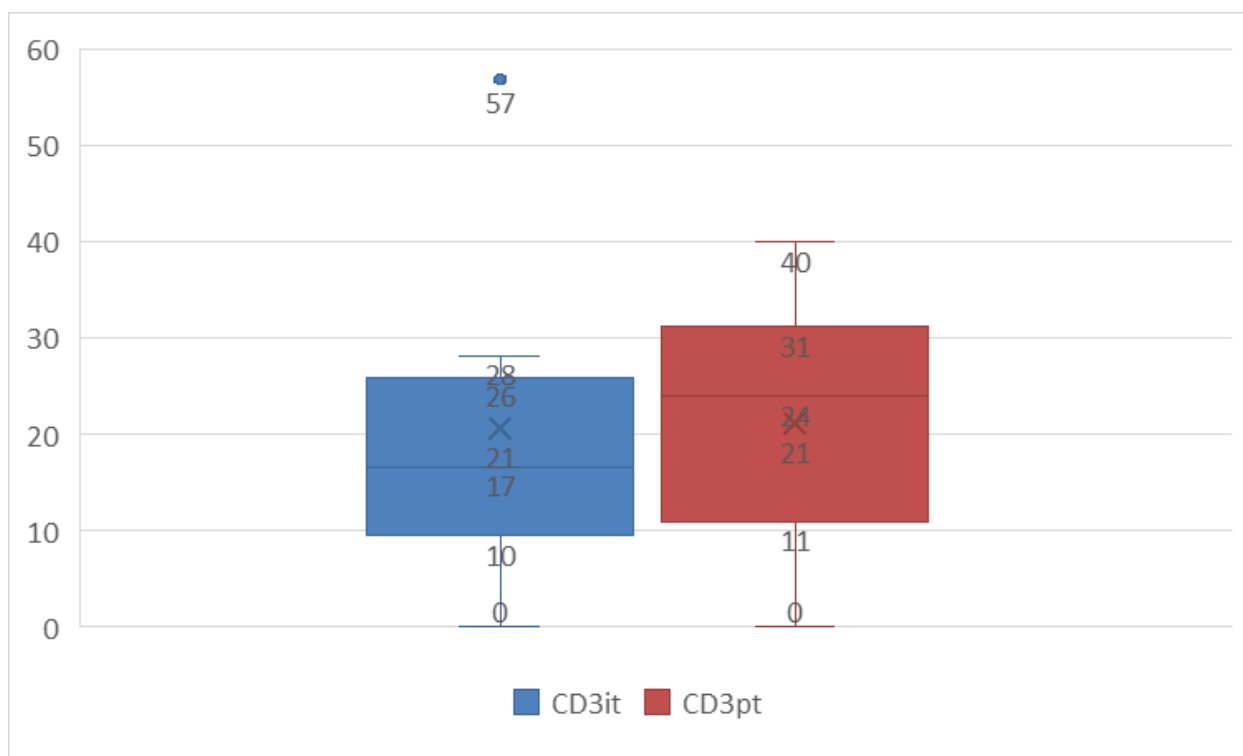


Figura 9. Repartizarea limfocitelor CD3⁺ în carcinomul mamar.

Notă. Se evidențiază o densitate semnificativ mai crescută a limfocitelor T CD3⁺ în stroma peritumorală comparativ cu zona intratumorală ($p=0.05$), sugerând o infiltrare preferențială în jurul tumorii.

Analiza expresiei markerului CD3 în carcinoamele mamare a evidențiat asocieri de intensitate variabilă cu diferite caracteristici tumorale, atât la nivel intratumoral, cât și peritumoral (*Anexa 1*). La nivel intratumoral, densitatea limfocitelor T CD3⁺ a prezentat o corelație inversă semnificativă cu indicele de proliferare tumorală Ki67 ($r_s=-0.37$; $p=0.02$), sugerând că tumorile cu activitate proliferativă redusă sunt asociate cu un infiltrat imun mai accentuat, în timp ce un conținut crescut de limfocite T CD3⁺ în stroma tumorală se corelează cu o proliferare tumorală diminuată. În contrast, densitatea peritumorală a limfocitelor T CD3⁺ a prezentat o corelație pozitivă semnificativă cu activitatea proliferativă tumorală evaluată prin Ki67 ($r_s=0.35$; $p=0.03$). Aceste rezultate sugerează că un infiltrat peritumoral mai dens de limfocite poate fi asociat cu o activitate mitotică crescută, indicând posibilitatea ca, în anumite contexte biologice, limfocitele T să contribuie la susținerea proliferării tumorale prin mecanisme paracrine la nivelul stromei peritumorale. De asemenea, a fost identificată o corelație negativă semnificativă între densitatea limfocitelor T CD3⁺ din stroma peritumorală și vârsta pacienților ($r_s=-0.45$; $p=0.01$), sugerând o diminuare a capacității de infiltrare a celulelor T odată cu înaintarea în vârstă.

Analiza expresiei markerului CD4 a permis cuantificarea și determinarea distribuției limfocitelor T helper. De menționat că densitatea limfocitelor T helper a prezentat o variabilitate largă, cu valori cuprinse între 0 și 62 de celule la nivel intraepitelial, respectiv între 0 și 47 de

celule în compartimentul peritumoral (Figura 10). La nivel intratumoral, densitatea limfocitelor T CD3⁺ a prezentat o corelație inversă semnificativă cu indicele de proliferare tumorală Ki67 ($r_s=-0.37$; $p=0.02$), sugerând că tumorile cu activitate proliferativă redusă sunt asociate cu un infiltrat imun mai accentuat, în timp ce un conținut crescut de limfocite T CD3⁺ în stroma tumorală se corelează cu o proliferare tumorală diminuată. În contrast, densitatea peritumorală a limfocitelor T CD3⁺ a prezentat o corelație pozitivă semnificativă cu activitatea proliferativă tumorală evaluată prin Ki67 ($r_s=0.35$; $p=0.03$). Aceste rezultate sugerează că un infiltrat peritumoral mai dens de limfocite poate fi asociat cu o activitate mitotică crescută, indicând posibilitatea ca, în anumite contexte biologice, limfocitele T să contribuie la susținerea proliferării tumorale prin mecanisme paracrine la nivelul stromei peritumorale de asemenea, a fost identificată o corelație negativă semnificativă între densitatea limfocitelor T CD3⁺ din stroma peritumorală și vârsta pacienților ($r_s=-0.45$; $p=0.01$), sugerând o diminuare a capacității de infiltrare a celulelor T odată cu înaintarea în vârstă.

Analiza expresiei markerului CD4 a permis cuantificarea și determinarea distribuției limfocitelor T helper. De menționat că densitatea limfocitelor T helper a prezentat o variabilitate largă, cu valori cuprinse între 0 și 62 de celule la nivel intraepitelial, respectiv între 0 și 47 de celule în compartimentul peritumoral.

În etapa următoare a studiului, a fost analizată influența factorilor clinico-patologici asupra conținutului de limfocite T helper, datele rezultate fiind sintetizate în *Anexa 2*. Trebuie de menționat faptul, că densitatea numerică a limfocitelor CD4⁺ a prezentat o corelație statistic semnificativă cu vârsta pacienților ($r_s=0.36$, $p=0.03$), ceea ce sugerează că odată cu înaintarea în vârstă, se conturează o tendință de creștere a infiltrării limfocitelor T helper rândul celulelor maligne. Densitatea numerică a limfocitelor CD4⁺ în zona peritumorală, nu a prezentat o asociere statistic semnificativă cu vârsta pacienților.

CD8. Analiza expresiei acestui marker în carcinoamele mamare a permis cuantificarea limfocitelor T citotoxice (CD8⁺) în funcție de localizarea acestora în compartimentele tumoral și peritumoral. Evaluările statistice au evidențiat că densitatea numerică a CD8⁺ este semnificativ mai mare în zona peritumorală (29.4 ± 15.2 , Me=28) comparativ cu cea intratumorală (17.5 ± 13.4 , Me=14) diferența fiind statistic semnificativă ($p=0.0005$).

Trebuie de menționat că numărul limfocitelor CD8⁺ a prezentat o variabilitate largă, cu valori cuprinse între 0 – 57 la nivel intraepitelial și între 7 și 66 în compartimentul peritumoral (Figura 11). Densitatea numerică intratumorală a limfocitelor CD8⁺ s-a dovedit a fi dependentă de infiltrarea limfocitară periferică, fapt susținut de o corelație pozitivă, statistic semnificativă ($r_s=0.68$; $p=0.001$).

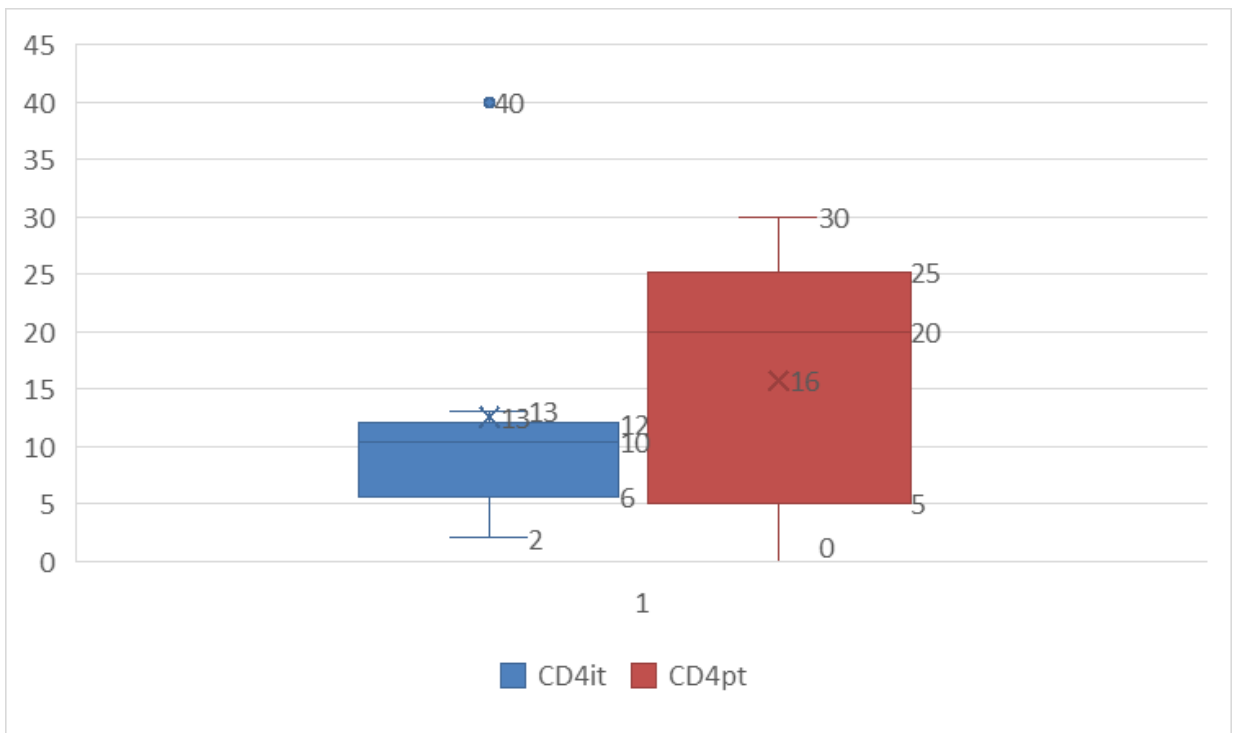


Figura 10. Repartizarea limfocitelor CD4⁺ în carcinomul mamar.

Notă. Graficul ilustrează distribuția limfocitelor T helper CD4⁺ în compartimentele intratumoral și peritumoral. Se observă o densitate numerică mai crescută a limfocitelor CD4⁺ la nivel peritumoral (20.3 ± 13.7 ; Me=20) comparativ cu zona intratumorală (10.4 ± 9.6 ; Me=8), diferența fiind statistic semnificativă ($p=0.04$). Aceste rezultate indică o acumulare preferențială a limfocitelor T helper în stroma peritumorală.

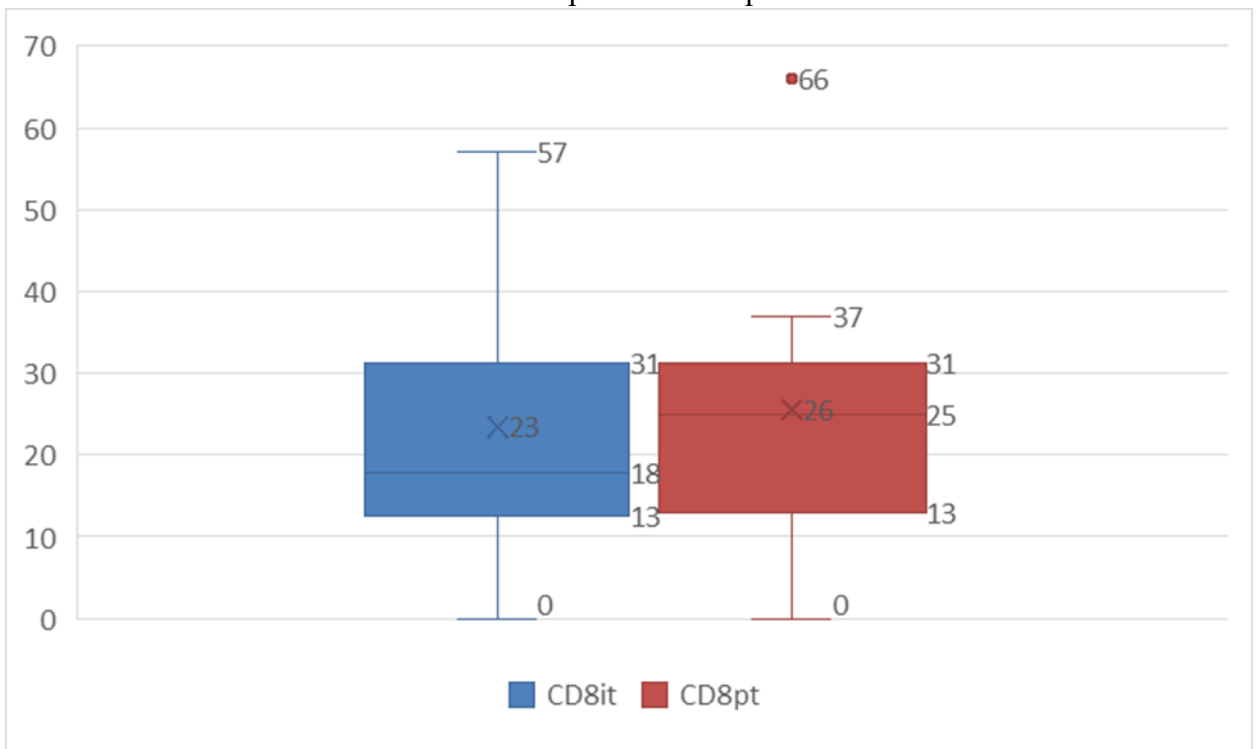


Figura 11. Repartizarea limfocitelor T citotoxice CD8⁺ în carcinomul mamar.

Notă. Se evidențiază un conținut semnificativ mai înalt al limfocitelor T citotoxice/supresoare CD8⁺ în stroma peritumorală (29.4 ± 15.2 ; Me=28) comparativ cu zona intratumorală (17.5 ± 13.4 ; Me=14) ($p=0.0005$), sugerând o infiltrare preferențială peritumorală.

Analiza statistică a expresiei markerului CD8 în raport cu factorii clinico-patologici ai tumorii este prezentată detaliat în *Anexa 3*. Rezultatele au evidențiat o variabilitate numerică semnificativă a parametrilor analizați. Astfel, densitatea numerică a limfocitelor CD8⁺ intratumorale s-a asociat semnificativ cu nivelul seric al glucozei, evidențiindu-se o corelație pozitivă, statistic semnificativă ($r_s=0.37$; $p=0.02$). De asemenea, densitatea numerică a limfocitelor CD8⁺ intratumorale a prezentat o corelație pozitivă cu densitatea limfocitelor CD4 din zona peritumorală ($r_s=0.30$, $p=0.05$). În ceea ce privește limfocitele CD8⁺ din zona peritumorală (CD8pt), densitatea numerică a acestora a prezentat o corelație pozitivă, statistic semnificativă, atât cu expresia receptorului pentru ER ($r_s=0.33$, $p=0.04$), cât și cu expresia markerului HER2 ($r_s=0.33$, $p=0.04$).

CD34. Analiza expresiei markerului CD34 în carcinoamele mamare a permis determinarea diferențelor în distribuția vascularizației dintre zona intratumorală și stroma peritumorală. Cuantificarea densității microvasculare a evidențiat valori semnificativ mai crescute în zona peritumorală (14 ± 8.5 ; Me=14) comparativ cu compartimentul intratumoral (10.5 ± 8.3 ; Me=9), diferența fiind statistic semnificativă ($p=0.003$) (Figura 12). Densitatea numerică a vaselor a prezentat o variabilitate largă în ambele compartimente analizate, cu valori cuprinse între 0 și 30 în zona intratumorală și între 2 și 45 în stroma peritumorală. Analiza corelațională a evidențiat o asociere pozitivă, de intensitate moderată, între densitatea microvasculară intratumorală (CD34it) și cea peritumorală (CD34pt) ($r_s=0.64$; $p=0.002$). Această asociere sugerează o relație strânsă între vascularizația intratumorală și cea peritumorală.

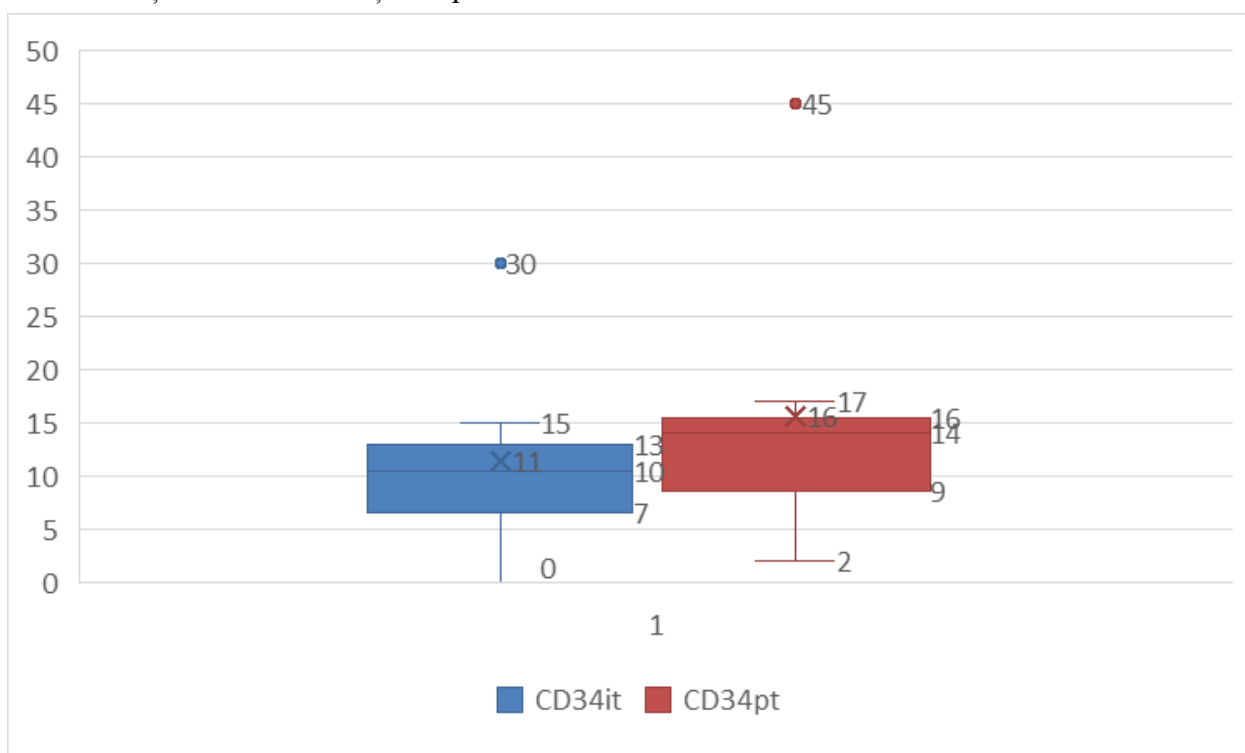


Figura 12. Distribuția densității microvasculare (CD34) în carcinomul mamar.
 Notă. Densitatea microvasculară evaluată prin CD34 este mai mare în compartimentul peritumoral comparativ cu cel intratumoral (14 ± 8.5 ; Me=14 vs $10,5 \pm 8,3$; Me=9).

Analiza expresiei markerului CD34 a evidențiat asocieri de intensitate variabilă cu diverși factori clinico-patologici (*Anexa 4*), atât în zona tumorală (CD34it), cât și în cea peritumorală (CD34pt). În stroma tumorală (CD34it), densitatea vasculară a demonstrat o corelație pozitivă statistic semnificativă cu indicele proliferativ Ki67 ($r_s=0.49$, $p=0.001$), sugerând o asociere între activitatea proliferativă tumorală crescută și intensificarea vascularizației. De asemenea, conținutul de vase a corelat pozitiv cu stadiul tumoral pT ($r_s=0.54$, $p=0.001$), indicând o creștere a vascularizației odată cu avansarea tumorii. În plus, a fost evidențiată o corelație pozitivă de intensitate moderată între densitatea microvasculară intratumorală și invazia limfovaculară ($r_s=0.34$, $p=0.03$), sugerând o asociere între intensificarea neoangiogenezei intratumorale și potențialul de diseminare tumorală.

Pe de altă parte, la nivelul stromei peritumorale (CD34pt), corelațiile identificate au fost de sens negativ și nu au atins pragul de semnificație statistică. Astfel, a fost evidențiată o corelație negativă de intensitate moderată între densitatea microvasculară peritumorală și vârsta pacientelor, situată în proximitatea pragului de semnificație statistică ($r_s=-0.30$; $p=0.06$), sugerând o tendință de reducere a vascularizației peritumorale odată cu înaintarea în vârstă. De asemenea, a fost observată o asociere negativă între densitatea CD34pt și intensitatea scorului Allred pentru receptorii de estrogen (ERis) ($r_s=-0.28$, $p=0.07$), ceea ce indică la o potențială legătură dintre vascularizația peritumorală și expresia receptorilor hormonal.

CD45. Analiza expresiei markerului CD45 în carcinoamele mamare a pus în evidență diferențe notabile a conținutului celulelor CD45 pozitive între compartimentele intratumoral (CD45it) și peritumoral (CD45pt).

În stroma tumorală (CD45it), numărul mediu al leucocitelor a constituit 40.5 ± 29 (CI95%), ceea ce sugerează o distribuție eterogenă a infiltratului leucocitar la nivel intratumoral. În contrast, în stroma peritumorală (CD45pt), densitatea medie a celulelor CD45⁺ a fost semnificativ mai mare (58.7 ± 29.6 , CI95%) ($p=0.01$), indicând o variabilitate relativ comparabilă, însă asociată cu o intensitate crescută a infiltratului celular în compartimentul peritumoral. Valorile mediane au evidențiat un model similar, cu o Me de 38 pentru CD45it și 57 pentru CD45pt, confirmând o tendință de acumulare mai pronunțată a fagocitelor în compartimentul peritumoral, comparativ cu cel intratumoral. Analiza intervalelor a demonstrat un spectru larg de valori, de la 0 la 147 în zona tumorală și de la 3 la 155 în stroma peritumorală, subliniind o recrutare mai intensă ($p=0.05$) a celulelor imune în jurul leziunilor tumorale (Figura 13).

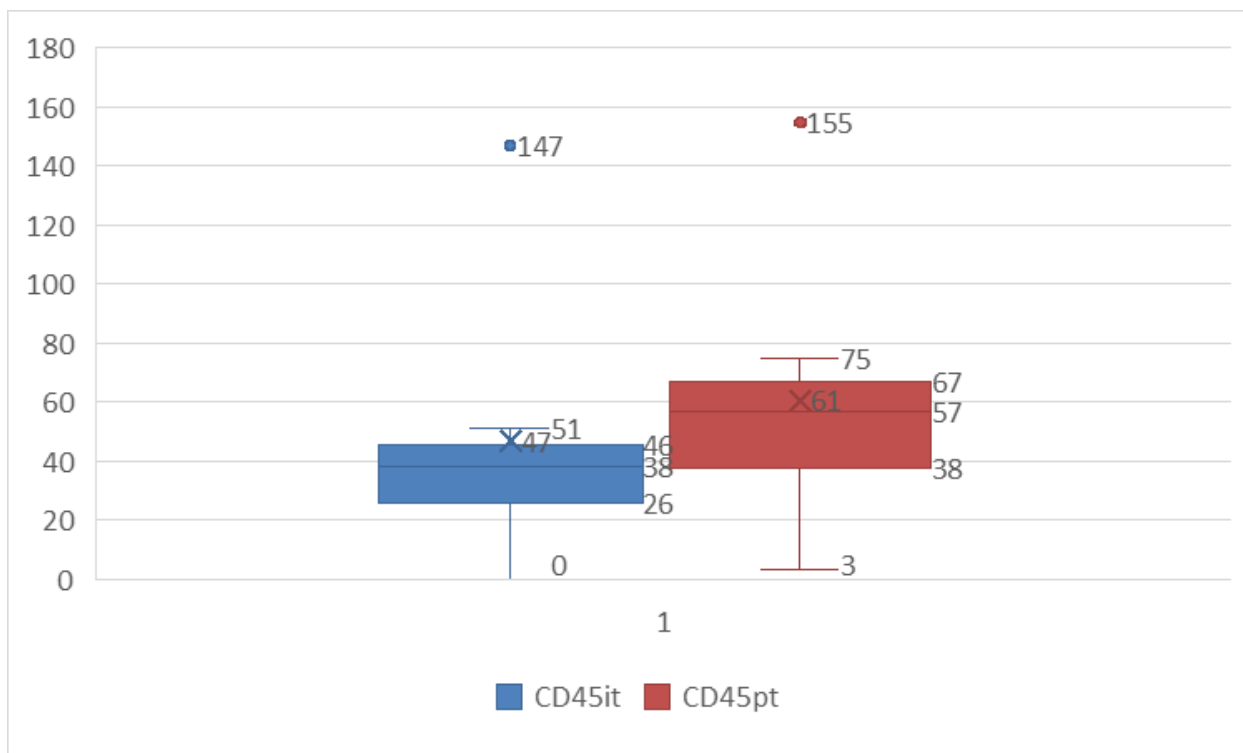


Figura 13. Repartizarea limfocitelor CD45⁺ în carcinomul mamar

Notă. Se evidențiază un conținut mediu semnificativ mai înalt al celulelor CD45⁺ în stroma peritumorală (58.7 ± 29.6 ; Me=57) comparativ cu zona intratumorală (40.5 ± 29 ; Me=38) ($p=0.01$), indicând o acumulare mai pronunțată a leucocitelor în jurul tumorii.

Analiza statistică a evidențiat o corelație pozitivă moderată și semnificativă între densitatea celulelor CD45it și CD45pt ($r_s=0.43$, $p=0.01$), sugerând existența unei interdependențe între infiltratul leucocitar intratumoral și cel peritumoral. Totodată, densitatea celulelor CD45⁺ în stroma peritumorală a demonstrat o corelație pozitivă de intensitate moderată, cu prezența invaziei limfovaskulare ($r_s=0.34$, $p=0.03$).

Analiza expresiei markerului CD45 în carcinoamele mamare a pus în evidență un șir de asocieri cu factorii clinico-patologici din ambele zone studiate (*Anexa 5*). În stroma tumorală (CD45it), densitatea leucocitelor a corelat pozitiv cu dimensiunea tumorii (pT) ($r_s=0.54$, $p=0.001$). De asemenea, a fost evidențiată o corelație pozitivă de intensitate moderată între densitatea celulelor CD45it și indicele de proliferare celulară Ki67 ($r_s=0.49$, $p=0.001$), sugerând că tumorile cu activitate proliferativă crescută sunt asociate cu un infiltrat leucocitar intratumoral mai abundent.

În zona peritumorală (CD45pt), densitatea leucocitelor CD45⁺ nu a prezentat asocieri semnificative statistic cu parametrii clinico-patologici analizați.

CD56. Analiza expresiei markerului CD56 a evidențiat o densitate medie redusă a celulelor CD56⁺ în zona intratumorală (2.5 ± 1.7), comparativ cu stroma peritumorală, unde valorile medii au fost semnificativ mai ridicate (5.0 ± 4.8) ($p=0.013$). Valorile mediane au fost de 2.5 pentru CD56it și 3.0 pentru CD56pt. Intervalele de variație au fost cuprinse între 1 și 4 pentru CD56it și 1 – 11 pentru CD56pt (Figura 14).

Analiza corelațională a demonstrat absența unei asocieri statistic semnificative între densitatea celulelor CD56⁺ din compartimentul intratumoral și cea din stroma peritumorală ($r_s=0.29$; $p=0.126$). Cu

toate acestea, densitatea medie mai mare a celulelor CD56⁺ în zona peritumorală (M=5) comparativ cu cea intratumorală (M=2.5) sugerează existența unei microambianțe tumorale distincte, posibil influențată de factorii locali specifici.

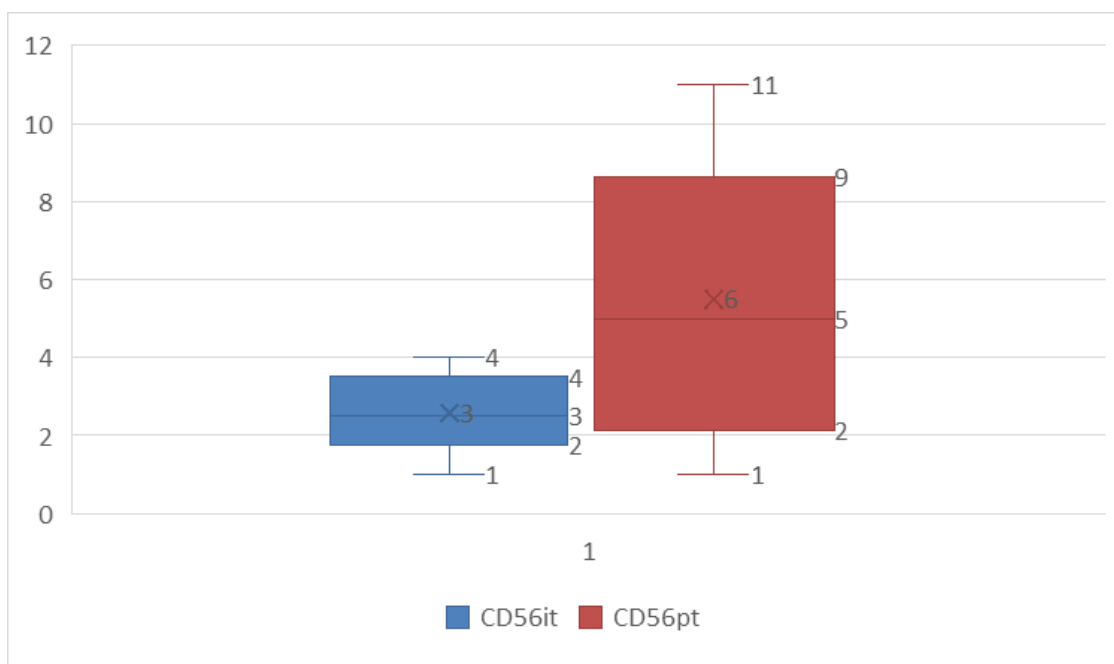


Figura 14. Repartizarea limfocitelor CD56⁺ în carcinomul mamar.

Notă. Se evidențiază o densitate semnificativ mai crescută a celulelor NK CD56⁺ în stroma peritumorală comparativ cu zona intratumorală (5.0 ± 4.8 ; Me=3.0 vs 2.5 ± 1.7 ; Me=2.5; $p=0.013$), sugerând o microambianță imună diferită, cu infiltrare preferențială peritumorală.

Analiza expresiei markerului CD56 în carcinoamele mamare a evidențiat o serie de asocieri statistice între parametrii imunohistochimici investigați, atât în compartimentul intratumoral (CD56it), cât și în stroma peritumorală (CD56pt).

În compartimentul intratumoral CD56it, densitatea celulelor CD56⁺ a prezentat o corelație pozitivă, de intensitate moderată, cu expresia markerului HER2 la nivelul celulelor tumorale ($r_s=0.36$, $p=0.03$). O asociere aflată în proximitatea pragului de semnificație statistică a fost observată între densitatea celulelor CD56it și gradul histologic Nottingham al tumorii ($r_s=0.28$, $p=0.07$), sugerând o tendință de creștere a infiltratului de celule NK odată cu accentuarea agresivității tumorale. Ipoteza conform căreia tumoarea inițiază un răspuns imun citotoxic este susținută și de observația că densitatea celulelor NK este corelată invers cu dimensiunea neoplasmului (pT), astfel odată cu avansarea în dimensiuni a tumorii, se constată o reducere a infiltratului NK în parenchimul tumoral ($r_s=-0.31$, $p=0.05$).

Spre deosebire de populația intratumorală de celule killeri naturali, densitatea celulelor CD56pt a prezentat o tendință de diminuare odată cu creșterea gradului histologic Nottingham. Este de remarcă faptul că, deși coeficientul de corelație a avut un sens negativ ($r_s=-0.28$, $p=0.07$), magnitudinea asocierii a fost comparabilă cu cea observată la nivelul compartimentului intratumoral. De menționat este faptul că, densitatea numerică a celulelor CD56pt a prezentat o

corelație pozitivă, însă ne semnificativă statistic cu expresia markerului HER2 la nivelul celulelor tumorale ($r_s=0.25$, $p=0.10$) (*Anexa 6*).

Analiza densității numerice de macrofage ($CD68^+$) în carcinoamele mamare a pus în evidență diferențe statistic semnificative ($p=0.02$) dintre zona intratumorală ($CD68it$) și stroma peritumorală ($CD68pt$). Astfel, în situsul tumoral densitatea medie a celulelor $CD68^+$ a constituit 9.5 ± 7.5 ($Me=6$, $CI95\%$: 6.3-12.7) comparativ cu stroma peritumorală, unde numărul mediu al macrofagelor a atins 12.4 ± 12.2 ($Me=11$, $CI95\%$: 7.7-17). Intervalele de valori au variat între 1 și 27 pentru $CD68it$ și 0 – 36 pentru $CD68pt$. Rezultatele obținute sugerează că în carcinomul mamar se formează o acumulare peritumorală de macrofage, cu potențial rol de barieră imună, însă probabil, puțin eficientă în limitarea progresiei tumorale (Figura 15).

Pentru a crește acuratețea analizei statistice și a reduce influența valorilor extreme, au fost excluse 12 cazuri din cohorta inițială în care nu s-au depistat celule $CD68$ pozitive. Pentru a identifica o posibilă sursă de macrofage intratumorale a fost analizată corelația statistică dintre densitatea macrofagelor $CD68^+$ din compartimentul intratumoral și cea a macrofagelor corespunzătoare din stroma peritumorală. Astfel am determinat că, odată cu creșterea infiltrației peritumorale, crește și conținutul acestora în stroma intratumorală ($r=0.40$, $p=0.02$).

Conținutul numeric al celulelor $CD68$ pozitive a fost dependent de diverse caracteristici ale tumorii, la nivelul ambelor situsuri studiate (*Anexa 7*). În stroma tumorală ($CD68it$), conținutul macrofagelor a corelat pozitiv și semnificativ statistic cu activitatea mitotică ($r_s=0.33$, $p=0.04$) și dimensiunea tumorii (pT) ($r_s=0.51$, $p=0.001$). Aceste date permit să presupunem că, odată cu creșterea agresivității tumorii și dimensiunilor sale concentrația macrofagelor recrutate de stimulul antigenic crește proporțional. În susținerea acestei ipoteze analiza statistică a evidențiat o corelație negativă între numărul celulelor $CD68^+$ și capacitatea tumorii de a forma structuri tubulare (Ft) ($r_s=-0.32$, $p=0.05$).

Rezultate asemănătorii au fost determinate și în cazul stromei peritumorale ($CD68pt$), unde conținutul macrofagelor a prezentat asocieri semnificativ statistice cu activitatea mitotică ($r_s=0.44$, $p=0.01$), subliniind faptul că prezența unui infiltrat peritumoral poate fi un indice că tumoarea este una agresivă. Rezultate similare au fost obținute și la nivelul stromei peritumorale ($CD68pt$), unde conținutul macrofagelor a prezentat o asociere pozitivă, semnificativă statistic, cu activitatea mitotică ($r_s=0.44$; $p=0.01$). În susținerea acestei ipoteze, analiza statistică a evidențiat că nivelul celulelor $CD68^+$ din stroma peritumorală se asociază pozitiv atât cu dimensiunea tumorii ($r_s=0.33$; $p=0.04$), cât și cu activitatea proliferativă evaluată prin indicele Ki67 ($r_s=0.31$; $p=0.05$). Trebuie de menționat, că odată cu creșterea nivelului de expresie a markerului HER2 de către celulele tumorale, se constată o creștere a numărului de macrofage crește, asociere evidențiată statistic ($r_s=0.34$, $p=0.04$).

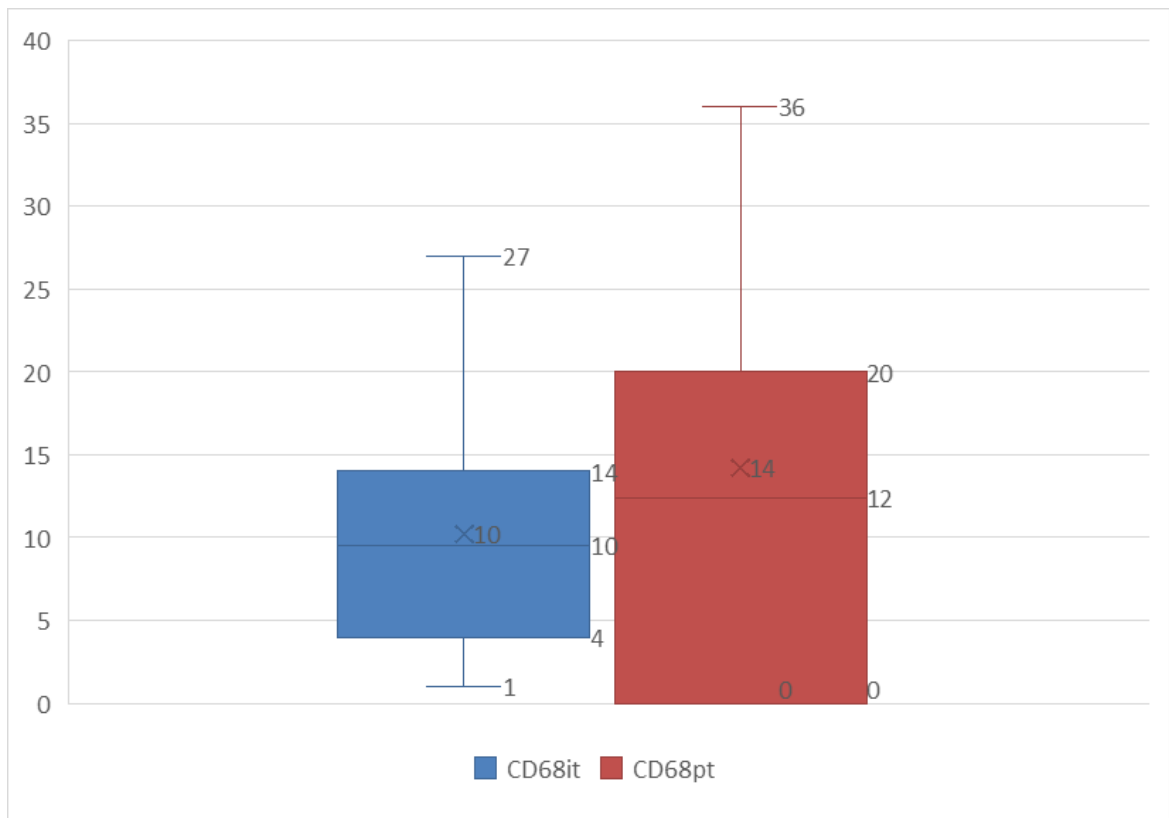


Figura 15. Repartizarea limfocitelor CD68⁺ în carcinomul mamar

Notă. Se evidențiază o densitate semnificativ mai crescută a macrofagelor CD68⁺ în stroma peritumorală (12.4 ± 12.2 ; Me=11) comparativ cu zona intratumorală (9.5 ± 7.5 ; Me=6), cu o diferență statistic semnificativă ($p=0.02$), sugerând formarea unei bariere peritumorale din macrofage.

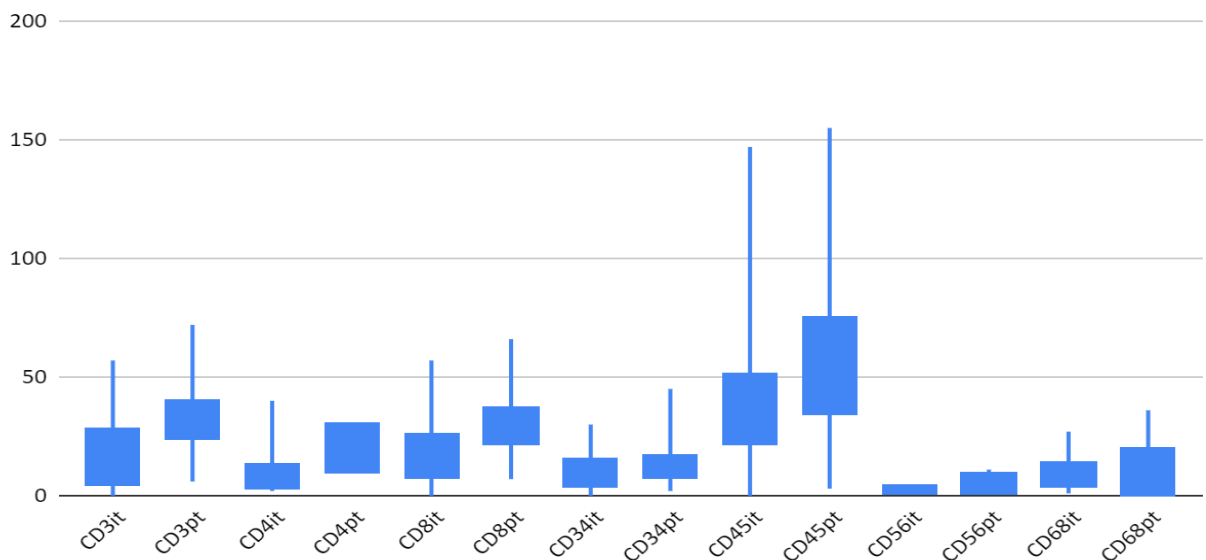


Figura 16. Repartizarea numerică a principalelor subpopulații celulare imunofenotipice în carcinomul mamar.

Notă: graficul ilustrează distribuția numerică a celulelor CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD56⁺ și CD68⁺ la nivel intratumoral (it) și peritumoral (pt). Pentru majoritatea markerilor analiza descriptivă evidențiază valori mai ridicate ale parametrilor de tendință centrală și o variabilitate crescută în compartimentul peritumoral comparativ cu cel intratumoral.

4.3. Caracteristica cantitativă a markerilor vizați în carcinomul mamar asociat cu DZT2

Analiza conținutului celulelor CD3⁺ nu a evidențiat diferențe semnificative între zona intratumorală (CD3it) și stroma peritumorală (CD3pt) (p=0.98). Astfel, conținutul celulelor T în zona intratumorală (CD3it) a variat în limitele de 17.9±15.9 (CI95%: 12.0- 23.8), în timp ce în stroma peritumorală (CD3pt) s-a înregistrat o valoare medie de 35.7±18.9 (CI95%: 28.4-43).

Valorile mediane au fost de 19 pentru CD3it și 31 pentru CD3pt, ceea ce sugerează o prezență mai intensă a celulelor T în jurul tumorii. Intervalele de valori au variat între 0 și 48 pentru CD3it și între 5 și 71 pentru CD3pt, reflectând o heterogenitate mai pronunțată a infiltrării peritumorale (Figura 17). Populația numerică a celulelor T din zona intratumorală (CD3it) a demonstrat dependențe numerice cu cea din stroma peritumorală (r_s=0.4, p=0.01).

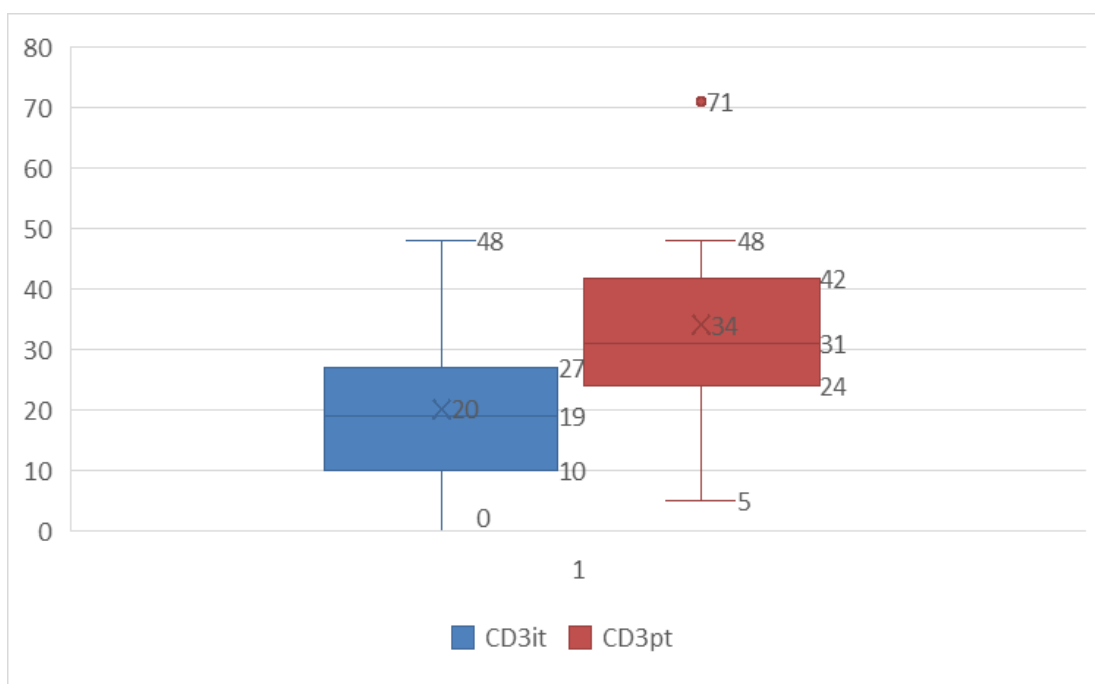


Figura 17. Repartizarea limfocitelor CD3⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.

Notă: graficul ilustrează distribuția limfocitelor T CD3⁺ în compartimentul intratumoral (CD3it) și în stroma peritumorală (CD3pt). Conținutul mediu al celulelor T în zona intratumorală a fost de 17.9±15.9 (Me=19), comparativ cu 35.7±18.9 (Me=31) în stroma peritumorală, fără diferențe semnificative statistice între cele două compartimente.

Trebuie de menționat, că numărul de limfocite T determinat în focarul tumoral (CD3it), a prezentat o corelație pozitivă și semnificativă statistic cu vârsta pacientului evaluată prin coeficientul Spearman (r_s=0.47, p=0.01). În cadrul analizei statistice a conținutului peritumoral de limfocite T (CD3pt) au fost identificate mai multe asocieri care au atins pragul de semnificație statistică.

Astfel, creșterea capacității de formare a tubulilor de către tumoare s-a asociat cu o creștere a numărului de limfocite T, evidențiată printr-o corelație pozitivă moderată (r_s=0.48; p=0.01). Totodată, concentrația limfocitelor T CD3⁺ s-a corelat pozitiv și semnificativ statistic cu scorul

Nottingham ($r_s=0.44$, $p=0.01$) și cu gradul tumoral ($r_s=0.39$, $p=0.02$). Prezența expresiei markerului HER2 a nivelului celulelor tumorale s-a asociat de asemenea cu o creștere a infiltrării limfocitelor T în stroma peritumorală, evidențiată printr-o corelație pozitivă semnificativă statistic ($r_s=0.33$, $p=0.04$). În ceea ce privește indicele de proliferare Ki67, numărul limfocitelor T a prezentat o tendință de creștere cu odată agresivitatea tumorală, însă fără atingerea pragului de semnificație statistică ($r_s=0.26$, $p=0.08$) (Anexa 9).

Limfocitele T helper. După ajustarea valorilor extreme, analiza a evidențiat faptul că densitatea limfocitelor T helper din compartimentul intratumoral (CD4it) a fost mai redusă, cu o valoare medie de 7.8 ± 5.5 (Me=6; CI95%: 5.3–10.3), comparativ cu stroma peritumorală (CD4pt), unde s-a înregistrat o medie de 14.8 ± 14.3 (Me=13; CI95%: 9.1–20.5). Această diferență a prezentat o tendință spre semnificație statistică, fără a atinge însă pragul convențional ($p=0.09$) Figura 18. Pentru a reduce influența valorilor extreme asupra distribuției și a asigura o analiză statistică mai robustă a fost efectuată o ajustare a setului de date. Astfel, au fost excluse au fost excluse 15 cazuri cu valori nule ale densității limfocitelor T helper în zona intratumorală (CD4it), precum și două cazuri cu valori extreme (40 și 58), identificate ca outlieri. O abordare similară a fost aplicată și pentru datele din stroma peritumorală, unde a fost exclus un caz cu o valoare extremă de 72 pentru CD4pt. Astfel, valorile numerice ale limfocitelor T helper din compartimentul intratumoral (CD4it) au variat între 0 și 22, și respectiv între 0 și 43 în stroma peritumorală (CD4pt), sugerând o distribuție mai eterogenă a acestora în stroma din jurul tumorii.

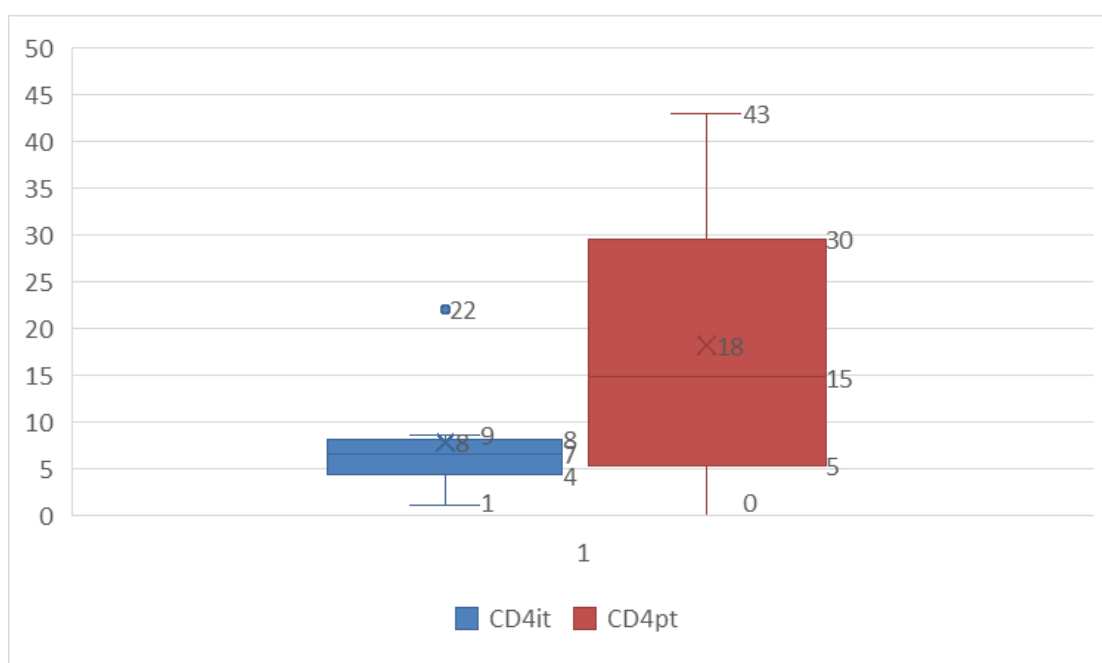


Figura 18. Repartizarea limfocitelor CD4⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.

Notă. Se observă o tendință de densitate mai crescută a limfocitelor T helper CD4⁺ în stroma peritumorală (14.8 ± 14.3 ; Me=13) comparativ cu zona intratumorală (7.8 ± 5.5 ; Me=6), fără a atinge pragul de semnificație statistică ($p=0.09$).

Analiza corelațională a evidențiat faptul că numărul limfocitelor T helper din compartimentul intratumoral nu s-a corelat semnificativ statistic cu cel al limfocitelor T helper din stroma peritumorală ($r_s=0.12$, $p=0.09$).

Evaluările statistice au demonstrat că conținutul numeric de celule $CD4^+$ este în funcție de diferiți parametri clinico-patologici, reprezentați cu lux de amănunt în *Anexa 10*. Rezultatele studiului au evidențiat o asociere între densitatea limfocitelor T helper intratumorale ($CD4it$) și profilul molecular al tumorii, exprimarea receptorilor estrogenici (ER) fiind corelată negativ cu conținutul de limfocite T helper ($r_s=-0.32$; $p=0.04$). Date asemănătoare au fost prezentate și la asocierea cu scorul Allred pentru ER ($r_s=-0.30$, $p=0.06$).

În stroma peritumorală ($CD4pt$), densitatea celulelor T helper nu a prezentat asocieri semnificative statistic cu majoritatea parametrilor clinico-patologici analizați.

Cu toate acestea, o corelație apropiată de pragul de semnificație statistică a fost observată între densitatea limfocitelor T helper din stroma peritumorală $CD4pt$ și prezența invaziei perineurale ($r_s=0.27$, $p=0.08$), sugerând o posibilă asociere între caracteristicile invazive ale tumorii și infiltrarea peritumorală cu limfocite T helper. Totodată, trebuie de menționat că densitatea celulelor $CD4^+$ din ambele zone nu a prezentat corelații semnificative statistic cu alte caracteristici tumorale, inclusiv cu parametrii de agresivitate.

Limfocite T citotoxice $CD8^+$. Analiza imunohistochimică a limfocitelor T citotoxice $CD8^+$ a evidențiat particularități distincte ale infiltrării imune în compartimentele intratumoral și peritumoral, precum și asocieri cu parametrii clinico-patologici ai tumorii. Astfel, numărul acestora în zona intratumorală a fost mai redus, cu o valoare medie de (15.2 ± 11.3 , $Me=12$, $CI95\%: 10.4-20$), comparativ cu stroma peritumorală, unde s-a înregistrat o medie de (28 ± 18.3 , $Me=25$, $CI95\%: 21-35$) diferența fiind semnificativă statistic ($p=0.02$). Intervalele de valori au variat între 0 și 40 pentru $CD8it$ și între 0 și 72 pentru $CD8pt$. Aceste date sugerează o distribuție eterogenă a celulelor $CD8^+$ în special în jurul tumorii.

Conținutul limfocitelor T $CD8^+$ din parenchimul tumoral s-a dovedit a fi dependent de populația acestora din jurul tumorii ($r_s=0.37$, $p=0.02$). Aceste rezultate sugerează, că infiltrarea limfocitelor T citotoxice nivel intratumoral ar putea fi influențată de compartimentul peritumoral, unde densitatea acestora este mai ridicată (Figura 19). Analiza corelațională a pus în evidență diverse asocieri dintre zona intratumorală ($CD8it$) și stroma peritumorală ($CD8pt$). Astfel, numărul acestor limfocite a sporit odată cu creșterea proprietăților invazive, în special cea perineurală ($r_s=0.42$, $p=0.01$). Totuși, odată cu creșterea activității mitotice a tumorii, populația T supresorilor din tumoare a diminuat ($r_s=-0.29$, $p=0.06$).

Prezența celulelor $CD8$ în stroma peritumorală nu a corelat statistic semnificativ cu caracteristicile tumorale analizate. Totuși, au fost observate asocieri apropiate de pragul de

semnificație statistică între densitatea limfocitelor T citotoxice CD8⁺ și dimensiunea tumorii (pT) ($r_s=0.25$; $p=0.10$), precum și stadiul nodal (pN) ($r_s=0.27$; $p=0.08$) (Anexa 11).

Markerul angiogenic CD34. Evaluarea expresiei markerului CD34 a permis aprecierea densității microvasculare tumorale și analiza relației acesteia cu parametrii clinico-patologici ai carcinomului mamar asociat cu DZT2. Conținutul mediu a vaselor CD34⁺ în parenchimul tumoral a constituit 12.8 ± 12.7 , cu o valoare mediană de 12.

Valorile numerice au variat între 0 și 59, reflectând grade diferite de vascularizare în carcinomul mamar. În contrast, la nivelul stromei peritumorale (CD34pt) s-a înregistrat o densitate medie mai ridicată a vaselor de sânge, de 16 ± 7.2 , cu o valoare mediană de 16, diferența față de parenchimul tumoral nu a fost semnificativă statistic ($p=0.194$). Valorile numerice au variat între 0 și 27.

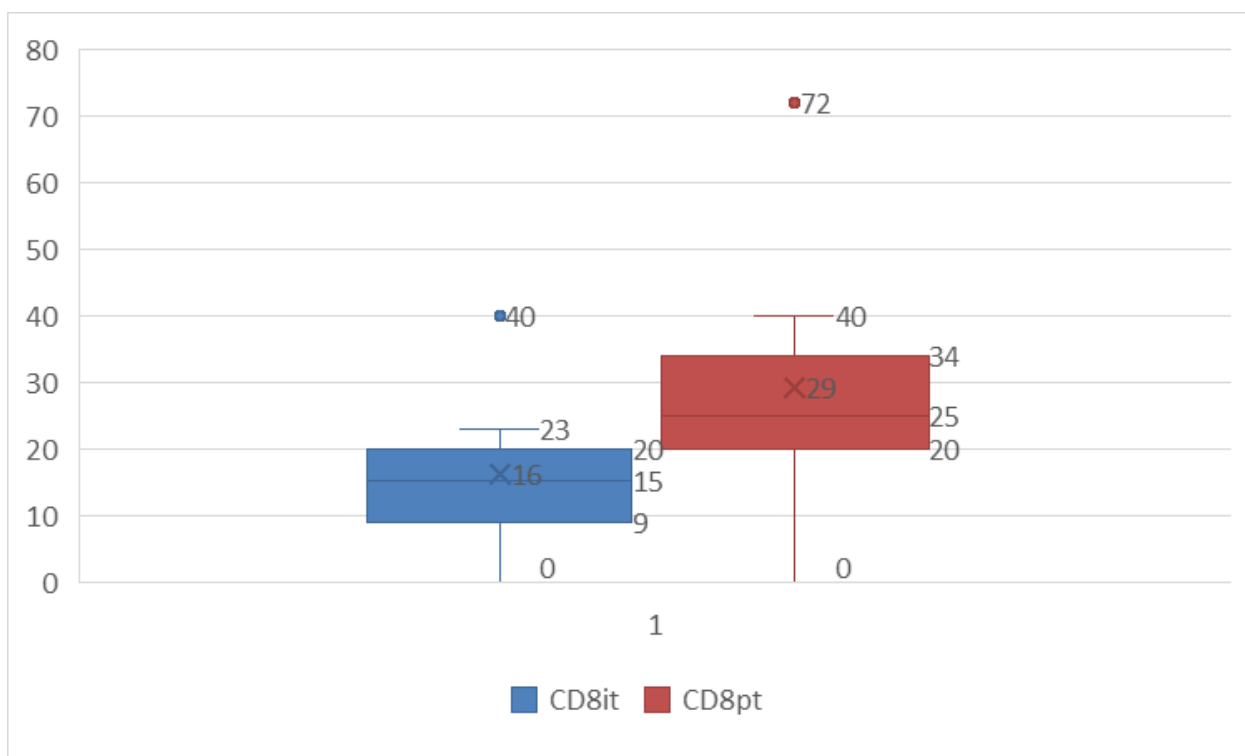


Figura 19. Repartizarea limfocitelor CD8⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.

Notă. Se evidențiază un conținut semnificativ mai înalt al limfocitelor T citotoxice/ supresoare CD8⁺ în stroma peritumorală (28 ± 18.3 ; Me=25) comparativ cu zona intratumorală (15.2 ± 11.3 ; Me=12) ($p=0.02$), sugerând o infiltrare preferențială peritumorală.

Markerul angiogenic CD34. Evaluarea expresiei markerului CD34 a permis aprecierea densității microvasculare tumorale și analiza relației acesteia cu parametrii clinico-patologici ai carcinomului mamar asociat cu DZT2. Conținutul mediu a vaselor CD34⁺ în parenchimul tumoral a constituit 12.8 ± 12.7 , cu o valoare mediană de 12.

Valorile numerice au variat între 0 și 59, reflectând grade diferite de vascularizare în carcinomul mamar. În contrast, la nivelul stromei peritumorale (CD34pt) s-a înregistrat o densitate

medie mai ridicată a vaselor de sânge, de 16 ± 7.2 , cu o valoare mediană de 16, diferența față de parenchimul tumoral nu a fost semnificativă statistic ($p=0.194$). Valorile numerice au variat între 0 și 27.

Deși din punct de vedere biologic ar putea fi anticipată o relație între vascularizația intratumorală și cea peritumorală, analiza statistică nu a evidențiat o asociere semnificativă între cele două compartimente, coeficientul de corelație fiind foarte scăzut ($r=0.023$; $p=0.194$) (Figura 20).

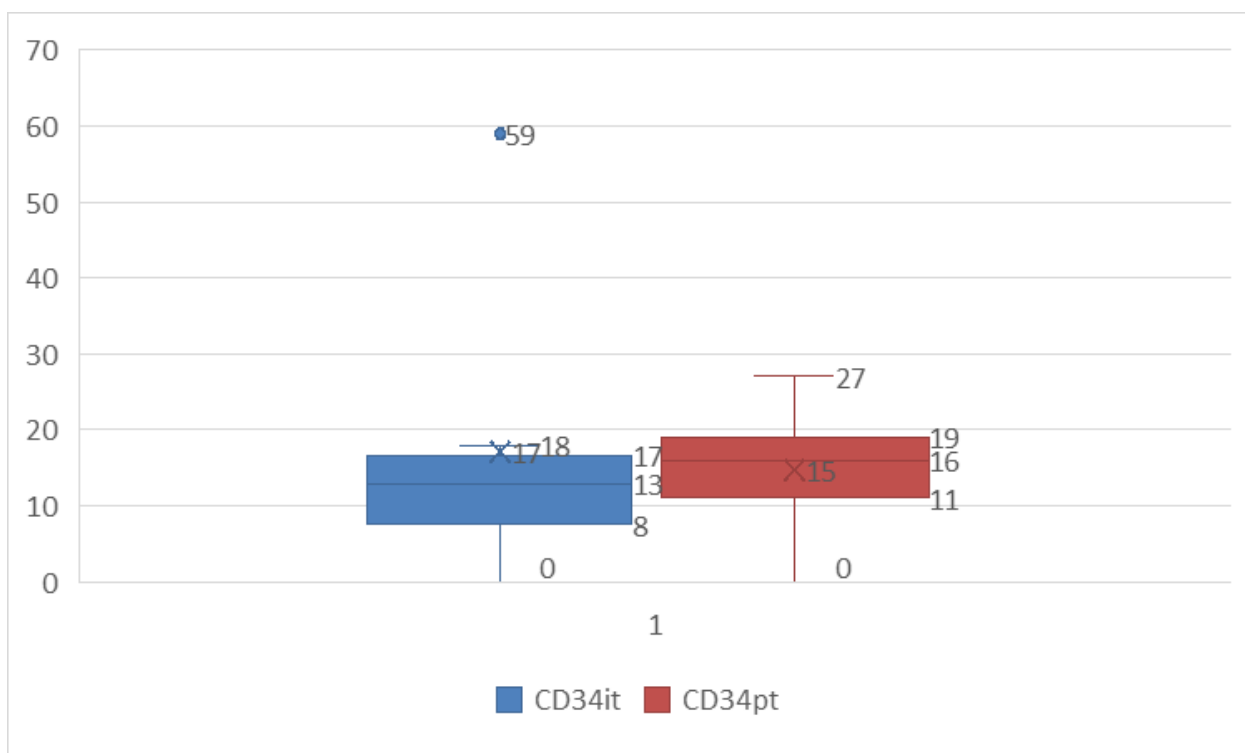


Figura 20. Distribuția densității microvasculare (CD34) în carcinom asociat cu DZT2.

Notă. Se observă o densitate medie aparent mai mare a vaselor marcate $CD34^+$ în stroma peritumorală (16 ± 7.2 ; $Me=16$) comparativ cu parenchimul intratumoral (12.8 ± 12.7 ; $Me=12$), fără diferență statistic semnificativă ($p=0.194$).

Analiza expresiei markerului CD34 a evidențiat diferențe descriptive între compartimentul intratumoral (CD34it) și stroma peritumorală (CD34pt) precum și patternuri distincte de asociere statistică în funcție de localizare. Datele analizate au evidențiat corelații negative semnificative statistic între densitatea vasculară intratumorală evaluată prin markerul CD34it și gradul tumoral ($r_s=-0.33$, $p=0.04$), scorul Nottingham ($r_s=-0.34$, $p=0.04$) precum și capacitatea tumorii de a forma tubuli (Ft) ($r_s=-0.34$, $p=0.04$).

De asemenea, densitatea vasculară intratumorală evaluată prin markerul CD34 (CD34it) s-a corelat negativ și semnificativ statistic cu indicele de proliferare Ki67 ($r_s=-0.37$, $p=0.02$).

La nivelul stromei peritumorale (CD34pt), densitatea vasculară evaluată prin markerul CD34 nu a prezentat asocieri semnificative statistic cu parametrii tumorali analizați (Anexa 12).

CD45. Rezultatele acestui studiu demonstrează că în zona intratumorală (CD45it) cantitatea numerică a leucocitelor variază în limite largi, media constituind 43.1 ± 35.1 (Me=32). Intervalul valorilor înregistrate a variat între 6 și 125, ceea ce reflectă o distribuție neuniformă a infiltrării leucocitare la nivel intratumoral. În contrast, la nivelul stromei peritumorale (CD45pt), conținutul leucocitar a fost mai crescut comparativ cu zona intratumorală, însă diferența nu a atins semnificație statistică ($p=0.126$), valorile variind în jurul mediei 50.1 ± 34.6 , cu o Me de 45. Valorile determinate la nivelul acestei zone au oscilat între 9 și 158, sugerând o infiltrare leucocitară mai intensă în stroma peritumorală comparativ cu zona intratumorală. Testele de asociere nu au atins pragul de semnificație statistică, ceea ce sugerează că nivelul infiltrării leucocitare intratumorale nu este influențat de conținutul celulelor imune omonime din stroma peritumorală ($r=0.29$, $p=0.126$) (Figura 21).

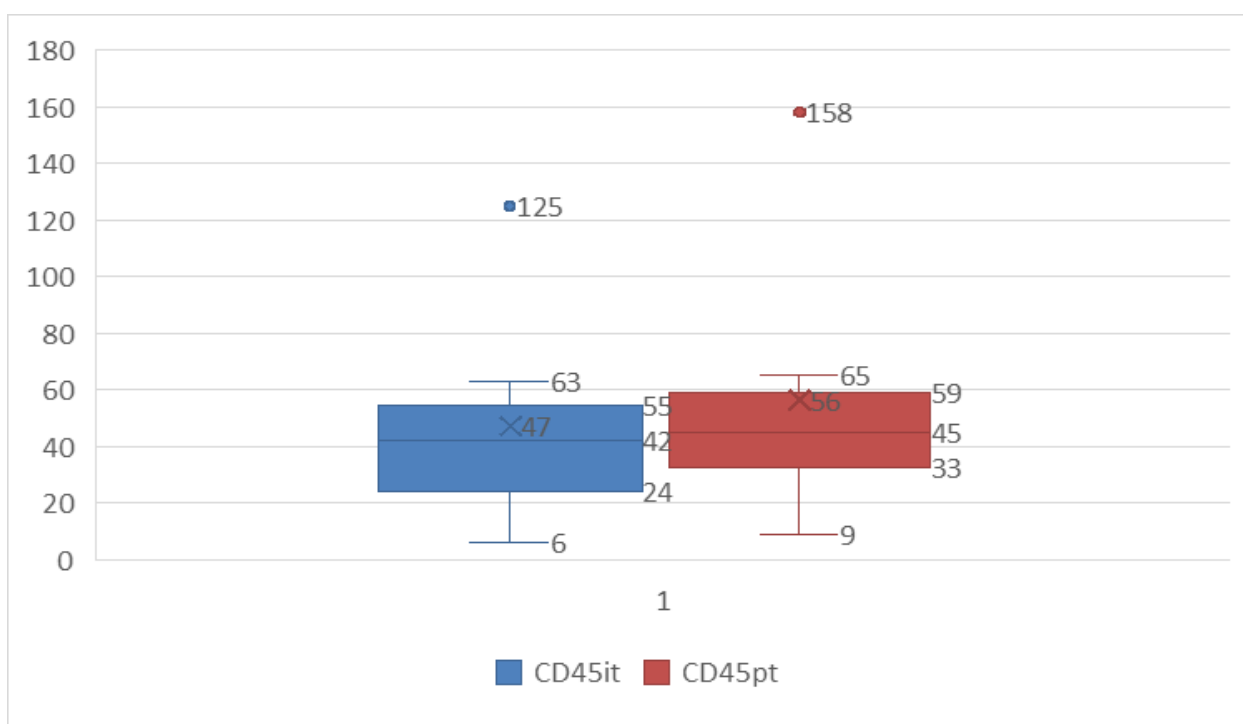


Figura 21. Repartizarea limfocitelor CD45⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.

Notă. Se observă un conținut leucocitar mediu ușor mai înalt al celulelor pan-leucocitare CD45⁺ în stroma peritumorală (50.1 ± 34.6 ; Me=45.0) comparativ cu zona intratumorală (43.1 ± 35.1 ; Me=32), fără diferență statistic semnificativă ($p=0.126$).

Totuși, trebuie de menționat că nivelul de expresie al CD45it nu a înregistrat asocieri statistic semnificative cu toți markerii și parametrii analizați. Cele mai apropiate de pragul de semnificație statistică au fost corelațiile dintre CD45pt și vârsta pacientelor ($r_s=0.37$, $p=0.02$). (Anexa 13). În contrast, conținutul celulelor CD45⁺ în stroma peritumorală (CD45pt) a înregistrat corelații pozitive semnificative cu gradul de diferențiere tumorală ($r_s=0.48$, $p=0.001$) și scorul Nottingham ($r_s=0.34$, $p=0.03$). De asemenea, au fost identificate corelații negative între CD45pt și expresia receptorilor hormonal ER și PR ($r_s=-0.41$, $p=0.01$, pentru ambii), indicând valori mai reduse ale

infiltrării leucocitare în tumorile cu fenotip luminal. Diminuarea conținutului leucocitar din stroma peritumorală se asociază cu un profil tumoral caracterizat prin proprietăți biologice mai agresive.

CD56. Analiza expresiei markerului CD56 în carcinoamele mamare asociate cu diabetul zaharat a evidențiat o variabilitate semnificativă a nivelului de expresie în funcție de localizarea intratumorală (CD56it) și peritumorală (CD56pt). Evaluările statistice au demonstrat că numărul de celule CD56 pozitive este semnificativ mai mare în stroma peritumorală comparativ cu cea intratumorală ($p=0.03$). Astfel, conținutul celulelor CD56 pozitive în zona intratumorală (CD56it) a prezentat valori medii de 0.58 ± 0.42 (ME=0.60, CI95%: 0.40-0.76), în timp ce în stroma peritumorală (CD56pt) valoarea medie a fost de 12.92 ± 7.62 (ME=11, CI95%: 10.50-15.34). Analiza corelațională a evidențiat o asociere puternică între conținutul celulelor CD56+ din ambele zone analizate, corelația fiind pozitivă și semnificativă din punct de vedere statistic ($r=0.97$, $p=0.006$) (Figura 22).

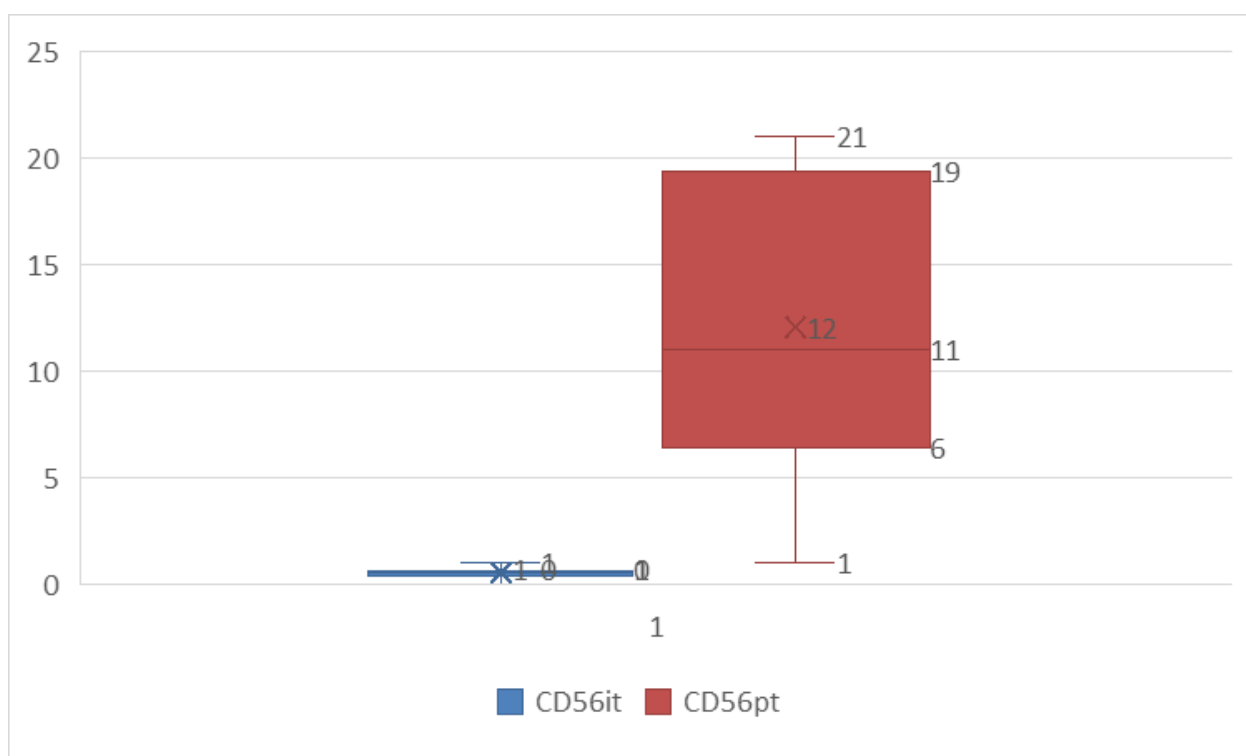


Figura 22. Repartizarea limfocitelor CD56⁺ în carcinoamele mamare asociate cu DZT2.

Notă. Se evidențiază un număr semnificativ mai înalt al celulelor NK CD56⁺ în stroma peritumorală (12.92 ± 7.62 ; Me=11) comparativ cu zona intratumorală (0.58 ± 0.42 ; Me=0.60) ($p=0.03$), sugerând o infiltrare preferențială peritumorală.

Expresia markerului CD56 a prezentat variații în funcție de localizare și de parametrii analizați. Datele obținute au indicat că densitatea celulelor CD56it prezintă corelații negative cu prezența invaziei limfovaskulare ($r_s=-0.35$, $p=0.03$) și cu indicele Allred pentru receptorii PR ($r_s=-0.30$, $p=0.05$).

De asemenea, a fost identificată o corelație pozitivă între densitatea CD56it și dimensiunea tumorii (pT), situată în proximitatea pragului de semnificație statistică ($r_s=0.29$, $p=0.06$).

În contrast, conținutul celulelor CD56pt pozitive din stroma peritumorală (CD56pt) a prezentat corelații negative semnificative cu activitatea mitotică ($r_s=-0.37$, $p=0.02$) și expresia HER2 ($r_s=-0.38$, $p=0.02$). Aceste date sugerează că prezența unui infiltrat dens de celule CD56⁺ la nivel peritumoral se asociază cu parametri tumorali corespunzători unui profil biologic mai puțin agresiv. Totodată, rezultatele obținute în zona peritumorală au fost, în general, mai puțin consistente din punct de vedere statistic (*Anexa 14*).

CD68. Numărul celulelor care au exprimat markerul pan-macrofagal CD68 în zona intratumorală a prezentat o variabilitate largă, cu o valoare medie de 10.61 ± 9.85 și o mediană de (ME=9). Conținutul de macrofage a variat între 0 și 27, reflectând o distribuție heterogenă în funcție de caz. În contrast, zona stromei peritumorale (CD68pt) a înregistrat o densitate medie mai mare a macrofagelor diferența situându-se la limita semnificației statistice (16.3 ± 16.1 , ME=13; $p=0.05$). Valorile determinate în această zonă de asemenea, într-un interval larg, cuprins între 0 și 36. Analizând asocierile statistice în funcție de localizare, am observat că în zona intratumorală (CD68it) corelațiile cu caracteristicile tumorale nu au atins pragul de semnificație statistică ($r_s=0.25$, $p=0.15$). În schimb, în zona peritumorală (CD68pt), aceste asocieri au atins pragul de semnificație statistică ($r_s=0.38$, $p=0.05$) (Figura 23).

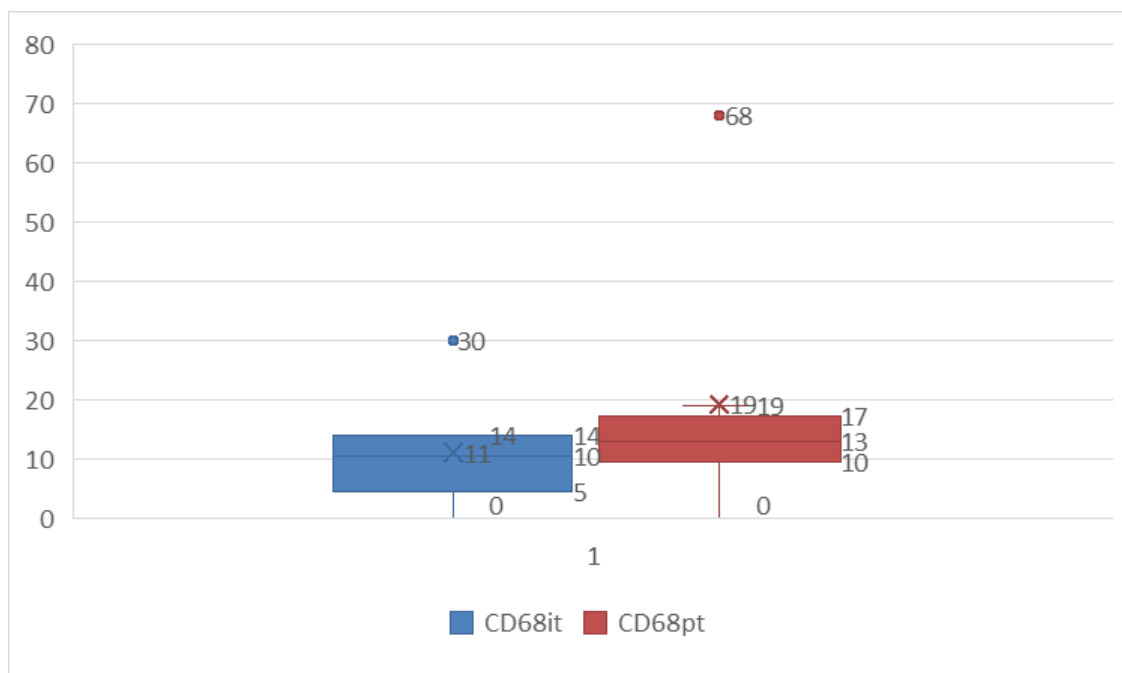


Figura 23. Repartizarea limfocitelor CD68⁺ în carcinomul mamar asociat cu DZT2.

Notă. Se evidențiază o densitate medie semnificativ mai crescută a macrofagelor CD68⁺ în stroma peritumorală (16.3 ± 16.1 ; ME=13) comparativ cu zona intratumorală (10.61 ± 9.85 ; ME=9) ($p=0.05$), sugerând o acumulare preferențială peritumorală.

Evaluările statistice realizate au evidențiat existența unor corelații pozitive semnificative între conținutul macrofagelor intratumorale și vârsta pacienților ($r_s=0.40$, $p=0.02$) precum și cu extinderea nodală a neoplasmului (pN) ($r_s=0.42$, $p=0.01$). Totuși, alte caracteristici tumorale,

precum gradul de diferențiere ($r_s=-0.22$, $p=0.13$), expresia HER2 ($r_s=-0.15$, $p=0.22$) și alți parametri analizați (*Anexa 15*), nu au atins pragul de semnificație statistică. O tendință similară a fost observată și în cazul macrofagelor din stroma peritumorală: unde asocierile dintre CD68pt și expresia markerului HER2 ($r_s=0.29$, $p=0.07$) precum și prezența invaziei limfovaskulare (LV) ($r_s=-0.25$, $p=0.09$) nu au atins pragul de semnificație statistică de 95%.

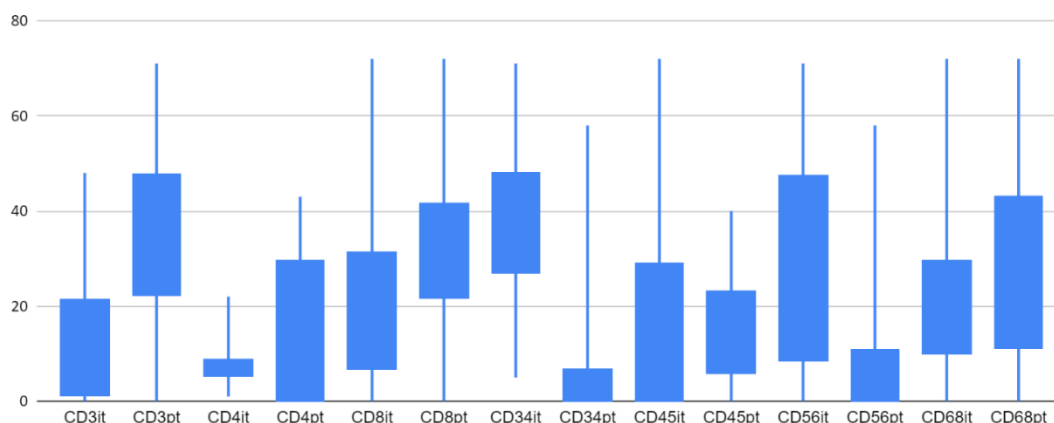


Figura 24. Repartizarea numerică a principalelor subpopulații celulare imunofenotipice în carcinomul mamar asociate cu DZT2.

Notă. Graficul ilustrează distribuția numerică a celulelor CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD56⁺ și CD68⁺ la nivel intratumoral (it) și peritumoral (pt). Analiza descriptivă evidențiază o distribuție eterogenă pentru markerii CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ și CD68⁺ se observă valori mai ridicate ale parametrilor de tendință centrală în compartimentul peritumoral, în timp ce pentru markerii CD34⁺, CD45⁺ și CD56⁺, atât valorile mediane, cât și variabilitatea, sunt mai crescute în compartimentul intratumoral.

Corelațiile statistice dintre markerii imunohistochimici analizați în cancerului mamar asociat cu diabet zaharat. Analiza corelațiilor dintre markerii imunohistochimici a evidențiat existența unor relații statistice variate între parametrii analizați. A fost evidențiată coexpresia receptorilor hormonal, reflectată printr-o corelație pozitivă foarte puternică și semnificativă din punct de vedere statistic între ER și PR ($r_s=0.78$, $p=0.001$). Acest tipar este specific subtipurilor Luminale, în special Luminal A, care sunt asociate cu un prognostic favorabil și un răspuns terapeutic bun la tratamentul endocrin. Menținerea acestei corelații chiar și în prezența diabetului sugerează păstrarea funcționalității axului hormonal tumoral, ceea ce poate reprezenta o oportunitate terapeutică relevantă. Pe de altă parte, a fost evidențiată o relație inversă între indicele de proliferare celulară (Ki67) și expresia receptorilor PR ($r_s=-0.49$, $p=0.007$), ceea ce sugerează o tranziție către un fenotip tumoral mai agresiv, caracterizat prin pierderea expresiei PR și intensificarea activității mitotice. Această asociere dintre diminuarea expresiei PR și creșterea

indicelui Ki67 reflectă un status biologic tumoral mai instabil și un risc prognostic crescut, posibil influențat de dereglările metabolice caracteristice diabetului zaharat.

Un alt aspect relevant îl reprezintă corelația pozitivă semnificativă dintre indicele de proliferare Ki67 și expresia HER2 ($r_s=0.52$, $p=0.004$), susținând caracteristicile biologice agresive ale tumorilor HER2⁺, cunoscute printr-o activitate proliferativă crescută. În contextul diabetului zaharat, această asociere ar putea reflecta existența unei interacțiuni patologice între hiperinsulinemie, inflamația cronică și expresia crescută a unor oncogene precum HER2, contribuind la accentuarea comportamentului invaziv al tumorii. În ceea ce privește celelalte corelații analizate, nu au fost identificate relații semnificative din punct de vedere statistic între indicele de proliferare Ki67 și expresia receptorilor ER ($r_s=-0.30$, $p=0.12$), precum nici între expresia HER2 și markerii hormonalți (HER2 vs ER: $r_s=-0.05$, $p=0.80$; HER2 vs PR: $r_s=-0.29$, $p=0.13$). Rezultatele obținute sugerează că, în acest subgrup de paciente, expresia HER2 se menține relativ independentă de axul hormonal, iar activitatea proliferativă nu este strâns corelată cu expresia receptorilor estrogenici, aspecte ce pot reflecta o heterogenitate biologică tumorală crescută.

Cu toate acestea, intensificarea proliferării tumorale, asociată cu pierderea expresiei PR și cu supraexpresia HER2 conturează un fenotip caracterizat printr-un grad crescut de agresivitate biologică (*Anexa 16*).

4.4. Evaluarea corelațiilor dintre markerii imunității celulare și potențialului angiogen în tumorile mamare cu și fără DZT2 asociat.

Carcinomul mamar fără diabet zaharat. Evaluarea asocierilor dintre markerii incluși în studiu a evidențiat existența mai multor relații statistice semnificative, sugerând prezența unor interacțiuni celulare complexe la nivelul stromei intratumorale și peritumorale.

Astfel conținutul total de celule T intratumorale (CD3it) a corelat pozitiv cu CD4it ($r=0.48$, $p=0.01$), ceea ce sugerează un răspuns imun, predominant mediat de limfocitele T helper. Totodată, a fost identificată o corelație pozitivă semnificativă între CD3it și CD8it ($r=0.62$; $p=0.01$). Corelația pozitivă dintre conținutul limfocitelor T și densitatea vasculară intratumorală ($r=0.43$; $p=0.01$) sugerează că intensificarea potențialului angiogen poate fi asociată cu o prezență crescută a limfocitelor T în microambianță tumorală. Corelația pozitivă semnificativă dintre CD3it și CD68it ($r=0.60$; $p=0.01$) sugerează o posibilă conlucrare între limfocitele T și macrofage în microambianță tumorală.

Corelațiile pozitive semnificative dintre CD3pt și CD4pt ($r=0,36$; $p=0,03$), respectiv dintre CD3pt și CD45pt ($r=0.40$; $p=0.02$), sugerează existența unui proces de recrutare leucocitară accentuată la nivel peritumoral, din care o proporție importantă este reprezentată de limfocitele T.

Un alt rezultat relevant a fost identificarea unei corelații pozitive semnificative între CD4it și CD34it ($r=0.59$, $p=0.01$). Această asociere indică faptul că o vascularizație intratumorală mai intensă se însoțește de o prezență numerică crescută a limfocitelor T helper, sugerând existența unei interacțiuni funcționale între compartimentul vascular și cel imun la nivelul microambianței tumorale. Gradul de vascularizare intratumorală, evaluat prin expresia (CD34it) s-a asociat cu variații ale numărului macrofagelor CD68it identificate la nivelul parenchimului tumoral. De asemenea, a fost evidențiată o corelație pozitivă semnificativă între gradul de vascularizare intratumorală CD34it și conținutul celulelor din stroma peritumorală CD56pt ($r=0.36$, $p=0.03$). Această asociere sugerează supra expresia existența unei relații bidirecționale între compartimentul vascular tumoral și infiltratul de celule NK peritumorale, în cadrul căreia intensificarea angiogenezei poate fi însoțită de o prezență crescută a celulelor cu potențial antitumoral, iar activitatea acestora ar putea influența, la rândul său, remodelarea vasculară tumorală.

Conținutul limfocitelor T helper din stroma peritumorală (CD4pt) a corelat pozitiv cu densitatea limfocitelor T citotoxice intratumorale (CD8it) ($r=0.31$, $p=0.05$), sugerând existența unei relații funcționale între compartimentul imun peritumoral și răspunsul citotoxic intratumoral. Corelația negativă dintre densitatea limfocitelor T citotoxice și numărul de vase peritumorale (CD34pt) ($r=-0.34$; $p=0.03$) sugerează o posibilă relație inversă între infiltratul citotoxic și potențialul angiogen peritumoral. Un alt marker analizat, CD68it, a prezentat o corelație pozitivă puternică cu conținutul limfocitelor T intratumorale CD3it ($r=0.60$, $p=0.01$), sugerând existența unor interacțiuni strânse între populațiile macrofagice și limfocitare T la nivelul microambianței tumorale.

Carcinomul mamar asociat cu DZT2. Analiza datelor obținute, a evidențiat o serie de corelații statistice relevante, care contribuie la o înțelegere mai aprofundată a interacțiunilor dintre sistemul imun și microambianța tumorală, modificată în contextul dereglărilor metabolice induse de DZT2. Astfel, conținutul de celule CD3⁺ din compartimentul intratumoral a prezentat corelații pozitive semnificative statistic cu subpopulațiile CD4it ($r=0.46$, $p=0.01$) și CD8it ($r=0.48$, $p=0.01$). Asocierea pozitivă dintre CD3it și CD68it ($r=0.49$; $p=0.01$) susține ipoteza unei conlucrări sinergice între celulele imune, sugerând un rol potențial al macrofagelor în medierea răspunsului imun antitumoral prin recrutarea limfocitelor T în compartimentul intratumoral. În plus, numărul celulelor (CD3it) a prezentat o corelație pozitivă, semnificativă statistic cu conținutul total de leucocite CD45pt din stroma peritumorală ($r=0.38$, $p=0.02$). Această asociere sugerează că infiltratul limfocitar T intratumoral este influențat de gradul de infiltrare imună a stromei peritumorale, evidențiind interdependența dintre compartimentele tumoral și peritumoral în organizarea răspunsului imun. De asemenea, s-a evidențiat o corelație pozitivă, semnificativă

statistic, între CD3it și CD34it ($r=0.38$; $p=0.02$), sugerând că un grad mai ridicat de vascularizare intratumorală poate facilita recrutarea și infiltrarea limfocitelor T în compartimentul tumoral.

La nivelul stromei peritumorale, markerul CD3 a prezentat corelații pozitive, semnificative statistic cu subtipurile sale, CD4pt ($r=0.32$, $p=0.04$) și CD8pt ($r=0.37$, $p=0.02$).

Conținutul celulelor CD8it a prezentat o corelație pozitivă, semnificativă statistic, cu gradul de vascularizare intratumorală evaluat prin (CD34it) ($r=0.49$, $p=0.01$), sugerând că intensificarea proceselor angiogenice poate favoriza afluxul limfocitelor T CD8⁺ cu potențial citotoxic în compartimentul tumoral. Corelația pozitivă semnificativă statistic, dintre CD8it și CD68it ($r=0.45$, $p=0.01$) reflectă o asociere semnificativă între infiltratul macrofagic și cel al limfocitelor T CD8⁺ cu potențial citotoxic, sugerând implicarea unor mecanisme complexe de interacțiune în medierea răspunsului citotoxic antitumoral. De asemenea, populația limfocitelor T CD8⁺ intratumorale a prezentat o asociere pozitivă, semnificativă statistic, cu conținutul celulelor CD56⁺ din stroma peritumorală (CD56pt) ($r=0.41$; $p=0.01$), sugerând existența unor interacțiuni funcționale, posibil de tip paracrin, între limfocitele T citotoxice și celulele NK.

La nivelul stromei peritumorale, celulele NK (CD56⁺) au prezentat o corelație pozitivă, semnificativă statistic, cu prezența vaselor intratumorale evaluate prin CD34it ($r=0.44$; $p=0.01$), sugerând că rețeaua vasculară tumorală poate constitui o poartă de acces pentru infiltrarea celulelor imune, inclusiv a celor provenite din compartimentul peritumoral. În plus, numărul vase intratumorale a crescut proporțional cu nivelul CD68it ($r=0.51$, $p=0.01$), fapt ce subliniază, că macrofagele pot contribui la remodelarea microambianței tumorale, și pot influența infiltrarea celulelor imune prin intermediul neoangiogenezei. Nivelul celulelor CD56pt din stroma peritumorală a înregistrat o asociere pozitivă, semnificativă statistic, cu CD68it ($r=0.50$, $p=0.01$), ceea ce presupune existența unor interacțiuni funcționale la distanță între celulele NK și macrofage.

Un alt aspect relevant a fost reprezentat de asocierea pozitivă, semnificativă statistic, dintre CD45pt și CD8it ($r=0.34$, $p=0.04$), sugerând că infiltratul leucocitar peritumoral poate influența nivelul celulelor T citotoxice în compartimentul intratumoral.

În sumar:

1. Glanda mamară normală dispune de un repertoriu complex de celule implicate în menținerea imunității locale. Studiul efectuat a evidențiat prezența mai multor populații celulare cu rol imun atât la nivel stromal, cât și epitelial al glandei mamare neafectate. Astfel, s-a constatat că limfocitele CD3⁺ și CD8⁺ sunt localizate predominant în stroma glandulară, în timp ce celulele CD4⁺ și CD56⁺ sunt identificate mai frecvent la nivelul epiteliului glandular.
2. În carcinomul mamar neasociat cu DZT2, se conturează un model distinct de infiltrare imună tumorală. Rezultatele obținute indică o infiltrare predominant intratumorală a limfocitelor CD3⁺ și CD8⁺, în timp ce celulele CD4⁺ și leucocitele CD45⁺ sunt mai abundente în stroma

peritumorală, sugerând un rol potențial al acestui compartiment în organizarea și modularea microambianței tumorale.

3. În contextul dereglărilor metabolice induse de DZT2, se constată modificări semnificative ale distribuției și conținutului numeric al celulelor imune în compartimentele tumoral și peritumoral. Analiza a demonstrat un conținut numeric mai redus al celulelor CD8⁺ și CD68⁺ la nivel intratumoral comparativ cu stroma peritumorală. În schimb, vascularizația evidențiată prin markerul CD34⁺, precum și celulele NK (CD56⁺), au fost mai frecvent identificate în stroma conjunctivă peritumorală, sugerând existența unor mecanisme adaptative compensatorii, caracterizate prin intensificarea angiogenezei și a activității efectoare a celulelor NK.

5. CARACTERIZAREA EXPRESIEI MARKERILOR HORMONALI (ER, PR), HER2 ȘI Ki67 ÎN GLANDA MAMARĂ INTACTĂ ȘI ÎN CARCINOMUL MAMAR

În cancerul de sân, expresiile markerilor pentru ER, PR, HER2 și Ki67 reprezintă caracteristici cheie ale tumorii și sunt baza prognosticului predictiv [23,235,236]. Pe de altă parte, DZT2, o afecțiune metabolică cronică, este asociat cu un risc crescut de inflamație sistemică și modificări profunde, severe ale microambianței tumorale, ceea ce ar putea modifica și expresia receptorilor sus-menționați de către celulele canceroase.

5.1. Caracteristica cazurilor de control

Studiile în domeniu ce țin de histologia glandei mamare, în special la femeile aflate în menopauză, evidențiază importanța receptorilor hormoni în menținerea arhitecturii și funcționării acestui țesut. Acești receptori, în special pentru estrogen (ER) și progesteron (PR), sunt cei mai mediatizați, fiindcă susțin dezvoltarea și funcționarea glandei în normă sau prezintă o verigă importantă în tratamentul anti-hormonal al carcinomului.

În glanda mamară neafectată, receptorii ER au fost predominant localizați în celulele epiteliale luminale ale ductelor și porțiunilor secretorii, unde conform datelor literaturii reglează procesele de creștere și diferențiere [237]. Rezultatele existente subliniază, că odată cu instalarea menopauzei, diminuarea nivelurilor de estrogen seric conduce și la reducerea expresiei receptorilor omonimi.

Similar cu ER, receptorii pentru PR sunt localizați în celulele epiteliale luminale și sunt esențiali pentru procesele de proliferare și remodelare tisulară [238]. În perioada menopauzei, odată cu reducerea generală a activității hormonale expresia PR de asemenea scade semnificativ.

Pe măsură trecerii în perioada de postmenopauză, glanda mamară suferă schimbări morfologice profunde. Din cele descrise anterior în Capitolul 3, involuția țesutului glandular s-a manifestat printr-o scădere a densității lobulilor și o creștere a proporției de țesut adipos și conjunctiv. Conform datelor literaturii, aceste transformări reprezintă un răspuns al glandei la reducerea stimulării hormonale [239–241]. Ca rezultat, țesutul epitelial al lobulilor a prezentat semne distinctive de reducere a activității, ductele devenind mai înguste, iar țesutul conjunctiv fibros mai pronunțat, modificând densitatea parenchimului. Aceste schimbări morfologice induc modificări și în expresia receptorilor hormoni, presupunând o reducere a expresiei receptorilor și ca rezultat o sensibilitate hormonală mai diminuată (Figura 25).

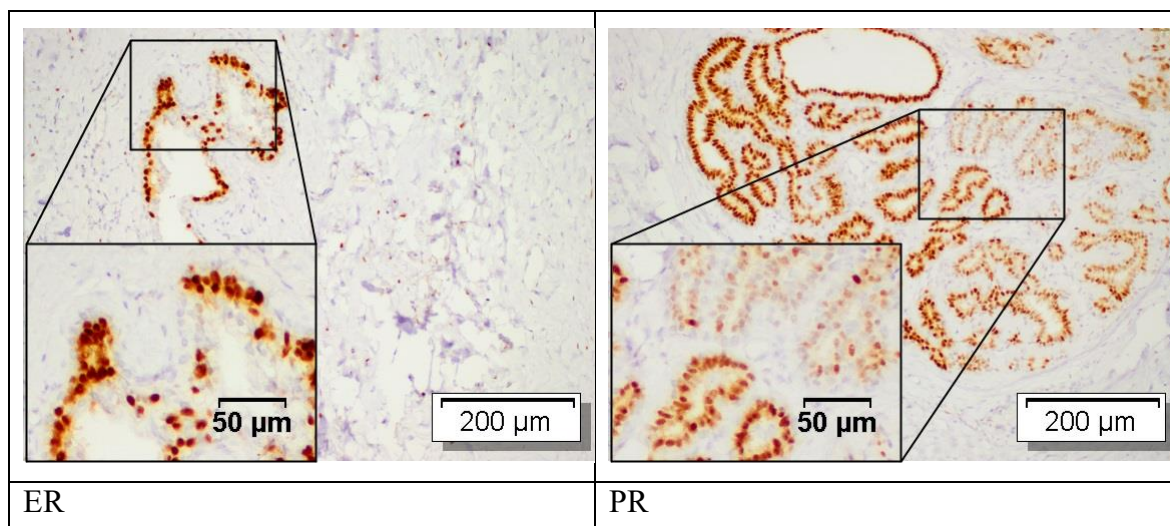


Figura 25. Glandă mamară în normă. Celule tumorale imunomarcate pentru ER și PR.
 Notă: Celule tumorale imunomarcate pentru ER: scor +2 (a) și PR, scor +3 după Allred (b).
 Colorație IHC, contracolorare cu hematoxină Lille (20x).

5.2. Tumorile mamare fără DZT2 asociat

Evaluarea imunopozitivității la ER a celulelor tumorale a arătat o variabilitate ridicată, media valorilor obținute în lotul studiat fiind de $57.2\% \pm 41.6\%$. Analiza statistică a evidențiat o distribuție largă și asimetrică, fapt susținut de valoarea mediane (Me=80%). Expresia ER a variat între 0% și 95%. Analiza statistică a pus în evidență, că la percentila 75%, în aproximativ un sfert dintre cazuri, expresia ER a depășit 90%. La percentila 25%, circa 25% dintre cazuri au prezentat valori de 0%, indicând absența completă a expresiei receptorului.

În cadrul studiului am evaluat atât proporția celulelor care exprimă receptorul (ERps), cât și intensitatea acestei expresii (ERis), rezultatele fiind sumate într-un scor total (ERts) pentru a oferi o imagine mai completă a profilului hormonal al tumorilor studiate.

Din totalul de 30 de cazuri, în 13 tumori (43.3%) nu am determinat prezența receptorului pentru ER, ceea ce înseamnă că aproape jumătate dintre tumorile NST analizate sunt hormon-independente. În restul cazurilor, am observat o variabilitate semnificativă a nivelurilor de expresie: în 6 cazuri (20%) s-a înregistrat un nivel extrem de ridicat al receptorului ER (95%), iar în alte 13 cazuri (43.3%) nivelul de expresie a fost de circa 90%.

Pentru o caracterizare mai detaliată a expresiei ER, am aplicat scorurile ERps, ERis și ERts. Analiza proporției de celule pozitive (ERps), a pus în evidență 28 de cazuri (65.1%) cu un scor maxim de 5. La aprecierea intensității expresiei ER am determinat că 23 de tumori (53.5%) au prezentat o intensitate maximă de 3.

Trebuie de subliniat că au fost descrise și 13 cazuri (30.2%) în care intensitatea ER a fost evaluată cu zero, ceea ce înseamnă că, deși unele tumori ar putea prezenta receptorul în proporție mare, intensitatea acestuia poate fi foarte slabă.

La evaluarea scorului total Allred (ts), care combină proporția de celule pozitive și intensitatea de colorare, am determinat că 14 tumori (32.6%) au obținut un scor maxim 8, iar 16 cazuri (37.2%) au fost evaluate cu un scor de 7, ceea ce indică o expresie hormonală puternică și relevantă din punct de vedere clinic.

Evaluarea expresiei PR a evidențiat valori medii mai scăzute comparativ cu cele ale ER (35.2±35.01%), cu o Me de 30%. La percentila 75%, valorile PR nu au depășit 62.5%, iar la percentila 25%, numeroase tumori au prezentat valori 0%. Trebuie însă de menționat, că atât valoarea maximă (95%), cât și valoarea minimă (0%) pentru PR au coincis cu cele înregistrate pentru ER, însă distribuția valorilor a fost semnificativ mai restrânsă pentru PR. Astfel, aproximativ jumătate dintre cazuri au prezentat o expresie a PR sub 30%, sugerând o potențială rezistență la terapiile care vizează receptorii de progesteron. Analiza statistică a relației dintre ER și PR, utilizând coeficientul de corelație, a indicat o asociere pozitivă puternică ($r_s=0.74$, $p=0.001$) dintre cei doi receptori. Din aceste date rezultă, că deși receptorii în cauză pot coexista în celulele tumorale, ER este expresat cu predilecție de către carcinomul NST, comparativ cu PR. Per ansamblu, datele obținute indică faptul că tumorile NST sunt în majoritate hormon-dependente, prezentând o expresie semnificativă a ER, aspect care susține utilizarea acestuia ca țintă terapeutică în cadrul terapiei antihormonale.

Utilizând o abordare complexă, am cuantificat prezența și intensitatea expresiei PR prin intermediul scorurilor PRps, PRis și PRts (Allred scor).

Datele obținute au pus în evidență o expresie variabilă a receptorului PR, cu o medie a valorilor de 35.2%±35%. Astfel, distribuția a fost una neuniformă, expresia variind de la absent la intens pozitiv. Aproximativ 37.2% dintre cazuri nu au prezentat nici o expresie detectabilă vizual a PR (valoare înregistrată ca 0%). În ceea ce privește distribuția scorurilor, Me a fost de 30%, iar percentila 75% a indicat o valoare de 62.5%, ceea ce sugerează că doar un grup minor de tumori prezintă PR. În 4 cazuri (9.3%) circa 60% din celulele tumorale au expresat PR, iar 90% din celulele tumorale PR⁺ au fost descrise în 3 cazuri (7%). Trebuie de menționat că în 16 cazuri (37.2%) celulele tumorale au fost completamente PR negative.

Pentru a obține o perspectivă mai detaliată asupra profilului hormonal, am cuantificat scorul total PRts, care combină rezultatele PRps și PRis. Media scorului total per grup a fost de 4±3.2 și o Me de 5. Un scor *null* al expresiei PR fost obținut în 15 cazuri (34.9%). Pe de altă parte, scorurile elevate (PRts=7 și 8) au fost mai rare, fiind descrise în 5 cazuri (9.3%) din cazuri. Astfel rezultatele în cauză indică o expresie redusă a PR în majoritatea cazurilor de tumori NST, în contrast cu ceea ce am observat pentru ER, unde expresia a fost mai frecventă și evaluată ca una puternică.

Pe lângă evaluarea expresiei receptorilor hormoni, a fost analizat și markerul activității proliferative a celulelor tumorale sau Ki67. Analiza distribuției valorilor Ki67 a arătat o

variabilitate semnificativă a nivelurilor de expresie. Media procentuală a valorilor Ki67 a constituit $35.2\% \pm 19\%$, ceea ce reflectă o variabilitate înaltă a activității mitotice în tumorile studiate. Mediana, situată la 35%, sugerează că 13 dintre cazuri prezintă o rată de proliferare celulară egală sau mai mare decât acest nivel. Analiza centilelor de 15% și 50% a pus în evidență o distribuție asimetrică, cu o concentrare mai mare a cazurilor la valori medii și înalte. De asemenea, analiza intervalului de valori, cuprins între un minim de 10% și un maxim de 70%, a susținut prezența unei heterogenități crescute a activității proliferative în cadrul tumorilor NST. Cea mai frecvent întâlnită valoare a Ki67 a fost de 60%, observată în 7 cazuri (16.3%). Pe de altă parte, valorile scăzute cum ar fi de 10% și 15%, apropiate de pragul de pozitivitate (14%) au fost observate câte 14 cazuri (33%). Valorile intermediare (20% și 50%), au fost întâlnite fiecare în 4 cazuri (9.3%), subliniind faptul că majoritatea tumorilor au activitate proliferativă moderată. Această distribuție neuniformă a valorilor Ki67 sugerează o diversitate largă în comportamentul proliferativ și clinic al tumorilor analizate.

Caracteristica de bază a tumorilor mamare a necesitat și evaluarea expresiei HER2, considerată a fi una variată. Me a constituit 1, cu valori cuprinse între 0 (absența expresiei HER2) și 3 (expresie înaltă). Percentila 25% a fost de 1, iar percentila 75% de 2, sugerând că majoritatea cazurilor au o expresie redusă a acestui marker. Distribuția scorurilor HER2 a evidențiat predominanța scorului +1, identificat în 20 de cazuri (46.5%), sugerând o expresie joasă a markerului HER2, interpretată ca negativă conform criteriilor clinice curente. În alte 9 cazuri (20.9%) a fost înregistrat scorul „0”, de asemenea considerate negative. În 6 cazuri (14%) acest marker a fost evaluat cu un grad intermediar, echivoc (+2). În contrast, 8 cazuri (18.6%) au prezentat scor HER2 +3, corespunzător unei expresii intense și asociat, potrivit literaturii de specialitate, cu un grad înalt de agresivitate tumorală. Astfel, datele prezentate indică că majoritatea tumorilor de tip NST 22 cazuri (81.4%) au o expresie diminuată sau absentă a HER2.

Rezultatele privind expresia ER, PR, Ki67 și HER2 sugerează existența unei heterogenități pronunțate în cadrul tumorilor mamare. Pentru a obține o imagine completă asupra structurii carcinoamelor mamare și posibilelor interacțiuni moleculare am evaluat și asocierile statistice. Astfel, rezultatele au indicat o corelație pozitivă puternică între ER și PR ($r_s=0.67$, $p=0.001$). Această asociere este importantă, deoarece indică că tumorile care sunt ER⁺ tind să fie și PR⁺.

În schimb, relația dintre ER și HER2 a fost apreciată ca foarte slabă ($r_s=-0.09$, $p=0.31$), susținând ideea că acești receptori activează independent unul față de altul. Aceasta sugerează că expresia ER și amplificarea HER2 sunt, în general, independente una de cealaltă, fapt des întâlnit în tumorile de sân, unde statusul HER2⁺ este de multe ori asociat cu un profil hormonal negativ. Astfel, pacienții cu tumori ER⁻ și HER2⁺ ar necesita terapii țintite anti-HER2, și mai puțin terapii hormonale.

O altă observație importantă a fost absența unei corelații semnificative statistice între ER și Ki67 ($r_s=-0.11$, $p=0.29$). Acest rezultat indică faptul că expresia receptorului pentru estrogen nu influențează rata de proliferare celulară evaluată prin Ki67, subliniind existența variabilității în rata de proliferare a tumorilor ER⁺. Altfel spus, prezența ER, cunoscut pentru efectele sale proliferative nu garantează dezvoltarea de tumori agresive și.

Corelațiile dintre PR și HER2 ($r_s=-0.04$, $p=0.42$), PR și Ki67 ($r_s=-0.06$, $p=0.39$) au fost de asemenea, foarte slabe și nu au atins cote semnificativ statistice, confirmând că expresia receptorului pentru progesteron pledează în favoarea unor tumori mai puțin agresive. Aceasta susține observația că tumorile PR⁺ și HER2⁺ reprezintă profile distincte, ceea ce poate avea implicații asupra prognosticului și al răspunsului la tratament.

În ceea ce privește relația dintre HER2 și Ki67, analiza statistică a pus în evidență o corelație pozitivă slabă ($r_s=0.18$, $p=0.17$). Deși aceasta nu a atins cote statistice semnificative, tendința pozitivă poate reflecta faptul că tumorile cu expresie ridicată de HER2 tind să aibă o rată de proliferare mai mare.

Astfel, analiza corelațiilor markerilor tumorali relevă asocierea pozitivă a ER și PR, susținând utilizarea terapiei hormonale în tumorile estrogen/ progesteron pozitive. În schimb, restul markerilor nu prezintă corelații semnificative statistice, ceea ce indică faptul că aceștia variază independent și contribuie fiecare, în mod unic, la caracterizarea tumorii. Aceste rezultate subliniază importanța unei abordări multidimensionale în evaluarea profilului tumoral, utilizând ER, PR, HER2 și Ki67, ceea ce va asigura alegerea strategiei terapeutice personalizate și va oferi un prognostic precis pentru fiecare pacientă.

5.3. Fenotipul tumorilor mamare NST asociate cu DZT2

În cadrul acestui lot de paciente, am observat că tumorile în cauză sunt preponderent hormonal-dependente. Analiza cantitativă a expresiei ER a pus în evidență o variabilitate considerabilă, media constituind $60.2\% \pm 37.8\%$. Totodată, Me de 80% sugerează că majoritatea dintre tumorile studiate sunt ER pozitive. În plus, percentila 75% a pus în evidență că în 8 cazuri, tumorile au fost intens ER pozitive (90%). Pe de altă parte, în cazul percentilei de 25%, un sfert dintre tumori au avut valori ale ER sub 32.5%.

Analiza expresiei receptorului pentru progesteron, spre deosebire de ER, a pus în evidență un profil diferit, unde media valorilor a fost de $39.7\% \pm 38.3\%$, cu o Me de 35%, expresia oscilând 0-95%. În timp ce Me de 75% prezintă că doar 33.3% dintre cazuri (10 cazuri) au avut o expresie ER de peste 80%, Me 25% indică o absență completă a receptorului în 36.7% dintre cazuri (11 cazuri), subliniind astfel frecvența mare a tumorilor PR⁻.

Receptorii pentru ER și PR s-au dovedit a fi dependenți unul de altul, cel puțin statistic, unde s-au determinat asocieri pozitive, înalte ($r_s=0.77$, $p=0.01$). Trebuie însă de subliniat, că deși există

o corelație semnificativă între ER și PR, nivelul de expresie al PR este considerabil mai scăzut decât cel al ER ($p=0.00084$). Rezultatele în cauză indică că tumorile asociate cu DZT2 sunt preponderent hormon-dependente, iar sensibilitatea la tratamentul corespunzător va fi dictată de prezența cu predilecție a receptorului pentru estrogen.

Ulterior am evaluat expresia ER folosind scorurile ERps, ERis și scorul total Allred pentru ER. Astfel am constatat, că în 7 cazuri (23.3%) nu a fost detectată nici-o celulă ER pozitivă.

Analiza ERps, care evaluează proporția celulelor ER pozitive, a permis să concluzionăm, că 18 cazuri (60%) au obținut valoarea maximă de 5, ceea ce indică că tumorile în cauză abundă în receptori pentru estrogen, totuși, în restul de 11 cazuri (40%), expresia ER a fost sub nivelul maxim, cu o distribuție variabilă: 7 cazuri (24 %) au prezentat absența completă a receptorilor (scor 0), 2 cazuri (6 %) au obținut scorul 4, iar câte un caz a înregistrat scorurile 3 și 2 (2,5 % fiecare). În ceea ce privește intensitatea expresiei (ERis), 8 tumori (26.7%) au prezentat intensitatea maximă de 3, în timp ce 7 cazuri (23.3%) au avut o intensitate evaluată cu 0. În ceea ce privește scorul total Allred ER, care combină proporția celulelor pozitive și intensitatea lor, 8 tumori (26.7%) au obținut scorul maxim de 8, iar 10 (33.3) au fost înregistrate cu un scor de 7, indicând la o expresie hormonală puternică și clinic relevantă pentru tratamentul țintit.

Identic cu ER, am evaluat și expresia receptorului pentru PR. Rezultatele obținute au evidențiat o variabilitate considerabilă în expresia acestui receptor, cu o distribuție neuniformă între cazuri. În 11 cazuri (37.9%) nu a fost detectată nici-o celulă PR pozitivă. În schimb, în 7 cazuri (24.1%) tumorile au fost scorificate ca PRts=7, iar în 4 cazuri (13.8%) au atins scorul maxim de 8, indicând o expresie puternică a PR. În ceea ce privește proporția celulelor pozitive (PRps), 11 tumori (37.9%) au atins valoarea maximă de 5. Totuși, acest rezultat a fost contrastat de nivelurile scăzute observate în 13 cazuri (44.83%), care au prezentat scoruri de 2 sau mai mici, reflectând o expresie slabă sau absentă a receptorului pentru PR.

La evaluarea intensității expresiei (PRis), 4 tumori (13.8%) au prezentat valori maxime 3, în timp ce în 11 cazuri (37.9%) intensitatea a fost egală cu zero, ceea ce indică că, deși receptorul poate fi prezent, activitatea acestuia poate fi considerată nulă. În ceea ce privește scorul total PRts, media a fost de 3.9 ± 3.4 , iar Me egală cu 5, sugerând o expresie moderată în majoritatea cazurilor. Percentila 25% a fost egală cu 0, în timp ce percentila 75% a fost de 7, sugerând o intensitate moderată în cazurile pozitive. Valoarea maximă a fost 8, iar valoarea minimă de 0, subliniind variația pronunțată a expresiei PR în tumorile NST asociate cu DZT2.

În cazul markerului Ki67, rezultatele au pus în evidență o variabilitate semnificativă în activitatea mitotică a tumorilor analizate. Media procentuală a valorilor Ki67 a fost de $30.6\% \pm 17.8\%$, cu o Me de 27.5%. Evaluarea centilelor a evidențiat o distribuție asimetrică a datelor: percentila 25% a fost de 20%, iar percentila 75% de 40%, ceea ce sugerează o concentrare a

tumorilor în intervale moderate de activitate proliferativă. Valorile Ki67 determinate în acest studiu au variat de la un minim de 7% la un maxim de 80% celule activ proliferative. Cea mai frecventă rata în funcție de pragul de 20%, de trecere: astfel, 22 de cazuri (76%) au prezentat o expresie $Ki67 \geq 20\%$, ceea ce sugerează o rată de proliferare crescută și un potențial biologic agresiv; în schimb, 7 cazuri (24%) au avut valori sub 20%, reflectând o activitate mitotică mai diminuată. Astfel, rezultatele obținute indică la existența unei variabilități marcate în activitatea proliferativă a tumorilor NST, în pofida dereglărilor metabolice induse de DZT2.

Pentru o caracterizare completă a tumorii, am evaluat și expresia HER2. Astfel Me a fost egală cu 1, la valori care au oscilat între 0 (absența expresiei HER2) și 3 (expresie înaltă). Percentila 25% a fost de 0, iar percentila 75% de 1.75, ceea ce sugerează că majoritatea cazurilor au o expresie redusă a acestui marker. Distribuția valorilor HER2 a demonstrat că scorul 1 a fost întâlnit, în 11 cazuri (36.7%). În alte 11 cazuri (36.7%) tumorile au fost HER2 negative, iar 3 cazuri (10%) au înregistrat scorul HER2 +2. În schimb, 5 cazuri (16,7%) au obținut scorul +3, semnalând o expresie ridicată și asociată cu o agresivitate tumorală mai mare. Astfel, putem constata că în 25 cazuri (83.3%) celulele tumorale au prezentat o expresie absentă sau scăzută a HER2, în timp ce 16.7% au indicat o expresie înaltă, sugerând o agresivitate mai mare a acestor tumori.

Ulterior am analizat interacțiunile dintre markerii tumorali evaluând asocierile dintre ER, PR, HER2 și Ki67. Astfel, rezultatele au pus în evidență asocieri puternice între ER și PR ($r_s=0.78$, $p=0.001$). În contrast, asocierea statistică dintre ER și HER2 a fost considerată ca foarte slabă și ne semnificativă statistic ($r_s=-0.05$, $p=0.40$). Apropiată de pragul statistic scontat, a fost corelația negativă dintre ER și Ki67 ($r_s=-0.30$, $p=0.06$). Astfel, acest rezultat sugerează că tumorile cu o expresie crescută de ER tind să aibă un indice de proliferare mai scăzut. Identic, aproape de pragul statistic propus a fost și asocierea PR cu HER2 ($r_s=-0.29$, $p=0.07$), ceea ce indică faptul că celulele tumorale progesteron pozitive tind să nu expreseze HER2. Aceeași relație de sens negativ, însă statistic semnificativă a fost înregistrată între PR și Ki67 ($r_s=-0.49$, $p=0.001$). Aceasta indică faptul că tumorile PR+ tind să fie mai puțin agresive.

În ceea ce privește relația dintre HER2 și Ki67, rezultatele au pus în evidență o corelație pozitivă moderat-puternică ($r_s=0.52$, $p=0.001$), rezumând că tumorile cu expresie ridicată a HER2 au o rată înaltă de proliferare.

În sumar, rezultatele acestui studiu indică faptul că tumorile NST asociate cu DZT2 sunt preponderent ER și PR pozitive, ceea ce sugerează utilizarea terapiei antihormonale. Totodată, expresia HER2 în cazul acestor tumori este asociată cu un indice proliferativ Ki67 înalt, ceea ce implică un comportament mai agresiv al tumorii. La polul opus, am dovedit statistic ($r_s=-0.44$,

$p=0.018$), că carcinoamele PR⁺ tind să aibă un Ki67 diminuat, ceea ce sugerează un comportament mai puțin agresiv al tumorii.

5.4. Caracteristica comparativă a tumorilor mamare, cu și fără asocierea DZT2

Pentru determinarea variațiilor posibile dintre cazurile de carcinom, cu sau fără asocierea DZT2 am utilizat un șir de teste de comparație, în urma cărora am determinat o serie de diferențe în expresia markerilor tumorali utilizați.

În cazul receptorului pentru estrogeni (ER), am constatat că tumorile din lotul non-diabetic au o medie a expresiei de $57.2\% \pm 41.6\%$, cu o Me situată la 80% și o percentilă de 90%. Aproximativ 30.2% dintre aceste tumori nu au exprimat ER deloc. Corelația dintre ER și receptorul pentru progesteron (PR) în acest grup a fost pozitivă și puternică ($r_s=0.74$, $p=0.001$), sugerând o coexistență frecventă a acestor receptori în tumorile hormon-dependente. În contrast, în lotul diabetic, media expresiei ER a fost ușor mai mare ($60.2\% \pm 37.8\%$), iar proporția tumorilor ER⁻ a fost mai mică (23.3%). Corelația dintre ER și PR a fost, de asemenea, puternică ($r_s=0.77$, $p=0.01$), indicând o sensibilitate hormonală pronunțată și în acest grup.

Referitor la receptorul pentru progesteron (PR), expresia medie în lotul fără diabet a fost de $35.2\% \pm 35.2\%$, cu o Me de 30% și o percentilă superioară de 62.5%, iar aproximativ 37.2% dintre cazuri nu au exprimat deloc acest receptor. Corelația cu indicele Ki67 în acest lot a fost nesemnificativă ($r_s=-0.06$). În schimb, în lotul diabetic, expresia medie a PR a fost aparent ($p=0.78$) ușor mai mare ($39.7\% \pm 38.3\%$), iar procentul de cazuri fără expresie a fost similar (37.9%). Totuși, aici am observat o corelație negativă moderată și semnificativă statistic între PR și Ki67 ($r_s=-0.49$, $p=0.001$), sugerând că tumorile PR⁺ au o rată de proliferare mai scăzută, ceea ce poate reflecta un comportament mai puțin agresiv în prezența diabetului.

În ceea ce privește activitatea proliferativă, măsurată prin expresia markerului Ki67, am remarcat diferențe între cele două grupuri. În lotul non-diabetic, media a fost de $35.2\% \pm 19\%$, cu o Me la 35% și o percentilă superioară de 50%. Corelația cu HER2 în acest lot a fost nesemnificativă ($r_s=0.18$). În contrast, în lotul diabetic, activitatea proliferativă a fost ușor ($p=0.06$) mai scăzută, cu o medie de $30.6\% \pm 17.8\%$ și o Me de 27.5%, sugerând o rată de proliferare mai redusă. Totodată, corelația dintre HER2 și Ki67 în acest grup a fost pozitivă ($r_s=0.52$, $p=0.001$), indicând o tendință a tumorilor HER2⁺ de a avea un comportament mai agresiv atunci când sunt asociate cu diabetul. Expresia markerului HER2 nu a prezentat diferențe majore ($p=0.12$) între cele două grupuri. În lotul non-diabetic, 46.5% dintre cazuri au avut un scor HER2 de egal cu +1, iar 18.6% dintre tumori au fost HER2⁺ (scor de +3). În lotul diabetic, aceste proporții au fost ușor mai mici, de 36.7% cu scor HER2 de +1 și 16.7% fiind HER2⁺. Deși procentul de cazuri cu expresie ridicată a HER2 (scor de +3) este similar între grupuri, corelația cu Ki67 înregistrată în lotul diabetic sugerează că tumorile HER2⁺ din acest grup sunt mai prolifiche și pot avea un comportament mai agresiv.

Concluziile acestui subcapitol pun în evidență câteva aspecte cruciale cu importanță predictivă. Astfel, tumorile mamare NST, cu sau fără asociere cu DZT2 majoritar sunt hormon dependente. Însă, conform eseurilor statistice, lotul cu DZT2 tinde să fie mai sensibil la influențele hormonale. În al doilea rând, deși diferența după activitatea proliferativă nu a atins cote semnificative ($p=0.226$), asocierea statistică puternică între HER2 și Ki67 sugerează că tumorile HER2⁺ pot avea un comportament mai agresiv în prezența dereglărilor metabolice induse de DZT2 ($r_s=0.52$, $p=0.004$).

5.5. Structura și fenotipul molecular al carcinomului mamar.

Subtipurile au fost structurate în baza expresiei markerilor hormonal (ER, PR), HER2 și Ki67, conform recomandărilor existente în literatură [231].

Subtipurile moleculare în carcinoamele mamare fără DZT2. Analiza incidenței subtipurilor moleculare în lotul inițial de paciente a indicat o distribuție variată. Subtipul Luminal B/HER2-negativ a fost cel mai frecvent, identificat în 21 de cazuri (48.8%), urmat de Triplu-negativ, înregistrat în 9 cazuri (20.9%). Subtipul Luminal B/HER2⁺ a fost întâlnit în 5 cazuri (11.6%), urmat de Luminal A în 4 cazuri (9.3%). Cel mai rar subtip observat a fost HER2⁺ descris în 3 cazuri (7%).

Profilul molecular al tumorilor asociate cu DZT2. Analiza incidenței subtipurilor moleculare a pus în evidență faptul că subtipul Luminal B/HER2⁻ predomină numeric, fiind identificat în 17 din 29 de cazuri (58.6%). Următorul, subtipul Triplu-negativ a fost observat în 5 cazuri (17.2%). Subtipurile Luminal A și Luminal B/HER2⁺ au fost înregistrate fiecare în 3 cazuri (10.3%). Cel mai rar întâlnit a fost subtipul HER2⁺ observat într-un singur caz (3.5%).

Caracteristica comparativă. În cadrul analizei comparative a subtipurilor moleculare ale carcinomului mamar la paciente cu și fără DZT2, am comparat distribuția subtipurilor în cele două loturi pentru a evalua dacă prezența diabetului influențează profilul tumoral. În urma evaluărilor statistice am determinat că subtipurile moleculare ale tumorilor NST nu sunt influențate de DZT2 ($p=0.48$) (Anexa 8).

În sumar:

1. Tumorile mamare de tip NST expresează predominant receptorul pentru estrogen, incidența căruia (70%) este mai mare decât pentru progesteron (35%) ($r_s=0.67$, $p=0.0001$). Aceste tumori per general (18.6%) sunt HER2⁻ și active mitotic;
2. Carcinoamele mamare asociate cu DZT2 de asemenea expresează cu predilecție ER (60%) față de PR (39.7%), ($r_s=0.78$, $p=0.0001$). Tumorile în cauză sunt frecvent Ki67 active (media per grup 30.6%) și HER2⁻ (16.7%);
3. Subtipul Luminal B/HER2⁻ este cel mai frecvent întâlnit atât la pacientele cu carcinom fără diabet (48.8%), cât și la cele cu DZT2 asociat (58.6%). Tumorile HER2⁺ sunt cel mai rar întâlnite în ambele grupuri;
4. Dereglările metabolice induse de DZT2 influențează incidența subtipurilor moleculare.

6. INFLUENȚA DEREGLĂRILOR METABOLICE DIN DZT2 ASUPRA STATUTULUI IMUN CELULAR LOCAL DIN CARCINOMUL MAMAR

Datorită creșterii incidenței ambelor afecțiuni, DZT2 și carcinom mamar la nivel mondial, acest subiect devine tot mai important pentru pacient și medic [1,13,15]. Coexistența acestor boli poate să influențeze evoluția și așa nefastă a ambelor maladii, punând accent pe modificarea expresiei markerilor tumorali și activitatea sistemului imun [23,235].

Datele din literatură indică faptul, că diabetul zaharat poate afecta expresia receptorilor hormonalți în cancerul mamar, observându-se o posibilă tendință de creștere a fenotipurilor cu expresia pozitivă a receptorilor pentru ER și PR [223,242]. În opinia autorilor această influență poate modifica semnificativ abordările terapeutice și prognosticul. Pe de altă parte, există rapoarte contradictorii privind legătura dintre DZT2 și incidența crescută a expresiei HER2 în cancerul mamar [28]. Această asociere complicată ar putea fi explicată prin alterarea căilor de semnalizare ale insulinei, care sunt frecvent modificate în DZT2. În plus, DZT2 este cunoscut prin faptul că induce o stare de inflamație cronică, care poate transforma TME, influențând astfel progresia cancerului mamar.

Un alt aspect de interes este modul în care densitatea și tipul limfocitelor tumorale infiltrative (TILs) pot fi afectate de prezența DZT2 [2,5,6]. Această observație subliniază legătura profundă dintre starea metabolică indusă de diabet și răspunsul imun al organismului la tumoare. Totodată, rezistența la tratament dezvoltată în contextul coexistenței cancerului mamar și DZT2 complică și mai mult prognosticul. Ideile lansate în spațiul medical susțin că diabetul zaharat are potențialul de a altera eficacitatea terapiilor anticanceroase uzual utilizate, cum ar fi terapia hormonală și chimioterapia [17,236,243]. Rezultatele în cauză susțin necesitatea de a dezvolta abordări personalizate a tratamentului pentru pacienții cu DZT2 și carcinom mamar, ținând cont de starea generală de sănătate și de prezența comorbidităților [235,236].

Rezultatele expuse în studiul nostru au pus în evidență relații statistice, specifice în cazurile cu diabet asociat. Inițial, după cum și era de așteptat, corelația dintre prezența diabetului și nivelul seric al glucozei ($r_s=0.74$) a fost una pozitivă. Totuși, relația dintre prezența diabetului și caracteristicile tumorale, precum stadiul tumorii (pT) și implicarea limfonodală (pN), a fost relativ slabă, sugerând că impactul metabolic al diabetului asupra progresiei cancerului nu este semnificativ. În susținerea acestei idei vine și corelația slabă între nivelul de glucoză și stadiul tumorii (pT). Însă la asocierea diabetului am observat o creștere a invaziei limfovaskulare (LVI) și perineurale (PN), ceea ce sugerează o posibilă implicare a dereglărilor metabolice în progresia și diseminarea tumorii.

Interesant este faptul că gradul de diferențiere a cancerului nu a prezentat corelații statistice semnificative cu celelalte variabile din acest grup.

Și dacă morfologic nu au fost determinate diferențe multiple dintre grupuri, acestea s-au manifestat în cazul markerilor celulari. Astfel, expresia pentru ER și PR, a fost influențată de prezența DZT2. În cercetarea noastră, cazurile cu diabet s-au asociat mai frecvent cu subtipurile Luminal (ER⁺ și PR⁺). Acest fapt sugerează că diabetul poate modifica răspunsul la terapiile hormonale, astfel având implicații semnificative în managementul clinic al acestor pacienți, idee susținută și de alte date din literatură [244,245]. În cazul studiului curent, incidența tumorilor ER⁺ a fost de 60.2% la cei cu diabet, comparativ cu 52.2% la cei non-diabetici, în timp ce expresia PR a fost 35.2% la non-diabetici vs 39.7% la diabetici. Aceste date susțin rezultatele anterioare. De exemplu, Berstein *et al.* (2010) și Bronsveld *et al.* (2017) au determinat, că pacienții cu diabet au prezentat tumori ER⁺ în 60% comparativ cu 40% la cei non-diabetici, iar expresia PR a fost de 50% față de 30% în grupul non-diabetic [246]. Un argument prezentat de Wu *et al.* (2015, 2017) referitor la influența diabetului asupra markerilor hormoni sunt rezultatele conform cărora pacienții cu diabet au o incidență mai mare a cancerului mamar luminal, care după definiție este asociat cu o expresie crescută a ER și PR [180,247], observație confirmată și în studiul nostru unde Luminalele au constituit 59.5% la non-diabetici vs 68.9% la diabetici. Totuși trebuie de menționat că există date care susțin că influența diabetului asupra markerilor hormoni nu este atât de directă. Drept exemplu, Michailidou *et al.* (2013) și ulterior Kuol *et al.* (2022) au afirmat, că deși există anumite asocieri statistice între diabet și cancerul mamar, mecanismele prin care DZT2 ar putea afecta expresia ER și PR nu sunt încă descifrate [248,249]. Mai mult, Barr *et al.* (2011) care au investigat expresia receptorilor pentru ER, nu au determinat asocieri plauzibile la prezența diabetului, ceea ce limitează aplicabilitatea concluziilor lansate anterior [250]. În plus, Kim *et al.* (2012) care nu au abordat direct influența diabetului asupra subtipurilor de carcinom mamar, ci au discutat despre clasificarea acestora la asocierea DZT2, face ca referința să nu fie pe deplin relevantă pentru discuția privind răspunsul la terapiile hormonale în context diabetic [251]. De asemenea, este important de menționat că, în opinia lui Stevens *et al.* (2012) și Michailidou *et al.* (2013), dar și în studiul nostru, nu toți pacienții cu diabet, dezvoltă tumori ER⁺, ceea ce sugerează că alți factori, precum predispoziția genetică sau stilul de viață, pot influența rezultatele [249,252].

Complexitatea problemei se agravează la prezentarea argumentelor care susțin că diabetul poate avea un impact negativ asupra eficacității terapiilor hormonale. Crispo *et al.* (2016) au raportat că diabetul influențează negativ prognosticul pacienților cu carcinom mamar, iar prezența acestuia poate fi asociată cu o rezistență mai mare la tratamentele hormonale. Aceasta sugerează că există interacțiuni complexe între metabolismul glucozei și mecanismele de acțiune ale hormonilor [253].

Astfel, în sumar, datele studiului nostru și cele din literatura de specialitate sugerează că diabetul zaharat influențează expresia markerilor hormoni în cancerul mamar, în special în

subtipurile ER⁺ și PR⁺, ceea ce poate avea implicații majore în managementul clinic al acestor pacienți. Totuși, această influență este mult mai complexă și poate varia în funcție de alți factori clinici și biologici.

Analizând activitatea proliferativă, am constatat anumite diferențe ce țin de expresia Ki67 la pacienții cu carcinom mamar și diabet zaharat. Per total, Ki67 reprezintă un marker de proliferare celulară, iar nivelurile sale ridicate sunt asociate cu un prognostic nefavorabil [185].

Pacienții din cohorta noastră cu diabet au prezentat o expresie a Ki67 > 14% în proporție de 9,5%, comparativ cu lotul non-diabetic, unde frecvența a fost de 10,3%. Aceste diferențe nu au atins pragul de semnificație statistică ($p = 0.91$), sugerând o distribuție relativ omogenă a activității proliferative înalte între cele două grupuri, indiferent de statusul metabolic.

Trebuie însă de menționat că există studii care susțin ideea că diabetul poate exacerba creșterea tumorală și riscul de recurență [254,255]. Astfel, Hashmi *et al.* (2019) au demonstrat că un index Ki67 crescut este frecvent întâlnit în subtipurile agresive de carcinom mamar, cum ar fi cele HER2⁺ și Triplu-negative, asociate cu un comportament clinic mai agresiv și o rată mai mare de recidivă [177]. Studiul recent efectuat de către Sun *et al.* (2022) a pus în evidență faptul că, deși diabetul este corelat cu un prognostic mai slab, această asociere poate fi influențată și de alți factori, precum tratamentul antidiabetic și stilul de viață. De exemplu, Tobe *et al.* (2022) au evidențiat că pacienții diabetici cu insulinorezistență au un prognostic mai slab, subliniind importanța unei abordări complexe în tratamentul cancerului mamar, care să ia în considerare și controlul medicamentos cu metformina sistematic al diabetului [243,246,256].

HER2 și Ki67 reprezintă markeri esențiali ce caracterizează tumorile mamare. Conform datelor literaturii, pozitivitatea HER2 este observată în aproximativ 11.5% - 13.9% dintre cazurile de carcinom mamar. În studiul nostru, pacienții cu DZT2 și pozitivitate HER2 au prezentat 13.8%, comparativ cu pacienții non-diabetici cu HER2⁺, care au constituit 19%. În unele studii, pacienții cu carcinom mamar HER2⁺ asociat cu diabetul zaharat au avut un prognostic mai nefavorabil față de cei fără diabet. Rezultatele în cauză susțin că diabetul poate influența expresia HER2, contribuind la un comportament tumoral mai agresiv. Drept exemplu, Kucukzeybek (2024) susține, că inflamația cronică din DZT2 poate contribui la un comportament tumoral mai agresiv în cancerul mamar [234,236,257]. Ideea în cauză este susținută și de studiile lui Pöttgen *et al.* (2015), care au determinat, că un index Ki67 crescut este frecvent întâlnit în subtipurile agresive de carcinom mamar, inclusiv cele HER2⁺ [258], iar eterogenitatea intratumorală a expresiei HER2 poate influența răspunsul la tratamentele anti-HER2. Rye *et al.* (2018) au subliniat că modificările în statutul HER2 pot complica evaluarea prognostică, fapt ce sugerează că pacienții cu diabet care prezintă o expresie heterogenă a HER2 ar putea beneficia de o abordare terapeutică personalizată [259]. Deși există dovezi că diabetul poate influența negativ evoluția cancerului mamar HER2⁺,

nu toate studiile susțin o asociere consistentă. De exemplu, Liu *et al.* (2023) au raportat că pacienții cu carcinom mamar HER2⁺ nu au prezentat diferențe semnificative în supraviețuire în funcție de prezența diabetului, sugerând că alți factori, cum ar fi tratamentele utilizate, pot influența rezultatele [260].

Influența diabetului zaharat asupra prognosticului pacienților cu carcinom mamar HER2⁺ reprezintă un subiect complex și controversat. În cazul studiului nostru, am observat o serie de interacțiuni relevante între cele două afecțiuni. Unul din aceste aspecte ține de influența diabetului asupra comportamentului tumorilor HER2⁺. Trebuie de menționat însă, că în cazul pacienților diabetici am identificat o proporție semnificativ mai mare de celule Ki67 pozitive [261]. Diferențele observate subliniază necesitatea unor studii suplimentare.

Evaluarea profilului hormonal al tumorii a permis personalizarea tratamentului, îmbunătățind și prognosticul, aceste rezultate sunt în concordanță cu cele raportate de Leong & Zhuang (2011), care au subliniat importanța monitorizării continue a acestor markeri pentru ghidarea optimă a tratamentului [262]. Pe de altă parte, există și date contradictorii. În studiul realizat de Liu *et al.* (2018), a fost evidențiat faptul că pacienții cu tumori ER⁺, dar PR⁻, pot dezvolta o formă de rezistență la tratamentele endocrine, în special la modulatoarele receptorilor de estrogen [263]. În mod similar, alte studii au arătat că pacienții cu profil hormonal mixt (ER⁺/PR⁻) nu răspund întotdeauna la fel de bine la terapiile hormonale comparativ cu cei care exprimă ambii receptori [262, 264]. Aceste observații sugerează că prezența ER și PR nu este întotdeauna un indicator complet fiabil al succesului terapeutic, și că pot exista mecanisme suplimentare care contribuie la dezvoltarea rezistenței la tratament [262, 264]. Cu toate acestea, Inkov *et al.* (2016) sugerează că pacienții la care se atestă pierderea PR, deși prezintă un risc mai mare de rezistență la terapia endocrină standard (precum tamoxifenul), ar putea totuși să răspundă la inhibitorii de aromatază sau la terapiile combinate care vizează căile de semnalizare alternante (PI3K/Akt/mTOR). Această observație subliniază necesitatea unei profilări moleculare detaliate pentru a identifica alternative terapeutice eficiente în absența sensibilității clasice la progesteron. Evaluarea subtipurilor moleculare în contextul DZT2 reprezintă un aspect relevant al studiului nostru, cu implicații prognostice și de management clinic. Subtipurile B-like, caracterizate prin ER și/sau PR pozitive, HER2 pozitiv și Ki67 mai mare de 14%, sunt asociate în literatură cu un risc mai mare de recurență și o supraviețuire mai slabă comparativ cu subtipurile A-like, care sunt ER și PR pozitive, HER2 negative și Ki67<14% [265]. Importanța acestei distincții rezidă în observațiile lui Shao *et al.* (2018) și Abubakar *et al.* (2019). Aceștia au raportat trăsături clinice comparabile pentru subtipurile A-like și B-like, însă au demonstrat că prognosticul este considerabil mai nefavorabilă în cazul pacienților cu profil B-like [266,267]. Pe de o parte, argumentele în favoarea acestei corelații sunt susținute de datele din literatura de specialitate, care

sugerează că subtipurile B-like sunt mai agresive și răspund diferit la tratamentele standard. De exemplu, studiile de specialitate susțin că pacienții cu subtip B-like au o rată mai mare de recidivă, ceea ce subliniază necesitatea unor strategii terapeutice personalizate [268]. În studiul nostru, persoanele cu diabet au prezentat o prevalență mai mare a subtipurilor B-like, sugerând un potențial impact negativ al DZT2 asupra prognosticului. În cohorta analizată, proporția tumorilor B-like a fost de 58.9% în rândul cazurilor diabetice, comparativ cu 50% în grupul non-diabetic, susținând astfel observațiile anterioare [269]. Pe de altă parte, există și date care indică că nu toate subtipurile B-like sunt afectate în mod egal de prezența diabetului. Drept exemplu, Shao *et al.* (2018) au determinat, că pacienții cu subtipuri A-like pot avea, de asemenea, un prognostic mai rezervat la asocierea diabetului, în special în cazul în care există și alte comorbidități [267]. Acest lucru sugerează, că impactul diabetului asupra prognosticului cancerului mamar poate varia în funcție de caracteristicile individuale ale pacienților și de tipul specific de cancer. Similar, Bosco *et al.* (2011) sugerează că preparatele antidiabetice, cum ar fi metforminul, pot avea un efect protector asupra evoluției cancerului mamar, ceea ce complică interpretarea rezultatelor [270].

Astfel, asocierile dintre diabetul zaharat și subtipurile moleculare de carcinom mamar, în special B-like și A-like reprezintă un subiect complex și deseori controversat. Deși există dovezi că subtipurile B-like sunt asociate cu un prognostic mai slab, impactul diabetului asupra acestor subtipuri poate varia în funcție de caracteristicile individuale ale pacienților și de tratamentele utilizate. Această complexitate subliniază necesitatea unor studii suplimentare pentru a înțelege mai bine interacțiunile dintre diabet și tumorile mamare. Pe de altă parte, este important să se recunoască și limitările studiilor efectuate. De exemplu, clasificarea subtipurilor de carcinom mamar poate fi influențată de variabile precum vârsta pacientului, stadiul bolii și tratamentele anterioare, ceea ce poate complica interpretarea rezultatelor. De asemenea, este esențial să se ia în considerație faptul că nu toate tumorile, chiar de același subtip molecular se comportă în mod uniform, iar heterogenitatea biologică poate afecta răspunsul la tratament așa pune o sursă bibliografică.

Relația dintre gradul histologic, subtipurile moleculare și markerii predictivi în cancerul mamar rămâne un subiect complex și controversat.

Determinarea gradului histologic reprezintă un aspect esențial al agresivității tumorilor. Conform datelor literaturii, tumorile bine diferențiate (G1) constituie aproximativ 15.8%-19.1%, cele moderat diferențiate (G2) 54.2%-54.8%, iar tumorile slab diferențiate (G3) se întâlnesc în 21.7%-23.7% din cazuri [271]. Bloom și Richardson au demonstrat că gradul histologic, evaluat prin diferențierea nucleară și infiltrarea limfocitară, este un predictor semnificativ al prognosticului în cancerul mamar [272]. Aceste date au fost confirmate de Kurozumi *et al.* (2023) care au determinat, că gradul histologic influențează răspunsul la tratamentele neoadjuvante, în special în

cazul pacienților cu cancer HER2⁺ [273], iar Wang *et al.* au evidențiat că evaluarea histologică este esențială pentru aprecierea riscurilor [274].

Studiul realizat de Zhen *et al.* (2017) a pus în evidență asocieri importante dintre *Nottingham Prognostic Index*, gradul histologic și subtipurile moleculare, evidențiind că expresia pozitivă a receptorilor hormonal și un indice Ki67<14% sunt asociate cu un prognostic favorabil [275]. De asemenea, Wojnar *et al.* (2010) au observat o corelație pozitivă între expresia markerilor proliferativi, cum ar fi Ki67, MCM-2 și gradul histologic al tumorilor, sugerând că tumorile cu grad înalt (G3) au o activitate proliferativă mai mare [276]. Mamoor *et al.* (2022) recent au determinat, că subtipurile Bazal-like sunt asociate cu un grad histologic mai ridicat și cu un prognostic mai rezervat [277]. Rezultatele lui Kurozumi *et al.* (2023) sugerează, că caracteristicile moleculare ale tumorilor pot influența nu doar gradul histologic, ci și răspunsul la tratamentele specifice, cum ar fi chimioterapia [273]. De asemenea, Rakha *et al.* (2008) au demonstrat că gradul histologic, conform sistemului Nottingham, este un predictor puternic în cancerul invaziv [278].

Pe de altă parte, există studii care contrazic aceste date, sugerând că gradul histologic nu este întotdeauna un predictor fiabil al prognosticului. De exemplu, Desmedt *et al.* (2008) au determinat, că semnăturile biologice asociate cu rezultatele clinice depind de subtipurile moleculare, iar gradul histologic poate să nu ofere informații complete despre prognostic în anumite subgrupuri [279]. În plus, studiile lui Ma *et al.* (2008) sugerează că raportul HOXB13/IL17BR poate oferi informații prognostice suplimentare în cancerul ER⁺, independent de gradul histologic [280].

În studiul nostru, am observat că pacienții cu diabet zaharat au avut o proporție mai mică de tumori G3 (27.6%) comparativ cu pacienții fără diabet (37.2%). Această observație particulară, care pare a contrasta cu unele așteptări privind agresivitatea indusă de diabet, necesită o analiză mai aprofundată în contextul întregului profil clinico-patologic și molecular al lotului studiat. Conform datelor lui Pal și Gupta (2016) corelarea gradului histologic cu alte caracteristici clinice rămâne problematică. Conform autorilor, acestea pot influența deciziile terapeutice și conduce la tratamente inadecvate pentru pacienți [281]. De asemenea, studiile lui Kurozumi *et al.* (2023) sugerează că microARN-urile asociate cu gradul histologic pot oferi o perspectivă mai bună asupra răspunsului la tratamentele neoadjuvante, ceea ce indică faptul că gradul histologic, de unul singur, poate să nu fie suficient pentru a prezice rezultatele clinice [273].

Un alt aspect important ține de markerii predictivi, care pot varia semnificativ în funcție de subtipul molecular. În acest context, expresia PD-L1 a fost asociată cu un grad histologic înalt și cu o densitate crescută a limfocitelor infiltrante tumorale, sugerând, conform studiului realizat de CD *et al.* (2021), un prognostic mai favorabil în subtipurile HER2⁺ [282]. Însă Kim *et al.* (2017) au determinat [283], că expresia PD-L1 nu a avut o semnificație prognostică în toate subtipurile HER2⁺, ceea ce subliniază complexitatea interpretării acestor markeri [282]. Această variabilitate

sugerează că markerii predictivi nu sunt întotdeauna fiabili în caracterizarea subtipurilor moleculare.

Rezultatele studiului nostru indică faptul că diabetul zaharat influențează caracteristicile tumorilor mamare. Deși am observat o prevalență crescută a subtipului molecular Luminal B la pacientele cu DZT2, tradițional asociat cu un comportament mai agresiv, incidența gradului histologic G3 în studiul nostru a fost mai mică în lotul respectiv. Aceste date sugerează că diabetul poate amplifica agresivitatea biologică a cancerului mamar prin anumite mecanisme (de exemplu, favorizarea subtipului Luminal B), dar interacțiunile sunt mult mai complexe și necesită o monitorizare continuă a acestor factori. Integrarea gradului histologic și a subtipurilor moleculare în planurile terapeutice poate facilita personalizarea tratamentelor pentru pacienții cu comorbidități metabolice.

Astfel, relația dintre gradul histologic și subtipurile moleculare este una complexă; cu toate acestea, în literatura de specialitate prevalează studiile ce evidențiază gradul ca fiind un predictor important al prognosticului și al răspunsului la tratament.

Infiltrarea tumorii de către limfocitele T, în special a subpopulațiilor CD3⁺, CD4⁺ și CD8⁺, joacă un rol critic în modularea răspunsului imun antitumoral. Aceste celule sunt responsabile de coordonarea și eficacitatea răspunsului imun, iar studiul lor în TME poate oferi perspective importante asupra prognosticului. În cancerul mamar, densitatea acestor limfocite variază și în funcție de factorii sistemici, precum diabetul zaharat și de particularitățile tumorale, cum ar fi gradul histologic [261,284].

În cazul celulelor T CD3⁺, rezultatele studiului nostru au pus în evidență populații numerice diferite a acestora în funcție de coexistența diabetului și gradul tumorii, susținând ideile anterioare din literatură [48, 49]. Date similare cu rezultatele altor studii au fost obținute în cazul celulelor T CD4⁺ și CD8⁺ [75,76].

Limfocitele T CD4⁺ sunt considerate a avea un rol de susținere în orchestrarea răspunsului imun. În studiul lui Li *et al.* (2023), ele au fost clasificate în diverse subtipuri, inclusiv celule Th1, care stimulează activitatea altor limfocite și Tregs, care suprimă activitatea imună [285]. După Wang *et al.* (2021), echilibrul dintre aceste subpopulații este crucial fiindcă o creștere a Tregs în TME poate conduce la o diminuare a răspunsului antitumoral, deoarece acestea inhibă și activitatea limfocitelor T efectoare [286]. Aceste date sugerează că în TME se produce un dezechilibru, cel puțin cantitativ, al populațiilor de celule imune [287].

Problema devine mai complexă, susțin Huang *et al.* (2015) și Tawfeik *et al.* (2020), fiindcă limfocitele CD4⁺ joacă un rol dual în TME. Conform autorilor, populația Tregs, cunoscută pentru capacitatea de a suprimă răspunsurile imune și de a promova progresia tumorii, poate domina numeric [287–289]. Astfel, studiile în cauză au demonstrat că un raport dezechilibrat între celulele

CD4⁺ efectoare și Tregs poate conduce la dezvoltarea unui mediu imun supresor, favorizând astfel dezvoltarea tumorilor [288, 289]. Mai mult, nu doar numărul acestor celule este important. După Huang *et al.* (2015) și Liu *et al.* (2014) incidența numerică a celulelor CD4⁺ poate fi asociată cu rezultate clinice duale în funcție de starea lor funcțională și de contextul imun general [288, 290].

În studiul dat, am identificat o asociere statistică moderată dintre numărul celulelor CD4⁺ și prezența diabetului, ceea ce sugerează că această interacțiune necesită studii adăugătoare. Rezultatele anterioare prezentate de Hinshaw & Shevde (2019) și Jiao X *et al.* (2022), sugerează că hiperglicemia poate duce la o creștere a numărului de Tregs și la o scădere a activității celulelor T citotoxice, ceea ce poate contribui la un mediu favorabil pentru progresia tumorii [291, 292]. Aceasta sprijină ideea că pacienții cu diabet pot prezenta răspunsuri imune diferite în contextul cancerului mamar, ceea ce ar putea conduce la prognostice diferite și va necesita opțiuni terapeutice individualizate.

În cercetarea dată, la pacienții cu DZT2, populațiile limfocitare au înregistrat variații numerice sugestive, ceea ce necesită continuarea studiilor. În mod particular, în ceea ce privește densitatea limfocitelor T citotoxice (CD8it), a fost observată o tendință de diminuare a conținutului CD8it la pacientele cu DZT2 (15.2±11.3; mediana 13.5) comparativ cu cele non-diabetice (17.5±13.4; mediana 19.5).

În afară de factorii sistemici, cei locali la fel pot influența nemijlocit statutul imun. Astfel, CAFs pot influența infiltrarea cu celule T. De exemplu, studiul realizat de Koeck *et al.* (2017) a demonstrat că fibroblastele pot promova infiltrarea limfocitelor T CD8⁺ activate, sugerând că interacțiunile dintre celulele stromale și limfocitele T sunt cruciale pentru răspunsul imun antitumoral [34]. Autorii susțin că citokinele produse în cadrul TME pot influența recrutarea și activarea subpopulațiilor de limfocite T [34]. Celulele CD8⁺ sunt extrem de relevante și în contextul cancerului mamar. Densitatea crescută a celulelor T CD8⁺ observată în studiile anterioare este asociată cu un prognostic mai favorabil [85, 89, 293, 294], fapt susținut și de Nedergaard *et al.* (2007) care sugerează că prezența acestui infiltrat reprezintă un indicator important al unui răspuns imun eficient [295].

După Le *et al.* (2010), limfocitele T CD8⁺ sunt esențiale pentru distrugerea celulelor tumorale, iar eficiența procesului depinde de capacitatea de a infiltra tumora și de a recunoaște antigenele tumorale prezentate prin intermediul moleculelor MHC. Studiile în cauză au demonstrat, că niveluri sporite ale limfocitelor T CD8⁺ sunt corelate cu un prognostic mai favorabil în diverse tipuri de cancer, inclusiv mamar [296]. Dar, pe de altă parte, TME poate crea un mediu imun supresor care limitează infiltrarea cu limfocite T și funcția acestora [287]. Datele recente indică că anumite componente ale TME, cum ar fi CAFs și TAMs, pot remodela matricea extracelulară într-un mod special, ceea ce împiedică infiltrarea cu limfocite T [297]. Această

remodelare creează o barieră care limitează accesul limfocitelor T la celulele tumorale, facilitând astfel progresia tumorii și evaziunea imună. În plus, prezența limfocitelor Tregs în TME după studiul lui Wang *et al.* (2021) poate suprima activitatea limfocitelor T efectoare, contribuind la un mediu imun supresor [286]. Prezența moleculelor reglatoare de *checkpoint* imun, cum ar fi PD-1 și CTLA-4, relatează Blasi *et al.* (2020), poate inhiba funcția limfocitelor T CD8⁺, conducând spre epuizarea și reducerea activității antitumorale [298]. În contrast, după definiția generală, reducerea numărului de CD8⁺ se echivalează cu imunosupresie, ceea ce poate accelera progresia bolii și agrava prognosticul [83, 84, 140]. Rezultatele studiului nostru susțin dualitatea și complexitatea rolului CD8⁺. Astfel, am observat că în tumorile G3 pacienții diabetici au avut 13.5 celule CD8⁺ vs 19.5 la non-diabetici.

Astfel, sumarizând, inflamația cronică și modificările metabolice asociate diabetului și obezității pot afecta activitatea și recrutarea limfocitelor T în tumorile mamare [18, 299]. Acest fenomen sugerează că procesele inflamatorii cronice legate de diabet pot compromite funcționarea sistemului imun în combaterea tumorilor. Deși densitatea sporită a limfocitelor T în tumori este privită în general drept un indicator promițător, rezultatele controversate indică la necesitatea continuării studiilor în domeniu pentru o mai bună înțelegere a mecanismelor prin care cancerul poate evita răspunsul imun și a modului în care diabetul influențează aceste interacțiuni [36, 37, 78]. Standardizarea metodologiilor pentru evaluarea celulelor imune și o investigație mai profundă a acestor interacțiuni vor fi esențiale pentru dezvoltarea unor terapii mai eficiente, adaptate caracteristicilor individuale ale fiecărui pacient.

Celulele CD45⁺ și CD56⁺ au fost identificate ca având roluri importante pentru TME. În contextul diabetului, aceste celule pot suferi modificări care afectează evoluția cancerului mamar. În cadrul studiului curent, am investigat heterogenitatea celulelor CD45⁺ și CD56⁺ în microambianța carcinomului mamar, evaluând impactul acestora asupra progresiei tumorale.

CD45, un pan-marker leucocitar, joacă un rol important în activarea și reglarea activității imune. Acest marker s-a dovedit a fi și o țintă potențială pentru noi strategii de imunoterapie. Studiile indică, că celulele CD45⁺ sunt implicate în modularea răspunsului imun în diverse tipuri de tumori, inclusiv mamare. Drept exemplu, Menyailo *et al.* (2022) au identificat că, celulele CD45⁺ circulante au caracteristici moleculare distincte care le permit să evite supravegherea imună, ceea ce contribuie la progresia tumorii [300]. Această heterogenitate celulară poate influența nu doar evoluția cancerului, ci și răspunsul la terapiile imune. Unele cercetări în domeniu sugerează, că heterogenitatea celulelor CD45⁺ nu este întotdeauna asociată cu o progresie mai rapidă a cancerului. Astfel, Matić *et al.* (2018) indică că anumite subpopulații de celule CD45⁺ pot avea efecte imuno-regulatorii care limitează progresia tumorii, ceea ce este contrar așteptărilor. Aceasta sugerează că, în funcție de contextul specific al tumorii și de interacțiunile cu

microambianța, heterogenitatea acestor celule poate avea efecte variate asupra evoluției cancerului [301]. Studiul recent efectuat de Han *et al.* (2022) rezultă cu ideea că celulele CD45⁺, care includ de fapt și limfocitele T, și celulele NK, pot media un răspuns imun eficient împotriva tumorilor. Mai mult, a fost demonstrat că inhibarea SRC-3 duce la recrutarea celulelor imune CD4⁺, CD8⁺ și CD56⁺ în tumorile mamare, generând o microambianță imună favorabilă, antitumorală, cu tendință clară de a suprima progresia neoplasmului [302]. În cercetarea noastră, am observat că pacienții diabetici au prezentat o densitate medie a celulelor CD45⁺ (43 celule/câmp) ușor mai mare comparativ cu cei non-diabetici (40 celule/câmp). Aceste rezultate sugerează că CD45 ar putea fi utilizat nu doar ca marker pentru infiltratul imun, ci și ca o potențială țintă pentru reactivarea imunității tumorale, în ambele grupuri de pacienți. În alt studiu, prezentat de Raiter *et al.* (2021), a fost demonstrat că reactivarea semnalizării prin CD45 poate conduce la o creștere a activității celulelor T-CD69⁺ și NK-CD69⁺, declanșând în final apoptoza celulelor tumorale [303]. Această observație sugerează că o infiltrare crescută a celulelor CD45⁺ și CD56⁺ poate fi benefică în combaterea cancerului mamar. Celulele CD56⁺, sunt cunoscute pentru funcția lor citotoxică împotriva tumorilor. Datele din literatură însă sunt contradictorii. Studiile recente arată că subpopulațiile imature de celule CD56^{bright}CD16⁻ pot promova progresia tumorală prin activarea celulelor stem canceroase utilizând semnalizarea pe cale Wnt [304]. Depleția acestor celule sau inhibarea funcției lor ar putea reprezenta o strategie terapeutică promițătoare pentru încetinirea progresiei tumorale și optimizarea răspunsului la imunoterapiile actuale, precum agenții anti-PD-L1. Interesant este faptul că prezența markerului CD56 a fost corelată semnificativ cu expresia receptorilor de estrogen (ER) $p = 0,022$, sugerând că densitatea celulelor NK poate fi un indicator indirect al unui prognostic mai favorabil în tumorile ER⁺ [305].

Acker *et al.* (2019) au concluzionat, că celulele CD56⁺ au capacitatea de a media citotoxicitatea naturală împotriva celulelor tumorale. Însă, heterogenitatea acestor celule poate influența eficiența răspunsului imun. Astfel, există date precum că homodimerizarea CD56 este asociată cu o activitate crescută a celulelor NK, ceea ce sugerează că expresia CD56 poate îmbunătăți formarea conexiunilor imunologice citotoxice [306]. Însă, după Aloysius *et al.* (2010), în contextul cancerului colorectal, expresia CD56 nu este asociată cu invazia tumorală sau prognostic global favorabil, sugerând că rolul său poate fi limitat [307]. Deci, nu toate tipurile de carcinom mamar pot răspunde similar la modificările ce țin de expresia CD56. De asemenea, un studiu realizat de Kerekes *et al.* (2017) prezintă că în țesuturile mamare cu modificări fibrochistice, nivelurile de CD56 sunt semnificativ mai scăzute, ceea ce ar putea indica o capacitate redusă de a media eficient răspunsurile imune [308]. Datele respective pun în evidență ideea că scăderea expresiei CD56 nu este neapărat un factor favorizant pentru progresia cancerului, ci mai degrabă o consecință a modificărilor TME.

La ziua de azi există dovezi care sugerează, că diabetul poate compromite funcția celulelor CD45⁺ și CD56⁺. De exemplu, Siddiqui *et al.* (2022) au observat că diabetul de tip 2 are un impact negativ asupra caracteristicilor clinice ale pacienților cu carcinom mamar, sugerând că mecanismele biologice asociate cu diabetul pot influența negativ prognosticul cancerului [309]. În plus, un studiu realizat de Tobe *et al.* (2022) indică că pacienții cu diabet au un risc crescut de apariție și dezvoltare a cancerului mamar, ceea ce sugerează că condițiile metabolice pot afecta negativ răspunsul imun. Aceste concluzii au fost legate de diminuarea numărului de celule. Totuși, studiul nostru a demonstrat că în DZT2 nu este vorba doar de o simplă scădere, ci de o distribuție alterată: celulele NK se acumulează în stroma peritumorală (blocaj), fiind incapabile să penetreze tumora, ceea ce explică lipsa controlului imun local.

Deși există dovezi care indică că heterogenitatea celulelor CD45⁺ și CD56⁺ poate influența progresia cancerului mamar, în special în contextul diabetului, interacțiunile dintre aceste celule și microambianța tumorală rămân a fi neelucidate [310]. Din studiul nostru au derivat câteva constatări: o densitate semnificativ mai mare a celulelor CD56⁺ în zona peritumorală la pacientele cu DZT2, corelată negativ cu markerii de agresivitate. Aceste observații sugerează că diabetul poate modula distribuția și funcția acestor celule imune.

Astfel, heterogenitatea celulelor CD45⁺ și CD56⁺ pare să aibă un acțiune dublu, contribuind atât la stimularea, cât și la inhibarea răspunsului imun, în funcție de contextul metabolic al pacientului. Această nuanțare este susținută de studii anterioare, însă rezultatele noastre aduc dovezi suplimentare privind modul în care diabetul poate amplifica influența acestor celule asupra evoluției bolii.

Celulele CD34 pozitive, recunoscute pentru rolul lor esențial în angiogeneză și regenerare vasculară, au o contribuție majoră și în procesele de vascularizare a tumorilor și în dezvoltarea metastazelor, conform studiilor realizate de Chen *et al.* (2013) și Gutiérrez *et al.* (2023), rezultă, că celulele CD34⁺ joacă un rol crucial în angiogeneza tumorală, ceea ce poate influența progresia și metastazarea [311], [312]. În mod similar, Ch'ng *et al.* (2012) au evidențiat importanța acestui marker pentru evaluarea potențialului metastatic al tumorilor sugerând că densitatea microvasculară crescută susține angiogeneza, care este esențială pentru creșterea tumorilor și metastazare [313]. Pe de altă parte, există studii care contestă ideea că celulele CD34⁺ au un impact semnificativ asupra progresiei cancerului mamar în special în contextul diabetului. De exemplu, Nakayama *et al.* (2000) au sugerat, că expresia CD34 poate varia semnificativ în diferite tipuri de cancer și tumorile mamare prezintă asocieri diferite dintre celulele CD34⁺ și progresia bolii [314]. În același context, Rossini *et al.* (2012) au evidențiat că celulele CD34⁺, derivate din sângele cordonului ombilical și transduse cu un vector adenoviral pentru a exprima TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), prezintă o activitate citotoxică semnificativă împotriva celulelor de

carcinom mamar. Acest lucru sugerează că astfel de celule modificate ar putea fi utilizate ca vehicule pentru livrarea terapiei țintite, contribuind activ la supravegherea imună și la inducerea apoptozei tumorale [315]. Astfel, acest marker oferă o oportunitate terapeutică pentru utilizarea celulelor CD34⁺ în tratamentele țintite.

CD34 nu este exprimat exclusiv de celulele stem și cele angiogene. De exemplu, fibroblastele CD34⁺ în anumite cazuri pot avea un efect protector. Westhoff *et al.* (2020) au observat că dispariția fibroblastelor CD34⁺ în cancerul lobular invaziv este asociată cu un prognostic mai slab, ceea ce sugerează că prezența acestor celule poate fi benefică în anumite contexte [100, 284].

În cazul studiului nostru, la pacienții cu diabet, am constatat că expresia și funcționalitatea celulelor CD34 pozitive sunt profund afectate, ceea ce poate avea consecințe negative asupra evoluției cancerului mamar [287]. Pacienții diabetici au prezentat o capacitate redusă de regenerare vasculară, iar răspunsul lor la tratament a fost semnificativ mai slab în comparație cu pacienții fără diabet [316,317]. Aceste rezultate susțin datele prezentate de Foca *et al.* (2023), care demonstrează că diabetul influențează negativ funcționalitatea celulelor CD34 pozitive, afectând posibil mecanismele autocrine și paracrine responsabile de angiogeneză [234]. În plus, Lin *et al.* (2020) susțin că disfuncția vasculară la pacienții diabetici poate agrava progresia cancerului mamar prin limitarea angiogenezei eficiente [316].

La moment există un șir de evidențe precum că diabetul poate afecta numărul și funcția celulelor CD34⁺. Fadini *et al.* (2010) au concluzionat, că pacienții cu diabet de tip 2 prezintă o diminuare a numărului celulelor CD34⁺ circulante, ceea ce poate influența negativ capacitatea organismului de a răspunde la tumori [317]. În opinia autorilor, această scădere a cantității de celulele CD34⁺ poate contribui la o progresie rapidă a cancerului mamar în rândul pacienților diabetici, deoarece aceste celule joacă un rol important în repararea țesuturilor și în răspunsurile imune. În studiul nostru, am identificat variații semnificative ale densității microvasculare, ceea ce indică faptul că interacțiunea dintre carcinomul mamar și diabetul zaharat este mediată de procese de angiogeneză intensificate în prezența hiperglicemiei. Aceste evidențe arată, că diabetul poate modifica TME prin diverse mecanisme, contribuind la un prognostic nefavorabil. În mod similar, Chen *et al.* (2017) au subliniat, că DZT2 este asociat cu un risc crescut de carcinom mamar, iar această legătură este determinată de mecanismele care afectează angiogeneza și funcționalitatea celulelor CD34 [318]. Siddiqui *et al.* (2022) au confirmat, de asemenea, că diabetul poate influența caracteristicile clinice ale pacienților cu carcinom mamar, determinând o evoluție mai rapidă a bolii [287,309]. Astfel, reiese că nivelul celulelor CD34 pozitive poate servi drept biomarker util în evaluarea riscului de recurență și a progresiei bolii. Pacienții cu o densitate sporită de celule CD34 pozitive în tumorile lor au un risc mai mare de a dezvolta metastaze și un prognostic mai

slab în comparație cu cei cu o densitate scăzută de astfel de celule. Aceste constatări sunt susținute și de studiile lui Westhoff *et al.* (2020), care subliniază importanța celulelor CD34 în predicția evoluției clinice a cancerului mamar [100].

Constatăm, că celulele CD34 pozitive joacă un rol complex și tot odată ambiguu în cancerul mamar, cu potențial atât benefic, cât și distructiv, în funcție de contextul microambianței tumorale TMA. În mod particular, aceste celule sunt implicate în procese critice precum angiogeneza, susținerea celulelor stem și remodelarea țesutului, contribuind la dezvoltarea și progresia tumorilor. Determinarea în premieră a corelațiilor negative statistice semnificative dintre CD34 și precum gradul histologic, scorul Nottingham și indicele de proliferare Ki67 la pacientele cu DZT2, sugerează o „angieneză disfuncțională”, unde densitatea numerică joasă a vaselor sangvine poate fi asociată cu un prognostic mai nefavorabil din cauza calității precare a acestora și a hipoxiei induse. Diabetul, prin influențele sale metabolice, adaugă o nouă dimensiune acestor interacțiuni complexe, perturbând echilibrul angiogenic și contribuind la imunosupresie. Este evident că relația dintre celulele CD34⁺, microambianța tumorală și diabet este una complicată. Înțelegerea mai bună a modului în care diabetul influențează funcția celulelor CD34⁺ în cancerul mamar va permite dezvoltarea unor strategii terapeutice eficiente.

Macrofagele CD68⁺ reprezintă celule controversate din perspectiva conținutului și a funcției. Unul din obiectivele acestei lucrări a fost de a înțelege mai bine modul în care diabetul influențează activitatea TAM-urilor și de a identifica posibile strategii terapeutice care să țină cont de această comorbiditate.

Studiile recente în domeniu au demonstrat, că densitatea celulelor CD68 pozitive diferă semnificativ la pacienții diabetici și cei non-diabetici. Muppala *et al.* (2020) au determinat, că în tumorile mamare la pacienții cu diabet, nivelurile de celule CD68⁺ sunt semnificativ elevate, ceea ce sugerează o infiltrare mai intensă a macrofagelor în microambianța tumorală [319]. Acest infiltrat poate fi asociat cu un răspuns inflamator exacerb, care poate influența progresia cancerului. În literatura de specialitate, densitatea celulelor CD68 pozitive este discutată și în contextul unor aspecte clinice și patologice. De exemplu, Abbasi *et al.* (2023) au demonstrat că tumorile cu un grad histologic înalt au o densitate mai mare de celule CD68⁺, sugerând o asociere dintre inflamație și agresivitatea tumorii [320]. Această observație este relevantă în contextul pacienților diabetici, care prezintă inflamație sistemică, influențând posibil și densitatea celulelor CD68⁺ în tumorile mamare. De asemenea, Chen *et al.* (2023) au observat că o densitate sporită a CD68⁺ este asociată cu invazia vasculară și cu prezența limfocitelor T infiltrate în tumoare, ceea ce sugerează că aceste celule pot influența microambianța tumorală și respectiv prognosticul [321]. Această interacțiune este deosebit de importantă în cazul diabeticilor, agravând situația cu un răspuns imun alterat.

În contrast, studiul lui Abbasi *et al.* (2023) a evidențiat că în cancerul mamar de grad înalt, densitatea celulelor CD68 pozitive a fost invers asociată cu expresia receptorilor hormonal, sugerând că tumorile cu caracteristici diferite pot prezenta nivele variate de infiltrare cu macrofage [320]. Această observație sugerează că, deși pacienții diabetici pot avea o densitate mai mare de macrofage CD68⁺, caracteristicile intrinsece ale tumorii (precum profilul hormonal și gradul de agresivitate) tumorii pot influența răspunsul imun. Totodată, Buldakov *et al.* (2017) au observat că expresia CD68 a fost invers corelată cu metastazele limfatice în cancerul mamar, indicând că o densitate mai mare de celule CD68 pozitive poate fi asociată cu un prognostic mai favorabil în anumite contexte [322]. Aceasta sugerează că, în ciuda inflamației pronunțate observate la pacienții diabetici, prezența macrofagelor CD68 pozitive poate avea efecte variate asupra progresiei tumorii. Datele sus-menționate sunt în discordanță cu cercetările efectuate de Medrek *et al.* (2012) și Ni *et al.* (2019), care sugerează că infiltrarea masivă a macrofagelor în stroma tumorală este asociată cu o invazie tumorală și o rată crescută de metastazare, ceea ce indică o corelație directă dintre prezența crescută a celulelor CD68 și agresivitatea tumorală [323, 324]. Studiul nostru susține această idee, prezentând câteva corelații dintre densitatea celulelor CD68⁺ și parametrii de agresivitate tumorală la pacientele cu DZT2, și anume:

- conținutul celulelor CD68⁺ intratumorale (CD68it) a corelat pozitiv și semnificativ statistic cu extinderea nodală (pN) ($r_s=0.42$, $p=0.01$);
- densitatea CD68⁺ peritumorale (CD68pt) a corelat pozitiv și semnificativ statistic atât cu activitatea mitotică ($r_s=0.44$, $p=0.01$), cât și cu dimensiunea tumorii (pT) ($r_s=0.33$, $p=0.04$).

Datele în cauză subliniază rolul pro-tumoral al macrofagelor în context diabetic, asociindu-le cu factori cheie ai progresiei și agresivității cancerului mamar. Mai mult, această concluzie este susținută și prin faptul că pacienții diabetici au avut o densitate mai mare de macrofage CD68 pozitive, comparativ cu pacienții non-diabetici. În special, am constatat o densitate medie a CD68it de 10.61 ± 9.85 celule/ câmp la pacientele cu DZT2, față de 9.5 ± 7.5 celule/ câmp la non-diabetice, și CD68pt de 16.3 ± 16.1 celule/ câmp la DZT2, față de 12.4 ± 12.2 celule/ câmp la non-diabetice. Aceste diferențe sugerează o infiltrare macrofagală mai pronunțată în caz de DZT2. Acest lucru poate fi explicat prin prezența inflamației sistemice, inclusiv și în tumoare, la pacienții cu diabet, [325].

În opinia lui Muppala *et al.* (2020), CD68it în condiții de hiperglicemie sunt activate și contribuie la inflamația cronică, ceea ce poate agrava progresia cancerului [319]. Această activare a macrofagelor poate conduce la o secreție crescută de citokine pro-inflamatorii, care pot influența negativ prognosticul pacienților cu carcinom mamar. Pe de altă parte, după cum a fost menționat anterior, în studiul lui Chen *et al.* (2023), expresia CD68 este asociată cu invazia vasculară și cu

prezența limfocitelor tumorale infiltrante, ceea ce poate fi un indicator al agresivității neoplasmului [321]. Aceasta confirmă ideea că, densitatea celulelor CD68 pozitive poate fi considerat drept un factor de prognostic.

Actualmente, macrofagele sunt clasificate în 2 categorii cu funcții distincte. Astfel, în DZT2 s-a constatat o predominanță a macrofagelor M1 (proinflamatorii) în detrimentul macrofagelor M2 (antiinflamatorii), ceea ce poate agrava progresia cancerului mamar. Aceste rezultate sugerează că diabetul modifică microambianța tumorală într-o „direcție proinflamatorie”, prin polarizarea anormală a macrofagelor [326,327].

Shiota *et al.* (2016) susține că densitatea celulelor CD68⁺ în tumorile mamare rămâne relativ uniformă, ceea ce diferă fiind numărul de celule CD169⁺ (un alt marker macrofagal), sugerând că microambianța tumorală este influențată de prezența diabetului [328]. Reiese că, deși CD68⁺ poate fi stabil, alte fenotipuri macrofagale pot varia semnificativ. În plus, un studiu de meta-analiză realizat de Ni *et al.* (2019) a determinat, că o densitate mare de CD68⁺ este asociată direct cu metastazele limfonodale și cu un grad histologic slab, ceea ce sugerează că pacienții diabetici ar putea avea o progresie mai rapidă a bolii [324]. Acest fapt indică că la asocierea diabetului și conținutului sporit de celulele CD68⁺ pacienții vor avea un prognostic mai rezervat.

În studiul nostru, am observat că macrofagele CD68 pozitive sunt distribuite predominant în stroma peritumorală, și nu în interiorul tumorii propriu-zise [261]. Această distribuție sugerează că macrofagele peritumorale pot juca un rol activ în modularea microambianței tumorale prin mecanisme paracrine [329,330]. Mai mult, după Yang *et al.* (2018) raportează că prezența unui număr mare de macrofage CD68 pozitive poate influența răspunsul la tratament [330].

Astfel, evaluarea numerică a celulelor CD68 pozitive în cancerul mamar la pacienți diabetici și non-diabetici evidențiază complexitatea interacțiunilor ce țin de inflamație, microambianța tumorală și caracteristicile biologice ale neoplasmului. Celulele TAM, joacă un rol esențial în modularea răspunsului imun și a progresiei tumorale. Acestea sunt implicate în numeroase procese biologice relevante pentru dezvoltarea cancerului, cum ar fi inflamația cronică, angiogeneza și remodelarea aș scrie remodelarea matricei extracelulare. În cazul pacienților diabetici, inflamația sistemică pronunțată și modificările metabolice asociate cu această boală pot influența direct comportamentul TAM-urilor, conducând la o densitate mai mare de celule CD68 pozitive în tumoare, așa cum am observat și în studiul nostru. Concluziile în cauză sunt susținute de studiul nostru prin determinarea corelațiilor pozitive semnificative statistic între CD68it și extinderea nodală (pN), între CD68pt și activitatea mitotică și dimensiunea tumorii (pT) la pacientele cu DZT2. Studiile existente, inclusiv constatările noastre, sugerează că o densitate sporită a macrofagelor CD68⁺ este asociată cu un prognostic mai nefavorabil, promovând o evoluție mai agresivă a tumorii

CONCLUZII GENERALE

1. Glanda mamară în postmenopauză prezintă modificări involutive asociate proceselor fiziologice de senescență și remodelare tisulară. Carcinomul mamar invaziv de tip NST, în contextul diabetului zaharat de tip 2, prezintă caracteristici morfologice și proliferative mai agresive, exprimate prin dimensiuni tumorale crescute, scor histologic mai avansat și activitate proliferativă accentuată, comparativ cu cazurile fără comorbiditate metabolică.
2. Parenchimul mamar postmenopauzal se caracterizează printr-un status particular de control imun, evidențiat prin distribuția predominantă a limfocitelor CD3⁺ și CD8⁺ la nivelul stromei glandulare, concomitent cu localizarea preferențială a leucocitelor CD4⁺ și CD56⁺ în compartimentul epitelial. În contrast, carcinomul mamar asociat diabetului zaharat de tip 2 prezintă un status imun celular local profund alterat, caracterizat prin creșterea semnificativă a populației de macrofage CD68⁺ intratumorale și prin corelații imune sugestive pentru dezvoltarea unei microambianțe tumorale imunosupresive, favorabile progresiei neoplazice.
3. În carcinomul mamar asociat diabetului zaharat de tip 2, angiogeneza tumorală este caracterizată printr-o arhitectură microvasculară dezorganizată și o funcționalitate vasculară deficitară, aspecte evidențiate de asocieri statistice semnificative între densitatea microvasculară CD34⁺ și markerii de agresivitate și proliferare tumorală. Aceste corelații sunt sugestive pentru o perfuzie tisulară compromisă și pentru instalarea unei microambianțe tumorale hipoxice, favorabilă progresiei neoplazice.
4. Glanda mamară în postmenopauză prezintă o expresie redusă a receptorilor steroizi (ER, PR), precum și a markerilor HER2 și Ki67. Diferențele dintre carcinomul mamar, cu și fără diabet zaharat asociat nu se reflectă în nivelurile cantitative ale expresiei ER, PR sau HER2, ci în tiparele de asociere statistică ale acestor markeri cu activitatea proliferativă (Ki67), care, în ansamblu, indică un profil tumoral mai agresiv.
5. Microambianța tumorală în carcinomul mamar invaziv de tip NST asociat diabetului zaharat de tip 2 este caracterizată printr-o remodelare complexă, rezultată din interacțiunea dinamică dintre componentele imune, vasculare și hormonale. Această remodelare se produce în absența modificărilor distribuției subtipurilor moleculare, însă exercită un impact semnificativ asupra comportamentului proliferativ tumoral.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Se recomandă includerea evaluării markerilor imunologici (CD3, CD4, CD8, CD68) în analiza histopatologică a carcinomului mamar, în special la pacientele cu diabet zaharat de tip 2, în vederea caracterizării statusului imun tumoral.
2. Se recomandă aprecierea concomitentă a potențialului angiogen (CD34) și a infiltratului imun celular, pentru o evaluare complexă a microambianței tumorale.
3. Se propune integrarea parametrilor imunologici și moleculari (ER, PR, HER2, Ki67) în stratificarea prognostică a pacientelor cu carcinom mamar asociat DZT2.
4. Se recomandă monitorizarea particularităților imunologice tumorale la pacientele cu DZT2, în vederea individualizării conduitei terapeutice.
5. Se impune luarea în considerare a impactului dereglărilor metabolice asupra a microambianței tumorale în elaborarea strategiilor terapeutice personalizate.
6. Se recomandă dezvoltarea unor protocoale integrate de evaluare histopatologică și imunohistochimică, care să includă markerii imunității celulare și ai angiogenezei în carcinomul mamar asociat DZT2.
7. Se propune utilizarea markerilor imunologici ca potențiali indicatori ai evoluției tumorale și ai răspunsului la tratament la pacientele cu comorbiditate metabolică.

Bibliografie

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
- [2] Varn FS, Mullins DW, Arias-Pulido H, et al. Adaptive immunity programmes in breast cancer. *Immunology*. 2017;150(1):25–34. doi: 10.1111/imm.12664.
- [3] Bordea C, Bordea M, Totan A, et al. Immunological aspects predicting metastatic sentinel lymph node in early breast cancer patients. *J Med Life*. 2012;5(4):455–61.
- [4] Weber F, Shen L, Fukino K, et al. Total-genome analysis of BRCA1/2-related invasive carcinomas of the breast identifies tumor stroma as potential landscaper for neoplastic initiation. *Am J Hum Genet*. 2006;78(6):961–72. doi: 10.1086/504090.
- [5] Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018;19(1):40–50. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X.
- [6] Salgado R, Loi S. Tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer: increasing clinical relevance. *Lancet Oncol*. 2018;19(1):3–5. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30905-1.
- [7] Saltz J, Gupta R, Hou L, et al. Spatial organization and molecular correlation of tumor-infiltrating lymphocytes using deep learning on pathology images. *Cell Rep*. 2018;23(1):181–193.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.086.
- [8] Asghar A, Sheikh N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. *Cell Immunol*. 2017;315:18–26. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.03.001.
- [9] Calabro P, Yeh ET. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem*. 2007;42:63–91.
- [10] Ghazarian M, Luck H, Revelo XS, et al. Immunopathology of adipose tissue during metabolic syndrome. *Turk Patoloji Derg*. 2015;31(Suppl 1):172–80. doi: 10.5146/tjpath.2015.01323.
- [11] Sun L, Wang X, Saredy J, et al. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol*. 2020;37:101759. doi: 10.1016/j.redox.2020.101759.
- [12] Wang L, Zhong L, Xu B, et al. Diabetes mellitus and the risk of ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort and case-control studies. *BMJ Open*. 2020;10(3):e040137. doi: 10.1136/bmjopen-2020-040137.
- [13] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
- [14] Guariguata L, Whiting D, Weil C, et al. The International Diabetes Federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;94(3):322–32. doi: 10.1016/j.diabres.2011.10.040.
- [15] Khan MAB, Hashim MJ, King JK, et al. Epidemiology of type 2 diabetes – global burden of disease and forecasted trends. *J Epidemiol Glob Health*. 2020;10(1):107–11. doi: 10.2991/jegh.k.191028.001.
- [16] Sanegre S, Lucantoni F, Burgos-Panadero R, et al. Integrating the tumor microenvironment into cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1677. doi: 10.3390/cancers12061677.
- [17] Ioacara S, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, et al. Cancer specific mortality in insulin-treated type 2 diabetes patients. *PLoS One*. 2014;9(3):e93132. doi: 10.1371/journal.pone.0093132.
- [18] Lampropoulou IT, Stangou M, Sarafidis P, et al. TNF- α pathway and T-cell immunity are activated early during the development of diabetic nephropathy in type II diabetes mellitus. *Clin Immunol*. 2020;215:108423. doi: 10.1016/j.clim.2020.108423.
- [19] Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(3):446–62. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.017.

- [20] McLaughlin T, Liu LF, Lamendola C, et al. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(12):2637–43. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304636.
- [21] Anestiadi Z, Vudu L, Alexa Z, Harea D, Zota L, Virtosu A, et al. Diabetul zaharat necomplicat: protocol clinic national PCN-33. Chisinau: Ministerul Sanatatii al Republicii Moldova; 2012.
- [22] Verhulst MJL, Loos BG, Gerdes VEA, et al. Evaluating all potential oral complications of diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:56. doi: 10.3389/fendo.2019.00056.
- [23] Wang C, Shih S, Huang K. Increasing risk of diabetes mellitus in postmenopausal women with newly diagnosed primary breast cancer. *J Diabetes Investig.* 2020;11(2):490–8. doi: 10.1111/jdi.13112.
- [24] Cazet A, Julien S, Bobowski M, et al. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(3):204. doi: 10.1186/bcr2577.
- [25] Zhu B, Qu S. The relationship between diabetes mellitus and cancers and its underlying mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:800995. doi: 10.3389/fendo.2022.800995.
- [26] Halamkova J, Kazda T, Pehalova L, et al. The impact of diabetes mellitus on the second primary malignancies in colorectal cancer patients. *Front Oncol.* 2021;10:573394. doi: 10.3389/fonc.2020.573394.
- [27] Vincent EE, Yaghootkar H. Using genetics to decipher the link between type 2 diabetes and cancer: shared aetiology or downstream consequence? *Diabetologia.* 2020;63(9):1706–17. doi: 10.1007/s00125-020-05228-y.
- [28] Zhu H, Doğan BE. American Joint Committee on Cancer’s staging system for breast cancer, eighth edition: summary for clinicians. *Eur J Breast Health.* 2021;17(3):234–8. doi: 10.4274/ejbh.galenos.2021.2021-4-3.
- [29] WHO Classification of Tumours Editorial Board, editor. Breast tumours. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019.
- [30] Zeitoun G, Sissy CE, Kirilovsky A, et al. The immunoscore in the clinical practice of patients with colon and rectal cancers. *Chirurgia (Bucur).* 2019;114(2):152. doi: 10.21614/chirurgia.114.2.152.
- [31] Zamfir M, Hudita A, Mardare M, Bondoc I, Vacarasu A, Tanase BC, et al. Optimization of a flow cytometry protocol for PD-1/CTLA-4 immune checkpoints receptors detection in colorectal cancer tumour microenvironment. *Farmacia.* 2023;71(2):367-374. doi: 10.31925/farmacia.2023.2.17.
- [32] Ibrahim A, Serkan YF, Tuba A, et al. Can neutrophil to lymphocyte ratio be a predictor tool for the non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer? *Chirurgia (Bucur).* 2019;114(1):83. doi: 10.21614/chirurgia.114.1.83.
- [33] Law AMK, Lim E, Ormandy CJ, et al. The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(4):R123–44. doi: 10.1530/ERC-16-0404.
- [34] Koeck S, Kern J, Zwierzina M, et al. The influence of stromal cells and tumor-microenvironment-derived cytokines and chemokines on CD3+CD8+ tumor infiltrating lymphocyte subpopulations. *Oncoimmunology.* 2017;6(7):e1323617. doi: 10.1080/2162402X.2017.1323617.
- [35] Glajcar A, Szpor J, Hodorowicz-Zaniewska D, et al. The composition of T cell infiltrates varies in primary invasive breast cancer of different molecular subtypes as well as according to tumor size and nodal status. *Virchows Arch.* 2019;475(1):13–23. doi: 10.1007/s00428-019-02568-y.
- [36] Bates JP, Derakhshandeh R, Jones L, et al. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer.* 2018;18:556. doi: 10.1186/s12885-018-4441-3.
- [37] Li JJ, Tsang JY, Tse GM. Tumor microenvironment in breast cancer—updates on therapeutic implications and pathologic assessment. *Cancers (Basel).* 2021;13(16):4233. doi: 10.3390/cancers13164233.

- [38] Klopfenstein Q, Derangère V, Arnould L, et al. Evaluation of tumor immune contexture among intrinsic molecular subtypes helps to predict outcome in early breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2021;9(6):e002036. doi: 10.1136/jitc-2020-002036.
- [39] Shi Y, Chen S, Xing H, et al. Comprehensive analysis of prognostic microenvironment-related genes in invasive breast cancer. *Front Oncol*. 2022;11:576911. doi: 10.3389/fonc.2021.576911.
- [40] Zou J, Duan D, Yu C, et al. Mining the potential prognostic value of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25) in colon cancer based on stromal-immune score. *PeerJ*. 2020;8:e10142. doi: 10.7717/peerj.10142.
- [41] Caruntu A, Moraru L, Lupu M, et al. Prognostic potential of tumor-infiltrating immune cells in resectable oral squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2268. doi: 10.3390/cancers13092268.
- [42] Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259–71. doi: 10.1093/annonc/mdu450.
- [43] Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(6):235–51. doi: 10.1097/PAP.000000000000162.
- [44] Pruneri G, Lazzeroni M, Bagnardi V, et al. The prevalence and clinical relevance of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ductal carcinoma in situ of the breast. *Ann Oncol*. 2017;28(2):321–8. doi: 10.1093/annonc/mdw623.
- [45] Khan AM, Yuan Y. Biopsy variability of lymphocytic infiltration in breast cancer subtypes and the ImmunoSkew score. *Sci Rep*. 2016;6:36231. doi: 10.1038/srep36231.
- [46] Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. *JAMA Oncol*. 2016;2(10):1354–60. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1061.
- [47] He Q, Xue S, Wa Q, et al. Mining immune-related genes with prognostic value in the tumor microenvironment of breast invasive ductal carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(11):e25715. doi: 10.1097/MD.00000000000025715.
- [48] Chetty R, Gatter K. CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *J Pathol*. 1994;173(4):303–7. doi: 10.1002/path.1711730404.
- [49] Mariuzza RA, Agnihotri P, Orban J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: an enduring enigma. *J Biol Chem*. 2020;295(4):914–25. doi: 10.1016/S0021-9258(17)49904-2.
- [50] Fischer A, de Saint Basile G, Le Deist F. CD3 deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(6):491–5. doi: 10.1097/01.all.0000191886.12645.79.
- [51] Richardsen E, Uglehus RD, Due J, et al. The prognostic impact of M-CSF, CSF-1 receptor, CD68 and CD3 in prostatic carcinoma. *Histopathology*. 2008;53(1):30–8. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03058.x.
- [52] Mao Y, Sun J, Wang W, et al. Clinical significance of costimulatory molecule B7-H3 expression on CD3+T cells in colorectal carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(16):3035–8. doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20122512.
- [53] Mansuri N, Birkman EM, Heuser VD, et al. Association of tumor-infiltrating T lymphocytes with intestinal-type gastric cancer molecular subtypes and outcome. *Virchows Arch*. 2021;478(4):707–17. doi: 10.1007/s00428-020-02932-3.
- [54] Wang N, Patel H, Schneider IC, et al. An optimal antitumor response by a novel CEA/CD3 bispecific antibody for colorectal cancers. *Antib Ther*. 2021;4(2):90–100. doi: 10.1093/abt/tbab009.
- [55] Wang C, Chen S, Wu Y, et al. The combination therapy with EpCAM/CD3 BsAb and MUC-1/CD3 BsAb elicited antitumor immunity by T-cell adoptive immunotherapy in lung cancer. *Int J Med Sci*. 2021;18(15):3380–8. doi: 10.7150/ijms.61681.

- [56] Li H, Zhang Q, Shuman L, et al. Evaluation of PD-L1 and other immune markers in bladder urothelial carcinoma stratified by histologic variants and molecular subtypes. *Sci Rep*. 2020;10(1):1439. doi: 10.1038/s41598-020-58351-6.
- [57] Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R. Tertiary lymphoid organs in cancer tissues. *Front Immunol*. 2016;7:244. doi: 10.3389/fimmu.2016.00244.
- [58] Kim H, Kwon HJ, Han YB, et al. Increased CD3⁺ T cells with a low FOXP3⁺/CD8⁺ T cell ratio can predict anti-PD-1 therapeutic response in non-small cell lung cancer patients. *Mod Pathol*. 2019;32(3):367–75. doi: 10.1038/s41379-018-0142-3.
- [59] Yu X, Zhang Z, Wang Z, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol*. 2016;18(5):497–506. doi: 10.1007/s12094-015-1391-y.
- [60] Mao Y, Qu Q, Chen X, et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152500. doi: 10.1371/journal.pone.0152500.
- [61] Nair-Gupta P, Rudnick SI, Luistro L, et al. Blockade of VLA4 sensitizes leukemic and myeloma tumor cells to CD3 redirection in the bone marrow microenvironment. *Blood Cancer J*. 2020;10(5):1–13. doi: 10.1038/s41408-020-0331-4.
- [62] Liang H, Li H, Xie Z, et al. Quantitative multiplex immunofluorescence analysis identifies infiltrating PD1⁺ CD8⁺ and CD8⁺ T cells as predictive of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Thorac Cancer*. 2020;11(10):2941–54. doi: 10.1111/1759-7714.13639.
- [63] Parra ER, Behrens C, Rodriguez-Canales J, et al. Image analysis–based assessment of PD-L1 and tumor-associated immune cells density supports distinct intratumoral microenvironment groups in non–small cell lung carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2016;22(24):6278–89. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2443.
- [64] Kim NI, Park MH, Cho N, et al. Comparison of the clinicopathologic features and T-cell infiltration of B7-H3 and B7-H4 expression in triple-negative breast cancer subtypes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2022;30(4):246. doi: 10.1097/PAI.0000000000001001.
- [65] Taki S, Kamada H, Inoue M, et al. A novel bispecific antibody against human CD3 and ephrin receptor A10 for breast cancer therapy. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144712. doi: 10.1371/journal.pone.0144712.
- [66] Tchou J, Zhao Y, Levine BL, et al. Safety and efficacy of intratumoral injections of chimeric antigen receptor (CAR) T cells in metastatic breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(12):1152–61. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0189.
- [67] Hillen LM, Vandyck HLD, Leunissen DJG, et al. Integrative histopathological and immunophenotypical characterisation of the inflammatory microenvironment in spitzoid melanocytic neoplasms. *Histopathology*. 2021;78(4):607–26. doi: 10.1111/his.14259.
- [68] Barbosa AM, Martinho O, Nogueira R, et al. Increased CD3⁺, CD8⁺, or FoxP3⁺ T lymphocyte infiltrations are associated with the pathogenesis of colorectal cancer but not with the overall survival of patients. *Biology (Basel)*. 2021;10(8):808. doi: 10.3390/biology10080808.
- [69] Dar AA, Pradhan TN, Kulkarni DP, et al. Extracellular 2'5'-oligoadenylate synthetase 2 mediates T-cell receptor CD3- ζ chain down-regulation via caspase-3 activation in oral cancer. *Immunology*. 2016;147(2):251–64. doi: 10.1111/imm.12560.
- [70] Tomasini C. Cytotoxic-mediated spontaneous regression of inflammatory cutaneous metastases of breast carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2020;47(8):758-763. doi: 10.1111/cup.13694.
- [71] Tokunaga E, Okano S, Nakashima Y, et al. Spontaneous regression of breast cancer with axillary lymph node metastasis: a case report and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(7):4371–80.
- [72] Ohara M, Koi Y, Sasada T, et al. Spontaneous regression of breast cancer with immune response: a case report. *Surg Case Rep*. 2021;7(1):10. doi: 10.1186/s40792-020-01103-5.
- [73] Rohan TE, Arthur R, Wang Y, et al. Infiltrating immune cells in benign breast disease and risk of subsequent invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2021;23(1):43. doi: 10.1186/s13058-021-01395-x.

- [74] Kos Z, Roblin E, Kim RS, et al. Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2020;6:17. doi: 10.1038/s41523-020-0156-0.
- [75] Yano H, Andrews LP, Workman CJ, et al. Intratumoral regulatory T cells: markers, subsets and their impact on anti-tumor immunity. *Immunology*. 2019;157(3):232–47. doi: 10.1111/imm.13067.
- [76] Meng S, Li L, Zhou M, et al. Distribution and prognostic value of tumor-infiltrating T cells in breast cancer. *Mol Med Rep*. 2018;17(6):8448–8458. doi: 10.3892/mmr.2018.9460.
- [77] De Angelis C, Nagi C, Hoyt CC, et al. Evaluation of the predictive role of tumor immune infiltrate in patients with HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anti-HER2 therapy without chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2020;26(3):738–45. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1402.
- [78] Goff SL, Danforth DN. The role of immune cells in breast tissue and immunotherapy for the treatment of breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2021;21(1):e63–73. doi: 10.1016/j.clbc.2020.06.011.
- [79] Verma R, Hanby AM, Horgan K, et al. Levels of different subtypes of tumour-infiltrating lymphocytes correlate with each other, with matched circulating lymphocytes, and with survival in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2020;183(1):49–59. doi: 10.1007/s10549-020-05757-5.
- [80] Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2873–92. doi: 10.1172/JCI67428.
- [81] Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, 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;26(5):623–37. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.006.
- [82] Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(11):651–68. doi: 10.1038/s41577-020-0306-5.
- [83] Terranova-Barberio M, Pawlowska N, Dhawan M, et al. Exhausted T cell signature predicts immunotherapy response in ER-positive breast cancer. *Nat Commun*. 2020;11(1):3584. doi: 10.1038/s41467-020-17414-y.
- [84] Kaewkangsadan V, Verma C, Eremin JM, et al. Crucial contributions by T lymphocytes (effector, regulatory, and checkpoint inhibitor) and cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a pathological complete response induced by neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer. *J Immunol Res*. 2016;2016:4757405. doi: 10.1155/2016/4757405.
- [85] Wu K, Zheng X, Yao Z, et al. Accumulation of CD45RO+CD8+ T cells is a diagnostic and prognostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(10):14304–21. doi: 10.18632/aging.203045.
- [86] Zugazagoitia J, Gupta S, Liu Y, et al. Biomarkers associated with beneficial PD-1 checkpoint blockade in non-small cell lung cancer (NSCLC) identified using high-plex digital spatial profiling. *Clin Cancer Res*. 2020;26(16):4360–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0175.
- [87] Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, et al. Prediction of treatment response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer by subtype using tumor-infiltrating lymphocytes. *Anticancer Res*. 2018;38(4):2311–21. doi: 10.21873/anticancer.12476.
- [88] Wein L, Savas P, Luen SJ, et al. Clinical validity and utility of tumor-infiltrating lymphocytes in routine clinical practice for breast cancer patients: current and future directions. *Front Oncol*. 2017;7:156. doi: 10.3389/fonc.2017.00156.
- [89] Banin-Hirata BK, de Oliveira CEC, Losi-Guembarovski R, et al. The prognostic value of regulatory T cells infiltration in HER2-enriched breast cancer microenvironment. *Int Rev Immunol*. 2018;37(3):144–50. doi: 10.1080/08830185.2017.1401620.
- [90] Catteau X, Simon P, Vanhaeverbeek M, et al. Variable stromal periductular expression of CD34 and smooth muscle actin (SMA) in intraductal carcinoma of the breast. *PLoS One*. 2013;8(2):e57773. doi: 10.1371/journal.pone.0057773.
- [91] Teo NB, Shoker BS, Jarvis C, et al. Vascular density and phenotype around ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *Br J Cancer*. 2002;86(6):905–11. doi: 10.1038/sj.bjc.6600053.

- [92] Frangou EM, Lawson J, Kanthan R. Angiogenesis in male breast cancer. *World J Surg Oncol*. 2005;3:16. doi: 10.1186/1477-7819-3-16.
- [93] Krishnapriya S, Malipatil B, Surekha S, et al. Microvessel density (MVD) in locally advanced breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(5):1537–45. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.5.1537.
- [94] Felix AS, Lenz P, Pfeiffer RM, et al. Relationships between mammographic density, tissue microvessel density, and breast biopsy diagnosis. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):88. doi: 10.1186/s13058-016-0746-9.
- [95] Bujor IS, Cioca A, Ceaușu RA, et al. Evaluation of vascular proliferation in molecular subtypes of breast cancer. *In Vivo*. 2018;32(1):79–83. doi: 10.21873/invivo.11207.
- [96] Fox SB. Assessing tumor angiogenesis in histological samples. *Methods Mol Biol*. 2009;467:55–78. doi: 10.1007/978-1-59745-241-0_3.
- [97] Verheul H, Voest E, Schlingemann R. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol*. 2004;202(1):5–13. doi: 10.1002/path.1473.
- [98] Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Lizartza K, et al. Behavior of in situ human native adipose tissue CD34+ stromal/progenitor cells during different stages of repair. Tissue-resident CD34+ stromal cells as a source of myofibroblasts. *Anat Rec*. 2014;298(5):917–30. doi: 10.1002/ar.23086.
- [99] Díaz-Flores L, Gutiérrez R, González-Gómez M, et al. CD34+ stromal cells/telocytes as a source of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in invasive lobular carcinoma of the breast. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3686. doi: 10.3390/ijms22073686.
- [100] Westhoff CC, Jank P, Jacke C, et al. Prognostic relevance of the loss of stromal CD34 positive fibroblasts in invasive lobular carcinoma of the breast. *Virchows Arch*. 2020;477(4):493–503. doi: 10.1007/s00428-020-02835-3.
- [101] Kishaba Y, Matsubara D, Niki T. Heterogeneous expression of nestin in myofibroblasts of various human tissues. *Pathol Int*. 2010;60(5):378–85. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02532.x.
- [102] Tremp M, Menzi N, Tchang L, et al. Adipose-derived stromal cells from lipomas: isolation, characterisation and review of the literature. *Pathobiology*. 2016;83(5):258–66. doi: 10.1159/000444501.
- [103] Khan AA, Alam K, Harris H. A clinicopathological study of CD34 antigen expression in benign and malignant breast lesions. *J Clin Exp Pathol*. 2017;7(3):1–9. doi: 10.4172/2161-0681.1000321.
- [104] Mamoor S. CD34 is differentially expressed in central nervous system metastasis [Preprint]. OSF; 2023. doi: 10.31219/osf.io/g6q9y.
- [105] Forsare C, Vistrand S, Ehinger A, et al. The prognostic role of intratumoral stromal content in lobular breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4):941. doi: 10.3390/cancers14040941.
- [106] Nakagawa S, Miki Y, Miyashita M, et al. Tumor microenvironment in invasive lobular carcinoma: possible therapeutic targets. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;155(1):65–75. doi: 10.1007/s10549-015-3668-9.
- [107] Kacar A, Arikok AT, Kokenek Unal TD, et al. Stromal expression of CD34, α -smooth muscle actin and CD26/DPPIV in squamous cell carcinoma of the skin: a comparative immunohistochemical study. *Pathol Oncol Res*. 2011;18(1):25–31. doi: 10.1007/s12253-011-9412-9.
- [108] Hu G, Wang S. Tumor-infiltrating CD45RO+ memory T lymphocytes predict favorable clinical outcome in solid tumors. *Sci Rep*. 2017;7(1):10376. doi: 10.1038/s41598-017-11122-2.
- [109] Peng RQ, Wu XJ, Ding Y, et al. Co-expression of nuclear and cytoplasmic HMGB1 is inversely associated with infiltration of CD45RO+ T cells and prognosis in patients with stage IIIB colon cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:496. doi: 10.1186/1471-2407-10-496.
- [110] Schnellhardt S, Erber R, Büttner-Herold M, et al. Tumour-infiltrating inflammatory cells in early breast cancer: an underrated prognostic and predictive factor? *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8238. doi: 10.3390/ijms21218238.

- [111] Figenschau SL, Fismen S, Fenton KA, et al. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2015;15:101. doi: 10.1186/s12885-015-1116-1.
- [112] Fernandes ATG, Carvalho MOO, Avvad-Portari E, et al. A prognostic value of CD45RA+, CD45RO+, CCL20+ and CCR6+ expressing cells as 'immunoscore' to predict cervical cancer induced by HPV. *Sci Rep*. 2021;11(1):8782. doi: 10.1038/s41598-021-88248-x.
- [113] Smolkova B, Cierna Z, Kalavska K, et al. Increased stromal infiltrating lymphocytes are associated with the risk of disease progression in mesenchymal circulating tumor cell-positive primary breast cancer patients. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9460. doi: 10.3390/ijms21249460.
- [114] Landskron J, Kraggerud SM, Wik E, et al. C77G in PTPRC (CD45) is no risk allele for ovarian cancer, but associated with less aggressive disease. *PLoS One*. 2017;12(7):e0182030. doi: 10.1371/journal.pone.0182030.
- [115] Kwiecień I, Rutkowska E, Sokołowski R, et al. Effector memory T cells and CD45RO+ regulatory T cells in metastatic vs non-metastatic lymph nodes in lung cancer patients. *Front Immunol*. 2022;13:864497. doi: 10.3389/fimmu.2022.864497.
- [116] Hardy WR, Moldovan NI, Moldovan L, et al. Transcriptional networks in single perivascular cells sorted from human adipose tissue reveal a hierarchy of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2017;35(5):1273–89. doi: 10.1002/stem.2599.
- [117] Ye N, Cai J, Dong Y, et al. A multi-omic approach reveals utility of CD45 expression in prognosis and novel target discovery. *Front Genet*. 2022;13:928328. doi: 10.3389/fgene.2022.928328.
- [118] Julia T, Zhang Paul J, Yingtao B, et al. Fibroblast activation protein expression by stromal cells and tumor-associated macrophages in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2013;44(11):2549–57. doi: 10.1016/j.humpath.2013.06.016.
- [119] Dötzer K, Schlüter F, Schoenberg MB, et al. Immune heterogeneity between primary tumors and corresponding metastatic lesions and response to platinum therapy in primary ovarian cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9):1250. doi: 10.3390/cancers11091250.
- [120] Hong ZF, Zhao WX, Yin ZY, et al. Natural killer cells inhibit pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma in nude mice. *Oncol Lett*. 2016;11(3):2019–26. doi: 10.3892/ol.2016.4170.
- [121] Lee HA, Goh HG, Lee YS, et al. Natural killer cell activity is a risk factor for the recurrence risk after curative treatment of hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2021;21(1):258. doi: 10.1186/s12876-021-01833-2.
- [122] Oh S, Lee JH, Kwack K, et al. Natural killer cell therapy: a new treatment paradigm for solid tumors. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1534. doi: 10.3390/cancers11101534.
- [123] Tao L, Wang S, Yang L, et al. Reduced Siglec-7 expression on NK cells predicts NK cell dysfunction in primary hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Immunol*. 2020;201(2):161–70. doi: 10.1111/cei.13444.
- [124] Uppendahl LD, Dahl CM, Miller JS, et al. Natural killer cell-based immunotherapy in gynecologic malignancy: a review. *Front Immunol*. 2018;8:1825. doi: 10.3389/fimmu.2017.01825.
- [125] Khan M, Arooj S, Wang H. NK cell-based immune checkpoint inhibition. *Front Immunol*. 2020;11:167. doi: 10.3389/fimmu.2020.00167.
- [126] Vyth-Dreese FA, Sein J, van de Kastele W, et al. Lack of anti-tumour reactivity despite enhanced numbers of circulating natural killer T cells in two patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(3):447–59. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04274.x.
- [127] Pan Y, Wu Y, Ji J, et al. Effect of cytokine-induced killer cells on immune function in patients with lung cancer. *Oncol Lett*. 2016;11(4):2827–34. doi: 10.3892/ol.2016.4284.
- [128] Yang J, Xu J, E Y, et al. Predictive and prognostic value of circulating blood lymphocyte subsets in metastatic breast cancer. *Cancer Med*. 2019;8(2):492–500. doi: 10.1002/cam4.1891.

- [129] Carter JM, Hoskin TL, Pena MA, et al. Macrophagic “crown-like structures” are associated with an increased risk of breast cancer in benign breast disease. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2018;11(2):113–9. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-17-0245.
- [130] Santiago-Fernández C, Pérez-Belmonte LM, Millán-Gómez M, et al. Overexpression of scavenger receptor and infiltration of macrophage in epicardial adipose tissue of patients with ischemic heart disease and diabetes. *J Transl Med*. 2019;17(1):95. doi: 10.1186/s12967-019-1842-2.
- [131] Jamiyan T, Kuroda H, Yamaguchi R, et al. CD68- and CD163-positive tumor-associated macrophages in triple negative cancer of the breast. *Virchows Arch*. 2020;477(6):767–75. doi: 10.1007/s00428-020-02855-z.
- [132] Mwafy SE, El-Guindy DM. Pathologic assessment of tumor-associated macrophages and their histologic localization in invasive breast carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2020;32(1):6. doi: 10.1186/s43046-020-0018-8.
- [133] Shinohara H, Kobayashi M, Hayashi K, et al. Spatial and quantitative analysis of tumor-associated macrophages: intratumoral CD163-/PD-L1+ TAMs as a marker of favorable clinical outcomes in triple-negative breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13235. doi: 10.3390/ijms232113235.
- [134] Sari S, Özdemir Ç, Çilekar M. The relationship of tumour-associated macrophages (CD68, CD163, CD11c) and cancer stem cell (CD44) markers with prognostic parameters in breast carcinomas. *Pol J Pathol*. 2022;73(4):299–309. doi: 10.5114/pjp.2022.125424.
- [135] Allison E, Edirimanne S, Matthews J, et al. Breast cancer survival outcomes and tumor-associated macrophage markers: a systematic review and meta-analysis. *Oncol Ther*. 2023;11(1):27–48. doi: 10.1007/s40487-022-00214-3.
- [136] Nagel A, Popeda M, Muchlinska A, et al. ER α 36-high cancer-associated fibroblasts as an unfavorable factor in triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(8):2005. doi: 10.3390/cancers14082005.
- [137] Carter JM, Chumsri S, Hinerfeld DA, et al. Distinct spatial immune microlandscapes are independently associated with outcomes in triple-negative breast cancer. *Nat Commun*. 2023;14(1):2215. doi: 10.1038/s41467-023-37806-0.
- [138] Jeong H, Hwang I, Kang SH, et al. Tumor-associated macrophages as potential prognostic biomarkers of invasive breast cancer. *J Breast Cancer*. 2019;22(1):38–51. doi: 10.4048/jbc.2019.22.e5.
- [139] Volodko N, Gutor T, Petronchak O, et al. Low infiltration of tumor-associated macrophages in high c-Myb-expressing breast tumors. *Sci Rep*. 2019;9(1):11634. doi: 10.1038/s41598-019-48051-1.
- [140] Mehta AK, Kadel S, Townsend MG, et al. Macrophage biology and mechanisms of immune suppression in breast cancer. *Front Immunol*. 2021;12:643771. doi: 10.3389/fimmu.2021.643771.
- [141] Sasamoto N, Wang T, Townsend MK, et al. Prospective analyses of lifestyle factors related to energy balance and ovarian cancer risk by infiltration of tumor-associated macrophages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021;30(5):920–6. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-20-1686.
- [142] Wei C, Yang C, Wang S, et al. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2019;18(1):64. doi: 10.1186/s12943-019-0976-4.
- [143] Hu Y, Yang C, Shen G, et al. Hyperglycemia-triggered sphingosine-1-phosphate and sphingosine-1-phosphate receptor 3 signaling worsens liver ischemia/reperfusion injury by regulating M1/M2 polarization. *Liver Transpl*. 2019;25(7):1074–90. doi: 10.1002/lt.25470.
- [144] Sukocheva OA. Estrogen, estrogen receptors, and hepatocellular carcinoma: are we there yet? *World J Gastroenterol*. 2018;24(1):1–4. doi: 10.3748/wjg.v24.i1.1.
- [145] Cavener DR, Gupta S, McGrath BC. PERK in beta cell biology and insulin biogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(12):714–21. doi: 10.1016/j.tem.2010.08.005.

- [146] Fedele CG, Ooms LM, Ho M, et al. Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(51):22231–6. doi: 10.1073/pnas.1015245107.
- [147] Zheng Y, Zhang J, Xu Z, et al. Quantitative profiles of the mRNAs of ER- α and its novel variant ER- α 36 in breast cancers and matched normal tissues. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010;11(2):144–50. doi: 10.1631/jzus.B0900266.
- [148] Tufail R, Jorda M, Zhao W, et al. Loss of Yes-associated protein (YAP) expression is associated with estrogen and progesterone receptors negativity in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;131(3):743–50. doi: 10.1007/s10549-011-1435-0.
- [149] Erkinüresin T, Demirci H, Aker FV. Estrogen receptor expression in normal breast epithelium in invasive ductal carcinoma. *Eur Res J*. 2021;7(1):66–73. doi: 10.18621/eurj.560939.
- [150] Björner S, Rosendahl AH, Simonsson M, et al. Body Mass Index Influences the Prognostic Impact of Combined Nuclear Insulin Receptor and Estrogen Receptor Expression in Primary Breast Cancer. *Front Endocrinol*. 2017;8:114. doi: 10.3389/fendo.2017.00332.
- [151] Jaini R, Loya MG, Eng C. Immunotherapeutic target expression on breast tumors can be amplified by hormone receptor antagonism: a novel strategy for enhancing efficacy of targeted immunotherapy. *Oncotarget*. 2017;8(20):32536–49. doi: 10.18632/oncotarget.15812.
- [152] Katsuta E, Maawy AA, Yan L, et al. High expression of bone morphogenetic protein (BMP) 6 and BMP7 are associated with higher immune cell infiltration and better survival in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncol Rep*. 2019;42(4):1413–21. doi: 10.3892/or.2019.7275.
- [153] O'Brien CS, Farnie G, Howell SJ, et al. Breast cancer stem cells and their role in resistance to endocrine therapy. *Horm Cancer*. 2011;2(2):91–103. doi: 10.1007/s12672-011-0066-6.
- [154] Monteiro R, Teixeira D, Calhau C. Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:615917. doi: 10.1155/2014/615917.
- [155] Rose DP, Vona-Davis L. The cellular and molecular mechanisms by which insulin influences breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(6):R225–241. doi: 10.1530/ERC-12-0203.
- [156] May FE. Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2014;6:225–52. doi: 10.2147/CMAR.S35024.
- [157] Brand JS, van der Schouw YT, Onland-Moret NC, et al. Age at menopause, reproductive life span, and type 2 diabetes risk: results from the EPIC-InterAct study. *Diabetes Care*. 2013;36(4):1012–9. doi: 10.2337/dc12-1020.
- [158] Werner LR, Gibson KA, Goodman ML, et al. Progesterone promotes immunomodulation and tumor development in the murine mammary gland. *J Immunother Cancer*. 2021;9(5):e001710. doi: 10.1136/jitc-2020-001710.
- [159] Trabert B, Sherman ME, Kannan N, et al. Progesterone and breast cancer. *Endocr Rev*. 2019;41(2):320–44. doi: 10.1210/endrev/bnz001.
- [160] Kim G, Lee JG, Cheong SA, et al. Progesterone receptor membrane component 1 is required for mammary gland development. *Biol Reprod*. 2020;103(6):1249–59. doi: 10.1093/biolre/ioaa164.
- [161] Need EF, Selth LA, Trotta AP, et al. The unique transcriptional response produced by concurrent estrogen and progesterone treatment in breast cancer cells results in upregulation of growth factor pathways and switching from a luminal A to a basal-like subtype. *BMC Cancer*. 2015;15:791. doi: 10.1186/s12885-015-1819-3.
- [162] Gomag M. *Biochimie pentru farmaciști. Hormonii în reglarea proceselor metabolice. Vol I.* București: Editura Universitară; 2021.
- [163] Li Z, Wei H, Li S, et al. The role of progesterone receptors in breast cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2022;16:305. doi: 10.2147/DDDT.S336643.
- [164] Lan C, Cao N, Chen C, et al. Progesterone, via yes-associated protein, promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Cell Prolif*. 2020;53(7):e12910. doi: 10.1111/cpr.12910.

- [165] Ples L. Endometrial safety of ulipristal acetate treatment for symptomatic uterine fibroids in premenopausal women - a systematic review. *Farmacia*. 2018;66(5):763-769. doi: 10.31925/farmacia.2018.5.4.
- [166] Luo Y, Li Q, Fang J, et al. The loss of progesterone receptor predicts more aggressive biological features and worse outcomes in estrogen receptor-positive and HER2-negative inflammatory breast cancer [Preprint]. *Research Square*; 2023. doi: 10.21203/rs.3.rs-3221306/v1.
- [167] Godbole M, Togar T, Patel K, et al. Up-regulation of the kinase gene SGK1 by progesterone activates the AP-1–NDRG1 axis in both PR-positive and -negative breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2018;293(49):19263–76. doi: 10.1074/jbc.RA118.002894.
- [168] Hao Q, Huang Z, Li Q, et al. A novel metabolic reprogramming strategy for the treatment of diabetes-associated breast cancer. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(24):2102303. doi: 10.1002/advs202102303.
- [169] Yadav N, Sunder R, Desai S, et al. Progesterone modulates the DSCAM-AS1/miR-130a/ESR1 axis to suppress cell invasion and migration in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2022;24(1):97. doi: 10.1186/s13058-022-01597-x.
- [170] Kim HJ, Kwon H, Lee JW, et al. Metformin increases survival in hormone receptor-positive, HER2-positive breast cancer patients with diabetes. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):64. doi: 10.1186/s13058-015-0574-3.
- [171] Godbole M, Tiwary K, Badwe R, et al. Progesterone suppresses the invasion and migration of breast cancer cells irrespective of their progesterone receptor status - a short report. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017;40(4):411–7. doi: 10.1007/s13402-017-0330-z.
- [172] Laurinavicius A, Plancoulaine B, Laurinaviciene A, et al. A methodology to ensure and improve accuracy of Ki67 labelling index estimation by automated digital image analysis in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res*. 2014;16(2):R35. doi: 10.1186/bcr3639.
- [173] Healey MA, Hirko KA, Beck AH, et al. Assessment of Ki67 expression for breast cancer subtype classification and prognosis in the Nurses' Health Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;166(2):613–22. doi: 10.1007/s10549-017-4421-3.
- [174] Pathmanathan N, Balleine RL, Jayasinghe UW, et al. The prognostic value of Ki67 in systemically untreated patients with node-negative breast cancer. *J Clin Pathol*. 2014;67(3):222–8. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201793.
- [175] Khan Q, Fabian C, Kimler B, et al. Abstract P3-13-04: change in oncotype DX variables and Ki67 response and outcome in women with ER positive early breast cancer treated with neoadjuvant anastrozole and fulvestrant. *Cancer Res*. 2018;78(4_Supplement). doi: 10.1158/1538-7445.SABCS17-P3-13-04.
- [176] Wang J, Sang D, Xu B, et al. Value of breast cancer molecular subtypes and Ki67 expression for the prediction of efficacy and prognosis of neoadjuvant chemotherapy in a Chinese population. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(18):e3518. doi: 10.1097/MD.0000000000003518.
- [177] Hashmi AA, Hashmi KA, Irfan M, et al. Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes*. 2019;12(1):605. doi: 10.1186/s13104-019-4653-x.
- [178] Hashmi AA, Edhi MM, Naqvi H, et al. Clinicopathologic features of triple negative breast cancers: an experience from Pakistan. *Diagn Pathol*. 2014;9:43. doi: 10.1186/1746-1596-9-43.
- [179] Li H, Han X, Liu Y, et al. Ki67 as a predictor of poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer. *Oncol Lett*. 2015;9(1):149–52. doi: 10.3892/ol.2014.2618.
- [180] Wu H, Wang H, Guan S, et al. Cell-specific regulation of proliferation by Ano1/TMEM16A in breast cancer with different ER, PR, and HER2 status. *Oncotarget*. 2017;8(50):84996–5013. doi: 10.18632/oncotarget.18662.
- [181] Sun JZ, Chen C, Jiang G, et al. Quantum dot-based immunofluorescent imaging of Ki67 and identification of prognostic value in HER2-positive (non-luminal) breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1339–46. doi: 10.2147/IJN.S58881.

- [182] Tokuda E, Horimoto Y, Arakawa A, et al. Differences in Ki67 expressions between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy specimens might predict early recurrence of breast cancer. *Hum Pathol.* 2017;63:40–5. doi: 10.1016/j.humpath.2017.02.005.
- [183] Ali A, Mohamed M, Khattab N, et al. Relationship between diabetes mellitus and clinicopathological stages of breast cancer at diagnosis. *Benha Med J.* 2020;37(2):68–80. doi: 10.21608/bmfj.2020.103526.
- [184] Li M, Cao J, He Y, et al. Generation and biological characteristics of a mouse model of breast cancer that copresents with diabetes mellitus. *Anat Rec (Hoboken).* 2019;302(2):269–77. doi: 10.1002/ar.23945.
- [185] Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(22):1656–64. doi: 10.1093/jnci/djr393.
- [186] Min W, Wang B, Guo A, et al. The effect of metformin on the clinicopathological features of breast cancer with type 2 diabetes. *World J Oncol.* 2020;11(1):23–32. doi: 10.4021/wjon.v11i1.1242.
- [187] Luo J, Virnig B, Hendryx M, et al. Diabetes, diabetes treatment and breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;148(1):153–62. doi: 10.1007/s10549-014-3146-9.
- [188] Cao Y, Rosenblum MG. Design, development, and characterization of recombinant immunotoxins targeting HER2/neu. In: Phillips GL, editor. *Antibody-drug conjugates and immunotoxins: pre-clinical development and therapeutic applications.* New York: Springer; 2013. p. 319-348. doi: 10.1007/978-1-4614-5456-4_18.
- [189] Alper Ö, Akoa A, Alper ÖM, et al. Abstract 3489: a novel monoclonal antibody to native HER2 epitope detects HER2-positive CTCs, HER2 in blood, and HER2 in tissue: realistic approach for monitoring breast carcinoma. *Cancer Res.* 2013;73(8_Supplement). doi: 10.1158/1538-7445.AM2013-3489.
- [190] Xu H, Aguilar ZP, Yang L, et al. Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood. *Biomaterials.* 2011;32(36):9758–65. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.076.
- [191] Koman IE, Commane M, Paszkiewicz G, et al. Targeting FACT complex suppresses mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5(8):1025–35. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0529.
- [192] Baumann J, Wong J, Sun Y, et al. Palmitate-induced ER stress increases trastuzumab sensitivity in HER2/neu-positive breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2016;16:551. doi: 10.1186/s12885-016-2611-8.
- [193] Blasquez L, Bouzinba-Segard H, Bourdoulous S, et al. Ebselen oxide and derivatives are new allosteric HER2 inhibitors for HER2-positive cancers. *Mol Oncol.* 2023;17(10):1981–99. doi: 10.1002/1878-0261.13419.
- [194] Onsum MD, Geretti E, Paragas V, et al. Single-cell quantitative HER2 measurement identifies heterogeneity and distinct subgroups within traditionally defined HER2-positive patients. *Am J Pathol.* 2013;183(5):1446–60. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.07.015.
- [195] Wuellner U, Klupsch K, Buller F, et al. Bispecific CD3/HER2 targeting FynomAb induces redirected T cell-mediated cytotoxicity with high potency and enhanced tumor selectivity. *Antibodies (Basel).* 2015;4(4):426–40. doi: 10.3390/antib4040426.
- [196] Diessner J, Bruttel V, Stein RG, et al. Targeting of preexisting and induced breast cancer stem cells with trastuzumab and trastuzumab emtansine (T-DM1). *Cell Death Dis.* 2014;5(3):e1149. doi: 10.1038/cddis.2014.115.
- [197] Chow A, Arteaga CL, Wang SE. When tumor suppressor TGF β meets the HER2 (ERBB2) oncogene. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011;16(2):81–8. doi: 10.1007/s10911-011-9206-4.
- [198] Yan Y, Zheng L, Zhang X, et al. Blockade of Her2/neu binding to Hsp90 by emodin azide methyl anthraquinone derivative induces proteasomal degradation of Her2/neu. *Mol Pharm.* 2011;8(10):1687–97. doi: 10.1021/mp2000499.

- [199] Zhuang W, Zhang W, Wang L, et al. Generation of a novel SORT1×HER2 bispecific antibody–drug conjugate targeting HER2-low-expression tumor. *Int J Mol Sci.* 2023;24(22):16056. doi: 10.3390/ijms242216056.
- [200] Jeong J, VanHouten JN, Kim W, et al. The scaffolding protein NHERF1 regulates the stability and activity of the tyrosine kinase HER2. *J Biol Chem.* 2017;292(16):6555–68. doi: 10.1074/jbc.M116.770883.
- [201] Do M, Kim H, Yeo I, et al. Clinical application of multiple reaction monitoring-mass spectrometry to human epidermal growth factor receptor 2 measurements as a potential diagnostic tool for breast cancer therapy. *Clin Chem.* 2020;66(10):1339–48. doi: 10.1093/clinchem/hvaa178.
- [202] Pietilä M, Sahgal P, Peuhu E, et al. SORLA regulates endosomal trafficking and oncogenic fitness of HER2. *Nat Commun.* 2019;10(1):2340. doi: 10.1038/s41467-019-10275-0.
- [203] Park S, Jiang Z, Mortenson ED, et al. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell.* 2010;18(2):160–70. doi: 10.1016/j.ccr.2010.06.014.
- [204] Ding H, Helguera G, Rodríguez JA, et al. Polymalic acid nanobioconjugate for simultaneous immunostimulation and inhibition of tumor growth in HER2/neu-positive breast cancer. *J Control Release.* 2013;171(3):322–9. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.06.001.
- [205] Fuenmayor J, Perez-Vazquez K, Perez-Witzke D, et al. Decreased survival of human breast cancer cells expressing HER2/neu on in vitro incubation with an anti-HER2/neu antibody fused to C5a or C5adesArg. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(8):2175–85. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1054.
- [206] Datta J, Roseblit C, Berk E, et al. Progressive loss of anti-HER2 CD4+ T-helper type 1 response in breast tumorigenesis and the potential for immune restoration. *Oncoimmunology.* 2015;4(10):e1022301. doi: 10.1080/2162402X.2015.1022301.
- [207] Wang L, Xie Y, Ahmed KA, et al. Exosomal pMHC-I complex targets T cell-based vaccine to directly stimulate CTL responses leading to antitumor immunity in transgenic FVBneuN and HLA-A2/HER2 mice and eradicating trastuzumab-resistant tumor in athymic nude mice. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;140(2):273–84. doi: 10.1007/s10549-013-2626-7.
- [208] Mortenson ED, Fu YX. Adaptive immune responses and HER2/neu-positive breast cancer. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;1(1):37–42. doi: 10.1007/s40139-012-0001-8.
- [209] Nguyen-Hoai T, Baldenhofer G, Ahmed MS, et al. CCL19 (ELC) improves TH1-polarized immune responses and protective immunity in a murine Her2/neu DNA vaccination model. *J Gene Med.* 2012;14(2):128–37. doi: 10.1002/jgm.1651.
- [210] Xing J, Lin L, Li J, et al. BiHC, a T-cell–engaging bispecific recombinant antibody, has potent cytotoxic activity against Her2 tumor cells. *Transl Oncol.* 2017;10(5):780–5. doi: 10.1016/j.tranon.2017.07.003.
- [211] Lopez-Albaitero A, Xu H, Guo H, et al. Overcoming resistance to HER2-targeted therapy with a novel HER2/CD3 bispecific antibody. *Oncoimmunology.* 2017;6(3):e1267891. doi: 10.1080/2162402X.2016.1267891.
- [212] Slaga D, Ellerman D, Lombana TN, et al. Avidity-based binding to HER2 results in selective killing of HER2-overexpressing cells by anti-HER2/CD3. *Sci Transl Med.* 2018;10(463):eaat5775. doi: 10.1126/scitranslmed.aat5775.
- [213] Li J, Ybarra R, Mak J, et al. IFN γ -induced chemokines are required for CXCR3-mediated T-cell recruitment and antitumor efficacy of anti-HER2/CD3 bispecific antibody. *Clin Cancer Res.* 2018;24(24):6447–58. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1139.
- [214] Zhou Y, Gou LT, Guo ZH, et al. Fully human HER2/cluster of differentiation 3 bispecific antibody triggers potent and specific cytotoxicity of T lymphocytes against breast cancer. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):147–54. doi: 10.3892/mmr.2015.3441.
- [215] Okabe M, Toh U, Iwakuma N, et al. Predictive factors of the tumor immunological microenvironment for long-term follow-up in early stage breast cancer. *Cancer Sci.* 2017;108(1):81–90. doi: 10.1111/cas.13114.

- [216] Hou Y, Nitta H, Wei L, et al. PD-L1 expression and CD8-positive T cells are associated with favorable survival in HER2-positive invasive breast cancer. *Breast J.* 2018;24(6):911–9. doi: 10.1111/tbj.13112.
- [217] Kaplan MA, Pekkoly Z, Kucukoner M, et al. Type 2 diabetes mellitus and prognosis in early stage breast cancer women. *Med Oncol.* 2012;29(3):1576–80. doi: 10.1007/s12032-011-0109-4.
- [218] Wang D, Zhu H, Ye Q, et al. Prognostic value of KIF2A and HER2-neu overexpression in patients with epithelial ovarian cancer. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(26):e2803. doi: 10.1097/MD.0000000000002803.
- [219] Xie Y, Chen Y, Ahmed KA, et al. Potent CD4+ T-cell epitope P30 enhances HER2/neu-engineered dendritic cell-induced immunity against Tg1-1 breast cancer in transgenic FVBneuN mice by enhanced CD4+ T-cell-stimulated CTL responses. *Cancer Gene Ther.* 2013;20(10):590–8. doi: 10.1038/cgt.2013.60.
- [220] Choi JH, Kim KH, Roh KH, et al. Combination therapy of a PI3K p110 α -isoform-selective inhibitor and anti-HER2/neu antibody enhances the anti-tumor immunity in breast cancer mouse model. *J Immunol.* 2017;198(1_Supplement):204.9. doi: 10.4049/jimmunol.198.Supp.204.9.
- [221] Sawaki M, Shien T, Iwata H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Jpn J Clin Oncol.* 2019;49(3):228–31. doi: 10.1093/jjco/hyy182.
- [222] Suci C, Muresan A, Cornea R, et al. Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncol Lett.* 2014;7(1):107–14. doi: 10.3892/ol.2013.1654.
- [223] Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2784–95. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6529.
- [224] Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, 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;36(20):2105–22. doi: 10.1200/JCO.2018.77.8738.
- [225] Noordzij M, Tripepi G, Dekker FW, et al. Sample size calculations: basic principles and common pitfalls. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(5):1388–93. doi: 10.1093/ndt/gfp732.
- [226] Bolarinwa OA. Sample size estimation for health and social science researchers: the principles and considerations for different study designs. *Niger Postgrad Med J.* 2020;27(1):67–75. doi: 10.4103/npmj.npmj_19_20.
- [227] Lachenbruch PA, Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies: a practical manual. *J Am Stat Assoc.* 1991;86(416):1149. doi: 10.2307/2290547.
- [228] Lovakov A, Agadullina ER. Empirically derived guidelines for effect size interpretation in social psychology. *Eur J Soc Psychol.* 2021;51(3):485–504. doi: 10.1002/ejsp.2752.
- [229] Lindsten T, Hedbrant A, Ramberg A, et al. Effect of macrophages on breast cancer cell proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *Int J Oncol.* 2017;51(1):104–14. doi: 10.3892/ijo.2017.3996.
- [230] Jeremiasen M, Borg D, Hedner C, et al. Tumor-associated CD68+, CD163+, and MARCO+ macrophages as prognostic biomarkers in patients with treatment-naïve gastroesophageal adenocarcinoma. *Front Oncol.* 2020;10:534761. doi: 10.3389/fonc.2020.534761.
- [231] Cserni G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica.* 2020;112(1):25–41. doi: 10.32074/1591-951X-1-20.
- [232] 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. *Med Ecol Probl.* 2019;23(1-2):3–7. doi: 10.31718/mep.2019.23.1-2.01.
- [233] Linde N, Casanova-Acebes M, Sosa MS, et al. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nat Commun.* 2018;9(1):21. doi: 10.1038/s41467-017-02481-5.

- [234] Foca E, Brînza D, Portnoi E, et al. The influence of diabetes mellitus on blood vessels amount in case of breast cancer. *Mold J Health Sci.* 2023;10(1):3–8. doi: 10.52645/MJHS.2023.1.01.
- [235] De Bruijn KMJ, Arends LR, Hansen BE, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. *Br J Surg.* 2013;100(11):1421–9. doi: 10.1002/bjs.9229.
- [236] Zhou Y, Zhang X, Gu C, et al. Influence of diabetes mellitus on mortality in breast cancer patients. *ANZ J Surg.* 2015;85(12):972–8. doi: 10.1111/ans.12877.
- [237] Hennighausen L, Robinson GW. Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell.* 2001;1(4):467–75. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00064-8.
- [238] Obr AE, Edwards DP. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;357(1-2):4–17. doi: 10.1016/j.mce.2011.10.030.
- [239] Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;102(1-5):89–96. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.09.004.
- [240] Writing Group For The Women’s Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;288(3):321–33. doi: 10.1001/jama.288.3.321.
- [241] Santen RJ, Allred DC, Ardoin SP, et al. Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7_Supplement_1):s1–66. doi: 10.1210/jc.2009-2509.
- [242] Chand P, Anubha G, Singla V, et al. Evaluation of immunohistochemical profile of breast cancer for prognostics and therapeutic use. *Niger J Surg.* 2018;24(2):100. doi: 10.4103/njs.NJS_2_18.
- [243] Chen K, Li Y, Guo Z, et al. Metformin: current clinical applications in nondiabetic patients with cancer. *Aging (Albany NY).* 2020;12(4):3993–4009. doi: 10.18632/aging.102787.
- [244] Xiao Y, Zhang S, Hou G, et al. Clinical pathological characteristics and prognostic analysis of diabetic women with luminal subtype breast cancer. *Tumour Biol.* 2014;35(3):2035–45. doi: 10.1007/s13277-013-1270-5.
- [245] Bronsveld HK, De Bruin ML, Wesseling J, et al. The association of diabetes mellitus and insulin treatment with expression of insulin-related proteins in breast tumors. *BMC Cancer.* 2018;18(1):224. doi: 10.1186/s12885-018-4072-8.
- [246] Berstein LM, Boyarkina MP, Tsyrlina EV, et al. More favorable progesterone receptor phenotype of breast cancer in diabetics treated with metformin. *Med Oncol.* 2011;28(4):1260–3. doi: 10.1007/s12032-010-9572-6.
- [247] Wu H, Guan S, Sun M, et al. Ano1/TMEM16A overexpression is associated with good prognosis in PR-positive or HER2-negative breast cancer patients following tamoxifen treatment. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126128. doi: 10.1371/journal.pone.0126128.
- [248] Kuol N, Yan X, Barriga V, et al. Pilot study: immune checkpoints polymorphisms in Greek primary breast cancer patients. *Biomedicines.* 2022;10(8):1827. doi: 10.3390/biomedicines10081827.
- [249] Michailidou K, Hall P, González-Neira A, et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet.* 2013;45(4):353–361. doi: 10.1038/ng.2563.
- [250] Barr FEG, Degnim AC, Hartmann LC, et al. Estrogen receptor expression in atypical hyperplasia: lack of association with breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4(8):1281–1289. doi: 10.1158/1940-6207.capr-10-0242.
- [251] Kim S, Kon M, DeLisi C. Pathway-based classification of cancer subtypes. *Biol Direct.* 2012;7:21. doi: 10.1186/1745-6150-7-21.
- [252] Stevens KN, Fredericksen ZS, Vachon CM, et al. 19p13.1 is a triple-negative-specific breast cancer susceptibility locus. *Cancer Res.* 2012;72(7):1795–1803. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-3364.

- [253] Crispo A, Augustin LSA, Grimaldi M, et al. Risk differences between prediabetes and diabetes according to breast cancer molecular subtypes. *J Cell Physiol*. 2016;232(8):2131-2137. doi: 10.1002/jcp.25579.
- [254] Sun G, Wang S, Wang Y. Expressions of Topo II α and Ki67 in breast cancer and its clinicopathologic features and prognosis. *Pak J Med Sci*. 2019;35(3):715–20. doi: 10.12669/pjms.35.3.81.
- [255] Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011;11:486. doi: 10.1186/1471-2407-11-486.
- [256] Tobe A, Horimoto Y, Kobayashi K, et al. Impact of diabetes on patient outcomes in breast cancer patients. *Breast Care (Basel)*. 2022;17(5):480–5. doi: 10.1159/000524513.
- [257] Bolat Kucukzeybek B, Dere Y, Akder Sari A, et al. The prognostic significance of CD117-positive mast cells and microvessel density in colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2024;103(29):e38997. doi: 10.1097/MD.00000000000038997.
- [258] Pöttgen C, Stuschke M, Graupner B, et al. Prognostic model for long-term survival of locally advanced non-small-cell lung cancer patients after neoadjuvant radiochemotherapy and resection integrating clinical and histopathologic factors. *BMC Cancer*. 2015;15:363. doi: 10.1186/s12885-015-1389-4.
- [259] Rye IH, Trinh A, Sætersdal AB, et al. Intratumor heterogeneity defines treatment-resistant HER2+ breast tumors. *Mol Oncol*. 2018;12(11):1838–55. doi: 10.1002/1878-0261.12375.
- [260] Liu G, Kong X, Dai Q, et al. Clinical features and prognoses of patients with breast cancer who underwent surgery. *JAMA Netw Open*. 2023;6(2):e2331078. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2023.31078.
- [261] Brînză D, Foca E, et al. Expression of CD8, CD68 and HER2 markers in breast carcinoma in diabetes patients. *Arch Balk Med Union*. 2025;60(4):509–18. doi: 10.31688/ABMU.2025.60.4.07.
- [262] Leong ASY, Zhuang Z. The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. *Pathobiology*. 2011;78(2):99–114. doi: 10.1159/000292644.
- [263] Liu XY, Ma D, Xu XE, et al. Genomic landscape and endocrine-resistant subgroup in estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative, and HER2-negative breast cancer. *Theranostics*. 2018;8(22):6386–99. doi: 10.7150/thno.29164.
- [264] Gheorghiu A, Mironescu A, Cobelschi C, et al. Profilul hormonal de risc la pacientele cu cancer mamar. *J Med Brasovean*. 2019;2019(1). doi: 10.31926/jmb.2019.1.09.
- [265] Mamoor S. Elevated FOXC1 expression distinguishes basal-like human breast cancer [Preprint]. OSF; 2022. doi: 10.31219/osf.io/rnwgc.
- [266] Abubakar M, Figueroa J, Ali HR, et al. Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and KI67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. *Mod Pathol*. 2019;32(9):1244–56. doi: 10.1038/s41379-019-0270-4.
- [267] Shao S, Gill AA, Zahm SH, et al. Diabetes and overall survival among breast cancer patients in the U.S. Military Health System. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(1):50–7. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0439.
- [268] Cleveland RJ, North KE, Stevens J, et al. The association of diabetes with breast cancer incidence and mortality in the Long Island Breast Cancer Study Project. *Cancer Causes Control*. 2012;23(7):1193–203. doi: 10.1007/s10552-012-9989-7.
- [269] Zhang P, Chen Z, Lv D, et al. Increased risk of cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective cohort study in China. *BMC Public Health*. 2012;12:567. doi: 10.1186/1471-2458-12-567.
- [270] Bosco JLF, Antonsen S, Sørensen HT, et al. Metformin and incident breast cancer among diabetic women: a population-based case-control study in Denmark. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(1):101–11. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0817.

- [271] Stevanovic L, Choschzick M, Moskovszky L, et al. Variability of predictive markers (hormone receptors, Her2, Ki67) and intrinsic subtypes of breast cancer in four consecutive years 2015-2018. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(12):2983–94. doi: 10.1007/s00432-019-03057-0.
- [272] Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*. 1957;11(3):359–77. doi: 10.1038/bjc.1957.43.
- [273] Kurozumi S, Seki N, Narusawa E, et al. Identification of microRNAs associated with histological grade in early-stage invasive breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2023;25(1):35. doi: 10.3390/ijms25010035.
- [274] Wang S, Wei Y, Li Z, et al. Development and validation of an MRI radiomics-based signature to predict histological grade in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2022;14:335–42. doi: 10.2147/bctt.s380651.
- [275] Zhen H, Yang L, Li L, et al. Correlation analysis between molecular subtypes and Nottingham Prognostic Index in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(43):74096–105. doi: 10.18632/oncotarget.18242.
- [276] Wojnar A, Kobierzycki C, Krolicka A, et al. Correlation of Ki-67 and MCM-2 proliferative marker expression with grade of histological malignancy (G) in ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;48(3):442–6. doi: 10.2478/v10042-010-0069-0.
- [277] Mamoor S. Elevated GAPDH expression distinguishes basal-like human breast cancer [Preprint]. OSF; 2022. doi: 10.31219/osf.io/g49jz.
- [278] Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3153–8. doi: 10.1200/JCO.2007.15.5986.
- [279] Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5158–5165. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-4756.
- [280] Ma XJ, Salunga R, Dahiya S, et al. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2601–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5026.
- [281] Pal S, Gupta ML. Correlation between cytological and histological grading of breast cancer and its role in prognosis. *J Cytol*. 2016;33(4):182. doi: 10.4103/0970-9371.190449.
- [282] Feng CD, Zhang Y, Xu ZP, Gao BY, Wang Y, et al. Expression of PD-L1 in relation to intrinsic molecular subtypes of breast cancer in Hainan Free Trade Port, China. *Austin J Womens Health*. 2021;8(1):1056. doi: 10.26420/austinjwomenshealth.2021.1056.
- [283] Kim HM, Lee J, Koo JS. Clinicopathological and prognostic significance of programmed death ligand-1 expression in breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2017;17(1):690. doi: 10.1186/s12885-017-3670-1.
- [284] Brînza D, Portnoi E, Foca E, et al. HER2/neu and CD3 expression in breast cancer associated with diabetes. *Bull Acad Sci Mold Med Sci*. 2025;80(3):269–74. doi: 10.52692/1857-0011.2024.3-80.47.
- [285] Li C, Xu Y, Zhang J, et al. The effect of resveratrol, curcumin and quercetin combination on immuno-suppression of tumor microenvironment for breast tumor-bearing mice. *Sci Rep*. 2023;13(1):12443. doi: 10.1038/s41598-023-39279-z.
- [286] Wang Y, Yin C, Geng L, et al. Immune infiltration landscape in clear cell renal cell carcinoma implications. *Front Oncol*. 2021;10:491621. doi: 10.3389/fonc.2020.491621.
- [287] Foca E, Brînza D, Carpenco E, et al. The influence of diabetes mellitus on blood vessels' amounts and immune status in case of breast cancer. *Rom J Morphol Embryol*. 2025;66(3):553–61. doi: 10.47162/RJME.66.3.12.
- [288] Huang Y, Ma C, Zhang Q, et al. CD4⁺ and CD8⁺ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015;6(23):19523-19532. doi: 10.18632/oncotarget.3958.

- [289] Tawfeik AM, Mora A, Osman A, et al. Frequency of CD4⁺ regulatory T cells, CD8⁺ T cells, and human papilloma virus infection in Egyptian women with breast cancer. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2020;34:2058738420966822. doi: 10.1177/2058738420966822.
- [290] Liu S, Foulkes WD, Leung S, et al. Prognostic significance of FOXP3⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res.* 2014;16(5):432. doi: 10.1186/s13058-014-0432-8.
- [291] Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res.* 2019;79(18):4557-4566. doi: 10.1158/0008-5472.can-18-3962.
- [292] Jiao X, Zhou J, Liang X, et al. Dynamic monitoring of lymphocyte subsets at different disease stages can predict the prognosis of acute myeloid leukemia especially in complete remission status. *Sci Rep.* 2025;15(1):17128. doi: 10.1038/s41598-025-01600-3.
- [293] Liu S, Lachapelle J, Leung S, et al. CD8⁺ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012;14(2):R48. doi: 10.1186/bcr3148.
- [294] Fu C, Jiang A. Dendritic cells and CD8 T cell immunity in tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2018;9:3059. doi: 10.3389/fimmu.2018.03059.
- [295] Nedergaard B, Ladekarl M, Thomsen HF, et al. Low density of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer.* 2007;97(8):1135-1138. doi: 10.1038/sj.bjc.6604001.
- [296] Le DT, Ladle BH, Lee T, et al. CD8⁺Foxp3⁺ tumor infiltrating lymphocytes accumulate in the context of an effective anti-tumor response. *Int J Cancer.* 2011;129(3):636-47. doi: 10.1002/ijc.25693.
- [297] Gao J, Li Z, Lu Q, Zhong J, Pan L, Feng C, et al. Single-cell RNA sequencing reveals cell subpopulations in the tumor microenvironment contributing to hepatocellular carcinoma. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11:1194199. doi: 10.3389/fcell.2023.1194199.
- [298] Di Blasi D, Boldanova T, Mori L, et al. Unique T-cell populations define immune-inflamed hepatocellular carcinoma. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020;9(2):195-218. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.08.004.
- [299] Sell H, Habich C, Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(12):709-16. doi: 10.1038/nrendo.2012.114.
- [300] Menyailo ME, Zainullina VR, Khozyainova AA, et al. Heterogeneity of circulating epithelial cells in breast cancer at single-cell resolution: identifying tumor and hybrid cells. *Adv Biol (Weinh).* 2023;7(7):2200206. doi: 10.1002/adbi.202200206.
- [301] Matic IZ, Kolundžija B, Damjanović A, et al. Peripheral white blood cell subsets in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: the potential clinical relevance. *Front Immunol.* 2018;8:1886. doi: 10.3389/fimmu.2017.01886.
- [302] Han SJ, Sung N, Wang J, et al. Steroid receptor coactivator-3 inhibition generates breast cancer antitumor immune microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2022;24(1):54. doi: 10.1186/s13058-022-01568-2.
- [303] Raiter A, Zlotnik O, Lipovetsky J, et al. A novel role for an old target: CD45 for breast cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2021;10(1):1929725. doi: 10.1080/2162402X.2021.1929725.
- [304] Thacker G, Henry S, Nandi A, et al. Immature natural killer cells promote progression of triple-negative breast cancer. *Sci Transl Med.* 2023;15(685):eab14414. doi: 10.1126/scitranslmed.abl4414.
- [305] Niknam K, Safaei A, Ghaderi A. Evaluation of the prognostic value of CD56 (140 kDa isoform) expression in breast cancer tissues: an eight-year retrospective study. *Iran Biomed J.* 2022;26(3):175-82. doi: 10.52547/ibj.26.3.175.
- [306] Acker HHV, Acker ZPV, Versteven M, et al. CD56 homodimerization and participation in anti-tumor immune effector cell functioning: a role for interleukin-15. *Cancers (Basel).* 2019;11(7):1029. doi: 10.3390/cancers11071029.

- [307] Aloysius MM, Zaitoun AM, Awad S, et al. Mucins and CD56 as markers of tumour invasion and prognosis in periampullary cancer. *Br J Surg*. 2010;97(8):1269–78. doi: 10.1002/bjs.7107.
- [308] Kerekes D, Visscher DW, Hoskin TL, et al. CD56+ immune cell infiltration and MICA are decreased in breast lobules with fibrocystic changes. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;167(3):649–58. doi: 10.1007/s10549-017-4558-0.
- [309] Siddiqui MH, Rana MA, Siddiqui MRO, et al. Impact of diabetes mellitus type 2 on clinical characteristics of breast cancer patients. *Pak J Med Health Sci*. 2022;16(7):303. doi: 10.53350/pjmhs22167303.
- [310] Brînza D, Foca E, David V, et al. CD45RO expression is associated with type 2 diabetes mellitus breast carcinoma [Preprint]. n.d.
- [311] Chen Z, Xu S, Xu W, et al. Expression of cluster of differentiation 34 and vascular endothelial growth factor in breast cancer, and their prognostic significance. *Oncol Lett*. 2015;10(2):723–9. doi: 10.3892/ol.2015.3348.
- [312] Gutiérrez R, González-Gómez M, García M del P, et al. Delimiting CD34+ stromal cells/telocytes are resident mesenchymal cells that participate in neovessel formation in skin Kaposi sarcoma. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):3793. doi: 10.3390/ijms24043793.
- [313] Ch'ng ES, Sharif SET, Jaafar H. Characteristics of invasive breast ductal carcinoma, NOS, diagnosed in a tertiary institution in the East Coast of Malaysia with a focus on tumor angiogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(9):4445–52. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.9.4445.
- [314] Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, et al. Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol*. 2000;53(8):626–9. doi: 10.1136/jcp.53.8.626.
- [315] Rossini A, Giussani M, Giacomini A, et al. Surveillance of spontaneous breast cancer metastasis by TRAIL-expressing CD34+ cells in a xenograft model. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;136(2):395–404. doi: 10.1007/s10549-012-2281-4.
- [316] Lin YY, Wang CY, Phan NN, et al. PODXL2 maintains cellular stemness and promotes breast cancer development through the Rac1/Akt pathway. *Int J Med Sci*. 2020;17(11):1639–51. doi: 10.7150/ijms.46125.
- [317] Fadini GP, Boscaro E, de Kreutzenberg S, et al. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2010;33(5):1097–102. doi: 10.2337/dc09-1999.
- [318] Chen Y, Wu F, Saito E, et al. Association between type 2 diabetes and risk of cancer mortality: a pooled analysis of over 771,000 individuals in the Asia Cohort Consortium. *Diabetologia*. 2017;60(6):1022–32. doi: 10.1007/s00125-017-4229-z.
- [319] Muppala S, Xiao R, Gajeton J, et al. Thrombospondin-4 mediates hyperglycemia- and TGF-beta-induced inflammation in breast cancer. *Int J Cancer*. 2021;148(8):2010–22. doi: 10.1002/ijc.33439.
- [320] Abbasi A, Rahimi S, Mahmoudzadeh L, et al. High grade breast ductal carcinomas have high density of tumor-associated macrophages. *Exp Oncol*. 2023;43(4). doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-4.16898.
- [321] Chen Y, Klingens TA, Aas H, et al. CD47 and CD68 expression in breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes, blood vessel invasion, detection mode, and prognosis. *J Pathol Clin Res*. 2023;9(2):151–64. doi: 10.1002/cjp2.309.
- [322] Buldakov M, Zavyalova M, Krakhmal N, 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;222(1):31–8. doi: 10.1016/j.imbio.2015.09.011.
- [323] Medrek C, Pontén F, Jirstrom K, et al. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;12:306. doi: 10.1186/1471-2407-12-306.
- [324] Ni C, Yang L, Xu Q, et al. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis. *J Cancer*. 2019;10(19):4463–72. doi: 10.7150/jca.33914.

- [325] Horii T, Fujita Y, Ishibashi C, et al. Islet inflammation is associated with pancreatic fatty infiltration and hyperglycemia in type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020;8(1):e001508. doi: 10.1136/bmjdr-2020-001508.
- [326] Chylikova J, Dvorackova J, Cizkova K, et al. Macrophages of the subcutaneous and omental fatty tissue in obese patients: immunohistochemical phenotyping of M2 subtypes in relation to type 2 diabetes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2020;164(2):133–7. doi: 10.5507/bp.2019.011.
- [327] Cucak H, Grunnet LG, Rosendahl A. Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. *J Leukoc Biol*. 2014;95(1):149–60. doi: 10.1189/jlb.0213075.
- [328] Shiota T, Miyasato Y, Ohnishi K, et al. The clinical significance of CD169-positive lymph node macrophage in patients with breast cancer. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166680. doi: 10.1371/journal.pone.0166680.
- [329] Carrio R, Koru-Sengul T, Miao F, et al. Macrophages as independent prognostic factors in small T1 breast cancers. *Oncol Rep*. 2013;29(1):141–8. doi: 10.3892/or.2012.2088.
- [330] Yang M, Li Z, Ren M, et al. Stromal infiltration of tumor-associated macrophages conferring poor prognosis of patients with basal-like breast carcinoma. *J Cancer*. 2018;9(13):2308–16. doi: 10.7150/jca.25155.

Lista anexelor

Anexa 1. Corelațiile dintre expresia CD3 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar.....	132
Anexa 2. Corelațiile dintre expresia CD4 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar.....	133
Anexa 3. Corelațiile dintre expresia CD8 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar.....	134
Anexa 4. Corelațiile statistice între expresia CD34 și proprietățile clinico-patologice ale carcinomului mamar.....	135
Anexa 5. Corelațiile dintre expresia CD45 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar.....	136
Anexa 6. Corelațiile dintre expresia CD56 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar.....	137
Anexa 7. Corelațiile dintre expresia CD68 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar.....	138
Anexa 8. Corelații între markerii tumorali în carcinomul mamar	139
Anexa 9. Corelațiile dintre expresia CD3 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar asociat cu DZT2.....	140
Anexa 10. Corelațiile dintre expresia CD4 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar asociat cu DZT2.....	141
Anexa 11. Corelațiile dintre expresia CD8 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar asociat cu DZT2.....	142
Anexa 12. Corelațiile dintre expresia CD34 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar asociat cu DZT2.....	143
Anexa 13. Corelațiile dintre expresia CD45 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar asociat cu DZT2.....	144
Anexa 14. Corelațiile dintre expresia CD56 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar asociat cu DZT2.....	145
Anexa 15. Corelațiile dintre expresia CD68 și caracteristicile clinico-patologice ale carcinomului mamar asociat cu DZT2.....	146
Anexa 16. Corelațiile statistice între markerii tumorali în carcinomul mamar asociat cu DZT2	147

**Anexa 1. Corelațiile dintre expresia CD3 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar**

CD3 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	-0.07	p=0.36	1.2±0.3
	Nottingham	0.01	p=0.48	5.1±0.8
	Ft	-0.19	p=0.17	10.5±1.7
	Atipie nucleară	0.08	p=0.34	2.3±0.4
	Activitate mitotică	0.04	p=0.42	3.4±0.9
	Vârsta	-0.05	p=0.40	52±4.5
	Glucoza	0.20	p=0.15	5.3±1.2
	ER	0.08	p=0.35	7.6±1.4
	PR	-0.20	p=0.15	8.3±2.0
	HER2	0.01	p=0.48	6.5±1.7
	Ki67	-0.37	p=0.02	13.2±3.6
	AllredER	0.09	p=0.32	4.5±0.9
	AllredPR	-0.13	p=0.26	7.1±1.0
	InvazieLV	-0.13	p=0.24	2.2±0.5
	InvaziePN	0.01	p=0.47	1.8±0.6
	pT	-0.27	p=0.08	3.5±1.3
pN	0.09	p=0.32	2.6±0.7	
Peritumoral	Grad	0.26	p=0.09	1.5±0.4
	Nottingham	0.24	p=0.11	4.9±0.8
	Ft	-0.05	p=0.41	9.8±2.1
	Atipie nucleară	0.06	p=0.38	2.1±0.5
	Activitate mitotică	0.35	p=0.03	3.7±0.6
	Vârsta	-0.45	p=0.01	49.5±5.6
	Glucoza	0.11	p=0.28	4.8±0.9
	ER	-0.11	p=0.29	7.4±1.2
	PR	-0.09	p=0.32	8.1±2.2
	HER2	-0.21	p=0.14	5.9±1.8
	Ki67	0.32	p=0.05	12.4±3.2
	AllredER	-0.10	p=0.30	4.3±1.0
	AllredPR	-0.08	p=0.34	7.0±1.5
	InvazieLV	-0.11	p=0.28	2.0±0.7
	InvaziePN	-0.17	p=0.19	1.9±0.4
	pT	0.30	p=0.06	3.2±1.1
pN	-0.27	p=0.08	2.8±0.6	

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 2. Corelațiile dintre expresia CD4 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar**

CD4 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	-0.07	p=0.35	1.5±0.4
	Nottingham	0.05	p=0.40	5.1±1.1
	Ft	-0.06	p=0.39	10.4±2.0
	Atipie nucleară	0.02	p=0.45	2.3±0.6
	Activitate mitotică	0.05	p=0.41	3.5±0.9
	Vârsta	0.36	p=0.03	54.2±5.2
	Glucosa	0.13	p=0.25	5.2±1.3
	ER	0.04	p=0.41	7.8±1.6
	PR	-0.09	p=0.31	8.1±2.2
	HER2	-0.13	p=0.25	6.4±1.5
	Ki67	-0.21	p=0.14	13.4±3.5
	AllredER	0.13	p=0.25	4.6±0.8
	AllredPR	-0.04	p=0.43	7.0±1.0
	InvazieLV	0.10	p=0.30	2.2±0.5
	InvaziePN	0.28	p=0.07	2.0±0.6
	pT	0.10	p=0.30	3.7±1.2
	pN	0.15	p=0.22	2.7±0.7
Peritumoral	Grad	0.14	p=0.23	1.6±0.5
	Nottingham	0.15	p=0.21	5.3±1.0
	Ft	0.05	p=0.39	10.1±2.2
	Atipie nucleară	0.03	p=0.45	2.4±0.4
	Activitate mitotică	0.23	p=0.12	3.6±0.7
	Vârsta	-0.10	p=0.31	55.0±4.7
	Glucosa	0.27	p=0.08	5.0±1.2
	ER	0.07	p=0.36	7.6±1.4
	PR	-0.12	p=0.27	8.0±2.0
	HER2	0.21	p=0.13	6.3±1.7
	Ki67	0.03	p=0.45	13.0±3.3
	AllredER	0.12	p=0.27	4.7±1.1
	AllredPR	-0.10	p=0.30	7.3±1.8
	InvazieLV	-0.09	p=0.32	2.3±0.6
	InvaziePN	0.18	p=0.17	1.9±0.5
	pT	-0.01	p=0.47	3.4±1.0
	pN	0.01	p=0.47	2.5±0.8

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 3. Corelațiile dintre expresia CD8 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar**

CD8 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	0.12	p=0.27	1.4±0.3
	Nottingham	0.13	p=0.25	5.2±0.9
	Ft	0.06	p=0.38	9.9±2.1
	Atipie nucleară	-0.07	p=0.36	2.5±0.4
	Activitate mitotică	0.20	p=0.15	3.8±0.8
	Vârsta	-0.06	p=0.38	54.0±5.0
	Glucosa	0.37	p=0.02	5.1±1.2
	ER	-0.03	p=0.43	7.4±1.3
	PR	-0.24	p=0.11	8.0±2.0
	HER2	0.17	p=0.19	6.2±1.5
	Ki67	-0.09	p=0.32	13.0±3.4
	AllredER	-0.05	p=0.40	4.4±0.9
	AllredPR	-0.19	p=0.16	6.8±1.0
	InvazieLV	-0.28	p=0.07	2.1±0.6
	InvaziePN	0.00	p=0.49	2.2±0.5
	pT	-0.23	p=0.11	3.3±1.1
	pN	-0.06	p=0.39	2.5±0.7
Peritumoral	Grad	-0.04	p=0.43	1.3±0.4
	Nottingham	-0.17	p=0.18	5.0±0.8
	Ft	-0.07	p=0.35	10.0±2.2
	Atipie nucleară	0.04	p=0.41	2.6±0.5
	Activitate mitotică	-0.28	p=0.07	3.6±0.7
	Vârsta	-0.10	p=0.30	53.8±4.8
	Glucosa	0.30	p=0.05	4.9±1.1
	ER	0.33	p=0.04	7.7±1.5
	PR	-0.04	p=0.42	8.2±2.1
	HER2	0.33	p=0.04	6.1±1.6
	Ki67	0.16	p=0.20	13.3±3.2
	AllredER	0.25	p=0.10	4.7±1.0
	AllredPR	-0.02	p=0.46	7.1±1.6
	InvazieLV	-0.08	p=0.34	2.4±0.7
	InvaziePN	-0.04	p=0.41	2.0±0.6
	pT	0.02	p=0.46	3.5±1.0
	pN	0.05	p=0.40	2.6±0.8

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 4. Corelațiile statistice între expresia CD34 și proprietățile clinico-patologice ale
carcinomului mamar**

CD34 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	-0.10	p=0.29	1.5±0.4
	Nottingham	-0.04	p=0.42	5.2±0.8
	Ft	-0.01	p=0.48	10.0±2.1
	Atipie nucleară	-0.09	p=0.32	2.3±0.5
	Activitate mitotică	0.05	p=0.39	3.5±0.9
	Vârsta	-0.08	p=0.34	53.5±4.9
	Glucoza	0.06	p=0.38	5.0±1.3
	ER	0.17	p=0.19	7.5±1.4
	PR	0.20	p=0.15	8.2±2.0
	HER2	0.06	p=0.38	6.3±1.5
	Ki67	0.49	p=0.001	13.8±3.5
	AllredER	0.26	p=0.09	4.8±1.0
	AllredPR	0.21	p=0.13	7.1±1.2
	InvazieLV	0.34	p=0.03	2.1±0.6
	InvaziePN	0.00	p=0.50	2.0±0.7
	pT	0.54	p=0.001	3.6±1.1
	pN	0.30	p=0.06	2.7±0.8
Peritumoral	Grad	0.12	p=0.26	1.4±0.5
	Nottingham	0.19	p=0.17	5.0±0.9
	Formarea tubulilor	0.23	p=0.11	10.3±2.0
	Atipie nucleară	0.04	p=0.42	2.4±0.6
	Activitate mitotică	0.12	p=0.27	3.7±0.8
	Vârsta	-0.30	p=0.06	54.0±5.1
	Glucoza	0.04	p=0.42	5.2±1.4
	ER	-0.12	p=0.26	7.6±1.5
	PR	-0.10	p=0.30	8.0±2.1
	HER2	0.22	p=0.12	6.5±1.6
	Ki67	0.22	p=0.13	13.5±3.3
	AllredER	-0.21	p=0.14	4.5±1.0
	AllredPR	-0.15	p=0.22	7.0±1.5
	InvazieLV	-0.06	p=0.38	2.3±0.5
	InvaziePN	0.21	p=0.14	2.2±0.6
	pT	0.11	p=0.28	3.2±1.0
	pN	-0.09	p=0.32	2.6±0.9

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistice semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 5. Corelațiile dintre expresia CD45 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar**

CD45 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	-0.05	p=0.39	1.4±0.4
	Nottingham	0.03	p=0.45	5.1±0.9
	Formarea tubulilor	-0.06	p=0.37	9.8±2.0
	Atipie nucleară	-0.01	p=0.47	2.2±0.5
	Activitate mitotică	0.10	p=0.31	3.6±0.8
	Vârsta	0.23	p=0.12	54.3±4.8
	Glucoza	-0.05	p=0.40	5.0±1.2
	ER	-0.09	p=0.32	7.3±1.4
	PR	-0.24	p=0.10	8.1±2.1
	HER2	-0.02	p=0.46	6.4±1.6
	Ki67	0.26	p=0.09	13.5±3.5
	AllredER	0.08	p=0.33	4.6±1.0
	AllredPR	-0.19	p=0.16	7.2±1.2
	InvazieLV	0.23	p=0.12	2.1±0.6
	InvaziePN	0.21	p=0.13	2.0±0.5
	pT	0.32	p=0.04	3.5±1.1
	pN	0.19	p=0.17	2.6±0.8
Peritumoral	Grad	-0.06	p=0.38	1.5±0.5
	Nottingham	-0.03	p=0.45	5.2±0.8
	Formarea tubulilor	-0.33	p=0.04	10.2±2.1
	Atipie nucleară	0.12	p=0.27	2.4±0.6
	Activitate mitotică	-0.02	p=0.47	3.4±0.9
	Vârsta	-0.25	p=0.09	53.7±4.7
	Glucoza	-0.05	p=0.40	5.1±1.3
	ER	0.27	p=0.08	7.4±1.5
	PR	0.05	p=0.39	8.0±2.0
	HER2	-0.15	p=0.23	6.5±1.7
	Ki67	0.33	p=0.04	13.4±3.4
	AllredER	0.24	p=0.10	4.5±1.0
	AllredPR	0.12	p=0.27	7.3±1.6
	InvazieLV	0.02	p=0.46	2.2±0.6
	InvaziePN	0.01	p=0.47	2.1±0.5
	pT	0.51	p=0.001	3.7±1.2
	pN	0.04	p=0.41	2.5±0.9

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistice semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 6. Corelațiile dintre expresia CD56 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar**

CD56 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	0.23	p=0.11	1.5±0.4
	Nottingham	0.28	p=0.07	5.0±1.0
	Formarea tubulilor	0.18	p=0.17	9.7±2.2
	Atipie nucleară	0.24	p=0.10	2.4±0.6
	Activitate mitotică	0.15	p=0.21	3.6±0.8
	Vârsta	0.07	p=0.35	54.1±4.8
	Glucosa	0.13	p=0.25	5.3±1.3
	ER	-0.04	p=0.42	7.2±1.5
	PR	-0.08	p=0.34	8.0±2.0
	HER2	0.36	p=0.03	6.5±1.6
	Ki67	-0.03	p=0.44	13.7±3.3
	AllredER	0.01	p=0.47	4.4±0.9
	AllredPR	-0.11	p=0.29	7.3±1.4
	InvazieLV	0.07	p=0.37	2.1±0.5
	InvaziePN	0.04	p=0.41	2.2±0.6
	pT	-0.31	p=0.05	3.4±1.2
pN	0.16	p=0.20	2.6±0.7	
Peritumoral	Grad	-0.09	p=0.32	1.4±0.5
	Nottingham	-0.11	p=0.29	5.1±0.9
	Formarea tubulilor	-0.16	p=0.20	10.0±2.0
	Atipie nucleară	0.12	p=0.26	2.5±0.5
	Activitate mitotică	-0.15	p=0.21	3.7±0.7
	Vârsta	-0.28	p=0.07	53.9±4.7
	Glucosa	-0.04	p=0.43	5.2±1.2
	ER	0.23	p=0.12	7.5±1.4
	PR	-0.13	p=0.25	8.1±2.1
	HER2	0.25	p=0.10	6.4±1.5
	Ki67	0.03	p=0.43	13.6±3.2
	AllredER	0.07	p=0.36	4.5±1.0
	AllredPR	-0.14	p=0.24	7.0±1.6
	InvazieLV	0.17	p=0.20	2.3±0.6
	InvaziePN	0.21	p=0.13	2.1±0.5
	pT	-0.05	p=0.40	3.5±1.1
pN	0.19	p=0.16	2.5±0.8	

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 7. Corelațiile dintre expresia CD68 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar**

CD68 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	-0.05	p=0.39	1.4±0.4
	Nottingham	0.06	p=0.37	5.1±0.9
	Formarea tubulilor	-0.32	p=0.05	10.2±2.1
	Atipie nucleară	0.00	p=0.49	2.3±0.6
	Activitate mitotică	0.33	p=0.04	3.5±0.8
	Vârsta	0.19	p=0.16	53.8±4.7
	Glucoza	0.06	p=0.37	5.2±1.2
	ER	0.07	p=0.36	7.3±1.5
	PR	-0.05	p=0.39	8.1±2.0
	HER2	0.12	p=0.27	6.4±1.6
	Ki67	0.31	p=0.05	13.5±3.4
	AllredER	0.25	p=0.10	4.5±1.0
	AllredPR	0.01	p=0.48	7.0±1.6
	InvazieLV	0.17	p=0.19	2.3±0.6
	InvaziePN	0.02	p=0.46	2.0±0.5
	pT	0.51	p=0.001	3.6±1.2
	pN	-0.06	p=0.38	2.6±0.7
Peritumoral	Grad	0.13	p=0.24	1.5±0.5
	Nottingham	0.19	p=0.16	5.2±0.9
	Formarea tubulilor	-0.03	p=0.43	10.1±2.0
	Atipie nucleară	-0.08	p=0.35	2.5±0.5
	Activitate mitotică	0.44	p=0.01	3.7±0.7
	Vârsta	0.02	p=0.46	54.0±4.8
	Glucoza	-0.05	p=0.39	5.0±1.3
	ER	-0.15	p=0.22	7.4±1.4
	PR	0.07	p=0.36	8.2±2.0
	HER2	0.34	p=0.04	6.3±1.5
	Ki67	0.31	p=0.05	13.3±3.2
	AllredER	-0.04	p=0.43	4.6±1.0
	AllredPR	0.09	p=0.31	7.1±1.4
	InvazieLV	0.06	p=0.37	2.2±0.5
	InvaziePN	0.03	p=0.45	2.1±0.6
	pT	0.33	p=0.04	3.5±1.1
	pN	-0.24	p=0.11	2.4±0.8

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

Anexa 8. Corelații între markerii tumorali în carcinomul mamar

Markerii studiați	r	Semnificație statistică (p-valoare)
ER vs PR	0.67	< 0.001
HER2 vs ER	-0.09	0.62
HER2 vs PR	-0.04	0.84
Ki67 vs ER	-0.11	0.58
Ki67 vs PR	-0.06	0.77
Ki67 vs HER2	0.18	0.34

Notă: r – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 9. Corelațiile dintre expresia CD3 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar asociat cu DZT2**

CD3 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	0.04	p=0.42	1.4±0.4
	Nottingham	0.04	p=0.43	5.1±0.9
	Formarea tubulilor	-0.10	p=0.31	10.3±2.1
	Atipie nucleară	0.28	p=0.07	2.4±0.5
	Activitate mitotică	-0.09	p=0.31	3.5±0.9
	Vârsta	0.47	p=0.01	54.0±4.7
	Glucoza	-0.08	p=0.34	5.0±1.3
	ER	-0.15	p=0.21	7.5±1.4
	PR	-0.13	p=0.25	8.0±2.0
	HER2	-0.27	p=0.07	6.4±1.5
	Ki67	-0.05	p=0.39	13.3±3.4
	AllredER	-0.13	p=0.25	4.4±1.0
	AllredPR	-0.06	p=0.38	7.0±1.4
	InvazieLV	0.14	p=0.23	2.2±0.6
	InvaziePN	0.12	p=0.26	2.0±0.5
	pT	0.02	p=0.46	3.6±1.2
pN	0.15	p=0.21	2.7±0.7	
Peritumoral	Grad	0.39	p=0.02	1.5±0.5
	Nottingham	0.44	p=0.01	5.2±0.8
	Formarea tubulilor	0.48	p=0.001	10.0±2.0
	Atipie nucleară	-0.11	p=0.29	2.5±0.5
	Activitate mitotică	0.23	p=0.11	3.7±0.7
	Vârsta	0.08	p=0.34	54.3±4.8
	Glucoza	0.04	p=0.41	5.1±1.2
	ER	-0.23	p=0.11	7.6±1.5
	PR	-0.16	p=0.21	8.2±2.1
	HER2	0.33	p=0.04	6.3±1.6
	Ki67	0.26	p=0.08	13.4±3.2
	AllredER	-0.15	p=0.21	4.5±1.0
	AllredPR	-0.16	p=0.21	7.2±1.6
	InvazieLV	0.07	p=0.35	2.1±0.6
	InvaziePN	0.12	p=0.27	2.3±0.5
	pT	0.07	p=0.37	3.4±1.1
pN	0.18	p=0.18	2.5±0.9	

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 10. Corelațiile dintre expresia CD4 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar asociat cu DZT2**

CD4 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	0.17	p=0.18	1.5±0.4
	Nottingham	0.25	p=0.09	5.2±0.8
	Formarea tubulilor	0.03	p=0.43	10.1±2.0
	Atipie nucleară	0.18	p=0.18	2.5±0.5
	Activitate mitotică	0.16	p=0.21	3.6±0.7
	Vârsta	0.10	p=0.31	54.0±4.9
	Glucoza	-0.19	p=0.16	5.0±1.2
	ER	-0.32	p=0.04	7.4±1.5
	PR	-0.26	p=0.09	8.0±2.1
	HER2	0.00	p=0.49	6.3±1.6
	Ki67	0.02	p=0.47	13.2±3.3
	AllredER	-0.30	p=0.06	4.6±1.0
	AllredPR	-0.12	p=0.26	7.0±1.4
	InvazieLV	0.12	p=0.26	2.2±0.5
	InvaziePN	-0.26	p=0.09	2.1±0.6
	pT	0.01	p=0.47	3.5±1.1
pN	0.03	p=0.43	2.5±0.8	
Peritumoral	Grad	0.02	p=0.46	1.4±0.5
	Nottingham	-0.10	p=0.30	5.1±0.9
	Formarea tubulilor	-0.21	p=0.14	10.2±2.0
	Atipie nucleară	0.24	p=0.11	2.4±0.6
	Activitate mitotică	-0.24	p=0.10	3.7±0.7
	Vârsta	-0.13	p=0.26	54.2±4.7
	Glucoza	0.16	p=0.21	5.3±1.3
	ER	0.03	p=0.44	7.5±1.4
	PR	0.18	p=0.18	8.2±2.0
	HER2	-0.15	p=0.22	6.5±1.5
	Ki67	-0.10	p=0.30	13.3±3.2
	AllredER	-0.09	p=0.33	4.4±1.0
	AllredPR	0.06	p=0.39	7.1±1.6
	InvazieLV	0.06	p=0.39	2.3±0.6
	InvaziePN	0.27	p=0.08	2.0±0.5
	pT	0.05	p=0.39	3.4±1.1
pN	0.18	p=0.17	2.6±0.7	

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 11. Corelațiile dintre expresia CD8 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar asociat cu DZT2**

CD8 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	-0.05	p=0.40	1.4±0.4
	Nottingham	-0.03	p=0.44	5.2±0.8
	Formarea tubulilor	0.07	p=0.35	10.1±2.1
	Atipie nucleară	0.13	p=0.24	2.3±0.6
	Activitate mitotică	-0.29	p=0.06	3.5±0.7
	Vârsta	0.19	p=0.16	54.0±4.7
	Glucosa	-0.15	p=0.22	5.1±1.2
	ER	-0.07	p=0.37	7.3±1.5
	PR	0.05	p=0.39	8.0±2.0
	HER2	-0.22	p=0.12	6.4±1.5
	Ki67	-0.10	p=0.31	13.4±3.3
	AllredER	-0.10	p=0.30	4.5±1.0
	AllredPR	0.01	p=0.49	7.0±1.6
	InvazieLV	0.18	p=0.18	2.1±0.6
	InvaziePN	0.42	p=0.01	2.2±0.5
	pT	0.23	p=0.12	3.6±1.1
	pN	0.23	p=0.11	2.5±0.7
Peritumoral	Grad	-0.23	p=0.12	1.5±0.5
	Nottingham	-0.07	p=0.37	5.1±0.9
	Formarea tubulilor	0.17	p=0.19	10.0±2.0
	Atipie nucleară	-0.10	p=0.30	2.4±0.6
	Activitate mitotică	-0.28	p=0.07	3.7±0.8
	Vârsta	0.26	p=0.09	53.9±4.8
	Glucosa	-0.08	p=0.35	5.0±1.3
	ER	0.10	p=0.31	7.4±1.4
	PR	0.06	p=0.39	8.2±2.1
	HER2	0.15	p=0.23	6.3±1.6
	Ki67	-0.02	p=0.46	13.3±3.2
	AllredER	0.03	p=0.44	4.6±1.0
	AllredPR	-0.06	p=0.38	7.2±1.4
	InvazieLV	-0.02	p=0.46	2.2±0.5
	InvaziePN	0.20	p=0.15	2.0±0.6
	pT	0.25	p=0.10	3.4±1.1
	pN	0.27	p=0.08	2.4±0.8

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 12. Corelațiile dintre expresia CD34 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar asociat cu DZT2**

CD34 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	-0.33	p=0.04	1.5±0.4
	Nottingham	-0.34	p=0.04	5.2±0.9
	Formarea tubulilor	-0.34	p=0.04	10.2±2.1
	Atipie nucleară	0.00	p=0.49	2.4±0.6
	Activitate mitotică	-0.22	p=0.13	3.5±0.8
	Vârsta	0.07	p=0.36	53.9±4.8
	Glucoza	0.00	p=0.49	5.1±1.2
	ER	0.06	p=0.38	7.3±1.5
	PR	0.25	p=0.09	8.2±2.0
	HER2	-0.29	p=0.06	6.4±1.6
	Ki67	-0.37	p=0.02	13.5±3.4
	AllredER	0.11	p=0.29	4.5±1.0
	AllredPR	0.24	p=0.11	7.1±1.4
	InvazieLV	-0.04	p=0.41	2.3±0.6
	InvaziePN	0.23	p=0.12	2.0±0.5
	pT	-0.20	p=0.15	3.6±1.2
pN	0.18	p=0.18	2.7±0.7	
Peritumoral	Grad	-0.17	p=0.19	1.4±0.5
	Nottingham	-0.17	p=0.19	5.1±0.8
	Formarea tubulilor	0.16	p=0.20	10.0±2.0
	Atipie nucleară	-0.23	p=0.11	2.4±0.6
	Activitate mitotică	-0.19	p=0.16	3.7±0.7
	Vârsta	0.17	p=0.19	54.1±4.7
	Glucoza	0.01	p=0.48	5.0±1.3
	ER	0.06	p=0.38	7.4±1.4
	PR	0.20	p=0.14	8.1±2.1
	HER2	-0.13	p=0.25	6.5±1.5
	Ki67	0.00	p=0.49	13.3±3.2
	AllredER	0.14	p=0.24	4.6±1.0
	AllredPR	0.22	p=0.13	7.2±1.4
	InvazieLV	-0.11	p=0.29	2.2±0.5
	InvaziePN	0.23	p=0.11	2.1±0.6
	pT	0.17	p=0.18	3.4±1.1
pN	-0.07	p=0.36	2.4±0.8	

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 13. Corelațiile dintre expresia CD45 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar asociat cu DZT2**

CD45 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	0.10	p=0.30	1.5±0.4
	Nottingham	0.19	p=0.16	5.1±0.9
	Formarea tubulilor	-0.09	p=0.32	10.3±2.0
	Atipie nucleară	0.20	p=0.15	2.4±0.6
	Activitate mitotică	0.20	p=0.14	3.6±0.7
	Vârsta	0.25	p=0.09	53.9±4.7
	Glucosa	-0.04	p=0.41	5.0±1.3
	ER	-0.11	p=0.29	7.4±1.5
	PR	-0.04	p=0.43	8.1±2.0
	HER2	-0.02	p=0.46	6.3±1.6
	Ki67	-0.13	p=0.25	13.3±3.2
	AllredER	0.22	p=0.13	4.5±1.0
	AllredPR	0.07	p=0.36	7.0±1.4
	InvazieLV	0.18	p=0.17	2.1±0.5
	InvaziePN	0.20	p=0.15	2.2±0.6
	pT	0.03	p=0.43	3.4±1.1
pN	0.01	p=0.48	2.6±0.7	
Peritumoral	Grad	0.48	p=0.001	1.4±0.5
	Nottingham	0.34	p=0.03	5.2±0.8
	Formarea tubulilor	0.19	p=0.16	10.1±2.1
	Atipie nucleară	0.17	p=0.19	2.5±0.5
	Activitate mitotică	0.19	p=0.16	3.7±0.7
	Vârsta	0.37	p=0.02	54.0±4.9
	Glucosa	-0.06	p=0.37	5.1±1.2
	ER	-0.41	p=0.01	7.5±1.4
	PR	-0.41	p=0.01	8.0±2.0
	HER2	-0.12	p=0.27	6.4±1.5
	Ki67	0.20	p=0.14	13.4±3.3
	AllredER	-0.43	p=0.01	4.6±1.0
	AllredPR	-0.46	p=0.01	7.2±1.6
	InvazieLV	-0.05	p=0.40	2.2±0.5
	InvaziePN	0.15	p=0.22	2.0±0.6
	pT	0.02	p=0.47	3.5±1.1
pN	-0.01	p=0.49	2.5±0.8	

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 14. Corelațiile dintre expresia CD56 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar asociat cu DZT2**

CD56 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	0.14	p=0.24	1.5±0.4
	Nottingham	0.06	p=0.37	5.2±0.9
	Formarea tubulilor	0.19	p=0.16	10.3±2.1
	Atipie nucleară	-0.15	p=0.22	2.4±0.6
	Activitate mitotică	0.10	p=0.30	3.6±0.7
	Vârsta	-0.02	p=0.45	53.9±4.8
	Glucoza	0.21	p=0.14	5.0±1.3
	ER	-0.27	p=0.08	7.4±1.5
	PR	-0.30	p=0.06	8.2±2.0
	HER2	-0.13	p=0.24	6.3±1.6
	Ki67	0.24	p=0.11	13.4±3.3
	AllredER	-0.30	p=0.06	4.5±1.0
	AllredPR	-0.30	p=0.05	7.0±1.4
	InvazieLV	-0.35	p=0.03	2.2±0.6
	InvaziePN	-0.20	p=0.15	2.1±0.5
	pT	0.29	p=0.06	3.6±1.1
pN	-0.31	p=0.05	2.7±0.7	
Peritumoral	Grad	-0.19	p=0.16	1.4±0.5
	Nottingham	-0.15	p=0.23	5.1±0.8
	Formarea tubulilor	0.14	p=0.24	10.0±2.0
	Atipie nucleară	-0.11	p=0.28	2.5±0.5
	Activitate mitotică	-0.37	p=0.02	3.7±0.7
	Vârsta	0.26	p=0.09	54.0±4.9
	Glucoza	0.02	p=0.45	5.1±1.2
	ER	-0.23	p=0.12	7.5±1.4
	PR	0.05	p=0.40	8.0±2.0
	HER2	-0.38	p=0.02	6.4±1.5
	Ki67	-0.19	p=0.17	13.3±3.2
	AllredER	-0.21	p=0.13	4.6±1.0
	AllredPR	-0.02	p=0.46	7.1±1.4
	InvazieLV	-0.03	p=0.45	2.3±0.5
	InvaziePN	0.05	p=0.39	2.0±0.6
	pT	0.18	p=0.17	3.5±1.1
pN	0.13	p=0.26	2.4±0.8	

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

**Anexa 15. Corelațiile dintre expresia CD68 și caracteristicile clinico-patologice ale
carcinomului mamar asociat cu DZT2**

CD68 (sediul)	Variabila	r	Semnificația statistică	X±SD
Intratumoral	Grad	-0.22	p=0.13	1.5±0.4
	Nottingham	-0.06	p=0.39	5.2±0.9
	Formarea tubulilor	-0.10	p=0.30	10.2±2.1
	Atipie nucleară	0.03	p=0.44	2.4±0.6
	Activitate mitotică	-0.11	p=0.28	3.6±0.7
	Vârsta	0.40	p=0.02	54.0±4.8
	Glucosa	-0.10	p=0.30	5.0±1.3
	ER	-0.04	p=0.42	7.3±1.5
	PR	0.06	p=0.38	8.1±2.0
	HER2	-0.15	p=0.22	6.4±1.6
	Ki67	-0.08	p=0.34	13.3±3.2
	AllredER	0.12	p=0.26	4.5±1.0
	AllredPR	0.09	p=0.32	7.0±1.4
	InvazieLV	0.18	p=0.17	2.1±0.6
	InvaziePN	0.22	p=0.13	2.2±0.5
	pT	0.09	p=0.32	3.4±1.1
pN	0.42	p=0.01	2.6±0.7	
Peritumoral	Grad	-0.12	p=0.27	1.4±0.5
	Nottingham	-0.04	p=0.42	5.1±0.8
	Formarea tubulilor	-0.07	p=0.35	10.0±2.0
	Atipie nucleară	-0.06	p=0.37	2.5±0.5
	Activitate mitotică	0.09	p=0.33	3.7±0.7
	Vârsta	0.14	p=0.24	53.9±4.7
	Glucosa	0.08	p=0.35	5.2±1.2
	ER	0.00	p=0.49	7.4±1.4
	PR	0.02	p=0.46	8.0±2.0
	HER2	0.29	p=0.07	6.3±1.5
	Ki67	-0.06	p=0.38	13.4±3.3
	AllredER	-0.01	p=0.48	4.6±1.0
	AllredPR	-0.04	p=0.42	7.2±1.4
	InvazieLV	-0.25	p=0.09	2.3±0.5
	InvaziePN	0.02	p=0.46	2.0±0.6
	pT	-0.03	p=0.43	3.5±1.1
pN	0.17	p=0.19	2.5±0.8	

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson/ Spearman în dependență de tipul variabilelor. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).

Anexa 16. Corelațiile statistice între markerii tumorali în carcinomul mamar asociat cu DZT2

Markerii studiați	r	Semnificație statistică (p-valoare)
ER vs PR	0.78	< 0.001
HER2 vs ER	-0.05	0.8
HER2 vs PR	-0.29	0.13
Ki67 vs PR	-0.49	0.007
Ki67 vs HER2	0.52	0.004
Ki67 vs ER	-0.3	0.12

Notă: r – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** au fost selectate valorile statistic semnificative ($p \leq 0.05$).





APROB

Proector pentru activitate de
cercetare și inovare

USMF „Nicolae Testemițanu” din RM
conf. univ., dr. hab. șt. med.

Jana CHIHAI

2025



ACTUL nr. 62
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-practic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** „PROFILUL IMUNOHISTOCHEMIC AL MACROFAGELOR CD68⁺ ÎN STABILIREA PARTICULARITĂȚILOR PROGNOSTICE ALE CARCINOMULUI MAMAR LA PACIENTE CU DIABET ZAHARAT TIP 2”

2. **Autori:** BRÎNZA Dumitru, medic, doctorand; FULGA Veaceslav, dr. hab. șt. med., conf. univ.; DAVID Valeriu, dr. șt. med., conf. univ.; FOCA Ecaterina, dr. șt. med., conf. univ.

3. **Numărul inovației:** Nr.6377 din 12 iunie 2025

Unde și când a fost implementată: Laboratorul de morfologie a USMF “Nicolae Testemițanu”, secția Anatomie Patologică a IMSP IO, anilor 2024-2025.

4. **Eficacitatea implementării:** metodă accesibilă tehnică și argumentată economic-financiar cu efect pozitiv ce a permis: obținerea procedurii standard (POS) prin aplicarea anticorpului primar anti-CD68 și a metodei de vizualizare EnVision™ FLEX în evaluarea diferențiată a densității celulare/macrofagale intra- și peritumorale cu scorificare ulterioară în cazul carcinomului de glandă mamară asociat cu DZT2 în vederea tratării densității celulare macrofagale ca factor de prognostic. Aprecierea corelațională a densității celulelor CD68+ cu un rol predominant pro-tumoral în contextul metabolic diabetic.

5. **Rezultatele:** Metoda propusă se bazează pe evaluarea diferențiată topografică ale macrofagelor tisulare atestate prin metoda IHC cu anti-CD68 pe un lot de studiu cu patologie de cancer de glandă mamară în asociație cu DZT2 (29 cazuri) și lotul de control fără DZT2 (n=43), material fasonat în bloc de parafină obținute de la pacientele internate în IMSP Institutul Oncologic pe parcursul perioadei anului 2018-2020. Propunerea este utilizată în optimizarea diagnosticului morfopatologic prin determinarea expresiei celulelor cu anticorpul anti-CD68, marker macrofagal prin îmbunătățirea stratificării prognostice.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Departament Cercetare, Șef Departament,
dr. hab. șt. med., prof. univ.

Elena RAEVSCHI

Director IMSP IO
dr.șt.med., conf. univ.

Ruslan BALTAGA



Brînză



CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This certificate is proudly presented to

Brinza Dumitru

in oral and technical presentation,
recognition and appreciation of research contributions to
INTERNATIONAL HARRAN HEALTH SCIENCES
CONGRESS-III October 1-3, 2021

Harran University, Şanlıurfa
with the paper entitled

**Proliferative activity of tumor cells in type 2 diabetic
breast cancer**

Dr. Hüseyin Eriş
Member of The Organizing Board



www.inhak.org

CERTIFICATE OF PARTICIPATION



This certificate is proudly presented to
Brinza Dumitru

in oral and technical presentation,
recognition and appreciation of research contributions to
INTERNATIONAL HARRAN HEALTH SCIENCES
CONGRESS-III October 1-3, 2021
Harran University, Şanlıurfa
with the paper entitled

Breast cancer proliferative activity

Dr. Fatmagün Erigü

Member of The Organizing Board



www.inhak.org

Certificate of participation

This certificate is proudly presented to:

Brinza Dumitru

in oral and technical presentation,
recognition and appreciation of research contributions to

2ND INTERNATIONAL HALICHI CONGRESS
October 29-30, 2021 / Istanbul

with the paper entitled

CO-EXPRESSION OF HORMONAL TYPE (ER; PR), GRADE AND
NUCLEAR ATYPIA NON-DIABETICALLY BREAST CANCER



A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Muhittin", is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Muhittin ELLAÇIK
Head of Congress





Certificate of participation

This certificate is proudly presented to

Brinza Dumitru

in oral and technical presentation,
recognition and appreciation of research contributions to

**3rd INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEDICAL & HEALTH SCIENCES
December 24-25, 2021 / BINGOL, TURKEY**

with the paper entitled
CORRELATION BETWEEN ESTROGEN
EXPRESSION AND TUMOR GRADE
DIFFERENTIATION IN BREAST
CARCINOMA

A blue ink handwritten signature, likely belonging to the conference chairwoman.

Assoc. Prof. Dr. Lydian Săteștii Borigă
Chairman of Conference



www.ispecongress.org



Certificate of participation

This certificate is proudly presented to

Brinza Dumitru

in oral and technical presentation,
recognition and appreciation of research contributions to

3rd INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEDICAL & HEALTH SCIENCES
December 24-25, 2021 / BINGOL, TURKEY

with the paper entitled

ESTROGEN EXPRESSION IN RELATION TO
GLUCOSE LEVEL IN CASE OF BREAST
CANCER ASSOCIATED WITH DIABETES
TYPE 2

A blue ink handwritten signature, likely belonging to the Chairman of the Conference, positioned above a horizontal line.

Assoc. Prof. Dr. Aydan Sıtkıcı Bengü
Chairman of Conference



www.ispeec.org



CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This Certificate is proudly presented to

Dr. Brinza Dumitru

in oral and technical presentation, recognition and appreciation
of research contributions to

4TH INTERNATIONAL CONGRESS OF
MULTIDISCIPLINARY STUDIES IN MEDICAL SCIENCES
held on February 18-20, 2022 / Antalya - Turkey

with the paper entitled

EXPRESSION OF Ki67 STATUS IN DIABETIC AND NONDIABETIC INVASIVE BREAST
CARCINOMA

Prof. Dr. Hülya ÇİÇEK
Head of Congress



www.iksadcongress.org

Certificate of participation

This certificate is proudly presented to

Brinza Dumitru

In oral and technical presentation,
recognition and appreciation of research contributions to
ISPEC 9th INTERNATIONAL CONFERENCE ON
AGRICULTURE, ANIMAL SCIENCES AND RURAL DEVELOPMENT
held on March 19–20, 2022 / BURDUR, TURKEY
with the paper entitled

The influence of blood sugar level on tumor cells markers expression



Prof. Dr. Hatice Öncü
Head of Conference
(Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Faculty of Veterinary Medicine Dean)



www.ispec.org



CERTIFICATE OF PARTICIPATION



This certificate is proudly presented to

Brinza Dumitru

in oral and technical presentation,
recognition and appreciation of research contributions to

2nd INTERNATIONAL SIIRT CONFERENCE ON SCIENTIFIC RESEARCH
March 21-23, 2022 / Siirt University

with the paper entitled

The progesterone expression versus nottingham score of breast cancer associated with diabetes type 2

Prof. Dr. **Fimine UZUNALI**
Head of Conference



IKSAD GLOBAL
INSTITUTE OF ECONOMIC DEVELOPMENT
AND SOCIAL RESEARCH

Certificate

OF PARTICIPATION

This certificate is proudly presented to

Brinza Dumitru

Image placeholder: s116

in oral and technical presentation,
recognition and appreciation of research contributions to
2ND INTERNATIONAL CAPPADOCIA SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS
held on June 17-19, 2022 / Cappadocia-Nevşehir
with the paper entitled

**Human epidermal growth factor receptor 2 expression according
to blood sugar level in breast cancer patients.**

Prof. Dr. Mustafa TALAS
Chairman of Organizing Board



www.cappadociacongress.org



Instituția Medico-Sanitară
Publică IMSP Institutul Oncologic



Societatea Științifico-Practică
a Oncologilor din Republica Moldova



Societatea Națională de Patologie
din Republica Moldova

CERTIFICAT

Se acordă Dnui/Dnei Felina Dumbră
pentru participare la Conferința Națională Științifico-Practică cu participare internațională

**“Istoria, actualități și perspective ale serviciului
de anatomie patologică din Republica Moldova”**
consacrată la 101 ani de la nașterea profesoarei Iraida IACOVLEVA,
un pilon al anatomiei patologice în oncologie

IMSP Institutul Oncologic, 7 februarie 2025

Acreditarea: 3 Credite de Educație Medicală Continuă

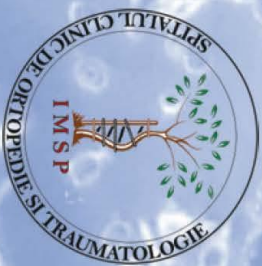


Serie MAP Cod XXV Nr. 6


Director Instituția Medico-Sanitară
Publică IMSP Institutul Oncologic,
doctor în medicină, conf. univ.
Ruslan BALTAGA


Președinte al Societății Științifico-
Practice a Oncologilor, doctor
habilitat în medicină, conf. univ.
Victor EFTODII


Președinte al Societății Naționale
de Patologie, doctor habilitat în
medicină, conf. univ.
Eugen MELNIC



Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare



CERTIFICATE OF PARTICIPATION

International Scientific Conference

“Cells and Tissues Transplantation. Actualities and Perspectives.

The 3rd Edition”

Dumitru Branza

Viorel Nacu, MD,

PhD, Professor

Dedicated to celebrating 80 years since the foundation of the *Nicolae Testimianu* State University of Medicine and Pharmacy of the Republic of Moldova



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL REPUBLICII MOLDOVA



IMSP IO



SORM



PNCC



SHTRM



CERTIFICAT DE PARTICIPARE



Dumitru Brinza

pentru participarea la Congresul Național de Oncologie, ediția a VI-a,
desfășurat în perioada 8-10 octombrie 2025.

ACREDITARE: 22 CREDITE DE EDUCAȚIE MEDICALĂ CONTINUĂ

Seria MON Cod XXV Nr.1377

Ruslan Baltaga

Co președinte

Rodica Mîndruța-Stratan

Co președinte

Sanda Buruiană

Co președinte

Chișinău, 2025



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL REPUBLICII MOLDOVA



CERTIFICAT DE PARTICIPARE

Se acordă Dnei/Dlui

Briuză Lumina

Conferință științifică cu participare internațională dedicată

Zilelor Medicale ale Spitalului Clinic Municipal

„Sfântul Arhanghel Mihail”, a IV-a ediție

Conferința a fost creditată cu 8 credite EMC

conform ord. MS nr. 1022 al RM din 12.11.2025

Seria MCH, codul XXV, nr. 223

Președinta Societății Medicilor Interniști din RM,
Membru corespondent al AȘM a RM,
dr.hab.șt.med.,prof. univ.,
Liliana Groppa

Președintele Asociației Chirurgilor
„Nicolae Anestiadi” din RM,
dr.șt.med.prof. univ.
Sergiu Ungureanu

Chișinău-2025

INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI MANIFESTĂRILOR ȘTIINȚIFICE

la care au fost prezentate rezultatele cercetărilor

la teza de doctor în științe medicale,

cu tema „Manifestările locale ale imunității celulare

În carcinomul mamar la pacienții cu diabet zaharat tip2”,

realizată în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie,

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

Articole în reviste științifice internaționale acreditate:

1. Foca E, **Brinza D**, Portnoi E, Carpenco E, David V, Saptefrati L, Fulga V. Role of CD68+ cells in the progression of breast cancer associated with diabetes mellitus. *Arch Balk Med Union*. 2024;59(3): pp. 280-289. ISSN 1584-9244 (print), ISSN 2558-815X (online). doi:10.31688/ABMU.2024.59.3.03. (SCOPUS)

2. Foca E, **Brinza D**, Carpenco E, David V, Saptefrati L, Fulga V. The influence of diabetes mellitus on blood vessels' amounts and immune status in case of breast cancer. *Rom J Morphol Embryol*. 2025;66(3): ISSN 1220-0522 (print), ISSN 2066-8279 (online). (IF 1.5). doi:10.47162/RJME.66.3.12

3. **Brinza D**, Foca E, David V, Carpenco E, Saptefrati L, Fulga V. Expression of CD8, CD68 and HER2 markers in breast carcinoma in diabetes patients. *Arch Balk Med Union*. 2025;60(4): pp. 11-20. ISSN 1584-9244 (print), ISSN 2558-815X (online). doi:10.31688/ABMU.2025.60.4.07. (SCOPUS)

- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**

- **articole în reviste de categoria B**

4. Foca E, **Brinza D**, Portnoi E, Carpenco E, David V, Saptefrati L, Fulga V. The influence of diabetes mellitus on blood vessels amount in case of breast cancer. *Mold J Health Sci*. 2023;11(1):1-8. doi:10.52645/MJHS.2023.1.01. ISSN (print) 1857-0534, ISSN (online) 2587-xxxx.

5. **Brinza D**, Portnoi E, Foca E, David V, Saptefrati L, Stratan V, Fulga V. Her2/neu and CD3 expression in breast cancer associated with diabetes. *Bull Acad Sci Mold Med Sci*. 2024;3(80):269-274. doi:10.52692/1857-0011.2024.3-80.47. ISSN 1857-0011. portal.issn.org+1

6. **Brinza D**, Foca E, David V, Saptefrati L, Fulga V. CD45RO expression in breast carcinoma associated with type 2 diabetes mellitus. *Arta Medica*. 2025;4(97):15-9. doi:10.5281/zenodo.17642100. UDC: 618.19-006.6-076-037+616.379-008.64

- **Articole în lucrările conferințelor științifice:**

- **Internaționale desfășurate în țară:**

7. **Brinza D**, David V, Foca E, Saptefrati L, Fulga V. Morphological and immunohistochemical characterization of the mammary gland in postmenopausal women. În: *Materialele Conferinței științifice Internaționale PROBLEME ACTUALE ALE MORFOLOGIEI dedicată aniversării a 80 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*, Chișinău, 2025, p.24-29. CZU: 611(063)

- **Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice naționale și internaționale:**

- **Internaționale:**

8. Portnoi E, **Brtnza D**, David V, Stratan V, Fulga V. Proliferative activity of tumor cells in type 2 diabetic breast cancer. In: *Abstract Book of the International Harran Health Sciences Congress-III*; 2021 Oct 1–3; Şanlıurfa, Turkey. p.413. ISBN: 978-625-7464-33-8.

9. **Brinza D**, Portnoi E, David V, Fulga V, Stratan V. Breast cancer proliferative activity. In: *Abstract Book of the International Harran Health Sciences Congress-III*; 2021 Oct 1–3; Şanlıurfa, Turkey. p.414. ISBN: 978-625-7464-33-8.

10. **Brinza D**, Portnoi E, Fulga V. Co-expression of hormonal type (ER, PR), grade and nuclear atypia in non-diabetic breast cancer. In: *Abstract Book of the II International Halich Congress on Multidisciplinary Scientific Research*; 2021 Oct 29–30; Istanbul, Turkey. p.145. ISBN: 978-625-7464-45-1.

11. **Brinza D**, Portnoi E, Fulga V. Correlation between estrogen expression and tumor grade differentiation in breast carcinoma. In: *Abstract Book of the 3rd International Conference on Medical & Health Sciences*; 2021 Dec 24–25; Bingöl, Turkey. p.180. ISBN: 978-625-7720-70-0.

12. Portnoi E, **Brinza D**, Foca E, Stratan V, Fulga V. Estrogen expression in relation to glucose level in breast cancer associated with type 2 diabetes. In: *Abstract Book of the 3rd International Conference on Medical & Health Sciences*; 2021 Dec 24–25; Bingöl, Turkey. p.181. ISBN: 978-625-7720-70-0.

13. **Brinza D**, Portnoi E, Fulga V, Stratan V. Expression of Ki67 status in diabetic and non-diabetic invasive breast carcinoma. In: *Abstract Book of the 4th International Congress of Multidisciplinary Studies in Medical Sciences*; 2022 Feb 18–20; Antalya, Turkey. p.372. ISBN: 978-625-8405-39-2.

14. **Brinza D**, Foca E, Portnoi E, Fulga V. The influence of blood sugar level on tumor cell markers expression. In: *Abstract Book of the ISPEC 13th International Conference on Engineering & Natural Sciences*; 2022 Mar 19–20; Burdur, Turkey. p.363. ISBN: 978-625-7720-79-3.

15. Portnoi E, **Brinza D**, Foca E, Stratan V, Fulga V. Progesterone expression versus Nottingham score in breast cancer associated with type 2 diabetes. In: *Abstract Book of the 2nd International Siirt Conference on Scientific Researches*; 2022 Mar 21–23; Siirt, Turkey. p.164. ISBN: 978-625-8405-07-1.

16. Portnoi E, **Brinza D**, Foca E, Stratan V, Fulga V. Human epidermal growth factor receptor 2 expression according to blood sugar level in breast cancer patients. In: *Abstract Book of the 2nd International Cappadocia Scientific Research Congress*; 2022 Jun 17–19; Cappadocia-Nevşehir, Turkey. p.1306. ISBN: 978-625-7464-92-5.

17. **Brinza D**, Foca E, Portnoi E, Șaptefrați L, Stratan V, Fulga V. T-lymphocyte content in breast carcinoma associated with type 2 diabetes mellitus. In: *Abstract Book of the Moldovan Journal of Health Sciences*; 2024 Sep 13–14; Chișinău, Republic of Moldova (4th Congress of Internal Medicine). p.114. ISSN: 2345-1467.

- **Naționale cu participare internațională:**

18. **Brinza D**, Portnoi E, Foca E, David V, Stratan V, Fulga V. Influence of type 2 diabetes mellitus on the proliferative activity of breast carcinoma. In: *Abstract Book of the Moldovan Journal of Health Sciences*; 4th Congress of Internal Medicine of the Republic of Moldova; 2024 Sep 13–14; Chișinău, Republic of Moldova. Vol.11, Supplement Annex 1, Issue 2(S); p.112. ISSN: 2345-1467.

19. **Brinza D**. The role of CD68+ macrophages in the tumor microenvironment of breast cancer: a new target for personalized therapies. In: *Abstract Book of the 6th National Oncology Congress* (in press).

20. **Brinza D**, Fulga V, Foca E, Șaptefrați L, David V. Local T-cell immune status in breast carcinoma of NST type. In: *Abstract Book of the Anniversary Congress “80 Years of Innovation in Health and Medical Education”*; *Moldovan Journal of Health Sciences*. 2025;12(3):17. Annex 2. UDC: 612.017:618.19-006.6.

21. **Brinza D**, Carpenco E, Foca E, David V, Șaptefrați L. The influence of diabetes mellitus on NK cell content in the microenvironment of breast carcinoma. In: *Abstract Book of the Anniversary Congress “80 Years of Innovation in Health and Medical Education”*; *Moldovan Journal of Health Sciences*. 2025;12(3). Annex 2. UDC: 616.379-008.64+618.19-006.6.

22. **Brinza D**, Foca E, David V, Șaptefrați L, Carpenco E, Fulga V. Vascularization of breast carcinoma in associated diabetes mellitus. In: *Abstract Book of the Anniversary Congress “80 Years of Innovation in Health and Medical Education”*; *Moldovan Journal of Health Sciences*. 2025;12(3):23. Annex 2. UDC: 618.19-006.6+616.379-008.64.

23. **Brinza D**, Foca E, David V, Șaptefrați L, Fulga V. CD45RO expression in breast carcinoma associated with type 2 diabetes mellitus. *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2024;11(2 Suppl 1):112. doi:10.5281/zenodo.17642100. ISSN: 2345-1467. UDC: 618.19-006.6-076-037+616.379-008.64.

- **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții:**

24. **Brinza D**, Fulga V, David V, Foca E. Profilul imunohistochimic al macrofagelor CD68+ în stabilirea particularităților prognostice ale carcinomului mamar la paciente cu DZ tip 2. Certificat de inovator Nr. 6377; 2025 Jun 12.

- **Participări cu comunicări la forumuri științifice:**

- **Internaționale:**

25. Portnoi E, **Brinza D**, David V, Stratan V, Fulga V. Proliferative activity of tumor cells in type 2 diabetic breast cancer. In: *International Harran Health Sciences Congress-III*; 2021 Oct 1–3; Şanlıurfa, Turkey.

26. **Brinza D**, Portnoi E, David V, Fulga V, Stratan V. Breast cancer proliferative activity. In: *International Harran Health Sciences Congress-III*; 2021 Oct 1–3; Şanlıurfa, Turkey.

27. **Brinza D**, Portnoi E, Fulga V. Co-expression of hormonal type (ER, PR), grade and nuclear atypia in non-diabetic breast cancer. In: *II International Halich Congress on Multidisciplinary Scientific Research*; 2021 Oct 29–30; Istanbul, Turkey.

28. **Brinza D**, Portnoi E, Fulga V. Correlation between estrogen expression and tumor grade differentiation in breast carcinoma. In: *3rd International Conference on Medical & Health Sciences*; 2021 Dec 24–25; Bingöl, Turkey.

29. Portnoi E, **Brinza D**, Foca E, Stratan V, Fulga V. Estrogen expression in relation to glucose level in breast cancer associated with type 2 diabetes. In: *3rd International Conference on Medical & Health Sciences*; 2021 Dec 24–25; Bingöl, Turkey.
 30. **Brinza D**, Portnoi E, Fulga V, Stratan V. Expression of Ki67 status in diabetic and non-diabetic invasive breast carcinoma. In: *4th International Congress of Multidisciplinary Studies in Medical Sciences*; 2022 Feb 18–20; Antalya, Turkey.
 31. **Brinza D**, Foca E, Portnoi E, Fulga V. The influence of blood sugar level on tumor cell markers expression. In: *ISPEC 13th International Conference on Engineering & Natural Sciences*; 2022 Mar 19–20; Burdur, Turkey.
 32. Portnoi E, **Brinza D**, Foca E, Stratan V, Fulga V. Progesterone expression versus Nottingham score in breast cancer associated with type 2 diabetes. In: *2nd International Siirt Conference on Scientific Researches*; 2022 Mar 21–23; Siirt, Turkey.
 33. Portnoi E, **Brinza D**, Foca E, Stratan V, Fulga V. Human epidermal growth factor receptor 2 expression according to blood sugar level in breast cancer patients. In: *2nd International Cappadocia Scientific Research Congress*; 2022 Jun 17–19; Cappadocia–Nevşehir, Turkey.
- **Naționale**
34. **Brînza D**, Foca E, Fulga V. Expresia markerilor imunității celulare în carcinomul mamar la pacienți cu diabet zaharat de tip 2. In: *Conferința Națională Științifico-Practică cu participare internațională „Istoria, actualități și perspective ale serviciului de anatomie patologică în Republica Moldova”*; 2025 Feb 7; Chișinău, Republica Moldova.
 35. **Brînza D**, Foca E, Fulga V. Correlation between CD45 expression and clinical-pathological variables in invasive ductal breast carcinoma associated with type 2 diabetes mellitus. In: *National Scientific Conference with International Participation “Cells and Tissues Transplantation. Actualities and Perspectives. The 3rd Edition”*; 2025 Mar 21–22; Chișinău, Republica Moldova.
 36. **Brînza D**. Rolul macrofagelor CD68+ în micro-ambianța tumorală a cancerului mamar: o nouă țintă pentru terapii personalizate. In: *Congresul Național de Oncologie, ediția VI*; 2025 Oct 9–10; Chișinău, Republica Moldova.
 37. **Brînza D**, Fulga V, Foca E, Șaptefrați L, David V. Statusul imun local T-celular în carcinomul mamar de tip NST / Local T-cell immune status in breast carcinoma of NST type. In: *Congresul aniversar „80 de ani de inovație în sănătate și educație medicală”*; 2025 Oct 20–22; Chișinău, Republica Moldova.
 38. Carpenco E, **Brînza D**, Foca E, David V, Șaptefrați L. Influența diabetului zaharat asupra conținutului de celule NK în microambianța carcinomului mamar / The influence of diabetes mellitus on NK cell content in the microenvironment of breast carcinoma. In: *Congresul aniversar „80 de ani de inovație în sănătate și educație medicală”*; 2025 Oct 20–22; Chișinău, Republica Moldova.
 39. **Brînza D**, Foca E, David V, Șaptefrați L, Carpenco E, Fulga V. Vascularizarea carcinomului mamar în diabetul zaharat asociat / Vascularization of breast carcinoma in associated diabetes mellitus. In: *Congresul aniversar „80 de ani de inovație în sănătate și educație medicală”*; 2025 Oct 20–22; Chișinău, Republica Moldova.
 40. **Brînza D**, Foca E, David V, Șaptefrați L, Fulga V. Expresia CD45RO în carcinomul mamar asociat cu Diabetul Zaharat de tip 2 / CD45RO expression in breast carcinoma associated with Type 2 Diabetes Mellitus. In: *Zilele Medicale ale Spitalului Clinic Municipal „Sfântul Arhanghel Mihail”*, ediția a IV-a; 2025 21 Nov; Chișinău, Republica Moldova.

CURRICULUM VITAE



Informații personale

Nume / Prenume

Adresa

Telefoane

e-mail

Sex

Data nașterii

Naționalitatea

Specialitatea

Brînză Dumitru

Str. Andrei Raileanu, nr. 3, sat. Fîrladeni, r.
Căușeni, MD-4314, Republica Moldova
mobil: (+373)-79057321

dumitrubrinza19@gmail.com

Masculin

19 octombrie 1984

Republica Moldova

medic specialist morfopatolog

Experiența profesională

Perioada

Funcția și postul ocupat

2020- prezent

Medic specialist morfopatolog, Serviciul
Anatomie patologică, IMSP Institutul Oncologic,
Chișinău, Republica Moldova

Perioada

Funcția și postul ocupat

2013-2020

Asistent universitar Catedra de morfopatologie;
USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău,
Republica Moldova

Perioada

Funcția și postul ocupat

2013

Medic specialist morfopatolog, Serviciul
Anatomie patologică, IMSP Spitalul Raional
Căușeni „Ana și Maria” Căușeni, Republica
Moldova

Perioada

Funcția și postul ocupat

2012

Medic specialist morfopatolog, IMSP Spitalul
Raional Ștefan Vodă, Ștefan Vodă, Republica
Moldova

Perioada

Funcția și postul ocupat

2011

Medic de urgență, IMSP Institutul Medicina de
Urgență. Chișinău, Republica Moldova

Educație și formare

Perioada

2018-2023

<i>Numele și tipul instituției de învățământ</i>	Doctorand Școala Doctorală în Domeniul Științe Medicale, „USMF ‘Nicolae Testemițanu’ 2009 – 2012
Perioada <i>Calificarea/ diploma obținută</i>	Rezidențiat în morfopatologie , Catedra de morfopatologie; USMF “Nicolae Testemițanu” Chișinău, Republica Moldova
<i>Calificarea/diploma obținută</i>	Medic morfopatolog, diploma seria AL nr. 005094 din 13.06.2012/13.06.2012
Perioada <i>Calificarea/ diploma obținută</i>	2003-2009 Diplomă de studii superioare, diploma seria ASM nr. 000000713 nr. 509210010213 din 12.06.2009
<i>Numele și tipul instituției de învățământ</i>	USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova
Perioada <i>Calificarea/ diploma obținută</i>	1991-2003 Diplomă de Bacalaureat
<i>Numele și tipul instituției de învățământ</i>	Liceul „Mihai Sadoveanu”- sat. Fîrladeni, r. Căușeni
Alte formări/instruiri	Educație profesională continuă:
10.06.2024-02.08.2024	Traning de specializare in hemotolinfopatologie/ SSD of Haemolymphopathology - IRCCS – University Hospital of Bologna Haemolymphopathology Unit. Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna. Policlinico S.Orsola-Malpighi
22-23.09.2023	Societatea de pediatrie din Republica Moldova; actualități în pediatrie și impactul imunizării asupra morbidității și mortalității copiilor în Republica Moldova"
14 – 16.06.2023	European School of Pathology (EScoP) for Lung and Thymic Pathology, Bucharest 2023
26.05.2023	Actualiatiti in diagnosticul cancerului bronhopulmonar. IMSP IOM
26.05.2023	ESMO Guidelines: Real World Cases - Webinar Series: Cancer of Unknown Primary 2023
16.05.2023	CCA Pathology Update: An Expert’s Guide for Histopathologists.
11-13.05.2023	Certificate of attendance for ESMO Breast Cancer Congress 2023 ESMO
25.03.2023	Actualiatiti in diagnosticul si tratamentul tumorilor sferei ORL

	<i>Participări la conferințe:</i>
21-22.03.2025	<p>National Scientific Conference with International Participation „CELLS AND TISSUES TRANSPLANTATION. ACTUALITIES AND PERSPECTIVES. THE 3rd EDITION”</p> <p>Dedicated to the 80th anniversary of the founding of Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy</p> <p>Correlation between CD45 expression and clinical-pathological variables in invasive ductal breast carcinoma associated with type 2 diabetes mellitus. <i>Chisinau, Republic of Moldova.</i></p>
07.02.2025	<p>Conferința Națională Științifico-Practică cu participare internațională " Istoria, actualități și perspective ale serviciului de anatomie patologică în Republica Moldova</p> <p>Republica Moldova.</p> <p>Expresia markerilor imunității celulare în carcinomul mamar la pacienți cu diabet zaharat de tip 2/</p>
17-19.06.2022	<p>2. INTERNATIONAL CAPPADOCIA SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS Cappadocia-Nevşehir; Human epidermal growth factor receptor 2 expression according to blood sugar level in breast cancer patients</p>
21-23.03. 2022	<p>2. INTERNATIONAL SIIRT CONFERENCE ON SCIENTIFIC RESEARCHES; The progesterone expression versus Nottingham score of breast cancer associated with diabetes type 2;</p>
19-20.03. 2022	<p>ISPEC 13th INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENGINEERING & NATURAL SCIENCES Mark, Burdur, Turkey; The influence of blood sugar level on tumor cells markers expression</p>
18-20.02. 2022	<p>4th INTERNATIONAL CONGRESS OF MULTIDISCIPLINARY STUDIES IN MEDICAL SCIENCES; Antalya – Turkey; Expression of Ki67 status in diabetic and nondiabetic invasive breast carcinoma;</p>
24-25.12. 2021	<p>3rd INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEDICAL & HEALTH SCIENCES, BINGOL,</p>

	TURKEY; Correlation between estrogen expression and tumor grade differentiation in breast carcinoma; Estrogen expression in relation to glucose level in case of breast cancer associated with diabetes type 2
10-11.11.2021	INTEGRARE PRIN CERCETARE ȘI INOVARE; Carcinom cu celule scuamoase ale capului și gâtului HPV+ și HPV- prin analiza micromediului tumoral. Strategii de reducere a daunei;
29-30.10. 2021	II. INTERNATIONAL HALICH CONGRESS ON MULTIDISCIPLINARY SCIENTIFIC RESEARCH, Istanbul, TURKEY; Co-expression of hormonal type (Er; Pr), grade and nuclear atypia non-diabetically breast cancer
1-3.10. 2021	INTERNATIONAL HARRAN HEALTH SCIENCES CONGRESS-III, Harran University, Şanlıurfa; Proliferative activity of tumor cells in type 2 diabetic breast cancer;
1-3.10. 2021	INTERNATIONAL HARRAN HEALTH SCIENCES CONGRESS-III, Harran University, Şanlıurfa; Breast cancer proliferative activity;
	<i>Domeniul de activitate științifică:</i>
<i>Specialitatea de bază</i>	311.02. Anatomie patologică;
<i>Domenii de cercetare</i>	MANIFESTĂRILE LOCALE ALE IMUNITAȚII CELULARE ÎN CARCINOMUL MAMAR LA PACIENȚII CU DIABET ZAHARAT TIP2
	Publicatii
	Moldovan Medical Journal. September 2021;64(3):50-53; HPV+ and HPV- head and neck squamous cell carcinoma by analysis of tumor microenvironment; https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.64-3.21.10 Goiman A., Portnoi E., Brînza D., Melnic E., ’’Prezentarea clinică și rezultatele autopsiei la pacienții cu COVID-19’’ In: Revista de Științe ale Sănătății din Moldova. 2020, vol. 23(1), pp. 29-34. ISSN 2345-1467.

	<p>Cazacu E., Melnic E., Pretula R., Brînza D., Parnov M., "Studiul histologic și imunohistochimic al tumorilor neuroendocrine gastro-intestinale" / Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”, 21-23 octombrie 2020: Abstract book</p> <p>Brînza D., Mărițoi T., Ivasiuc I., Mindruța-Stratan R., Uncuța D., "Expresia markerilor biologici în leziunile premaligne ale carcinomului de cap și gât" / Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”, 21-23 octombrie 2020: Abstract book</p> <p>Lesnic E., Roșca V., Niguleanu R., Haidarli I., Popa V., Brinza D., Cazacu O., "Particularitățile clinico-morfopatologice ale tuberculozei pulmonare cu evoluție letală", 2017; CZU: 616.24-002.5</p>			
Participarea la proiecte				
2024-2025	Collaborative RO-MD research on diagnosis and treatment strategies for patients with HIV (+) DLBCL. Proiect PN-IV-P8-8.3-ROMD-2023-0036-UMF Cluj			
2020-2027	Proiectul EUNetCCC - CRANE2			
Aptitudini și competențe personale				
<i>Limba maternă</i>	Română			
Autoevaluare	Înțelegere	Vorbire	Scriere	Autoevaluare
<i>Nivel european (*)</i>	Ascultare	Citare	Participare la conversație	Discurs oral
Rusă	C2	C2	C2	C2
Engleză	B2	B2	B2	B2
Competențe și aptitudini PC	Windows, MS Office applications: Word, Excel, Power Point; Internet			
Competențe organizaționale/ manageriale	capacitate de analiză și sinteză; responsabilitate; capacitate de adaptare sporită; spirit de echipă; comunicare; seriozitate; capacitate de asimilare de noi informații și abilități, disponibilitate pentru implicare în activități socioculturale; capacități decizionale; spirit organizatoric, aptitudini de coordonare, punctualitate; capacitatea de a lua decizii în condiții de stres și de a respecta termene limită.			
Informații suplimentare	Căsătorit Permis de conducere ABCH			

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnatul, declar pe răspundere personală, că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Brînza Dumitru

Semnătura _____

Data _____

Declaration on accountability

I declare the personal responsibility that information presented in this thesis are the result of my own research and scientific achievements. I realize that, otherwise, will suffer the consequences in accordance with law.

Brînza Dumitru

Signature _____

Date _____

ADNOTAREA TEZEI

„MANIFESTĂRILE LOCALE ALE IMUNITĂȚII CELULARE ÎN CARCINOMUL MAMAR LA PACIENȚII CU DIABET ZAHARAT DE TIP 2”

Structura tezei: introducere, 6 capitole, concluzii generale, recomandări practice, bibliografie cu 330 titluri, 16 anexe, 110 pagini de text de bază. Rezultatele au fost publicate în 40 lucrări științifice.

Cuvinte cheie: carcinom mamar, profil hormonal, HER2, Ki67, diabet zaharat de tip 2 (DZT2), imunitate locală, T limfocite, macrofage, angiogeneză.

Scopul lucrării: Evaluarea complexă a carcinomului mamar invaziv de tip ductal (NST) asociat cu DZT2, prin prisma profilului molecular al tumorii și a statusului imun celular local, comparativ cu pacienții non-diabetici.

Metodologia cercetării: Studiu retrospectiv, comparativ, pe un lot de 102 specimene: 72 paciente cu carcinom mamar (43 fără diabet și 29 cu DZT2) și un lot de control de 30 cazuri (țesut mamar neafectat). S-au utilizat metode histologice clasice și imunohistochemice (panel de 11 anticorpi: ER, PR, HER2, Ki67, CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56, CD68).

Rezultatele obținute: Analiza morfologică a demonstrat că tumorile asociate cu DZT2 prezintă caracteristici mai agresive, având dimensiuni mai mari și stadii patologice mai avansate comparativ cu lotul non-diabetic. S-a constatat că diabetul zaharat nu este doar o comorbiditate, ci un factor activ care remodelează microambianța tumorală.

Evaluarea statusului imun a relevat modificări semnificative induse de DZT2. În tumorile pacientelor diabetice, s-a observat o diminuare a densității limfocitelor T citotoxice (CD8⁺) și a macrofagelor (CD68⁺) în zona intratumorală, comparativ cu stroma peritumorală. În schimb, stroma peritumorală la diabetici este caracterizată printr-o infiltrare mai intensă cu celule NK (CD56⁺) și o densitate vasculară (CD34⁺) crescută, sugerând o adaptare compensatorie. Spre deosebire de pacientele non-diabetice, unde vascularizația intratumorală corelează pozitiv cu agresivitatea, la diabetici aceasta corelează negativ cu gradul histologic și Ki67, indicând o angiogeneză inefficientă.

Din punct de vedere molecular, tumorile asociate cu DZT2 sunt preponderent hormon-dependente (ER/PR pozitive), iar subtipul Luminal B/HER2-negativ este cel mai frecvent. Deși diabetul nu alterează distribuția globală a subtipurilor moleculare, acesta modulează relațiile dintre markeri: s-a evidențiat o corelație pozitivă puternică între HER2 și Ki67 la diabetici, sugerând un comportament mai agresiv al tumorilor HER2⁺ în context metabolic alterat.

Concluzii: Dereglările metabolice din DZT2 influențează profund interacțiunea dintre tumoră și gazdă, favorizând un profil imun local modificat ce pot contribui la progresia neoplazică și necesită o abordare terapeutică personalizată.

THESIS ABSTRACT

"LOCAL MANIFESTATIONS OF CELLULAR IMMUNITY IN BREAST CARCINOMA IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS"

Thesis structure: Introduction, 6 chapters, general conclusions, practical recommendations, bibliography with 330 titles, 16 annexes, 110 pages of core text. The results were published in 40 scientific papers.

Keywords: breast cancer, hormonal profile, HER2, Ki67, type 2 diabetes mellitus (T2DM), local immunity, T lymphocytes, macrophages, angiogenesis.

The purpose of the study: A complex evaluation of invasive ductal breast carcinoma (NST) associated with T2DM, through the lens of the tumor's molecular profile and local cellular immune status, compared to non-diabetic patients.

Research methodology: A retrospective, comparative study on a batch of 102 specimens: 72 patients with breast cancer (43 without diabetes and 29 with T2DM) and a control group of 30 cases (unaffected breast tissue). Classical histological and immunohistochemical methods were used (a panel of 11 antibodies: ER, PR, HER2, Ki67, CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56, CD68).

Results obtained: Morphological analysis demonstrated that T2DM-associated tumors exhibit more aggressive characteristics, showing larger sizes and more advanced pathological stages compared to the non-diabetic group. It was established that diabetes mellitus is not merely a comorbidity but an active factor that remodels the tumor microenvironment. The evaluation of immune status revealed significant changes induced by T2DM. In the tumors of diabetic patients, a decrease in the density of cytotoxic T lymphocytes (CD8⁺) and macrophages (CD68⁺) was observed in the intratumoral area compared to the peritumoral stroma. Conversely, the peritumoral stroma in diabetics is characterized by a more intense infiltration of NK cells (CD56⁺) and increased vascular density (CD34⁺), suggesting a compensatory adaptation. Unlike non-diabetic patients, where intratumoral vascularization correlates positively with aggressiveness, in diabetics, it correlates negatively with histological grade and Ki67, indicating inefficient angiogenesis. From a molecular perspective, T2DM-associated tumors are predominantly hormone-dependent (ER/PR positive), and the Luminal B/HER2- subtype is the most frequent. Although diabetes does not alter the global distribution of molecular subtypes, it modulates the relationships between markers: a strong positive correlation was highlighted between HER2 and Ki67 in diabetics, suggesting more aggressive behavior of HER2-positive tumors in a context of altered metabolism.

Conclusions: Metabolic disturbances in T2DM profoundly influence the interaction between tumor and host, favoring a modified local immune profile that may contribute to neoplastic progression and necessitates a personalized therapeutic approach.

АННОТАЦИЯ ДИССЕРТАЦИИ

«ЛОКАЛЬНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОК С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА»

Структура диссертации: введение, 6 глав, общие выводы, практические рекомендации, библиография, включающая 330 наименований, 16 приложений, 110 страниц основного текста. Результаты исследования опубликованы в 40 научной работе.

Ключевые слова: рак молочной железы, гормональный профиль, HER2, Ki67, сахарный диабет 2 типа (СД2), локальный иммунитет, Т-лимфоциты, макрофаги, ангиогенез.

Цель работы: комплексная оценка инвазивного рака молочной железы протокового типа, неспецифического типа (NST), ассоциированного с сахарным диабетом 2 типа, с позиций молекулярного профиля опухоли и состояния локального клеточного иммунитета в сравнении с пациентками без диабета.

Методология исследования: проведено ретроспективное сравнительное исследование на материале 102 образцов: 72 пациентки с раком молочной железы, из которых 43 без сахарного диабета и 29 с СД2, а также контрольная группа из 30 случаев неизменной ткани молочной железы. В исследовании использованы классические гистологические и иммуногистохимические методы с применением панели из 11 антител: ER, PR, HER2, Ki67, CD3, CD4, CD8, CD34, CD45, CD56, CD68.

Полученные результаты: морфологический анализ показал, что опухоли, ассоциированные с СД2, характеризуются более агрессивными признаками, включая большие размеры и более высокие патологические стадии по сравнению с опухолями у пациенток без диабета. Установлено, что сахарный диабет является не только сопутствующей патологией, но и активным фактором, ремоделирующим опухолевое микроокружение. Оценка иммунного статуса выявила существенные изменения, обусловленные СД2. В опухолях пациенток с диабетом отмечено снижение плотности цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺) и макрофагов (CD68⁺) в интралимфатической зоне по сравнению с перитуморальной стромой. В то же время перитуморальная строма у больных с диабетом характеризуется более выраженной инфильтрацией NK-клетками (CD56⁺) и повышенной сосудистой плотностью (CD34⁺), что может отражать компенсаторно-адаптационные изменения. В отличие от пациенток без диабета, у которых интралимфатическая васкуляризация положительно коррелирует с агрессивностью опухоли, у больных с СД2 она отрицательно коррелирует с гистологической степенью злокачественности и индексом Ki67, что свидетельствует о неэффективном ангиогенезе. Хотя наличие диабета не изменяет общей структуры молекулярных подтипов, оно модифицирует взаимосвязи между опухолевыми маркерами.

Выводы: метаболические нарушения при сахарном диабете 2 типа существенно влияют на взаимодействие между опухолью и макроорганизмом, способствуя формированию измененного локального иммунного профиля, который может участвовать в прогрессировании неопластического процесса и обуславливает необходимость персонализированного терапевтического подхода.