



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО НУКЛЕАРНА МЕДИЦИНА, ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ И
МЕДИЦИНСКА ОНКОЛОГИЯ

Д-р Георги Димитров Димитров

**ФАКТОРИ, ПРЕДСКАЗВАЩИ ПЪЛЕН ПАТОЛОГИЧЕН
ОТГОВОР СЛЕД НЕОАДЮВАНТНА ХИМИОТЕРАПИЯ
ПРИ ИНВАЗИВЕН ДУКТАЛЕН КАРЦИНОМ НА
МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

За придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование 7. „Здравеопазване и спорт“

Професионално направление 7.1. Медицина

Докторска програма „Медицинска онкология“

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

Проф. д-р Петранка Петрова Кънева-Троянова, дм

Доц. д-р Весела Иванова Тодорова, дм

София, 2024

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ –
КАТЕДРА ПО НУКЛЕАРНА МЕДИЦИНА, ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ И
МЕДИЦИНСКА ОНКОЛОГИЯ

**Фактори, предсказващи пълен патологичен отговор след
неoadювантна химиотерапия при инвазивен дуктален
карцином на млечната жлеза**

АВТОРЕФЕРАТ НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА
ПРИДОБИВАНЕ НА ОНС “ДОКТОР”

Д-р Георги Димитров Димитров

Ръководители: проф. д-р Петранка Петрова Кънева-Троянова, дм¹ и
доц. Весела Иванова Годорова, дм²

София, 2024г.

¹Катедра по Нуклеарна медицина, Лъчелечение и Медицинска Онкология - МУ София.

²Катедра по Обща Патология и Патологическа Анатолия - МУ София.



Дисертационният труд е представен в обем 130 машинописни страници и съдържа 16 таблици, 18 оригинални фигури и 4 приложения. Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на КНМЛМО при МУ – София. Литературната справка включва 147 индексирани в PubMed заглавия, от които 8 от български автори. Дисертационният труд е обсъден и одобрен за публична официална защита от катедрен съвет на КНМЛМО на МУ-София на 26 юни 2024г. и съгласно заповед №РК36-1842/26.07.2024г. на ректора на МУ-София, е избрано научно жури в състав:

Вътрешни членове:

Проф. д-р Теофил Ангелов Седлоев, дм

Проф. Радка Петрова Кънева, дб

Външни членове:

Доц. д-р Желязко Илиев Арабаджиев, дм

Проф. д-р Николай Владимиров Цонев, дм

Проф. д-р Юлиан Руменов Ананиев, дм

Резервен вътрешен член:

Проф. д-р Радина Стефанова Иванова-Боянова, дмн

Резервен външен член:

Проф. д-р Галина Петрова Куртева, дм

„Пози труд нямаше да бъде осъществен без подкрепата на КНМЛМО на МУ-София и моите научни ръководители: проф. Петранка Пролянова и доц. Весела Иванова. Изказвам искрена благодарност на д-р Радослав Мангалджиев за неговия неоценим принос в набирането на пациенти. Дълбоко признателен съм на своите скъпи приятели проф. Радка Аргирова, доц. Трифон Вълков и д-р Мариана Атанасова за мъдрите съвети и насоки както в професионалния, така и в личния ми живот. Най-вече изразявам своята безкрайна благодарност към моето семейство за тяхната безусловна подкрепа и търпение през целия процес.“

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък със съкращения	5
На латиница	5
На кирилица	8
1 Въведение	10
2 Цел и задачи на дисертацията	13
3 Материали и методи	15
3.1 Туморни проби и пациентни	15
3.2 Обработка на туморните блокчета	16
3.3 Оборудване, реактиви и антитела	18
3.4 Оцветяване с Хематоксилин и Еозин (H&E)	18
3.5 Имунохистохимия - (ИХХ)	19
3.6 Транскриптомен анализ	21
3.7 Статистически анализ	21
4 Резултати	24
4.1 Резултати от всички туморни подгрупи	25
4.1.1 Еднофакторен анализ на клиничните параметри.....	25
4.1.2 Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри	29
4.1.3 Еднофакторен анализ на имунохистохимичните биомаркери	34
4.1.4 Многофакторен логистичен регресивен анализ	41
4.1.5 Сходства и разлики между английската и българската кохорти при всички молекулярни подтипове КМЖ	43
4.1.6 Конкордантност и Дискордантност на Биомаркерите	45
4.2 Резултати в HR-отрицателната подгрупа	45

6.2.1 Еднофакторен анализ на честота на ППО при HR-отрицателни КМЖ.....	45
4.2.2 Еднофакторен анализ на клиничните параметри при HR-отрицателни КМЖ.....	48
4.2.3 Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри при HR-отрицателни КМЖ	51
4.2.4 Имунохистохимични параметри при HR-отрицателни кмж .	55
4.3 Резултати от подгрупата с ТНКМЖ	60
4.3.1 Еднофакторен анализ на честотата на ППО при ТНКМЖ....	60
4.3.2 Еднофакторен анализ на клиничните параметри при ТНКМЖ	60
4.3.3 Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри при ТНКМЖ	64
4.3.4 Имунохистохимични параметри при ТНКМЖ.....	67
4.3.5 Многофакторен логистичен регресивен анализ на ТНКМЖ	69
4.4 Транскриптомен анализ	71
4.4.1 Експресия на <i>MME</i> (CD10).....	71
4.4.2 Експресия на <i>p53</i>	72
4.4.3 Експресия на EGFR	72
5 Обсъждане.....	74
6 Изводи.....	87
7 Заключение.....	89
8 Приноси на дисертационния труд	90
9 Научни публикации и съобщения свързани с дисертационния труд..	91
9.1 Участия в научни форуми с публикувани резюмета	92

СПИСЪК СЪС СЪКРАЩЕНИЯ

НА ЛАТИНИЦА

АКТ	Протеин киназа Б
ВАК	BCL-2 homologous antagonist/killer
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein-1
BRCA1/2	Breast Cancer associated gene 1/2
CD10	Cluster of differentiation 10
СК	Cytokeratin
CNB	Core needle biopsy
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole (double stranded DNA staining)
DCIS	Ductal carcinoma in situ
DFS	Disease-free survival
E-CADHERIN	Epithelial calcium-dependent adhesion molecule
EGF-R	Epithelial growth factor receptor
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
ER	Estrogen receptor
ERBB2	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase

FDG-PET-CT	Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography
EC	Epirubicin and cyclophosphamide
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FNA	Fine needle aspiration
GATA3	Guanosine-adenine-thymine-adenine binding protein
GDP	Guanosine 5'-Diphosphate
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosine 5'-Triphosphate
GTPase	Activating Proteins Guanine Nucleotide Exchange Factors
H&E	Hematoxylin and eosin stain
HR	Hormone receptor
HER2	Human epidermal receptor 2/ neuroblastoma associated
JNK	Jun N-terminal kinase
LCIS	Lobular carcinoma in situ
LNIS	Ductal neoplasia in situ
MAB	monoclonal antibody
MAP-K	Mitogen activated protein kinase
MET	Mesenchymal to epithelial transition
MME	Membrane Metalloendopeptidase

MMP	Matrix metalloproteinases
MYC	Myelocytomatosis oncogene
OM	Original magnification
OS	Overall survival
P-CADHERIN	Placental calcium-dependent adhesion molecule
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PR	Progesterone receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAC	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAS	Rat sarcoma oncogene
RNA	Ribonucleic acid
SALL4	Sal-like protein 4
TGF-beta	Transforming growth factor beta
(t)P53	Tumor protein 53

НА КИРИЛИЦА

ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
ИДК	Инвазивен дуктален карцином
ИХХ	Имунохистохимия
ИЛК	Инвазивен лобуларен карцином
ИП	Имунопероксидаза
КМЖ	Карцином на млечната жлеза
КТ	Компютърна томография
МРТ	Магнитно-резонансна томография
НАХТ	Неoadювантна химиотерапия
ОСО	Органосъхраняваща операция
ППО	Пълен патологичен отговор
РСК	Ракови стволови клетки
ТНКМЖ	Тройно-негативен карцином на млечната жлеза
ТТ	Таргетна терапия

01

ГЛАВА ПЪРВА

Въведение

ВЪВЕДЕНИЕ

1 ВЪВЕДЕНИЕ

Карциномът на млечните жлези (КМЖ) е едно от най-честите злокачествени заболявания сред жените в световен мащаб, представляващ приблизително 26% от всички случаи на рак в тази група (Siegel et al., 2023). Специфични тумор-агностични фактори усъвършенстват терапията, насочена към различни подгрупи на заболяването (Loibl et al., 2021). Неоадювантната терапия за карцином на гърдата (в стадий II – III) включва оперативна интервенция след системно лечение (химиотерапия, хормонална терапия и/или имунотерапия) в зависимост от туморната биология (Gradishar et al., 2022). Ози подход позволява намаляване на размера на тумора преди операцията и оценка на чувствителността към системното лечение.

Антрациклин базираната неоадювантна химиотерапия (НАХТ) е един от най-често прилаганите режими и довежда до пълен патологичен отговор (ППО) при приблизително 30% от пациентите с ранен карцином на гърдата (Cortazar et al., 2014). ППО корелира с по-добра прогноза, което го прави привлекателна клинично-патологична цел. Сред признатите прогностични и предиктивни биомаркери за карцином на гърдата, естрогенният рецептор (ER) и рецепторът на епидермалния човешки растежен фактор 2 (HER2) са сред най-силните индикатори за прогнозата и предвиждането на отговора към системното лечение (Colleoni and Montagna, 2012, Mitri et al., 2012). Въпреки наличието на тези утвърдени биомаркери като ER, PR и HER2, все още липсват достатъчно надеждни маркери за предсказване на отговора към НАХТ. Това води до неопределеност при избора на лечение и възможно неправилно управление на терапията.

Други фактори като митотичния индекс Ki-67 са показали спорни резултати относно предсказването на този отговор (Ács et al., 2017). Степента на туморната диференциация (G) съгласно Модифицираната система за оценяване на Скарф-Блум-Ричардсън според Елстън-Елис и

ВЪВЕДЕНИЕ

резултатът от НАХТ играят важна роля в определянето на прогнозата (Goorts et al., 2017).

Връзката между туморната биология и предсказването на отговора към системната терапия остава неясна, което налага изучаването на допълнителни предиктивни фактори. Хетерогенността между основните четири подтипа КМЖ представлява предизвикателство за точната оценка на терапевтичния отговор и изисква откриването на допълнителни биомаркери (Zhang et al., 2022). Разбирането на биологичните механизми, стоящи в основата на различните терапии, и техните асоциации с определени биомаркери е критично за оптимизирането на клиничното им приложение.

Целта на това проучване е да изясни връзката между различни клинични, патохистологични и имунохистохимични фактори и ППО след 4-6 курса антрациклин базирана НАХТ при пациентки с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза, диагностицирани в стадий IIIa/b и стратифицирани по експресията на ER, PR, HER2, EGFR, CK5, CD10, p53 и SALL. Проучването включва 130 пациентки, диагностицирани и лекувани в период от 2010 до 2020 година в две лечебни заведения – болниците Черинг Крос в Лондон и УМБАЛ Царица Йоанна в София. Пациентките са подложени на 4-6 курса антрациклин базирана НАХТ по схема EC. Данните от туморните биопсии преди и след системното лечение са анализирани, за да се определи наличието на ППО и връзката с различните фактори.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

02

ГЛАВА ВТОРА

Цел и задачи

2 ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Цел: Да се изяснят факторите, предсказващи пълен патологичен отговор (ППО) след 4-6 курса антрациклин базирана неoadjuвантна химиотерапия (НАХТ) при пациентки с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза, диагностицирани в стадий IIIa/б.

За постигане на тази цел сме поставили следните задачи:

- 1) Да се установят клиничните характеристики на пациентките с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза в стадий IIIa/б (cT0-3 cN2 cM0 или cT4 cN0-2 cM0) и връзката с ППО (ypT0/Tis ypN0) след НАХТ.
- 2) Да се определят хистопатологичните особености на туморите на пациентки с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза в стадий IIIa/б и честотата на ППО след НАХТ.
- 3) Да се анализират имунохистохимичните биомаркерни експресии (ER, PR, HER2, EGFR, CK5, CD10, p53 и SALL4) на туморите на пациентки с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза в стадий IIIa/б и връзката с ППО след НАХТ.
- 4) Да се оценят клиничните, хистопатологичните и имунохистохимичните характеристики при HR-отрицателните пациентки с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза в стадий IIIa/б и честотата на ППО след НАХТ.
- 5) Да се проучат клиничните, хистопатологичните и имунохистохимичните характеристики на пациентките с ТНКМЖ в стадий IIIa/б и връзката с ППО след НАХТ.
- 6) Да се сравнят имунохистохимичните биомаркерни експресии, на пробите непостигнали ППО, преди (от дебелоиглената биопсия) и след НАХТ (от ексцизионните проби след дефинитивното оперативно лечение) на пациентки с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза в стадий IIIa/б.
- 7) Да се съпоставят резултатите получени от Английската кохорта пациентки с тези от България.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

03

ГЛАВА ТРЕТА

Материали и методи

3 МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1 ТУМОРНИ ПРОБИ И ПАЦИЕНТИ

Това ретроспективно проучване включва 130 пациентки със спорадичен инвазивен дуктален карцином на млечните жлези в стадий IIIa/б (сT0-3 cN2 cM0 или сT4 cN0-2 cM0). Отрицателната фамилна анамнеза за наследствено заболяване и липса на данни за мутации в *BRCA1/2*, са основни критерии за включване в изследването. Случаите са от архивите на болниците Черинг Крос, Лондон и „УМБАЛ Царица Йоанна“, София. В Английската кохорта, са изследвани общо 168 фиксирани във формалин парафинови блокчета (100 дебелоиглени и 68 ексцизионни биопсии). В Българската кохорта, са изследвани общо 49 фиксирани във формалин парафинови туморни проби (30 дебелоиглени и 19 ексцизионни биопсии) само от пациентки диагностицирани с трийно-негативен карцином на млечната жлеза (ТНКМЖ). Включените пациентки са преминали 4-6 цикъла антрациклин базирана неоадювантна терапия по схема ЕС (Epirubicin – 75 mg/m² I.V., ден 1; Cyclophosphamide – 600 mg/m² I.V., ден 1, през 21 дни) в периода между 2010 и 2020 година, само в споменатите две лечебни заведения. След НАХТ е проведено дефинитивно оперативно лечение с обем, зависим от терапевтичния отговор. Последващото адювантно лечение е адаптирано към специфичната туморна биология и отговора към НАХТ.

Критериите за включване се основават на следните фактори:

- Жена, диагностицирана със спорадичен инвазивен дуктален карцином в стадий IIIa/б в болниците Черинг Крос, Лондон и „УМБАЛ Царица Йоанна“, София.
- Получила 4-6 курса антрациклин базирана НАХТ по схема ЕС като лечение.
- Наличието на достатъчно количество тъкан за допълнителни ИХХ процедури.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изключващи критерии:

- Пациентки с други хистологични варианти КМЖ.
- Пациентки, които не са получили антрациклин базирана НАХТ по схема ЕС.
- Пациентки, при които няма налични тъканни проби преди и/или след НАХТ.
- Пациентки извън стадий IIIa/б или с наличие на метастатично заболяване.
- Пациентки, при които е налице непълна медицинска документация за проведеното лечение и резултатите от него.

Включени са и проби, за които се смята, че ППО не е достигнато и съдържат > 0% остатъчни туморни клетки във всички срезове (т.е. не са урT0/Tis урN0 по AJCC TNM системата на стадиране) (Cserni et al., 2018). Точно 90 (от общо 130) проби отговарят на тези критерии и всички те имат налични туморни биопсии преди лечение. Останалите 40 (от общо 130) проби са класифицирани като ППО. Използваният „шаблон“ за събиране на данни с цел системно провеждане на анализите е показана в **(Таблица 1)**.

3.2 ОБРАБОТКА НА ТУМОРНИТЕ БЛОКЧЕТА

Туморните блокчета се обработват по стандартен протокол. Този процес включва фиксиране на тъканите, последвано от дехидратация, просмукване с парафин и рязане на тънки секции за микроскопско изследване. Осигуряването на равна повърхност на туморните блокчета е критично за последващите хистопатологични и имунохистохимични анализи, които изискват прецизно изрязани и равномерно оцветени секции. Оцветяването с хематоксилин и еозин (H&E) е златният стандарт и се извърши както машинно, така и ръчно по препоръките на производителя на багрилата.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Критерии	Коментар	
Пациент (ID)		
Туморно блокче от дебелоглена биопсия (номер и дата)		
Туморно блокче от ексцизионна биопсия (номер и дата)		
Пол		
Възраст		
Инициален стадий (TNM)		
Режим НАХТ		
Брой цикли НАХТ		
Период на провеждане на системното лечение		
ER статус (преди и след НАХТ)		
PR статус (преди и след НАХТ)		
HER2 статус (преди и след НАХТ)		
CK5 статус (преди и след НАХТ)		
EGFR статус (преди и след НАХТ)		
CD10 статус (преди и след НАХТ)		
p53 статус (преди и след НАХТ)		
Sall4 статус (преди и след НАХТ)		
Туморна диференциация (G)		
Наличие на DCIS компонента		
Наличие на еластоза		
Наличие на некроза		
Лечебно заведение		
Най-добър терапевтичен отговор по RECIST 1.1		
Наличие на ППО (ypT0/Tis ypN0)		

Таблица 1. Пациентска карта с основните критерии за провеждането на анализите в това ретроспективно проучване.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.3 ОБОРУДВАНЕ, РЕАКТИВИ И АНТИТЕЛА

Туморните блокчета се нарязват на срезове с помощта на Microm Rotary Microtome H35 с дебелина 3-5µm. За оцветяване с Н&Е са използват реактиви следвайки стандартен протокол: Harris Hematoxylin (микросистеми Leica), киселинен алкохол (1% HCl в 70% алкохол), абсолютен алкохол (аптечен отдел на NHS Trust), „чешмяна вода“ на Scott (микросистеми Leica), алкохолен разтвор на Eosin Y (Микросистеми Leica), ксилол (Genta medical) и предметни микроскопски стъкла Superfrost (Thermo Scientific). Реактиви и антитела за ИХХ: предварително разредени ER, PR и HER2 миши mAb (Ventana), CD10 миши mAb (микросистеми Leica), CK5 миши mAb (микросистеми Leica), EGFR миши mAb (микросистеми Leica), p53 mAb (Leica), SALL4 миши mAb (Санта-Крус). ИХХ се извърши с помощта на машина Leica BOND III с Leica BOND Dewax Solution (AR9222), Leica BOND Epitope Retrieval Solution 1/2 (AR9961 / AR9640) и Leica BOND Polymer Refine Detection (DS9800), Dako REAL™ Peroxidase Blocking Solution, Super Enhancer (Bio Enhancer) Genex, САЩ), поли-HRP кит (Bio Genex, САЩ).

3.4 ОЦВЕТЯВАНЕ С ХЕМАТОКСИЛИН И ЕОЗИН (Н&Е)

Вградените в парафин блокчета, направени след дебелоиглени или ексцизионни биопсии, бяха срязани (5 µm) с помощта на Microm Rotary Microtome. След което тъканните срезове са поставени на микроскопски предметни стъкла Superfrost. Впоследствие, предметните стъкла са сушени в пещ за ~ 20 минути. Оцветяването Н&Е се извършва с помощта на автоматизатори: автостайнър Leica XL и стъкло покривател CV5000. В тези машини предметните стъкла първо бяха обработени с ксилол, абсолютен алкохол и вода, за да се ‘хидратира’ тъканта. След това същите са оцветени с ядреното багрило хематоксилин. Стъклата се изплакват с вода и киселинен алкохол, за да се отстрани излишъкът. Последва оцветяване на предметните стъкла с еозин, повторно

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

изплакване и дехидратиране, по обратния ред на „хидратацията“ (преминаване обратно през вода, абсолютен алкохол и ксилол), след което така оцветените проби бяха покрити с покривно стъкло с помощта на CV5000. Срезове бяха разгледани под светлинен микроскоп.

3.5 ИМУНОХИСТОХИМИЯ - (ИХХ)

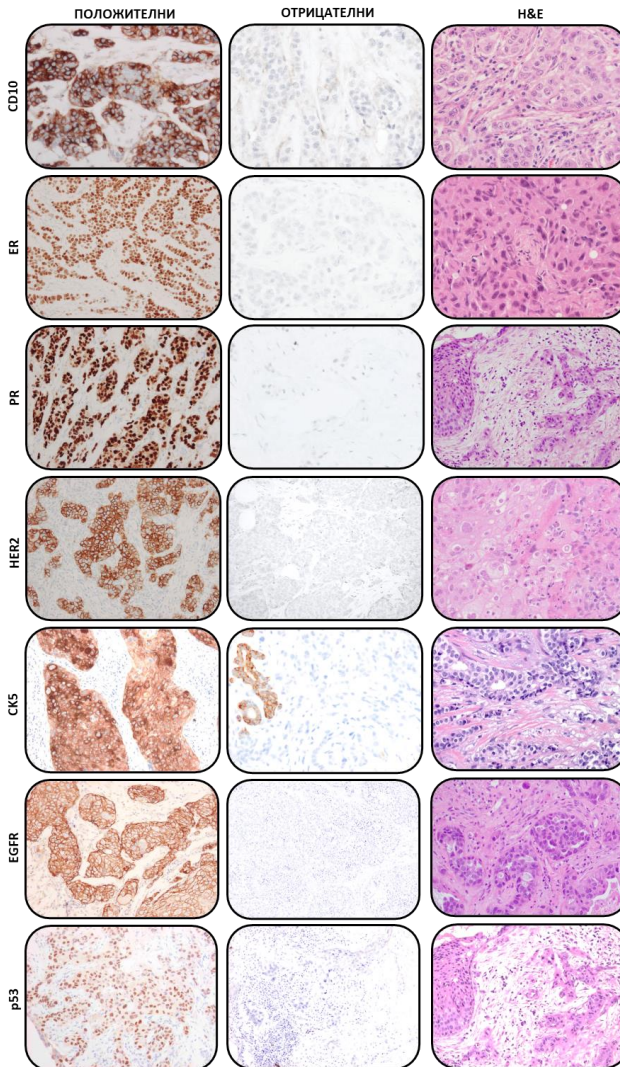
Серийните тъканни срезове (3µm) се изрязват от парафинови блокчета и използват за имунохистохимично оцветяване по препоръките на производителя. Маркери като: p53 (1: 200, Leica), CD10 (1: 100 Leica), CK5 (1: 200 Leica), SALL4 (1: 100, SC), както и китове за: естрогенният рецептор α (Ventana), прогестероновият рецептор (Ventana) и HER2 (Ventana), заедно с подходящите положителни и отрицателни контроли, са оцветени с помощта на имунопероксидазна техника, използвайки автоматичната система Leica BOND™ III следвайки стандартен протокол.

Оцветените стъкла се разглеждат под микроскоп с ярко поле. Имунореактивността се оценява полуколичествено и случаите се считат за положителни ако:

- Повече от 1% от туморните клетки показват положително оцветяване за ER/PR.
- Повече от 10% от туморните клетки показват положително оцветяване за CK5, CD10, EGFR и SALL4; изпълнени са критериите за HER2 свръхекспресия и мутантен тип p53 (Goldhirsch et al., 2001).

Резултатите от ИХХ (**Фигура 1**), получени след оцветяване на пробите, позволяват сравнение и визуализация на ER, PR и HER2. Силно ядрено оцветяване (кафяво оцветяване) се наблюдава в ER и PR пробите, докато силно мембранно оцветяване се наблюдава в пробите на HER2.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ



Фигура 1 Имунохистохимично оцветяване на инвазивен дуктален карцином G3, при увеличение X10-20.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Този резултат е очакван, тъй като хормоналните рецептори са ядрени рецептори, докато HER2 е мембранно закрепена рецепторна тирозин киназа. Подобни находки са наблюдавани за CK5 и EGFR със силно мембранно оцветяване, показващо правилното местоположение на тези протеини. Наблюдава се силно мембранно оцветяване в положителните CD10 проби, докато в положителните случаи на p53 се открива силно ядрено маркиране.

Оцветяването на пробите от Английската кохорта пациентки се извършва в катедрата по обща и клинична патология на болниците Черинг Крос, Лондон. Оцветяването на пробите от Българската кохорта пациентки се извършва в патологийте на „УМБАЛ Царица Йоанна“, София и „МБАЛ Благоевград“ с прилагане на същите комплекти багрила за H&E и антители за IXX.

3.6 ТРАНСКРИПТОМЕН АНАЛИЗ

Уеб-базираната платформа UALCAN, достъпна на <http://ualcan.path.uab.edu>, представлява иновативен инструмент, основан на данни от проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA). Тази платформа не само предоставя достъп до геномни данни, но и предлага изчерпателен анализ на генната експресия, като позволява на изследователите и клиницистите да извършват обширни транскриптомни и протеомни анализи.

3.7 СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Статистически анализ е извършен с използването на софтуерните пакети SPSS 26.0 и GraphPad Prism 6. Асоциациите между променливите (например: възраст, стадий на заболяването, брой на циклите на неoadювантна химиотерапия, туморна диференциация, наличие на DCIS

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

компонента, еластоза и/или некроза в дебелоиглените биопсични проби, имуннохистохимичен профил на ER, PR, HER2, CD10, CK5, EGFR и p53) и постигането на пълно патологично ремисия (ППО) бяха оценени с помощта на Хи-квадрат тест на Пиърсън, а също така бяха изчислени и съотношението на шансовете (OR) със съответните доверителни интервали (CI). Статистическата значимост се определена при стойности $p \leq 0.05$.

Многофакторният анализ чрез логистична регресия включи променливите с „ $p \leq 0.05$ “ от еднофакторните анализи. Логистичната регресионна модел изчисляваше коригирани относителни рискове (aOR), което предоставя по-ясна представа за връзката между всяка променлива и ППО, като се контролират другите променливи. Качеството на прилагания логистичен регресивен модел се оцени чрез теста на Хосмер-Лемешоу. Диагностични инструменти като фактори на раздуване на дисперсията (VIFs) бяха използвани за проверка на мултиколинеарността между прогностичните променливи.

04

ГЛАВА ЧЕТВЪРТА

Резултати

РЕЗУЛТАТИ

4 РЕЗУЛТАТИ

Всичките сто и тридесет пациентки диагностицирани със стадий IIIa (n=63) и IIIb (n=67) са получили 4-6 цикъла на антрациклин базирана неоадювантна химиотерапия, през периода 2010-2020гг. Лечението е дозирано въз основа на Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status ≤ 2 , телесната повърхност, бъбречната функция (CrCl > 10 мл / мин), наличието на и тежестта на чернодробно увреждане (<3x горна граница на AST и/или ALT) и общия коморбиден статус на пациентката, за постигането на оптимални резултати.

Преди започване на лечението са взети дебелоиглени биопсии за диагностика и ИХХ профилиране. Оценихме връзката на ППО с характеристиките на пациентите (възраст, стадий IIIa / IIIb и брой цикли НАХТ), тумора (хистологична диференциация, наличие на DCIS, еластоза и/или некроза в биопсията) и ИХХ експресия на следните биомаркери: ER, PR, HER2, CK5, EGFR, SALL4, CD10 и протеин p53 (Фигура 1).

Общо са изследвани 217 туморни проби включващи:

- **Английска кохорта (n=100):** 100 дебелоиглени (преди НАХТ) и 68 ексцизионни (след НАХТ и при липса на ППО) биопсии от КМЖ.
- **Българска кохорта (n=30):** 49 фиксирани във формалин парафинови туморни проби от ТНКМЖ, включващи 30 дебелоиглени (преди НАХТ) и 19 ексцизионни (след НАХТ и при липса на ППО) биопсии.

В Английската кохорта (n=100) процента диагностицирани в стадий IIIa е 47% (n=47) и 53% в IIIb (n=53). В Българската кохорта (n=30) процента диагностицирани в стадий IIIa е 44% (n=13) и 56% в IIIb (n=17). Липсва значима разлика между двете групи по отношение на разпределянето по стадий на заболяването.

РЕЗУЛТАТИ

Средната възраст на пациентките включени в това ретроспективно проучване е 52г [95% CI 1.960 $s_{\bar{x}}$; 52.02 \pm 2.375 (\pm 4.57%)]. В Английската кохорта, от 100-те пациентки, 50% (n=50) са <52 годишна възраст и 50% (n=50) са \geq 52г. В Българската кохорта, от 30-те пациентки, 46% (n=14) са <52 годишна възраст и 54% (n=16) са \geq 52г. Липсва значима разлика между двете групи по отношение на разпределянето по възраст.

В Английската група от пациентки, 29% (n=29/100) са постигнали ППО. В Българската група пациентки (n=30) процентът постигнали ППО е 36% (n=11). Липсва значима разлика между двете групи по отношение на честотата на ППО.

В Английската група от пациентки, 59% (n=59/100) са провели <6 Антрациклин базирана НАХТ и 41% (n=41) са подложили на точно 6 цикъла лечение. В Българската група пациентки 40% (n=12/30) са провели <6 курса, а 60% (n=18) са подложили на точно 6 цикъла лечение. Налична значима разлика между двете групи по отношение на брой цикли НАХТ.

4.1 РЕЗУЛТАТИ ОТ ВСИЧКИ ТУМОРНИ ПОДГРУПИ

4.1.1 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА КЛИНИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ

Резултатите са представени в **Таблица 2**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър и кохорта.

РЕЗУЛТАТИ

Таблица 2 - Еднофакторен анализ на клиничните параметри

Параметър	Липса на ППО	ППО	OR [95% CI]	P
Клиничен стадий (n=130):				
Стадий IIIa; cT0-3 cN2 cM0 (n=60)	44 (73%)	16 (27%)	0.6970 [0.3274 - 1.4838]	= 0.3491
Стадий IIIб; cT4 cN0-2 cM0 (n=70)	46 (66%)	24 (34%)		
Възраст (n=130):				
≥52 (n=66)	47 (71%)	19 (29%)	0.8246 [0.3790 - 1.7938]	= 0.6266
<52 (n=64)	48 (75%)	16 (25%)		
Брой цикли НАХТ (n=130):				
<6 цикъла (n=71)	54 (76%)	17 (24%)		
6 цикъла (n=59)	36 (61%)	23 (39%)	0.4928 [0.2315 - 1.0490]	= 0.0664
Брой пациенти	90 (70%)	40 (30%)	-	-

4.1.1.1 КЛИНИЧЕН СТАДИЙ

В Английската група от пациентки, 29% (29/100) са постигнали ППО, подкрепяйки съобщените по-рано констатации в съществуващата научна литература. От 29-те пациентки постигнали ППО в тази кохорта, 42% (n=12) са стадирани като IIIa и 58% (n=17) са стадирани като IIIб. От пациентките стадирани като IIIa (n=47), 25% (n=12) са постигнали ППО. От пациентките стадирани като IIIб (n=53), 32% (n=17) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима

РЕЗУЛТАТИ

разлика за по-често постигане на ППО в полза на пациентки в стадий IIIб в тази група [OR 0.7261 (95% CI 0.3032 - 1.7387); $p = 0.4724$].

В Българската група пациентки ($n=30$) процентът постигнали ППО е 36% ($n=11$). От пациентките стадириани като IIIа ($n=13$), 30% ($n=4$) са постигнали ППО. От пациентките стадириани като IIIб ($n=17$), 41% ($n=7$) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки в стадий IIIб в тази група [OR 0.6349 (95% CI 0.1384 - 2.9124); $p = 0.5589$].

При събиране на всички пациенти ($n=130$), процента постигнали ППО е 31% ($n=40$). От пациентките стадириани като IIIа ($n=60$), 27% ($n=16$) са постигнали ППО. От пациентките стадириани като IIIб ($n=70$), 34% ($n=24$) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки в стадий IIIб спрямо тези в IIIа [OR 0.6970 (95% CI 0.3274 - 1.4838); $p = 0.3491$].

4.1.1.2 ВЪЗРАСТ

Средната възраст на пациентките включени в това ретроспективно проучване е 52г. В Английската кохорта, от 29-те пациентки постигнали ППО, 52% ($n=15$) са <52 годишна възраст и 48% ($n=14$) са ≥ 52 г. От пациентките определени като <52 годишна възраст ($n=50$), 30% ($n=15$) са постигнали ППО. От пациентките определени като ≥ 52 г годишна възраст ($n=50$), 28% ($n=14$) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки в по-младата възраст [OR 1.1020 (95% CI 0.4644 - 2.6155); $p = 0.8256$].

РЕЗУЛТАТИ

В Българската кохорта, от 11-те пациентки постигнали ППО, 54% (n=6) са <52 годишна възраст и 46% (n=5) са ≥52г. От пациентките определени като <52 годишна възраст (n=14), 42% (n=6) са постигнали ППО. От пациентките определени като ≥52г годишна възраст (n=16), 31% (n=5) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки в по-младата възраст в тази кохорта [OR 1.6500 (95%CI 0.3696 - 7.3653); p = 0.5118].

При събиране на двете кохорти (n=130), процента постигнали ППО е 31% (n=40). От пациентките определени като <52 годишна възраст (n=64), 25% (n=16) са постигнали ППО. От пациентките определени като ≥52г годишна възраст (n=66), 29% (n=19) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки в по-младата възраст в общата популация [OR 0.8246 (95%CI 0.3790 - 1.7938); p = 0.6266].

4.1.1.3 БРОЙ ЦИКЛИ НАХТ

Пациентките включени в проучването (n=130) са провели <6 (n=72) или точно 6 (n=58) цикъла НАХТ по схема ЕС през 21 дни. От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 45% (n=13) са провели <6 курса и 55% (n=16) се подложиха на точно шест цикъла на лечение. От пациентките провели <6 курса (n=59), 22% (n=13) са постигнали ППО. От пациентките подложили се на точно 6 цикъла НАХТ (n=41), 39% (n=16) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентките провели точно шест курса НАХТ в тази кохорта [OR 0.7786 (95%CI 0.3374 - 1.7967); p = 0.5576].

РЕЗУЛТАТИ

От 11-те пациентки постигнали ППО в Българската кохорта (n=30), 36% (n=4) са провели <6 курса и 63% (n=7) се подложиха на точно шест цикъла лечение. От пациентките провели <6 курса (n=12), 33% (n=4) са постигнали ППО. От пациентките подложили се на точно 6 цикъла НАХТ (n=18), 38% (n=7) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентките провели точно шест курса НАХТ в тази кохорта [OR 0.7857 (95% CI 0.1703 - 3.6259); p = 0.7573].

При събиране на двете кохорти (n=130), процентът постигнали ППО е 31% (n=40). От пациентките провели <6 курса (n=71), 24% (n=17) са постигнали ППО. От пациентките подложили се на точно 6 цикъла НАХТ (n=59), 39% (n=23) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО в полза на пациентките провели точно шест курса НАХТ в общата популация [OR 0.4928 (95% CI 0.2315 - 1.0490); p = 0.0664]. Р-стойността в общия анализ е близка до критичната стойност ($p \leq 0.05$). Това означава, че при друг обем на извадката, резултатът може да се промени.

4.1.2 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ХИСТОПАТОЛОГИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ

Резултатите са представени в **Таблица 3**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър и кохорта.

РЕЗУЛТАТИ

Таблица 3 - Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри

Параметър	Липса на ППО	ППО	OR [95% CI]	P
DCIS (n=130):				
Да (n=42)	21 (50%)	21 (50%)	0.5307 [0.2194 - 1.2837]	= 0.0011
Не (n=88)	69 (79%)	19 (21%)		
Диференциация (n=130):				
G3 (n=69)	42 (61%)	27 (39%)	0.4634 [0.2150 - 0.9988]	= 0.0496
<G3 (n=61)	47 (77%)	14 (23%)		
Еластоза (n=130):				
Да (n=4)	4 (76%)	0 (24%)	4.2139 [0.2215 - 80.1511]	= 0.3385
Не (n=126)	86 (61%)	40 (39%)		
Некроза (n=130):				
Да (n=46)	31 (68%)	15 (32%)	0.6041 [0.2712 - 1.3456]	= 0.2174
Не (n=84)	65 (78%)	19 (22%)		
Брой пациенти	90 (70%)	40 (30%)	-	-

4.1.2.1 КОМПОНЕНТА НА ДУКТАЛЕН КАРЦИНОМ *IN SITU* В МАТЕРИАЛА ОТ ДЕБЕЛОИГЛЕНАТА БИОПСИЯ

Патоморфологичните фактори оценени в това проучване са: наличие на компонента на дуктален карцином *in situ* (DCIS), еластоза или некроза в туморната биопсия, както и туморната диференциация (G3 или < G3).

В Английската кохорта (n=100), 30% (n=30) са с наличие на DCIS компонента в туморната биопсия и при 70% (n=70) не е открит този параметър. От пациентките с наличие на DCIS (n=30), 50% (n=15) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър (n=70), 39% (n=14) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична

РЕЗУЛТАТИ

статистически значима разлика за по-често постигане на ППО в полза на пациентките с DCIS, в хистологичния препарат от дебелоиглената биопсия, в тази кохорта [OR 0.2500 (95%CI 0.0992 - 0.6303); $p = 0.0033$].

От 11-те пациентки постигнаха ППО в Българската кохорта ($n=30$), 40% ($n=12$) са с наличие на DCIS в туморната биопсия, а при 60% ($n=18$) не е открит този параметър. От пациентките с наличие на DCIS ($n=12$), 50% ($n=6$) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този параметър ($n=18$), 27% ($n=5$) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО в полза на пациентките с DCIS, в хистологичния препарат от дебелоиглената биопсия, в тази кохорта [OR 0.3846 (95%CI 0.0832 - 1.7782); $p = 0.2213$]. Този резултат, вероятно се дължи на малкият брой пациентки в Българската група.

При събиране на двете кохорти ($n=130$), процентът постигнаха ППО е 31% ($n=40$). От пациентките с наличие на DCIS ($n=42$), 50% ($n=21$) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този параметър ($n=88$), 21% ($n=19$) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО в полза на пациентките с DCIS, в хистологичния препарат от дебелоиглената биопсия, в общата популация [OR 0.2676 (95%CI 0.1216 - 0.5889); $p = 0.0011$].

4.1.2.2 ТУМОРНА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ

В Английската кохорта, от 29-те пациентки постигнаха ППО, 69% ($n=20$) са с G3 заболяване и 21% ($n=9$) са с $< G3$ (т.е. G1-2). От пациентките определени като G3 ($n=51$), 39% ($n=20$) са постигнаха ППО. От пациентките определени като $< G3$ ($n=49$), 18% ($n=9$) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ниско диференцирани тумори [OR 0.3488 (95%CI 0.1396 to 0.8715); $p = 0.0242$].

РЕЗУЛТАТИ

От 11-те пациентки постигнаха ППО в Българската кохорта (n=30), 60% (n=18) са определени с G3 заболяване и 40% (n=12) с < G3. От пациентките определени като G3 (n=18), 38% (n=7) са постигнаха ППО. От пациентките определени като < G3 (n=12), 42% (n=5) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ниско диференцирани тумори [OR 1.1224 (95%CI 0.2534 - 4.9722); p = 0.8791]. Този резултат, вероятно се дължи на малкият брой пациентки в Българската група.

При събиране на двете кохорти (n=130), процентът постигнаха ППО е 31% (n=40). От пациентките определени като G3 (n=69), 39% (n=27) са постигнаха ППО. От пациентките определени като < G3 (n=61), 23% (n=14) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ниско диференцирани тумори в общата популация [OR 0.4634 (95%CI 0.2150 - 0.9988); p = 0.0496].

4.1.2.3 ТУМОРНА ЕЛАСТОЗА

От 29-те пациентки постигнаха ППО в Английската кохорта (n=100), 0% (n=0) са с наличие на еластоза (наличие на изобилие на съединителнотъканны еластични влакна) в туморната проба, т.е. при 100% (n=29) от случаите не е открит този параметър. От пациентките с наличие на еластоза (n=3), 0% (n=0) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този параметър (n=97), 30% (n=29) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистическа значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на еластоза в тази кохорта [OR 3.0146 (95%CI 0.1509 - 60.2185); p = 0.4701].

От 11-те пациентки постигнаха ППО в Българската кохорта (n=30), 0% (n=0) са с наличие на еластоза в туморната проба, т.е. при 100% (n=11) от случаите не е открит този параметър. От пациентките с наличие на

РЕЗУЛТАТИ

еластоза (n=1), 0% (n=0) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър (n=29), 38% (n=11) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на еластоза в тази кохорта [OR 1.8649 (95% CI 0.0699 - 49.7688); p = 0.7100].

При събиране на двете кохорти (n=130), процентът постигнали ППО е 31% (n=40). От пациентките с наличие на еластоза (n=4), 0% (n=0) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър (n=126), 32% (n=40) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на еластоза в пробата от дебелоиглената биопсия [OR 4.2139 (95% CI 0.2215 - 80.1511) p = 0.3385].

4.1.2.4 ТУМОРНА НЕКРОЗА

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 38% (n=11) са с наличие на туморна некроза в хистологичната проба, а при 62% (n=18) не е открит този параметър. От пациентките с наличие на некроза (n=37), 30% (n=11) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър (n=63), 29% (n=18) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на туморна некроза в тази кохорта [OR 0.9455 (95% CI 0.3875 - 2.3071); p = 0.9019].

От 11-те пациентки постигнали ППО в Българската кохорта (n=30), 36% (n=4) са с наличие на туморна некроза в хистологичната проба, а при 64% (n=7) не е открит този параметър. От пациентките с наличие на некроза (n=9), 44% (n=4) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър (n=21), 33% (n=7) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на некроза в тази кохорта [OR 0.6250 (95% CI 0.1265 - 3.0878); p = 0.5642].

РЕЗУЛТАТИ

При събиране на двете кохорти (n=130), процентът постигнали ППО е 31% (n=40). От пациентките с наличие на туморна некроза (n=46), 32% (n=15) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър (n=84), 22% (n=19) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на некроза в общата популация [OR 0.6041 (95%CI 0.2712 - 1.3456) p = 0.2174].

4.1.3 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ИМУНОХИСТОХИМИЧНИТЕ БИОМАРКЕРИ

ИХХ експресията на следните биомаркери се оцени, от дебелоиглените биопсии, в общата туморна популация: ER, PR, HER2, CK5, EGFR, SALL4, CD10 и протеин p53 (**Таблица 4**). Следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър и кохорта.

4.1.3.1 ЕСТРОГЕН РЕЦЕПТОР (ER)

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 24% (n=7) са с наличие на положителен ER, а при 76% (n=22) не е открит този параметър. От пробите експресиращи ER (n=57), 12% (n=7) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=43), 51% (n=22) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при пациентки с наличие ER експресия в тази кохорта [OR 7.4830 (95%CI 2.7762 - 20.1699); p = 0.0001]. Българската кохорта съдържа само проби от ТНКМЖ и тя не е включена в този анализ, поради риск от статистическо отклонение.

РЕЗУЛТАТИ

Таблица 4 - Еднофакторен анализ на имунохистохимичните параметри

Параметър	Липса на ППО	ППО	OR [95% CI]	P
ER (n=100):				
Да (n=57)	50 (78%)	7 (12%)	7.4830 [2.7762 - 20.1699]	= 0.0001
Не (n=43)	22 (49%)	21 (51%)		
PR (n=100):				
Да (n=55)	49 (89%)	6 (11%)	8.5379 [3.0490 - 23.9083]	< 0.0001
Не (n=45)	22 (49%)	23 (51%)		
HER2 (n=100):				
Да (n=38)	23 (61%)	15 (39%)	0.4472 [0.1852 - 1.0801]	= 0.0737
Не (n=62)	48 (78%)	14 (22%)		
Биологичен подтип (n=100):				
ТНКМЖ (n=24)	12 (50%)	12 (50%)	0.3469 [0.1313 - 0.9170]	= 0.0328
Не-ТНКМЖ (n=66)	49 (78%)	17 (22%)		
Брой пациенти	71 (71%)	29 (29%)	-	-
SALL4 (n=100):				
Да (n=23)	18 (78%)	5 (22%)	1.6302 [0.5416 - 4.9069]	= 0.3847
Не (n=77)	53 (69%)	24 (31%)		
EGFR (n=130):				
Да (n=36)	25 (70%)	11 (30%)	1.0140 [0.4407 - 2.3332]	= 0.9739
Не (n=94)	65 (69%)	29 (31%)		
CK5 (n=130):				
Да (n=35)	21 (60%)	14 (40%)	0.5652 [0.2507 - 1.2742]	= 0.1689
Не (n=95)	69 (73%)	26 (27%)		
CD10 (n=130):				
Да (n=32)	12 (38%)	20 (62%)	0.1799 [0.0709 - 0.4567]	= 0.0003
Не (n=98)	81 (83%)	17 (17%)		
p53 (n=130):				
Да (n=31)	16 (52%)	15 (48%)	0.2700 [0.1145 - 0.6372]	= 0.0028
Не (n=99)	79 (80%)	20 (20%)		
Брой пациенти	90 (70%)	40 (30%)	-	-

РЕЗУЛТАТИ

4.1.3.2 ПРОГЕСТЕРОН РЕЦЕПТОР (PR)

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 20% (n=6) са с наличие на положителен PR, а при 80% (n=23) не е открит този параметър. От пробите експресиращи PR (n=55), 11% (n=6) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=45), 51% (n=23) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при пациентки с наличие PR експресия в тази кохорта [OR 8.5379 (95%CI 3.0490 - 23.9083); $p < 0.0001$].

Българската кохорта съдържа само проби от ТНКМЖ и тя не е включена в този анализ, поради риск от статистическо отклонение.

4.1.3.3 РЕЦЕПТОР 2 НА ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМАЛЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР (HER2)

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 52% (n=15) са с наличие на положителен HER2, а при 48% (n=14) не е открит този параметър. От пробите експресиращи HER2 (n=38), 39% (n=15) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=62), 22% (n=14) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие HER2 експресия в тази кохорта [OR 0.4472 (95%CI 0.1852 - 1.0801); $p = 0.0737$].

Българската кохорта съдържа само проби от ТНКМЖ и тя не е включена в този анализ, поради риск от статистическо отклонение.

4.1.3.4 ТРОЙНО-НЕГАТИВЕН КМЖ (ТНКМЖ) СРЕЩУ НЕ-ТНКМЖ

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 41% (n=12) са класифицирани като ТНКМЖ, 31% (n=9) са класифицирани като Луминални и 28% (n=8) като HER2 обогатени. От туморите категоризирани като ТНКМЖ (n=24), 50% (n=12) са постигнали ППО. От пробите определени като не-ТНКМЖ (n=76), 22% (n=17) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки определени като ТНКМЖ [OR 0.3469 (95% CI 0.1313 - 0.9170); p = 0.0328].

4.1.3.5 СПАЛТОПОДОБЕН ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР 4 (SALL4)

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 17% (n=5) са с наличие на положителен SALL4, а при 83% (n=24) не е открит този параметър. От пробите експресиращи SALL4 (n=23), 22% (n=5) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=77), 31% (n=24) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие SALL4 експресия в тази кохорта [OR 1.6302 (95% CI 0.5416 - 4.9069); p = 0.3847].

Тъй като резултатите са статистически незначими в Английската кохорта и поради материални причини, Българската група пациентки не се изследва за връзката между този биомаркер и честотата на ППО.

РЕЗУЛТАТИ

4.1.3.6 РЕЦЕПТОР НА ЕПИДЕРМАЛЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР (EGFR)

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 27% (n=8) са с наличие на положителен EGFR (свръхекспресия), а при 72% (n=21) не е открит този параметър. От пробите експресиращи EGFR (n=28), 28% (n=8) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=72), 29% (n=21) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие EGFR експресия в тази кохорта [OR 1.0294 (95% CI 0.3923 - 2.7010); p = 0.9530].

От 11-те пациентки постигнали ППО в Българската кохорта (n=30), 27% (n=3) са с наличие на положителен EGFR, а при 73% (n=8) не е открит този параметър. От пробите експресиращи EGFR (n=8), 37% (n=3) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=22), 36% (n=8) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие EGFR експресия в тази кохорта [OR 0.9524 (95% CI 0.1785 - 5.0813); p = 0.9545].

При събиране на двете кохорти (n=130), процентът постигнали ППО е 31% (n=40). От пробите експресиращи EGFR (n=36), 30% (n=11) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=94), 31% (n=29) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие EGFR експресия в общата популация [OR 1.0140 (95% CI 0.4407 - 2.3332); p = 0.9739].

4.1.3.7 ЦИТОКЕРАТИН 5 (СК5)

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 31% (n=9) са с наличие на СК5, а при 69% (n=20) не е открит този

РЕЗУЛТАТИ

параметър. От пробите експресиращи СК5 (n=24), 37% (n=9) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=76), 26% (n=20) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие СК5 експресия в тази кохорта [OR 0.5952 (95%CI 0.2253 - 1.5724); p = 0.2952].

От 11-те пациентки постигнали ППО в Българската кохорта (n=30), 45% (n=5) са с положителен СК5, а при 55% (n=6) не е открит този параметър. От пробите експресиращи СК5 (n=11), 45% (n=5) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=19), 31% (n=6) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие СК5 експресия в тази кохорта [OR 0.5538 (95%CI 0.1198 - 2.5607); p = 0.4494].

При събиране на двете кохорти (n=130), процентът постигнали ППО е 31% (n=40). От пробите експресиращи СК5 (n=35), 40% (n=14) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=95), 27% (n=26) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие СК5 експресия в общата кохорта [OR 0.5652 (95%CI 0.2507 - 1.2742); p = 0.1689].

4.1.3.8 КЛЪСТЕР НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ 10 (CD10)

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 55% (n=16) са с положителен CD10, а при 45% (n=13) не е открит този параметър. От пробите експресиращи CD10 (n=20), 80% (n=16) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=80), 16% (n=13) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с положителна експресия на CD10 в тази кохорта [OR 0.0485 (95%CI 0.0139 - 0.1687); p < 0.0001].

РЕЗУЛТАТИ

От 11-те пациентки постигнаха ППО в Българската кохорта (n=30), 63% (n=7) са с положителен CD10, а при 37% (n=4) не е открит този параметър. От пробите експресиращи CD10 (n=12), 58% (n=7) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=18), 22% (n=4) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика, но се формира тенденция, за по-често постигане на ППО при пациентки с положителна експресия на CD10 в тази кохорта [OR 0.2041 (95%CI 0.0413 - 1.0083); p = 0.0512]. Р-стойността в този анализ е близка до критичната стойност (p ≤ 0.05). Това означава, че при друг обем на извадката, резултатът може да се промени.

При събиране на двете кохорти (n=130), процентът постигнаха ППО е 31% (n=40). От пробите експресиращи CD10 (n=32), 62% (n=20) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=98), 17% (n=17) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с положителна експресия на CD10 в общата популация [OR 0.1799 (95%CI 0.0709 - 0.4567); p = 0.0003].

4.1.3.9 ПРОТЕИН 53 (P53)

От 29-те пациентки постигнаха ППО в Английската кохорта (n=100), 38% (n=11) са с положителен p53 (мутирал), а при 62% (n=18) не е открит този параметър. От пробите експресиращи p53 (n=24), 45% (n=11) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=76), 17% (n=13) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с положителна експресия на p53 в тази кохорта [OR 0.2439 (95% 0.0897 - 0.6633); p = 0.0057].

От 11-те пациентки постигнаха ППО в Българската кохорта (n=30), 36% (n=4) са с положителен p53, а при 64% (n=7) не е открит този параметър. От пробите експресиращи p53 (n=7), 57% (n=4) са постигнаха ППО. От

РЕЗУЛТАТИ

пробите с липса на този биомаркер ($n=23$), 30% ($n=7$) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с положителна експресия на p53 в тази кохорта [OR 0.3281 (95% 0.0576 - 1.8706); $p = 0.2096$]. Този резултат, вероятно се дължи на малкият брой пациентки в Българската група.

При събиране на двете кохорти ($n=130$), процентът постигнали ППО е 31% ($n=40$). От пробите експресиращи p53 ($n=31$), 48% ($n=15$) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер ($n=99$), 20% ($n=20$) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с положителна експресия на p53 в общата популация [OR 0.2700 (95% 0.1145 - 0.6372); $p = 0.0028$].

4.1.4 МНОГОФАКТОРЕН ЛОГИСТИЧЕН РЕГРЕСИВЕН АНАЛИЗ

Само биомаркерите, които са значими при еднофакторния статистически анализ, се включват в многофакторния анализ за идентифициране на възможни връзки между параметрите. Многофакторният анализ потвърждава, че експресията на ER [OR 9.95 (95% CI 1.24-79.93); $p = 0.031$] е предсказващ белег за липса на ППО и доминира в регресионния логистичен анализ. Резултатите показват, че ER е свързан с експресията на PR [OR 7.12 (95% CI 1.55-67.25); $p = 0.043$]. Анализът също демонстрира асоциация между наличието на CD10 [OR 0.04 (95% CI 0.01-0.28); $p = 0.001$] и p53 [OR 0.57 (95% CI 0.22-0.92); $p = 0.049$] с ППО при HR-положителни тумори (**Таблица 5**).

Многофакторният регресионен анализ не показва статистически значима разлика за връзка между другите параметри и липсата на DCIS компонент в дебелоигления биопсичен материал с по-ниска честота на ППО [OR 3.89 (95%CI 0.97-15.56); $p=0.054$]. P-стойността в анализа е близка до

РЕЗУЛТАТИ

критичната стойност ($p \leq 0.05$), което означава, че при по-голям обем на извадката, резултатът може да се промени.

Таблица 5 - Многофакторен логистичен регресивен анализ на факторите свързани с ППО

Параметър	Coefficient B	SE	Z	P	OR	95% CI
DCIS-отр (компонента)	1.36	0.71	1.92	0.054	3.89	0.97- 15.56
ER-пол	2.3	1.06	2.16	0.031	9.95	1.24- 79.93
PR-пол	2.1	1.11	2.32	0.043	7.12	1.55- 67.25
CD10-пол	3.28	1.02	3.23	0.001	0.04	0.01- 0.28
p53-пол	3.14	0.75	2.11	0.049	0.57	0.22- 0.92
Общ брой пациенти = 130						

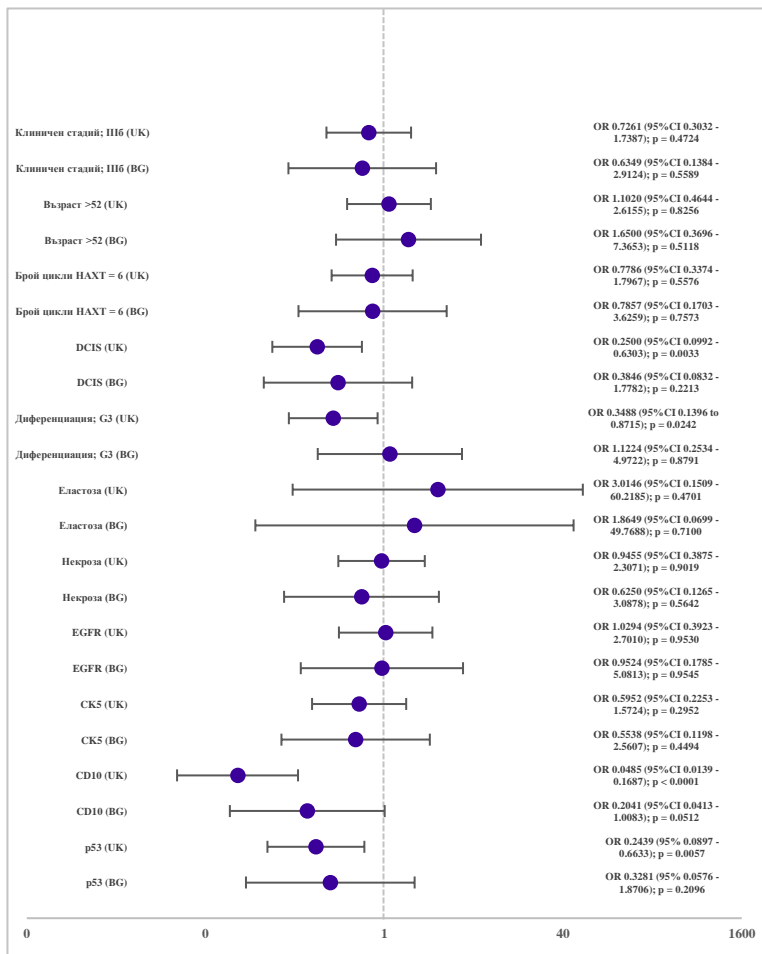
4.1.5 СХОДСТВА И РАЗЛИКИ МЕЖДУ АНГЛИЙСКАТА И БЪЛГАРСКАТА КОХОРТИ ПРИ ВСИЧКИ МОЛЕКУЛЯРНИ ПОДТИПОВЕ КМЖ

Българската (n=30: 30 ТНКМЖ) и Английската (n=100: 24 ТНКМЖ, 60 луминални, 16 HER2-обогатени) подгрупи демонстрират повече сходства, отколкото разлики в 3 от 11 параметъра (**Фигура 2**). Разминавания се наблюдават само при следните параметри:

- Връзката между наличието на DCIS компонента в пробата от дебелоиглената биопсия и ППО не е установена в Българската кохорта [OR 0.3846 (95%CI 0.0832 - 1.7782); p = 0.2213].
- Асоциация между ниско диференцирани тумори (G3) и ППО не е установена в Българската кохорта [OR 1.1224 (95%CI 0.2534 - 4.9722); p = 0.8791].
- Връзката между наличието на мутирания p53 и честотата на ППО не е статистически значима в Българската кохорта [OR 0.3281 (95%CI 0.0576 - 1.8706); p = 0.2096].

Тези разминавания вероятно се дължат на малкия брой пациентки в Българската група съдържаща само пациентки с ТНКМЖ. Експресията на CD10 също не е статистически значима в Българската кохорта [OR 0.2041 (95%CI 0.0413 - 1.0083); p = 0.0512]. Р-стойността в този анализ е близка до критичната стойност ($p \leq 0.05$), което означава, че при друг обем на извадката, резултатът може да се промени.

РЕЗУЛТАТИ



ПНО

Липса на ПНО

Фигура 2 Блобограма на сходствата и разликите между двете кохорти.

4.1.6 КОНКОРДАНТНОСТ И ДИСКОРДАНТНОСТ НА БИОМАРКЕРИТЕ

Конкордантността на биомаркерите се отнася до съответствието на техните експресии в различни типове проби и времеви точки, докато дискордантността описва несъответствието между тях. В нашето изследване, след анализ на ексцизионните биопсии от тумори, които не са постигнали ППО (n=87), и сравнение с резултатите от дебелоиглените проби от същите пациентки, не се наблюдава значима промяна в експресията на биомаркерите след НАХТ (**Фигура 3**).

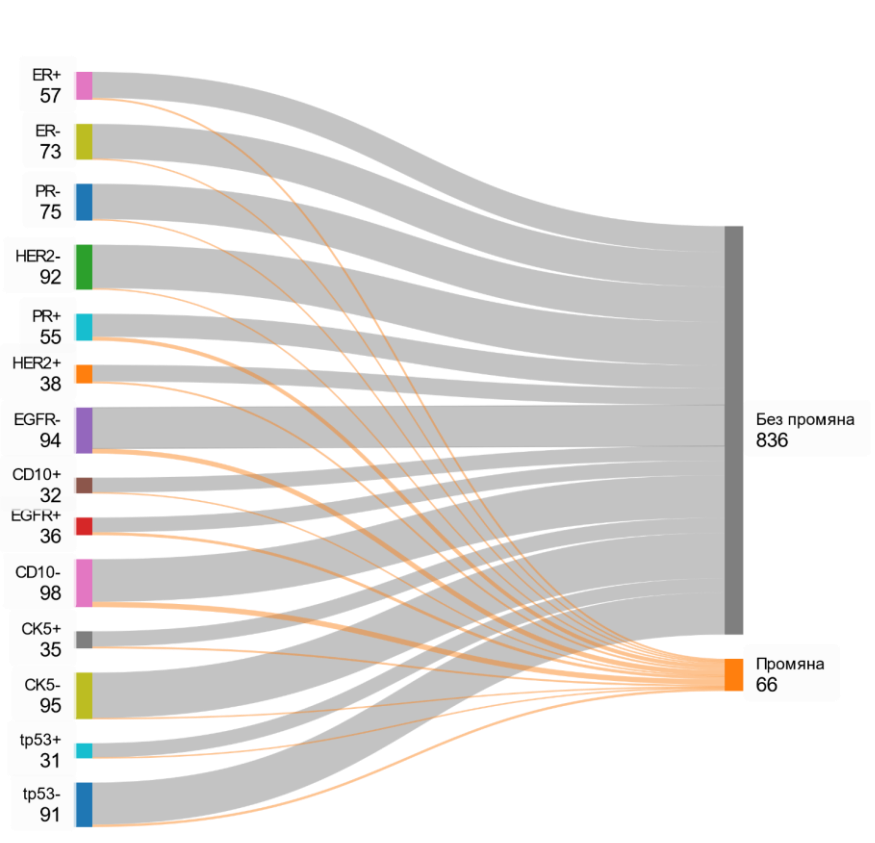
Тази липса на съществена промяна в експресията на биомаркерите (~8% общо за всички; n=66/836) след терапевтична интервенция подчертава тяхната стабилност във времето, въпреки антрациклин базираното лечение.

4.2 РЕЗУЛТАТИ В HR-ОТРИЦАТЕЛНАТА ПОДГРУПА

6.2.1 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ЧЕСТОТА НА ППО ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

Данните от еднофакторните анализи, на всички туморни подгрупи и от многофакторния такъв демонстрираха много силна статистически значима тенденция за липса на ППО при пациенти с ER-положителни тумори ER [OR 9.95 (95% CI 1.24-79.93); p = 0.031] и силна асоциация с PR [OR 7.12 (95% CI 1.55-67.25); p = 0.043]. Същият анализ показва, че съществува връзка между наличието на CD10 [OR 0.04 (95% CI 0.01-0.28); p = 0.001] и p53 [OR 0.57 (95% CI 0.22-0.92); p = 0.049] с ППО при хормонален рецептор (HR)-положителни тумори.

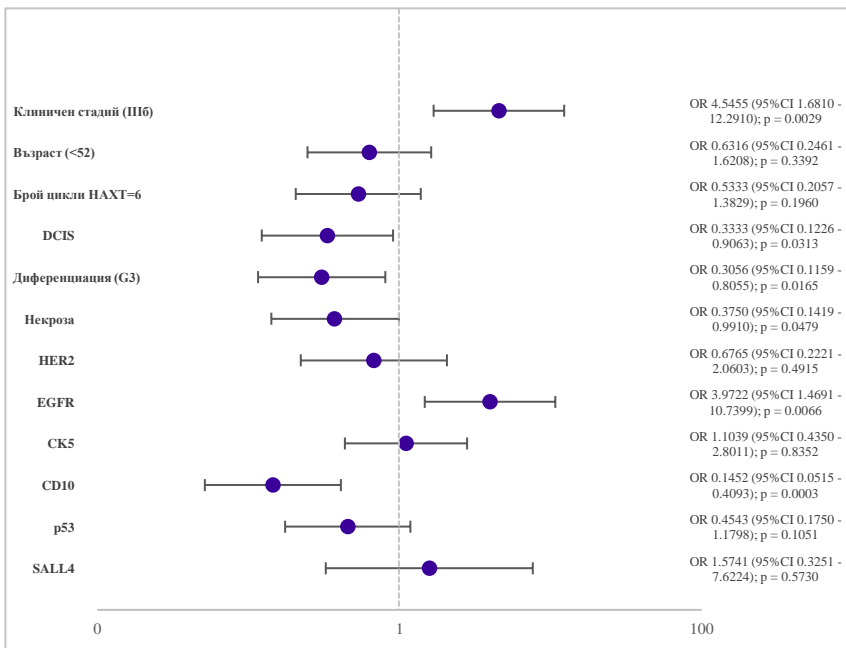
РЕЗУЛТАТИ



Фигура 3 Санки диаграма на промяната в експресията на избраните биомаркери.

РЕЗУЛТАТИ

В този отдел се разглеждат всички HR-отрицателни проби и тяхната асоциация с честотата на отговора към НАХТ (**Фигура 4**). Тъй като Българската кохорта съдържа само проби от пациентки с ТНКМЖ, тя бе включена в този анализ.



ППО

Липса на ППО

Фигура 4 Блогограма на резултатите за HR-отрицателната кохорта.

РЕЗУЛТАТИ

4.2.2 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА КЛИНИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

Резултатите са представени в **Таблица 6**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

Таблица 6 - Еднофакторен анализ на клиничните параметри при HR-отрицателни пациентки

Параметър	Липса на ППО	ППО	OR [95% CI]	P
Клиничен стадий (n=73):				
Стадий IIIa; cT0-3 cN2 cM0 (n=32)	12 (38%)	20 (62%)	4.5455 [1.6810 - 12.2910]	= 0.0029
Стадий IIIb; cT4 cN0-2 cM0 (n=41)	30 (73%)	11 (27%)		
Възраст (n=73):				
≥52 (n=33)	21 (64%)	12 (36%)	0.6316 [0.2461 - 1.6208]	= 0.3392
<52 (n=40)	21 (53%)	19 (47%)		
Брой цикли НАХТ (n=73):				
<6 цикъла (n=44)	28 (62%)	16 (38%)	0.5333 [0.2057 - 1.3829]	= 0.1960
6 цикъла (n=29)	14 (41%)	15 (59%)		
Брой пациенти	42 (58%)	31 (42%)	-	-

4.2.2.1 КЛИНИЧЕН СТАДИЙ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

В групата на HR-отрицателни пациентки в Английската кохорта, 46% (20/43) са постигнали ППО. От 20-те пациентки постигнали ППО в тази кохорта, 65% (n=13) са стадириани като IIIa и 35% (n=7) са стадириани като IIIb. От пациентките стадириани като IIIa (n=19), 68% (n=13) са постигнали ППО. От пациентките стадириани като IIIb (n=24), 29% (n=7) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при пациентки в стадий IIIb в тази кохорта [OR 5.2619 (95% CI 1.4228 - 19.4602); p = 0.0128].

При събиране на двете кохорти (n=73), 42% (n=31) от случаите се характеризират с ППО. От тези постигнали ППО, 65% (n=20) се определят като стадий IIIa, докато останалите 35% (n=11) са класифицирани като стадий IIIb. В групата на стадий IIIa (n=32), 62% (n=20) от пациентките са постигнали ППО, докато в групата на стадий IIIb (n=41) само 27% (n=11) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при пациентки в стадий IIIb [OR 4.5455 (95% CI 1.6810 - 12.2910); p = 0.0029]. Резултатът се интерпретира по следния начин - пациенти стадириани като IIIa (т.е. cT0-3 cN2 cM0) постигат ППО по-често в случай, че са определени с HR-отрицателно заболяване.

4.2.2.2 ВЪЗРАСТ И ППО ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

Средната възраст в HR-отрицателната кохорта също е изчислена като 52г. В Английската група от пациентки, 46% (20/43) са постигнали ППО. От 20-те пациентки постигнали ППО, 60% (n=12) са <52 годишна възраст и 40% (n=8) са ≥52г. От пациентките определени като <52 годишна възраст (n=24), 48% (n=12) са постигнали ППО. От пациентките определени като ≥52г годишна възраст (n=19), 44% (n=8) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима

РЕЗУЛТАТИ

разлика за по-често постигане на ППО при пациентки в по-младата възраст [OR 0.8667 (95%CI 0.2567 - 2.9255); p = 0.8177].

При събиране на двете кохорти (n=73), 42% (n=31) от случаите се характеризират с ППО. От 31 пациентки с ППО, 61% (n=19) са определени като <52 годишна възраст, докато 39% (n=12) са били на 52 или повече години. В групата пациентки под 52 години (n=40), 47% (n=19) са постигнали ППО. Сред пациентките на възраст 52 и повече години (n=33), 36% (n=12) са постигнали ППО. Едновариантният анализ не разкрива статистически значима разлика, показваща по-висока вероятност за ППО при по-младите пациентки [OR 0.6316 (95% CI 0.2461 – 1.6208); p = 0.3392].

4.2.2.3 БРОЙ ЦИКЛИ НАХТ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

HR-отрицателните Английски пациентки включени в проучването (n=43) са провели <6 (n=26) или точно 6 (n=17) цикъла НАХТ по схема ЕС през 21 дни. От 20-те пациентки постигнали ППО в тази кохорта, 50% (n=10) са провели <6 курса и 50% (n=10) се подложиха на точно шест цикъла лечение. От пациентките провели <6 курса (n=26), 38% (n=10) са постигнали ППО. От пациентките подложени се на точно 6 цикъла НАХТ (n=17), 59% (n=10) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентките провели точно шест курса НАХТ в HR-отрицателната кохорта [OR 0.4375 (95% CI 0.1256 - 1.5238); p = 0.1941].

При събиране на двете кохорти (n=73), 42% (n=31) от случаите се характеризират с ППО. Пациентките са завършили по-малко от 6 цикъла (n=44) или точно 6 цикъла (n=29) антрациклин базирана НАХТ. От 31 пациентки, постигнали ППО, 52% (n=16) са провели по-малко от 6 курса лечение, докато останалите 48% (n=15) са завършили точно шест цикъла терапия, преди да се подложат на дефинитивно оперативно лечение. В

РЕЗУЛТАТИ

групата, която е провела по-малко от 6 цикъла (n=44), 36% (n=16) са постигнали ППО.

Сред пациентките, които са провели точно 6 цикъла НАХТ (n=29), 52% (n=15) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентките провели точно шест курса НАХТ в общата HR-отрицателна кохорта [OR 0.5333 (95% CI 0.2057 – 1.3829); p = 0.1960].

4.2.3 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ХИСТОПАТОЛОГИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

Резултатите са представени в **Таблица 7**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

4.2.3.1 ДУКТАЛЕН КАРЦИНОМ *IN SITU* В МАТЕРИАЛА ОТ ДЕБЕЛОИГЛЕНАТА БИОПСИЯ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

В групата от HR-отрицателни Английски пациентки, 46% (20/43) са постигнали ППО. В тази група (n=43), 35% (n=15) са с наличие на DCIS компонента в туморната биопсия, а при 65% (n=28) липсва тази находка. От пациентките с наличие на DCIS (n=15), 60% (n=9) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър (n=28), 21% (n=6) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентките с DCIS, в хистологичния препарат от дебелоиглената биопсия, в тази кохорта [OR 0.1818 (95% CI 0.0461 - 0.7168); p = 0.0149].

РЕЗУЛТАТИ

Таблица 7 - Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри при HR-отрицателни КМЖ

Параметър	Липса на ППО	ППО	OR [95% CI]	P
DCIS (n=73):				
Да (n=25)	10 (40%)	15 (60%)	0.3333 [0.1226 - 0.9063]	= 0.0313
Не (n=48)	32 (67%)	16 (33%)		
Диференциация (n=73):				
G3 (n=35)	15 (43%)	20 (57%)	0.3056 [0.1159 - 0.8055]	= 0.0165
<G3 (n=38)	27 (61%)	11 (29%)		
Еластоза (n=73):				
Да (n=3)	3 (100%)	0 (0%)	5.5823 [0.2779 - 112.1233]	= 0.2612
Не (n=70)	39 (53%)	31 (47%)		
Некроза (n=73):				
Да (n=28)	12 (43%)	16 (57%)	0.3750 [0.1419 - 0.9910]	= 0.0479
Не (n=45)	30 (67%)	15 (33%)		
Брой пациенти	42 (58%)	31 (42%)	-	-

РЕЗУЛТАТИ

При комбинираната кохорта от HR-отрицателни пациентки (n=73), 34% (n=25) са с наличие на DCIS компонента в дебелоиглената биопсия, докато останалите 66% (n=48) не са имали тази характеристика. От тези с DCIS (n=25), 60% (n=15) са постигнали ППО. Сред групата без тази характеристика (n=48), 33% (n=16) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентките с DCIS, в хистологичния препарат от дебелоиглената биопсия в общата популация [OR 0.3333 (95%CI 0.1226 – 0.9063); p = 0.0313].

4.2.3.2 ТУМОРНА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

В HR-отрицателната Английска кохорта, от 20-те пациентки постигнали ППО, 65% (n=13) са с G3 заболяване и 35% (n=7) са определени като < G3. От пациентките с G3 тумори (n=21), 62% (n=13) са постигнали ППО. От пациентките определени като < G3 (n=22), 32% (n=7) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ниско диференцирани тумори [OR 0.2872 (95%CI 0.0817 - 1.0096); p = 0.0518]. P-стойността в този анализ е близка до критичната стойност (p ≤ 0.05). Това означава, че при друг обем на извадката, резултатът може да се промени.

Сред постигналите ППО (n=31) пациентки в комбинираната кохорта, 65% (n=20) са диагностицирани с ниско диференцирани (G3) тумори, докато 35% (n=11) са класифицирани като < G3. От тези с G3 тумори (n=35), 57% (n=20) са постигнали ППО. Сред пациентките, категоризирани със заболяване < G3 (n=38), 29% (n=11) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ниско диференцирани тумори в общата популация [OR 0.3056 (95% CI 0.1159 – 0.8055); p = 0.0165].

РЕЗУЛТАТИ

4.2.3.3 ТУМОРНА ЕЛАСТОЗА ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 0% (n=0) са с наличие на еластоза в туморната проба от дебелоиглената биопсия, т.е. при 100% (n=43) от случаите не се откри този параметър. От пациентките с наличие на еластоза (n=1), 0% (n=0) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър (n=22), 91% (n=20) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на еластоза в тази кохорта [OR 24.6000 (95%CI 0.7735 - 782.3246); p = 0.0696].

Сред постигналите ППО (n=31) пациентки в комбинираната кохорта, 0% (n=0) са с наличие на еластоза, идентифицирана в пробата от дебелоиглената биопсия, т.е. при 100% (n=31) от случаите липсва този показател. От пациентките с еластоза (n=3), 0% (n=0) са постигнали ППО. Сред пробите без този параметър (n=70), 44% (n=31) са с ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на еластоза в общата популация [OR 5,5823 (95%CI 0,2779 - 112,1233); p = 0.2612].

4.2.3.4 ТУМОРНА НЕКРОЗА ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 55% (n=11) са с наличие на туморна некроза в хистологичната проба, а при 45% (n=9) не е открит този параметър. От пациентките с наличие на некроза (n=17), 65% (n=11) са постигнали ППО. От случаите с липса на този параметър (n=26), 35% (n=9) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на туморна некроза в тази кохорта [OR 0.2888

РЕЗУЛТАТИ

(95% CI 0.0802 - 1.0402); $p = 0.0575$]. Това означава, че при друг обем на извадката, резултатът може да се промени.

В HR-отрицателната група пациентки ($n=73$), които са постигнали ППО ($n=31$), 51% ($n=16$) са имали първоначална туморна некроза в сравнение с 49% ($n=15$) без нея. Сред тези с некроза ($n=28$), 57% ($n=16$) са постигнали ППО, докато сред тези без нея ($n=45$), 33% ($n=15$) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на туморна некроза, в пробата от дебелоиглената биопсия, в общата популация [OR 0,3750 (95% CI 0,1419 - 0,9910); $p = 0.0479$].

4.2.4 ИМУНОХИСТОХИМИЧНИ ПАРАМЕТРИ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

Резултатите са представени в **Таблица 8**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

4.2.4.1 ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМАЛЕН РЕЦЕПТОР ЗА РАСТЕЖЕН ФАКТОР 2 (HER2)

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната Английска кохорта ($n=43$), 40% ($n=8$) са с наличие на положителен HER2, а при 60% ($n=12$) не се откри този параметър.

РЕЗУЛТАТИ

Таблица 8 - Еднофакторен анализ на имунохистохимичните параметри при HR-отрицателни КМЖ.

Параметър	Липса на ППО	ППО	OR [95% CI]	P
SALL4 (n=43):				
Да (n=8)	5 (78%)	3 (22%)	1.5741 [0.3251 - 7.6224]	= 0.5730
Не (n=35)	18 (69%)	17 (31%)		
Брой пациенти	23 (54%)	20 (46%)	-	-
HER2 (n=73):				
Да (n=16)	8 (50%)	8 (50%)	0.06765 [0.2221 - 2.0603]	= 0.4915
Не (n=57)	34 (56%)	23 (40%)		
EGFR (n=73):				
Да (n=35)	26 (74%)	9 (26%)	3.9722 [1.4691 - 10.7399]	= 0.0066
Не (n=38)	16 (42%)	22 (58%)		
CK5 (n=73):				
Да (n=34)	20 (59%)	14 (41%)	1.1039 [0.4350 - 2.8011]	= 0.8352
Не (n=39)	22 (57%)	17 (43%)		
CD10 (n=73):				
Да (n=33)	11 (34%)	22 (66%)	0.1452 [0.0515 - 0.4093]	= 0.0003
Не (n=40)	31 (78%)	9 (22%)		
p53 (n=73):				
Да (n=39)	19 (49%)	20 (51%)	0.4543 [0.1750 - 1.1798]	= 0.1051
Не (n=34)	23 (68%)	11 (32%)		
Брой пациенти	42 (58%)	31 (42%)	-	-

РЕЗУЛТАТИ

От пациентките които са постигнали ППО в комбинираната HR-отрицателна кохорта (n=31), 26% (n=8) са обогатени с HER2, докато 74% (n=23) са HER2-отрицателни. Сред тези с обогатяване на HER2 (n=16), 50% (n=8) са постигнали ППО, докато сред тези с липса на свръхекспресия (n=57), 40% (n=23) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие HER2-обогатяване в общата популация [OR 0.6765 (95% CI 0.2221 - 2.0603); p = 0.4915].

4.2.4.2 СПАЛТОПОДОБЕН ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР 4 (SALL4)

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната кохорта (n=43), 15% (n=3) са с наличие на положителен SALL4, а при 85% (n=17) не се откри този параметър. От пробите експресиращи SALL4 (n=8), 37% (n=3) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=35), 48% (n=17) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие SALL4 експресия [OR 1.5741 (95%CI 0.3251 - 7.6224); p = 0.5730].

Тъй като резултатите са статистически незначими в Английската кохорта и поради материални причини, Българската група пациентки не се изследва за връзка между този биомаркер и честотата на ППО.

4.2.4.3 ЕПИДЕРМАЛЕН РЕЦЕПТОР ЗА РАСТЕЖЕН ФАКТОР (EGFR)

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 30% (n=6) са с наличие положителен EGFR, а при 70% (n=14) не се откри този параметър. От пробите определени като

РЕЗУЛТАТИ

експресиращи EGFR (n=21), 28% (n=6) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=22), 61% (n=14) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на EGFR [OR 4.3750 (95%CI 1.2105 - 15.8126); p = 0.0244].

В общата популация 29% (n=9) от случаите на ППО (n=31) са EGFR-положителни, докато 71% (n=22) са EGFR-отрицателни. Сред тези, експресиращи EGFR (n=35), 26% (n=9) са постигнали ППО. Сред отрицателните проби (n=38), 58% (n=22) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на EGFR в общата популация [OR 3,9722 (95%CI 1,4691 - 10,7399); p = 0.0066].

4.2.4.4 ЦИТОКЕРАТИН 5 (СК5)

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 45% (n=9) са с наличие положителен СК5, а при 55% (n=11) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи СК5 (n=20), 45% (n=9) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=23), 48% (n=11) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на СК5 [OR 1.1204 (95%CI 0.3367 - 3.7282); p = 0.8530].

45% (n=14) от случаите с ППО показват положително СК5 оцветяване, докато при 55% (n=17) липсва такова. В случаите, експресиращи СК5 (n=34), 41% (n=14) са постигнали ППО. Сред пробите без експресия на СК5 (n=39), 43% (n=17) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на СК5 в общата популация [OR 1,1039 (95%CI 0,4350 - 2,8011); p = 0.8352].

4.2.4.5 КЛЪСТЕР НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ 10 (CD10)

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 75% (n=15) са с наличие на положителен CD10, а при 25% (n=5) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи CD10 (n=19), 79% (n=15) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=24), 21% (n=5) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на CD10 [OR 0.0702 (95% CI 0.0160 - 0.3079); p = 0.0004].

71% (n=22) от туморите с ППО експресират CD10, докато 29% (n=9) са отрицателни. В случаите, експресиращи CD10 (n=33), 66% (n=22) са постигнали ППО. Сред тези без експресия на CD10 (n=40), 22% (n=9) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на CD10 в общата популация [OR 0,1452 (95% CI 0,0515 - 0,4093); p = 0,0003].

4.2.4.6 ПРОТЕИН 53 (P53)

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 65% (n=13) са с наличие на положителен (t)p53, а при 35% (n=7) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи p53 (n=23), 56% (n=13) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=20), 35% (n=7) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на мутирал p53 [OR 0.4142 (95% CI 0.1205 - 1.4235); p = 0.1617].

Сред комбинираната HR-отрицателна кохорта (n=73), 42% са постигнали ППО (n=31). 65% (n=20) са имали положителна експресия на p53, докато 35% (n=11) не са имали такава. В случаите, експресиращи p53 (n=39),

РЕЗУЛТАТИ

51% (n=20) са постигнали ППО. Сред тези с липса на p53 (n=34), 32% (n=11) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на мутирал p53 [OR 0,4543 (95%CI 0,1750 - 1,1798); p = 0.1051].

4.3 РЕЗУЛТАТИ ОТ ПОДГРУПАТА С ТНКМЖ

4.3.1 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ЧЕСТОТАТА НА ППО ПРИ ТНКМЖ

Данните от еднофакторните анализи, на HR-отрицателната подгрупа, припокриват данните от общия анализ. Нелуминални тумори [OR 0.3469 (95%CI 0.1313 - 0.9170); p = 0.0328] с наличие на DCIS компонента [OR 0.1818 (95%CI 0.0461 - 0.7168); p = 0.0149], липса на EGFR [OR 4.3750 (95%CI 1.2105 - 15.8126); p = 0.0244] и експресия на CD10 [OR 0.0702 (95%CI 0.0160 - 0.3079); p = 0.0004] показват по-високи честоти на ППО. Наличието на мутирал (t)p53 и постигането на ППО е статистически значимо само в общия анализ включващ всички биологични подтипове на КМЖ [0.2700 (95% 0.1145 - 0.6372); p = 0.0028].

В този отдел се разглеждат всички проби от пациентките с ТНКМЖ и тяхната асоциация с честотата на отговора към НАХТ (**Фигура 5**).

4.3.2 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА КЛИНИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ ПРИ ТНКМЖ

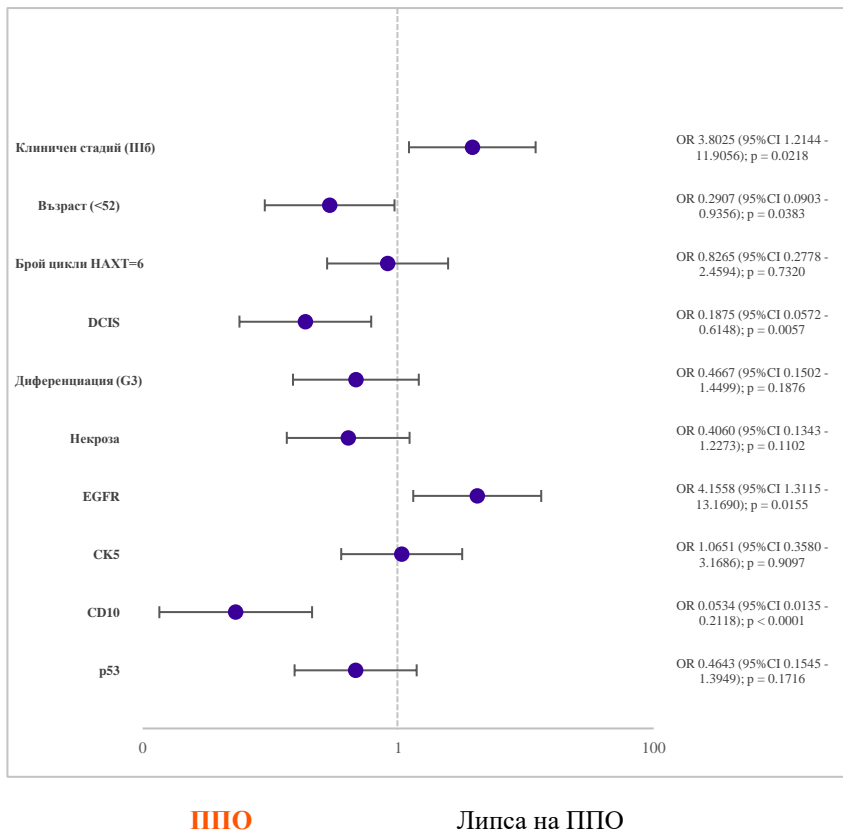
Резултатите са представени в **Таблица 9**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

РЕЗУЛТАТИ

Таблица 9 - Еднофакторен анализ на клиничните параметри при пациентки с ТНКМЖ

Параметър	Липса на ППО	ППО	OR [95% CI]	P
Клиничен стадий (n=54):				
Стадий IIIa; cT0-3 cN2 cM0 (n=24)	10 (39%)	14 (61%)	3.8025 [1.2144 - 11.9056]	= 0.0218
Стадий IIIб; cT4 cN0-2 cM0 (n=30)	21 (71%)	9 (29%)		
Възраст (n=54):				
≥52 (n=23)	17 (74%)	6 (26%)	0.2907 [0.0903 - 0.9356]	= 0.0383
<52 (n=31)	14 (45%)	17 (55%)		
Брой цикли НАХТ (n=54):				
<6 цикъла (n=22)	13 (59%)	9 (41%)	0.8265 [0.2778 - 2.4594]	= 0.7320
6 цикъла (n=32)	18 (56%)	14 (44%)		
Брой пациенти	31 (58%)	23 (42%)	-	-

РЕЗУЛТАТИ



Фигура 5 Блобограма на резултатите за кохортата с ТНКМЖ.

4.3.2.1 КЛИНИЧЕН СТАДИЙ ПРИ ТНКМЖ

В групата от пациентки диагностицирани с ТНКМЖ (n=54), 42% (n=23) са постигнали ППО. От 23-те пациентки постигнали ППО, 61% (n=14) са

РЕЗУЛТАТИ

стадирани като IIIa и 39% (n=9) са стадирани като IIIб. От пациентките стадирани като IIIa (n=23), 61% (n=14) са постигнали ППО. От пациентките стадирани като IIIб (n=31), 29% (n=9) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при пациентки в стадий IIIб в тази кохорта [OR 3.8025 (95%CI 1.2144 - 11.9056); p = 0.0218]. Резултата се интерпретира по следния начин: пациентки стадирани като IIIa (т.е. cT0-3 cN2 cM0) постигат ППО по-често при условие, че са диагностицирани с ТНКМЖ.

4.3.2.2 ВЪЗРАСТ И ППО ПРИ ТНКМЖ

Средната възраст в ТНКМЖ кохортата е изчислена като 52г. 42% (23/54) са постигнали ППО в тази група. От 23-те пациентки постигнали ППО, 74% (n=17) са <52 годишна възраст и 26% (n=6) са ≥52г. От пациентките определени като <52 годишна възраст (n=31), 55% (n=17) са постигнали ППО. От пациентките определени като ≥52г годишна възраст (n=23), 26% (n=6) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки в по-младата възраст [OR 0.2907 (95%CI 0.0903 - 0.9356); p = 0.0383].

4.3.2.3 БРОЙ ЦИКЛИ НАХТ ПРИ ТНКМЖ

ТНКМЖ пациентките включени в проучването (n=54) са провели <6 (n=22) или точно 6 (n=32) цикъла НАХТ по схема ЕС през 21 дни. От 23-те пациентки постигнали ППО в тази кохорта (n=23), 39% (n=9) са провели <6 курса и 61% (n=14) се подложиха на точно шест цикъла лечение. От пациентките провели <6 курса (n=22), 41% (n=9) са постигнали ППО. От пациентките подложили се на точно 6 цикъла НАХТ (n=32), 43% (n=14) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва,

РЕЗУЛТАТИ

че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентките провели точно шест курса НАХТ в тройно-негативната кохорта [OR 0.8265 (95%CI 0.2778 - 2.4594); $p = 0.7320$].

4.3.3 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ХИСТОПАТОЛОГИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ ПРИ ТНКМЖ

Резултатите са представени в **Таблица 10**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

4.3.3.1 ДУКТАЛЕН КАРЦИНОМ *IN SITU* В МАТЕРИАЛА ОТ ДЕБЕЛОИГЛЕНАТА БИОПСИЯ ПРИ ТНКМЖ

В групата от пациентки с ТНКМЖ, 42% (23/54) са постигнали ППО. В тази група (n=43), 48% (n=21) са с наличие на DCIS компонента в туморната биопсия, а при 52% (n=22) липсва тази находка. От пациентките с наличие на DCIS (n=21), 66% (n=14) са постигнали ППО. От случаите с липса на този параметър (n=33), 40% (n=9) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО в полза на пациентките с DCIS, в хистологичния препарат от дебелоиглената биопсия, в тази кохорта [OR 0.1875 (95%CI 0.0572 - 0.6148); $p = 0.0057$].

РЕЗУЛТАТИ

Таблица 10 - Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри при ТНКМЖ

Параметър	Липса на ППО	ППО	OR [95% CI]	P
DCIS (n=54):				
Да (n=21)	7 (34%)	14 (66%)	0.1875 [0.0572 - 0.6148]	= 0.0057
Не (n=33)	24 (73%)	9 (27%)		
Диференциация (n=54):				
G3 (n=32)	16 (50%)	16 (50%)	0.4667 [0.1502 - 1.4499]	= 0.1876
<G3 (n=22)	15 (68%)	7 (32%)		
Еластоза (n=54):				
Да (n=2)	2 (100%)	0 (0%)	3.9831 [0.1823 - 87.0472]	= 0.3798
Не (n=52)	29 (56%)	23 (44%)		
Некроза (n=54):				
Да (n=23)	9 (40%)	14 (60%)	0.4060 [0.1343 - 1.2273]	= 0.1102
Не (n=31)	22 (70%)	9 (30%)		
Брой пациенти	31 (58%)	23 (42%)	-	-

РЕЗУЛТАТИ

4.3.3.2 ТУМОРНА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИ ТНКМЖ

В кохортата диагностицирана с ТНКМЖ, от 23-те пациентки постигнаха ППО, 70% (n=16) са с G3 заболяване, а 30% (n=7) са определени като < G3. От пациентките с G3 тумори (n=32), 50% (n=16) са постигнаха ППО. От пациентките определени като < G3 (n=22), 32% (n=7) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с по-ниско диференцирани тумори [OR 0.4667 (95% CI 0.1502 - 1.4499); p = 0.1876].

4.3.3.3 ТУМОРНА ЕЛАСТОЗА ПРИ ТНКМЖ

От 23-те пациентки постигнаха ППО в кохортата с ТНКМЖ (n=54), 0% (n=0) са с наличие на еластоза в туморната проба от дебелоиглената биопсия, т.е. при 100% (n=23) от случаите не е открит този параметър. От пациентките с наличие на еластоза (n=2), 0% (n=0) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този параметър (n=52), 44% (n=23) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на еластоза в тази кохорта [OR 3.9831 (95% CI 0.1823 - 87.0472); p = 0.3798].

4.3.3.4 ТУМОРНА НЕКРОЗА ПРИ ТНКМЖ

От 23-те пациентки с ТНКМЖ постигнаха ППО, 60% (n=14) са с наличие на туморна некроза в хистологичната проба, а при 40% (n=9) не е открит този параметър. От пациентките с наличие на некроза (n=23), 54% (n=14) са постигнаха ППО. От случаите с липса на този параметър (n=31), 32% (n=9) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на туморна некроза в тази кохорта [OR 0.4060 (95% CI 0.1343 - 1.2273); p = 0.1102].

РЕЗУЛТАТИ

4.3.4 ИМУНОХИСТОХИМИЧНИ ПАРАМЕТРИ ПРИ ТНКМЖ

Резултатите са представени в **Таблица 11**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

Таблица 11 - Еднофакторен анализ на имунохистохимичните параметри при ТНКМЖ.

Параметър	Липса на ППО	ППО	OR [95% CI]	P
EGFR (n=54):				
Да (n=27)	20 (74%)	7 (26%)	4.1558 [1.3115 -	= 0.0155
Не (n=27)	11 (41%)	16 (59%)	13.1690]	
CK5 (n=54):				
Да (n=31)	18 (58%)	13 (42%)	1.0651 [0.3580 -	= 0.9097
Не (n=23)	13 (57%)	10 (43%)	3.1686]	
CD10 (n=54):				
Да (n=23)	5 (21%)	18 (78%)	0.0534 [0.0135 -	< 0.0001
Не (n=31)	26 (79%)	5(21%)	0.2118]	
p53 (n=54):				
Да (n=27)	13 (48%)	14 (52%)	0.4643 [0.1545 -	= 0.1716
Не (n=27)	18 (73%)	9 (33%)	1.3949]	
Брой пациенти	31 (58%)	23 (42%)	-	-

РЕЗУЛТАТИ

4.3.4.1 ЕПИДЕРМАЛЕН РЕЦЕПТОР ЗА РАСТЕЖЕН ФАКТОР (EGFR)

От 23-те пациентки постигнаха ППО в кохортата с ТНКМЖ (n=54), 30% (n=7) са с наличие на положителен EGFR, а при 70% (n=16) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи EGFR (n=27), 26% (n=7) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=27), 59% (n=16) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при пациентки с ТНКМЖ и наличие на EGFR [OR 4.1558 (95% CI 1.3115 - 13.1690); p = 0.0155].

4.3.4.2 ЦИТОКЕРАТИН 5 (CK5)

От 23-те пациентки постигнаха ППО в кохортата с ТНКМЖ (n=54), 56% (n=13) са с наличие на положителен CK5, а при 45% (n=10) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи CK5 (n=31), 42% (n=13) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=23), 43% (n=10) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ТНКМЖ и наличие на CK5 [OR 1.0651 (95% CI 0.3580 - 3.1686); p = 0.9097].

4.3.4.3 КЛЪСТЕР НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ 10 (CD10)

От 23-те пациентки постигнаха ППО в кохортата с ТНКМЖ (n=54), 78% (n=18) са с наличие на положителен CD10, а при 22% (n=5) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи CD10 (n=23), 78% (n=18) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=31), 16% (n=5) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на

РЕЗУЛТАТИ

ППО при пациентки с ТНКМЖ и наличие на CD10 [OR 0.0534 (95%CI 0.0135 - 0.2118); $p < 0.0001$].

4.3.4.4 ПРОТЕИН 53 (P53)

От 23-те пациентки постигнаха ППО в кохортата с ТНКМЖ ($n=54$), 60% ($n=14$) са с наличие на положителен мутирал (t)p53, а при 40% ($n=9$) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи p53 ($n=27$), 52% ($n=14$) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер ($n=27$), 33% ($n=9$) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ТНКМЖ и наличие на мутирал (t)p53 [OR 0.4643 (95%CI 0.1545 - 1.3949); $p = 0.1716$].

4.3.5 МНОГОФАКТОРЕН ЛОГИСТИЧЕН РЕГРЕСИВЕН АНАЛИЗ НА ТНКМЖ

Параметрите които бяха значими при еднофакторния статистически анализ бяха включени и в многофакторния. Изследването потвърди, че експресията на CD10 [OR 0.145 (95% CI 0.01-0.28); $p < 0.001$] може да се използва като самостоятелен предсказващ биомаркер за ППО. Резултатите ни показват, че съществува статистически значима връзка между експресията на CD10 и ТНКМЖ [OR 0.105 (95% CI 0.067-0.136); $p < 0.01$]. Липсата на EGFR експресия при пробите от ТНКМЖ се асоциира с положителна CD10 експресия и повишена честота за ППО [OR 0.06 (95% CI 0.01-0.48); $p < 0.01$]. (**Таблица 12**).

РЕЗУЛТАТИ

Таблица 12 - Многофакторен логистичен анализ на туморните биомаркери при ТНКМЖ

Параметър	Coefficient B	SE	Z	P	OR	95% CI
DCIS-отр (компонент)	1.45	0.69	1.83	0.067	2.29	0.43- 12.26
ER-отр	2.3	1.06	2.16	0.031	0.1	0.01- 0.81
CD10-пол	3.28	1.02	3.23	0.001	0.04	0.01- 0.28
EGFR-отр	2.78	1.04	2.67	0.008	0.06	0.01- 0.48
p53-пол	0.04	0.75	0.05	0.942	0.96	0.22- 4.25
Общ брой пациентки с ТНКМЖ = 54						

РЕЗУЛТАТИ

Многофакторният регресионен анализ не показва статистически значима разлика за връзка между другите параметри и липсата на DCIS компонент в дебелиогления биопсичен материал от ТНКМЖ с по-ниска честота на ППО [OR 2.29 (95%CI 0.43-12.26); $p=0.067$]. Р-стойността в анализа е близка до критичната стойност ($p \leq 0.05$), което означава, че при по-голям обем на извадката, резултатът може да се промени.

Няма статистически значима връзка между статуса на p53 [OR 0.96 (95% CI 0.22-4.24); $p=0.94$ и другите включени параметри, както и с пълната патологична ремисия при тройно негативен карцином на млечната жлеза.

4.4 ТРАНСКРИПТОМЕН АНАЛИЗ

Нашите статистически анализи показаха, че наличието на CD10, p53 и липсата на EGFR са независими фактори за предсказване на ППО при различните подтипове на КМЖ. Използвайки базата данни на TCGA чрез UALCAN (Портал за анализ на данни за рака на Университета Алабама), сравнихме разликите в експресията на тези биомаркери между контролни проби и такива от КМЖ.

4.4.1 ЕКСПРЕСИЯ НА *MME* (CD10)

Пробите от здравите тъкани експресираща CD10 (кодирана от *MME* на хромозома 3) около 20 пъти повече от туморните (93.228 и 4.518 съответно) с наличие на статистическа значимост; $p < 0.0001$. Тази тенденция се наблюдава при всички подтипове рак на гърдата (**Фигура 6**). ДНК метилирането на генния промотор е вероятният причинител на подтискането на експресията на *MME* в туморните проби (Chandrashekar et al., 2017).

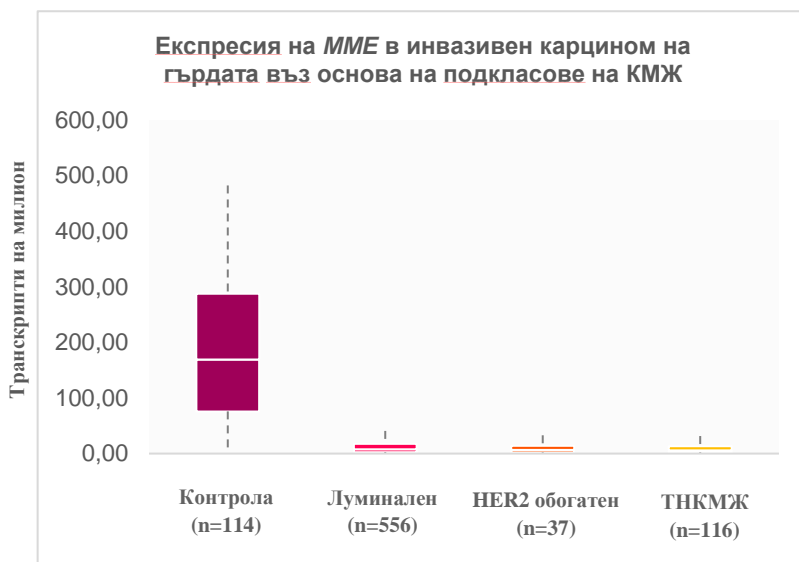
РЕЗУЛТАТИ

4.4.2 ЕКСПРЕСИЯ НА P53

Честотата на експресията на p53 протеина варира в зависимост от подтипа на КМЖ, като е най-ниска при луминално заболяване и най-висока при ТНКМЖ и HER2-обогатени подтипове ($p < 0.001$) (Chandrashekar et al., 2017).

4.4.3 ЕКСПРЕСИЯ НА EGFR

Експресията на *EGFR* е най-висока при ТНКМЖ в сравнение с други подтипове рак на гърдата ($p < 0.001$). В нетуморна тъкан от млечна жлеза, експресията на този биомаркер е 4-10 пъти по-висока спрямо нивата отчетени при КМЖ (Chandrashekar et al., 2017).



Фигура 6 Сравнение на разликите в експресията на *MME* между здрави контроли и тъкан от КМЖ.

05

ГЛАВА ПЕТА

Обсъждане

ОБСЪЖДАНЕ

5 ОБСЪЖДАНЕ

Наскорощният напредък в молекулярната онкобиология и възможността за прогнозирането на лекарствена резистентност, подчертават значимостта на туморното молекулярно профилиране (Freitas et al., 2021). Наличието на тъканни архиви допринесе значително за идентифицирането и проучването на свръхекспресирани или потиснати молекулярни биомаркери като: HER2, p53, ER и други. Впоследствие, се разработиха няколко, в момента рутинно прилагани, таргетни медикамента. Част от пациентите с карцином на гърдата не отговарят на критериите за този вид персонализирано лечение. При тях цитостатичната химиотерапия играе основна роля в системното лечение. Определен брой пациенти демонстрират добър отговор след ХТ и ~30% от тях постигат пълен патологичен отговор (Omaig et al., 2023).

Антрациклин базираната цитостатична химиотерапия е един от най-често прилаганите режими както при пациентки с ранен КМЖ, така и при такива с авансирало заболяване (Gradishar et al., 2022). Неoadювантната химиотерапия увеличава шансовете за дефинитивно оперативно лечение (R0 резекция) заедно с вероятността за органосъхраняваща операция, намалява риска от следоперативен рецидив и определя чувствителността на заболяването към ХТ (Zhu et al., 2019). Пълният патологичен отговор след НАХТ е свързан с дългосрочна преживяемост (OS) и е независим предиктор за благоприятни клинични резултати (DFS) при всички молекулярни подтипове КМЖ (Bonnetfoi et al., 2014, van Mackelenbergh et al., 2023). Съвременен научно изследване предостави данни, които подчертават ползите от включването на антрациклини в терапията на пациенти с КМЖ, като това увеличава честотата на ППО (Shan et al., 2020). Това проучване включва пациенти, диагностицирани, чрез дебелиоглена биопсия с Луминален Б, HER2-отрицателен рак на гърдата или ТНКМЖ. Тези данни допълнително подкрепят идеята, че пациентите с ТНКМЖ са склонни да отговарят по-добре на системно лечение и по този начин по-често постигат ППО. До момента липсва надежден

ОБСЪЖДАНЕ

биомаркер позволяващ подкатегоризация на пациенти с ТНКМЖ постигнали ППО.

Разработена е предиктивна скала, която предоставя възможност за индивидуално предсказване на ППО при пациенти с КМЖ след прилагане на неoadювантна химиотерапия (Pu et al., 2020). Тази скала включва пет компонента: статуса на ER, процента на Ki-67, наличие на експресия/амплификация на HER2, размера на тумора преди началото на НАХТ и броя курсове химиотерапия. Предиктивната скала, макар и полезна е обобщаваща и включва само класически фактори. Това води до липса на специфичност при прилагането в случаи с по-различни клинични и биологични параметри. Този аспект на скалата може да бъде подобрен, като се включат по-специфични и индивидуални фактори за по-точно предсказване на ППО при различни групи пациенти.

Няколко проучвания разширяват хоризонта за търсене на различни предиктивни фактори за ППО, използвайки разнообразни терапевтични режими. Все още липсва успех в тази област (Han et al., 2021).

Целта на този труд е да идентифицира фактори, свързани с предсказването на честотата на ППО след НАХТ при пациентки със спорадичен инвазивен дуктален карцином на млечните жлези в стадий III. В ретроспективното проучване са включени жени подложени на 4-6 курса антрациклин базирана химиотерапия в неoadювантен аспект, през периода 2010-2020гг., от базата данни на болниците Черинг Крос, Лондон и „УМБАЛ Царица Йоанна“, София.

Нашите анализи в общата популация пациентки (n=130), включваща всички молекулярни подтипове на КМЖ, показаха, че от клиничните критерии (стадий IIIa/б, възраст и брой цикли НАХТ) липсва статистическа значимост в полза на по-напреднал стадий, по-напреднала възраст и повече цикли на лечение. Наблюдава се тенденция за по-висока честота на ППО при по-млади пациентки (<52 години) и при по-ранен стадий (IIIa). В едно от основните проучвания по тази тема, публикувано в “Journal of clinical oncology” бяха изследвани няколко ключови фактора,

ОБСЪЖДАНЕ

свързани с пълния патологичен отговор при пациенти с рак на млечната жлеза. Анализът показва, че първоначалният стадий на ангажиране на лимфните възли, възрастта на пациентите и степента на разпространение на болестта не се различават значително между пациентите с ППО и тези без ППО. Въпреки това, бяха забелязани някои интересни разлики. По-голям процент от пациентите с ППО имаха HR-отрицателни тумори и се характеризираха като ниско диференцирани (G3). Тези тумори също бяха с по-малък размер в сравнение с туморите на пациентите без ППО. Многофакторният анализ, извършен в това изследване подчерта, че влиянието на ER статуса и туморната диференциация върху честотата на ППО са независими предиктори от първоначалния туморен размер (Kuerer et al., 1999).

От нашите анализи на хистопатологичните параметри, наличието на DCIS компонента в пробата от дебелоиглената биопсия, и/или ниско диференциран тумор (G3), са демонстрирали статистическа значимост за постигане на ППО. Тези находки са известни в литературата и нашите данни ги подкрепят (Chou et al., 2019, Goorts et al., 2017). В проучването ни, наличието на *in situ* компонента се отбелязва най-вече при ниско диференцираните карциноми. Известно е, че ниско диференцираните тумори отговарят по-често на цистостатични системни химиотерапевтици (Jones et al., 2006, Esteva and Hortobaguy, 1999). Някои проучвания са доказали, че наличието на DCIS фокуси, на фона на инвазивен дуктален карцином, корелира с по-висока обща преживяемост (Kole et al., 2019). Други проучвания са показали, че наличието на некроза в пробата от дебелоиглената биопсия (преди НАХТ), корелира с по-високи честоти на ППО (Pu et al., 2005). Допълнителни научни изследвания показват, че комбинацията от степента на туморната диференциация и наличието на некроза в момента е най-добрият предиктор за биологичното поведение на болестта (Mokbel, 2003). Нашето проучване показва, че съществува тенденция за по-често постигане на ППО при наличие на некроза, но само при HR-отрицателната кохорта. Следователно, тези факти могат да обяснят защо

ОБСЪЖДАНЕ

по-голямата част от туморите, в които присъстват и фокуси на DCIS, постигат ППО по-често.

В нашето проучване наличието на еластоза не показва тенденции нито към по-често постигане на ППО, нито към липса на отговор след антрациклин базирана НАХТ. Механизмите за поява на еластоза в тъканите на млечните жлези не са ясни. Предполага се, че еластичните влакна не се произвеждат само от фибробласти, а и от ендотелни и неопластични клетки (Krishnan and Cleary, 1990). Наличието на корелация между еластозата с подобрена преживяемост и благоприятни туморни характеристики (напр. висока степен на диференциация и нисък Ki-67) не се потвърди в редица проучвания (Chen et al., 2014, Rasmussen et al., 1985). Друга установена връзка е тази на еластозата с експресията на естрогенния рецептор (ER). Тези данни подкрепят нашите находки.

Анализирането на имунохистохимичните биомаркери в нашата обща кохорта пациентки показва, че наличието на ER е самостоятелен предиктор за липса на ППО. Тези резултати подкрепят литературните данни от множество проучвания доказващи, че ER-положителни тумори, демонстрират резистентност към цитостатична системна терапия както в неoadювантен, така и в адювантен аспект (Ring et al., 2004, Omranipour et al., 2020, Tang et al., 2022). Литературата съобщава, че ER-положителното заболяване, представляващо приблизително 50 - 60% от случаите на рак на гърдата, е относително нечувствително към химиотерапевтично лечение, в сравнение с други подтипове КМЖ, и с честота на ППО варираща около 10% (Naqee et al., 2018). Специфичните механизми на HR-положителните КМЖ за понижената чувствителност към химиотерапията включват:

- **Хормонална зависимост:** Растежа на HR-положителният рак на гърдата се ръководи от естроген. Химиотерапията е насочена към бързо делиращи се клетки, но HR-позитивните заболявания отговарят по-слабо на този вид системно лечение, тъй като техният растеж е бавен (Burststein et al., 2019).

ОБСЪЖДАНЕ

- **Механизми за възстановяване на ДНК:** Химиотерапията уврежда ДНК в раковите клетки и до клетъчна смърт. HR-позитивните тумори имат по-ефективни механизми за възстановяване на ДНК (Lee et al., 2015).
- **Взаимодействие с други сигнални каскади:** HR-позитивният КМЖ може да осъществи взаимодействие между сигнализирането чрез естрогенния рецептор и други пътища свързани с клетъчно оцеляване (напр. PI3K/AKT/mTOR) (Bratton et al., 2010).

Нашите резултати показват, че сред трите основни подтипа КМЖ, най-ниските честоти на ППО от антрациклин базирана НАХТ са при хормонално чувствителните тумори, което подкрепя данните от световната литература. Клинични проучвания показват, че при HR-положителните пациентки, ендокринна терапия съобразена с антропологичните им параметри, е за предпочитане дори и в неoadювантен аспект (Gradishar et al., 2022). Генетични изследвания са показали възможности за допълнително молекулярно типизиране на HR-положителни/HER2-отрицателни тумори чрез анализ на 80 гена. Проучването показва ~15% вероятност за рекласифициране на луминалния подтип КМЖ в базален, демонстриращ тенденции сходни с тези на ТНКМЖ за постигане на ППО (Whitworth et al., 2022).

Присъствието на PR също е свързано с по-слаб терапевтичен отговор към цитостатично лечение (Osako et al., 2012). Нашите данни показват, че експресията на PR е силно зависима от наличието на ER. По този начин използването на прогестеронови рецептор като независим предиктивен маркер за ППО не е редно, тъй като повечето тумори, експресиращи PR, имат повишени нива и на ER (Simone et al., 1991). Липсата на ER експресия, само по себе си, не демонстрира убедителни статистически значими стойности предсказващи ППО или липса на отговор (Rodler et al., 2010).

Нашият анализ показва, че при HR-положително заболяване, наличието на CD10 и експресия на мутирал (t)p53 е свързано с по-високи честоти на

ОБСЪЖДАНЕ

ППО. Научната литература съобщава, че ER-индуцираното потискане на медиерия от p53 апоптогичен отговор, води до стареене на туморните клетки и последваща резистентност към химиотерапия. При ER-отрицателни КМЖ, мутираният (t)p53 води до натрупването на генетични аномалии и съответно до по-висока геномна нестабилност и чувствителност към цитостатици (Bertheau et al., 2013). Нашите данни не показваха зависимост от наличието на p53 с по-висока честота на ППО при пациентки с HR-отрицателно заболяване или ТНКМЖ. Това се потвърждава и от други проучвания, въпреки по-честото разпространение на *TP53-мут* в тези по-агресивни фенотипове на КМЖ (Darb-Esfahani et al., 2016). Чрез многофакторният логистичен регресивен анализ, при пациентки постигнали ППО, потвърдихме връзката между експресията на CD10 и p53 в HR-положителната кохорта, с по-висока честота на ППО.

Наличието на CD10 и връзката с ППО е установена при всички туморни подгрупи в нашия анализ. Най-високата статистическа значимост се постигна при HR-отрицателната група и кохортата с ТНКМЖ. Мултифакторният анализ демонстрира статистическа значимост за наличието на CD10 при ТНКМЖ. Проучванията показват, че CD10 играе роля в модуляцията на пътя Фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), чрез активиране на тумор супресора „фосфатаза с двойна субстратна специфичност“ - PTEN (Sumitomo et al., 2005). Това действие може да предотврати активирането на каскадата чрез Akt / PKB, която е замесена както в нормалния клетъчен растеж, така и в растежа на туморните клетки. Редица проучвания показваха, че активирането на каскадата PI3K/AKT/mTOR води и до лекарствена резистентност при КМЖ (Sumitomo et al., 2005, Dong et al., 2021, Liu et al., 2020b). Stern et al. съобщават, че пациенти с КМЖ при които липсва експресия на PTEN, лекувани с химиотерапия в контекста на прочуването „BCIRG-006“, показват по-лоши DFS и OS, в сравнение с тези с положителен PTEN потвърден имунохистохимично (Stern et al., 2015). Тези данни показват, че чрез функционалното активиране на PTEN, медирано от CD10, се осъществява потискане на сигналната каскадата PI3K/AKT/mTOR,

ОБСЪЖДАНЕ

водещо до повишаване на чувствителността към химиотерапия и е свързано с по-благоприятна прогноза без значение от мутационния статус на PIK3CA.

Проучване в три онкологични центъра в България анализира честотата на PIK3CA мутациите при пациенти с метастатичен HER2-негативен/HR-позитивен карцином на гърдата и оцени преживеваемостта свободна от прогресия (PFS) между групите с див тип и мутационно позитивни пациенти. Анализирани са 250 тъканни проби, събрани между 2016 и 2022 година, като PIK3CA мутациите са открити в 29.2% от случаите. Резултатите показаха, че мутационният статус на PIK3CA не компроментира ефективността на системното лечение на първа линия (Gencheva et al., 2024).

Използвайки базата данни TCGA чрез UALCAN (Портал за анализ на данни за рака на Университета Алабама), демонстрирахме статистически значима разлика в експресията на *MME (CD10)* във всички подтипове карциноми на млечната жлеза в сравнение със здравата тъкан. Тенденция за редуцирана експресия се наблюдава при всички подтипове рак на гърдата, а метилирането на промотора е най-вероятната причина за потискането на експресията на *MME* в туморните проби (Chandrashekar et al., 2017). Заглушаването на CD10 дерегулира потискащите ефекти, с които този сигнален път контролира клетъчната смърт. По този начин се повишава резистентността към цитостатици. Отношението на тази молекула към прогнозата бе показана в няколко проучвания, установяващи наличието ѝ при по-агресивните фенотипове рак на гърдата (Vo et al., 2015, Subitha Kandamuthan, 2022).

Нашият анализ показа, че свръхекспресията на EGFR е свързана с намалена вероятност за постигане на пълен патлогичен отговор при пациенти с HR-отрицателно заболяване и в подгрупата с тройно-негативен карцином. Този резултат е със статистическа значимост. Подобни данни се откриват и в научната литература, която подкрепя нашите резултати и допълнително доказва, че експресията на EGFR при

ОБСЪЖДАНЕ

пациенти с TNKMЖ е свързана с по-слаб отговор към химиотерапия и с по-ниска обща преживяемост (Nogi et al., 2009).

Изследванията показват, че EGFR, заедно с неговата сигнална каскада, играе ключова роля в регулирането на процеси като епително-мезенхимен преход, клетъчна миграция и туморна инвазия (Burness et al., 2010). Високата експресия на EGFR може да бъде използвана като независим фактор, предсказващ по-лоша прогноза при пациенти с рак на гърдата (Masuda et al., 2012). Чрез провеждането на многофакторен логистичен регресивен анализ, при пациентки постигнали ППО, демонстрирахме връзка между експресията на CD10 при липса на EGFR в HR-отрицателната кохорта, с по-висока честота на ППО. Когато изследвахме наличието на промени в експресията на различните биомаркери преди и след НАХТ, не открихме статистически значима разлика в туморните профили. Световната литература показва, че при пациенти с EGFR-положителни тумори, при които след НАХТ липсва експресия на този рецептор, са с по-добра прогноза (Wang et al., 2021). До момента не са налични данни за връзка между промяната в експресията на другите дискутирани тук биомаркери преди и след НАХТ и по-благоприятния краен клиничен резултат.

Липсва консенсус в световната литература за ролята на биомаркерите SALL4 и CK5, които и в нашето проучване не показаха статистически значима тенденция за ППО или липса на такава, след антрациклин базирана НАХТ. Предклинично изследване показа, че заглушаването на SALL4 инхибира растежа на лекарствено-резистентни клетки от КМЖ чрез спиране на клетъчния цикъл и обръщане на химиорезистентността на тумора (Chen et al., 2016). SALL4 е силно експресирани при пациентки с HR-положителен КМЖ резистентни към хормонално лечение и корелира с фенотип на стволови клетки експресиращи Oct4, Nanog и SOX2 (Boustan et al., 2021). В проучването на Liu et al. е демонстрирано, че експресията на SALL4 при КМЖ е свързана с клетъчния растеж, туморната инвазия и избягването от апоптоза (Liu et al., 2020a). До момента липсват проучвания асоцииращи SALL4 с терапевтичния

ОБСЪЖДАНЕ

отговор към системна терапия при КМЖ. Нашият анализ показва липса на статистически значима връзка между тази молекула и честотата на ПШО.

Цитокератин 5 (СК5) е междинен филамент откриваем в епителните клетки. В контекста на рака на гърдата, СК5 се използва като биомаркер за класифициране на тумори на гърдата в различни подтипове, с варираща прогноза (Masood, 2016). Налични са данни които демонстрират тенденции за подобрена прогноза при пациенти със СК5-положителни тумори (Schulmeier et al., 2023). Други проучвания показват, че клетки експресиращи СК5 притежават свойства на ракови стволови клетки и могат да представляват химиорезистентна популация при КМЖ (Kabos et al., 2011, Dodova et al., 2015). Експресията на СК5 е статистически значимо свързана със соматични *BRCA1* мутации и с лоша прогноза (Foulkes et al., 2004). Нашите данни подкрепят, макар и статистически незначимо и двете становища. При анализа на HR-положителната кохорта е налична склонност към по-добър терапевтичен отговор. За разлика от нея, в HR-отрицателната кохорта и при пациентките с ТНКМЖ тази тенденция липсва.

Изследванията показват, че макар и да има случаи на промени в експресията на биомаркерите след НАХТ, те не са статистически значими (Shanmugalingam et al., 2022). Нашите резултати подчертават стабилността на експресията на ключови биомаркери като естрогенов рецептор (ER), прогестеронов рецептор (PR), човешки епидермален растежен фактор рецептор 2 (HER2), рецептор за епидермален растежен фактор (EGFR), миоепителен маркер CD10, цитокератин-5 (СК5) и протеин p53 в контекста на терапията. Тази стабилност е важна за предсказването на отговора на лечението и последващите терапевтични стратегии. Стабилната експресия на тези биомаркери след НАХТ има няколко ключови предимства. Първо, тя позволява по-точна оценка на прогнозата и реакцията на лечението. Например, стабилността на ER и PR експресията може да помогне за по-добро предсказване на отговора към ендокринната терапия. По същия начин, стабилната експресия на HER2 е критична за пациентите, които се лекуват с HER2-таргетиращи

ОБСЪЖДАНЕ

терапии особено поради хетерогеността на тумора. Стабилната експресия на EGFR, CD10, CK5 и p53 след НАХТ показва, че тези биомаркери могат да бъдат надеждни предиктори за терапевтичния отговор и за определяне на оптимална стратегия за терапевтични стъпки.

Прилагането на неoadювантно системно лечение в клиничната практика при пациенти с карцином на гърдата, се е увеличило драстично през последните години. Това важи особено за България, тъй като значителна част от пациентите постъпват вече с авансирало заболяване, а този подход позволява постигането на възможно най-благоприятен резултат. Мета-анализ показва, че наситен (dose-dense) режим НАХТ значително подобрява честотата на ППО при пациенти с ниски нива на експресия на хормонални рецептори, без да увеличава нежеланите реакции (Ding et al., 2020). Друг анализ, проведен от Групата за сътрудничество на участниците в ранните проучвания на рака на гърдата (EBCTCG) през 2019 г., установи, че в сравнение със стандартната цикличност на ХТ, 10-годишните DFS и OS са значително подобрени в популацията, провеждала системно лечение с наситен режим (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, 2019). Златният стандарт за дефинитивно лечение на КМЖ остава хирургичното лечение, дори и при наличие на пълен отговор (Gradishar et al., 2022). Въпреки това, текал проучвания изучаващи вероятността премахването на операцията при пациенти с пълен отговор да компрометира прогностичните показатели (Jung et al., 2023). Към момента, провеждането на аксиларна лимфна дисекция при пациенти постигнали пълен отговор все още се дискутира (Boughey et al., 2018).

Нашето изследване има някои ограничения. Първо, то не оценява ефективността на лечението проспективно, защото информацията е базирана на наблюдения след вече проведена терапия. Този ретроспективен подход предоставя полезни данни, но не дава възможност за изграждането на директна причинно-следствена връзка.

ОБСЪЖДАНЕ

Второ, нашето проучване обединява различни биологични подтипове на пациентки с инвазивен дуктален карцином в стадий III, което довежда до ограничен брой случаи в подгруповия анализ. Този подход е необходим, за да се създаде общ образ за връзката между параметрите и пълния патологичен отговор, но оставя ограничени статистически възможности за прецизен анализ при различните молекулярни подгрупи на КМЖ.




Трето, работата ни не анализира въздействието на различни демографски групи. Известно е, че етносът играе роля в прогнозата при пациенти с рак на млечната жлеза, но текущите данни са ограничени до сравнения между афро-американци и бели неиспанци (Уар, 2023). Този аспект трябва да се изследва в бъдеще, за да се разберат по-подробно връзките между анализирания параметри и качеството на терапевтичния отговор.

За да потвърдим и разширим нашите наблюдения, са необходими допълнителни изследвания с по-голям обем от данни, предимно в проспективен план и желателно с наситени режими на системно лечение. Тези изследвания ще са насочени към потвърждаване на връзката между факторите предсказващи ППО и крайният резултат, при пациенти с КМЖ подходящи за антрациклин базирана НАХТ.

Откриването на молекулярни и генетични белези, позволяващи предсказването на пълен патологичен отговор е от голямо медицинско и социално-икономическо значение. Възможността за идентифициране на реагиращи на терапия подтипове КМЖ, ще осигури по-добри клиничко-патологични резултати поради по-индивидуализирания лечебен подход (Фигура 7).

Едновременно, ще се елиминират неблагоприятните ефекти от ненужната химиотерапия при вече известните резистентни подтипове на заболяването. Впоследствие, този подход за персонализирана медицина ще доведе до намаляване на социално-икономическата тежест, ще даде по-висок шанс за възстановяване на работоспособността на пациентите и ще позволи по-бързо завръщане към нормален и качествен начин на живот.

ОБСЪЖДАНЕ

	TNBC	HER2+++	Луминален Б	Луминален А
ER	-	-	+	+
PR	-	-	±	+
HER2	-	+	±	-
Ki-67	Нисък-висок	Нисък-висок	Умерен/висок	Нисък
 Прогноза				
				
	I	II	III	IV
DCIS	+	-	+	-
EGFR	-	-	±	+
CD10	+	+	-	-
P53-mut	+	+	-	-
AR	-	-	+	+
ТИЛ	+	-	-	-
 Склонност към pCR				
Персонализиран подход	<ul style="list-style-type: none"> • Антрациклин базирана ХТ • Имуно-терапия 	<ul style="list-style-type: none"> • PI3K инхибитори • Мултикиназна блокада 	<ul style="list-style-type: none"> • PI3K инхибитори • Андрогенна блокада 	<ul style="list-style-type: none"> • EGFR инхибитори • mTOR инхибитори • MET инхибитори

Фигура 7 Предложение за персонализиране на терапевтичните подходи в зависимост от подтипа на КМЖ.

ИЗВОДИ

06

ГЛАВА ШЕСТА

Изводи и заклучение

6 ИЗВОДИ

Въз основа на поставените цели и задачи на настоящата дисертация, могат се формулират следните изводи, които предоставят отговори на всяка от задачите:

1. Клинични характеристики и връзка с ППО:

Извод: Анализът на клиничните характеристики на пациентките ($n=130$) с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза в стадий IIIa/б показва, че клиничните фактори като стадий IIIa/б (cT0-3 cN2 cM0 или cT4 cN0-2 cM0), над или под средната възраст на кохортата (т.е. 52г) и брой цикли НАХТ (т.е. точно C6 или < C6), нямат статистическо значимо влияние върху вероятността за постигане на пълен патологичен отговор след антрациклин базирана неoadювантна химиотерапия.

2. Хистопатологични морфологични особености и ППО:

Извод: Хистопатологичните изследвания разкриват специфични морфологични особености на туморите, които корелират с честотата на ППО. Ниската туморна диференциация (G3) и наличие на DCIS компонента в пробите от дебелиоглената биопсия са свързани с по-добър отговор на НАХТ в общата изследвана популация.

3. Имунохистохимични биомаркерни експресии и ППО:

Извод: Експресията на биомаркери като ER, PR, HER2, EGFR, CK5, CD10, p53 и SALL4 се анализира и резултатите показват, че ER е самостоятелен предсказващ фактор за липса на ППО след антрациклин базирана НАХТ. Наличие на други биомаркери като CD10 и p53, при липса на EGFR, също показва значителна асоциация с ППО, което подчертава тяхната роля в предсказването на терапевтичния отговор.

4. Сравнение на биомаркерни експресии преди и след НАХТ:

ИЗВОДИ

Извод: Сравнението на имунохистохимичните биомаркерни експресии преди и след НАХТ показва, че няма статистически значима промяна в експресията на биомаркерите при тумори, които не са постигнали ППО. Несъответствието на биомаркерната експресия, преди и след НАХТ, е около 7% в зависимост от параметъра (между 3% и 16%). Тези данни подчертават стабилността на изследваните биомаркери.

5. Характеристики на HR-отрицателни пациентки и ППО:

Извод: При HR-отрицателните пациентки с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза (n=73) се установи по-висока честота на пълен патологичен отговор (n=31) след антрациклин базирана неoadювантна химиотерапия в сравнение с общата популация (n=40/130). Въпреки това, липсата на HR само по себе си не се асоциира с ППО. Наличието на CD10 при HR-отрицателните пациентки води до ППО в 78% от случаите.

6. Характеристики на пациентки с ТНКМЖ и ППО:

Извод: Пациентките с тройно негативен карцином на млечната жлеза (ТНКМЖ) показват значително по-висока честота на ППО след антрациклин базирана НАХТ в сравнение с други подтипове КМЖ. Това потвърждава известната висока чувствителност на ТНКМЖ към цитостатици. При CD10-положителните пациентки без експресия на EGFR, ППО се постига в 77% от случаите. CD10 е независим предсказващ фактор за отговор към антрациклин-базирана химиотерапия в тази кохорта.

7. Сравнение между Английската и Българската кохорти:

Извод: Сравнението между резултатите от Английската и Българската кохорти показва, че въпреки географските и медицинските различия, наблюдаваните тенденции и фактори, влияещи на ППО, са статистически сходни в приблизително 80% от параметрите.

7 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нашето проучване показва, че пациентките с тройно-негативен карцином на млечната жлеза постигат ППО по-често от тези с луминален подтип. Наличието на HR е силен предиктор за липса на ППО към антрациклин базирана НАХТ при инвазивен дуктален карцином, докато липсата на ER сама по себе си не е надежден предиктор. Данните показват, че ниско диференцирани карциноми (G3), съдържащи DCIS и експресиращи CD10 на фона на мутирал p53, постигат ППО по-често в HR-положителната кохорта. Клинични фактори като по-напреднал стадий (ШБ), по-млада възраст (<52 години) и шест цикъла НАХТ не показват статистически значими предимства за ППО. Многофакторният регресионен анализ свързва положителния ER с PR и CD10 експресия при мутирал p53.

При HR-отрицателни заболявания или ТНКМЖ, по-напредналото заболяване (ШБ) и по-млада възраст (<52 години) са свързани с по-честа ППО. CD10 при липса на EGFR е свързано с ППО в HR-отрицателната и ТНКМЖ кохорти. Транскриптомен анализ на P13K регулатора *MME* (CD10) показва редуцирана експресия, повишаваща резистентността към цитостатици.

Проучването подкрепя и допълва световната литература, определяйки нови потенциални подтипове карцином на млечната жлеза чрез допълнителни биомаркери с различно клинично поведение и чувствителност към антрациклин базирана терапия. Подобни открития позволяват изготвяне на персонализирани терапевтични подходи, които са от решаващо значение за създаване на специфични лечебни протоколи за различните подтипове рак на гърдата.

ПРИНОСИ

8 ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с научно-теоретичен характер:

- Откриване на фактори, свързани с пълен патологичен отговор (ППО) след антрациклин базирана неoadювантна химиотерапия (НАХТ) при карциноми на млечната жлеза в стадий III:
 - Оптимизиране на стратификацията и типизирането на карциноми на млечната жлеза чрез хистоморфологични параметри и панел от нерутинни молекулярни биомаркери.
 - Идентифициране и валидация на биомаркери, като ER, PR, HER2, EGFR, CK5, CD10, p53 и SALL4, част от които се асоциират с ППО.
 - Изясняване на взаимодействието между CD10, EGFR, CK5, SALL4 и p53 в постигането и предсказването на ППО при различните молекулярни подгрупи на карцинома на млечната жлеза.
 - Допълнително субгрупиране на ТНКМЖ с все още нерутинно използвани ИХХ биомаркери.

Приноси с научно-практичен характер:

- Определяне на клиничните характеристики на пациентките и хистопатологични особености на КМЖ в стадий IIIa/b и връзката с ППО след антрациклин базиран НАХТ.
- Подобряване на терапевтичния подход при пациентки с различни молекулярни подгрупи на КМЖ чрез допълнителното характеризиране на заболяванията и оптимизиране на тумор-агностичните терапевтични подходи.
- Подкрепа за клинични решения чрез интегриране на нови биомаркери в рутинната диагностика.

9 НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **DIMITROV G**, SHOUSHA S, & TROIANOVA P. CD10 EXPRESSION AS A POTENTIAL PREDICTOR OF PATHOLOGICAL COMPLETE RESPONSE IN ER-NEGATIVE AND TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER PATIENTS TREATED WITH ANTHRACYCLINE-BASED NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY. **EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY VOL. 135 (2024): 104885. DOI:10.1016/J.YEXMP.2024.104885.**
2. **DIMITROV G**, ATANASOVA M, MILUSHEVA Y, ET AL. THE ASSOCIATION BETWEEN BREAST CANCER MOLECULAR SUBTYPES AND PATHOLOGICAL COMPLETE RESPONSE AFTER NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY, **JOURNAL OF BULGARIAN CANCER SCIENTIFIC SOCIETY, 2/2022; P. 81-86, ISSN 2367-797X.**
3. **DIMITROV G**, ODZHAKOV F, & BAYTCHEV G. BREAST CANCER AND ITS IMPACT IN SOCIETY AT A GLANCE. **INT J SURG MED. (2015); 1(1): P. 7-11. DOI:10.5455/IJSM.188450.**
4. **DIMITROV G**, BAYTCHEV G, INKOV I, DIMITROV D. THE ADVANCEMENT AND HISTORY OF BREAST CANCER SURGICAL THERAPY AT A GLANCE. **INT J SURG MED. 2017; 3(2): P. 119-127. DOI:10.5455/IJSM.BREAST-SURGERY-HISTORY.**

БИБЛИОГРАФИЯ

9.1 УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ С ПУБЛИКУВАНИ РЕЗЮМЕТА

1. Биомаркери предсказващи пълен патологичен отговор при рак на гърдата., 8-ма конференция „medicRON“, 2-5 декември 2021г.
2. Лечение на рак на гърдата в град София през периода 2015-2019г., 9-та конференция „medicRON“, 1-4 декември 2022г.
3. ESMO in Focus Breast Cancer 2024, toxicity management of new drug molecules in adult patients. Institute for research breast cancer treatment, 7-8 June 2024, Bulgaria.



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ

КАТЕДРА ПО НУКЛЕАРНА МЕДИЦИНА, ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ И МЕДИЦИНСКА ОНКОЛОГИЯ

София, 2024г.