

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА ПО ХИРУРГИЯ**

**КЛИНИКА ПО ХИРУРГИЯ „ПРОФ. АЛЕКСАНДЪР СТАНИШЕВ“**

**УМБАЛ „АЛЕКСАНДРОВСКА“ ЕАД**

**Д-Р МАРИЕЛА БОРИСОВА ВАСИЛЕВА**

**АВТОРЕФЕРАТ НА**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН**

**„ДОКТОР“**

**НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: ОБЩА ХИРУРГИЯ**

**НА ТЕМА**

**„ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ ПРИ КАРЦИНОМА НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА“**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ**

**ПРОФ. Д-Р ГЕОРГИ ТОДОРОВ Д.М.**

**Рецензенти:**

**Доц. д-р Костадин Георгиев Ангелов**

**Проф. д-р Никола Николов Владов**

**София, 2016**

Дисертационният труд съдържа 167 страници и е онагледен с 16 таблици, 40 фигури и 5 приложения. Библиографската справка включва 291 автора, от които 9 са български.

Дисертационният труд е обсъден, приет и е насочен за защита от Катедрен съвет на Катедра по Хирургия на Медицински Университет-София.

Публичната защита ще се проведе на **24.03.2016 от 13:00 часа в аудитория „Проф. Янко Добрев“ на Клиника по хирургия УМБАЛ „Александровска“ ЕАД**, на основание чл. 4, ал. 2 от правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България, на чл. 5, ал. 2, във връзка с чл. 73, ал. 2 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински Университет-София и въз основа на заповед РК36-251/11.02.2016г. на Ректора на МУ-София, пред научно жури в състав:

**Председател:** 1. Проф. д-р Георги Тодоров, дм

**Членове:** 2. Доц. д-р Костадин Георгиев Ангелов, дм

3. Доц. д-р Йовчо Петков Йовчев, дм

4. Проф. д-р Никола Николов Владов, дмн

5. Проф. д-р Александър Петров Червеняков, дмн

**Резервни членове:** 1. Доц. Радка Петрова Кънева, дб

2. Доц. д-р Михаил Владимиров Радионов, дм

Материалите по защитата са на разположение Секретариата на Клиника по хирургия, УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, бул. „Георги Софийски“ №1 и са публикувани на интернет страницата на МУ-София

**Номерацията на фигурите и таблиците не отговаря на тази в дисертационния труд.**

*Учителят: Деца, запишете си изречението: „Рибата седеше на дървото“.*

*Ученикът: А нима рибите седят на дърветата?*

*Учителят: Ами... Това е било побъркана риба.*

*Из „Понеделник започва в събота“, Аркадий Стругацки, Борис Стругацки*

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

СЗО – Световна Здравна Организация

AACR - American Association for Cancer Research

NCI – National Cancer Institute

Progress partnership - PROGnosis RESearch Strategy

VEGF- васкуларен ендотелен растежен фактор

TGF- $\beta$  трансформиращия растежен фактор бета

PDGF - тромбоцитен растежен фактор

IGF1 - инсулиноподобен растежен фактор

SNP - single nucleotide polymorphism, единични нуклеотидни полиморфизми

TNM – Tumor- Node –Metastasis classification system

LNR – Lymph Node Ratio

FDA - U.S. Food and Drug Administration

QALYs - Quality-Adjusted Life-Years

MPO - Myeloperoxidase

LYZ - Lysozyme

CLCA2 - Calcium-activated chloride channel regulator 2

FBN1 - Fibrillin-1

FNDC1 - Fibronectin type III domain-containing protein 1 (izoform 2)

HER2/neo ECD - HER2/neo extracellular domain

IPA - Ingenuity® Pathway Analysis

## СЪДЪРЖАНИЕ

|  |    |
|--|----|
| Въведение.....   | 5  |
| Цел и задачи.....  | 8  |
| Първа глава.....   | 9  |
| Втора глава.....   | 19 |
| Трета глава.....   | 36 |
| Изследване на евентуалните прогностични фактори на околната среда..... | 41 |
| Изследване на прогностичните фактори свързани с човека.....            | 45 |
| Изследване на прогностичните фактори свързани с тумора.....            | 53 |
| Заключение.....  | 63 |
| Изводи.....  | 67 |
| Приноси.....   | 68 |
| Библиография.....  | 68 |
| Публикации.....  | 75 |
| Участия в конгреси.....  | 75 |

## ВЪВЕДЕНИЕ

Карциномът на млечната жлеза представлява злокачествен тумор, който се развива в тъканта на млечната жлеза. Според данни на Световната Здравна Организация (СЗО) той е вторият най-чест карцином в света, като и до днес остава, най-разпространеният при жените. Само през 2012 са установени 1,67 милиона нови случая по целия свят, което представлява 25% от всички карциноми. Това е и най – честият карцином сред жените едновременно в развитите и развиващите се страни, като абсолютният брой на новите случаи в развиващите се региони е по-голям. Честотата на новите случаи варира близо 4 пъти между отделните региони в света започвайки от 27/100 000 в Средна Африка и Източна Азия до 96/100 000 в Западна Европа.<sup>1</sup>

Както Световната Здравна Организация (СЗО) така и Американската Асоциация за Изследване на Рака (American Association for Cancer Research, AACR) публикуват проучвания, с които предсказват тенденциите в епидемиологията на карцинома на млечната жлеза до 2030г. И двете организации предсказват бързо увеличаване броя на новите случаи. СЗО публикува своите резултати през 2012г. като предвижда увеличаване със 75% на общия брой на новите случаи на злокачествени заболявания. Това увеличение е за сметка на карциномите асоциирани с репродуктивни, диетични и хормонални фактори, какъвто е и карциномът на млечната жлеза.<sup>2</sup>

През 2015 г. на годишната среща на Американската Асоциация за Изследване на Рака Филип Розенберг, водещ изследовател на Националния Раков Институт (National Cancer Institute, NCI), показва няколко тенденции в епидемиологията на рака на млечната жлеза:

1. Очаквано е повишаване на броя на новите случаи (както на инвазивен така и на и ин ситу карцином) с 50% до 2030г.
2. В отделните възрастови групи се очаква както следва: понижаване на новите случаи сред жените между 50 и 69 години с 50% и повишаване броят на новите случаи в групата между 70-84 години, в която възраст карциномът на млечната жлеза е най-разпространен<sup>3</sup>, от 24% до 35%.
3. Различните тенденции във възрастовите групи се обясняват с нарастването на карциномите позитивни за естрогенен рецептор (които се срещат в по-късна възраст) и намаляване на хормон негативните и тройно негативните карциноми (характерни за по-ранната възраст).

4. Така през следващите няколко декади родените между 1946г. и 1964г. ще имат висок абсолютен риск за развитие на постменопаузален карцином на млечната жлеза, докато тези сега на възраст между 20 и малко над 30 години, ще имат сериозен риск от развитие на пременопаузален.<sup>4</sup>

Ракът на гърдата е пети по причина за смърт сред злокачествените заболявания. За 2012г. е най-честа причина за смърт при жените в развиващите се региони и втори в развития свят след рака на белия дроб. Нивата на смъртност в различните региони се различават по-малко от тези на заболяемост, заради по-добрата преживяемост в развитите страни, където и честотата е по-голяма. Смъртността варира от 6/100 000 в Източна Азия до 20/100 000 в Западна Африка.<sup>1</sup>

За Европа средната 5 годишна преживяемост е 81,8%. България се нарежда на предпоследно място в Европа със средна 5-годишна преживяемост от 71,7 % следвана само от Полша със 71,6%.<sup>5</sup>

Тенденциите в епидемиологията на различните видове карциноми на млечната жлеза изискват и различни подходи в профилактиката, диагнозата и лечението. С въвеждането на персонализираната медицина се появява и тенденцията за изследване на отделни характеристики на пациента, тумора или заобикалящата ги среда. Значението на тези характеристики за прогнозата и избора на терапия ги определя като прогностични и/или предиктивни фактори.

Съществува голямо разнообразие от възможни прогностични фактори, което ги прави трудни за определяне, доказване и класифициране. Създаването на по-подробна класификация на тези фактори ще подобри познаването им и може да предскаже появата на нови.

Прогностичните фактори са използвани за определяне прогнозата на пациента в конкретен момент, но във времето тази прогноза може да се промени. Това се дължи не само на природата на тумора или самото остаряване на пациента, а най-вече на взаимодействието на всички фактори свързани с тумора, пациента, лечението и околната среда, които променят прогнозата по начин, който не винаги може да се предскаже.

В края на настоящия труд ни беше трудно да посочим прогностични фактори, които да не зависят от времето. Това показва, че шансовете на пациента не са постоянни и тяхното проследяване и оценка във времето може да подобри индивидуализираната грижа за болния.

Дисертационен труд е съставен от 5 части. Първата част представлява **обзор** на развитието и съвременното разбиране на концепцията за прогностичните фактори, който и не е представен в настоящия автореферат. Обзорът е последван от три глави, разглеждащи различни аспекти на прогностичните и предиктивни фактори.

**Първата глава** представя подробна класификация на прогностичните и предиктивни фактори, като обединява досега описани класификации, но се съсредоточава най-вече върху влиянието на времето върху пациента и неговата прогноза.

**Втората глава** представя ретроспективно изследване на прогностичните фактори за пациентите диагностицирани и лекувани за периода от 2010 до 2015г в Клиника по хирургия „Проф. Александър Станишев“ на УМБАЛ „Александровска“.

**Третата глава** представя приносите на биобанкирането в изследването на прогностичните и предиктивни фактори. Специално за целта е създадена тъканна биобанка за карциноми на млечната жлеза. Изследвана е прогностичната стойност на факторите свързани с качеството на живот на пациентите и околната среда; полиморфизми на гена на васкуларния ендотелен растежен фактор в ДНК от кръв; част от протеомния профил на туморната тъкан.

Последната част на настоящия труд е **заключение**, което обобщава получените резултати и представя мястото им в съвременното лечение и разбиране на карцинома на млечната жлеза. Описани са бъдещите насоки за развитие на изследванията и са представени приносите.

Създаването на биобанка за карциноми на млечната жлеза и изследването на полиморфизмите на гена на васкуларния ендотелен растежен фактор е финансирано с докторантски проекти към МУ-София, Съвет по медицинска наука за финансиране на научни изследвания (27-Д/2013; 28-Д/2014 и 13-Д /2015).

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Цел:** Да се открият нови и утвърдят доказани прогностични и предиктивни фактори при карцинома на млечната жлеза

### **Задачи:**

1. Да се създаде обобщена класификация на прогностичните и предиктивни фактори при карцинома на млечната жлеза
2. Да се оцени стойността на прогностичните фактори при болните лекувани в Клиника по хирургия „Александър Станишев“ на УМБАЛ „Александровска“ за периода от Януари 2010г. до Юли 2015г.
3. Да се оценят приносите на биобанкирането в изследването на прогностичните и предиктивни фактори
  - 1) Да се изследват евентуалните прогностични фактори свързани с околната среда
  - 2) Да се оцени значението на наличието на полиморфизми на васкуларния ендотелен растежен фактор (VEGF) при пациентите за прогнозата
  - 3) Да се оцени значението на протеомният профил на туморите за прогнозата

## **ПЪРВА ГЛАВА**

### **Обобщена класификация на прогностичните и предиктивни фактори при карцинома на млечната жлеза**

На базата на вече съществуващи класификации на прогностичните и предиктивните фактори, описани в литературния обзор, предлагаме нова обобщена класификация, която по-добре показва конкретното място на всеки един фактор. За създаването на тази обобщена класификация първо определихме всеки един фактор като свързан с пациента, свързан с тумора или свързан с околната среда. След това определихме, основните фактори (тези, които биха променили терапията за пациента, тъй като имат едновременно прогностична и предиктивна стойност) и допълнителните фактори (тези, с доказано прогностично значение, които на базата на сегашните познания, не променят лечението на пациента) сред споменатите групи. Както основните така и допълнителните фактори могат да бъдат постоянни във времето или да се променят с времето. С други думи факторите, които зависят от времето, могат да описват състояние (описание на тумора в конкретен момент) или промяна (описание на промяната в пациента, тумора или околната среда). По този начин, предложената класификация е представена на таблица 1.

Таблица 1. Предложение за класификация на прогностичните и предиктивни фактори

| Прогностичен фактор                      | Основен  |  |                                     | Допълнителен             |                    |                                     |
|--|--|--|-------------------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------------------|
|  | Независим от времето                           | Зависим от времето   |                                     | Независим от времето     | Зависим от времето |                                     |
|  |  | Описващ състояние  | Описващ промяната                   |                          | Описващ състояние  | Описващ промяната                   |
| <b>Фактори свързани с пациента</b>       | Възраст на диагноза, раса, менопаузален статус | Придружаващи заболявания                                   | Преживяемост след диагнозата        | Индекс на телесната маса | депресия           | Съотношението неутрофили /лимфоцити |
| <b>Фактори свързани с тумора</b>         | Хистологичен вид                               | Рецептор за естроген, прогестерон                          | Съотношение между тумора и отговора | Е-кадхерин               | Е-кадхерин         | Времето за удвояване на размера     |
| <b>Фактори свързани с околната среда</b> | Социален статус                                | Хирургично лечение<br>Достъп до лечение<br>Социален статус | Година на диагноза                  | Лъчетерапия              | Качество на живот  | Тютюнопушене                        |

Първо всички фактори включени в класификацията трябва да имат доказана прогностична стойност за преживяемостта на пациента.

### **Прогностични фактори свързани с пациента**

#### **Възраст при диагноза**

Възрастта при диагноза е фактор с доказана прогностична стойност в много проучвания.<sup>6,7,8</sup> Установено, че тя е важна в процеса на взимане на решение относно адювантната терапия, независимо от аксиларния статус.<sup>9</sup> В проучване на T. Siu и съавтори се разглежда влиянието на възрастта на диагноза върху процеса на взимане на решения за избора на лечение. Авторите намират значима разлика в препоръките за хирургично лечение и химиотерапия за всяка възрастова група.<sup>10</sup> Последното издание на препоръките на NCCN също предлага различно лечение на пациентите над 70 годишна възраст.<sup>11</sup> Това прави възрастта на диагноза доказан, основен и независим от времето прогностичен фактор при карцинома на млечната жлеза.

#### **Раса**

В наши дни е вече доказано, че субтипозите карцином на млечната жлеза се срещат с различна честота сред жените от различна раса.<sup>12</sup> Доказано е също, че черната раса сама по себе си е прогностичен фактор.<sup>13, 14</sup> Проучване върху 1928 пациенти, в което са изследвани предикторите на прогресия на тумора по време на неoadювантната терапия, намира расата като независим фактор за предсказване на прогресията на заболяването в мултивариантни проучвания.<sup>15</sup> Проучването показва, че расата е също и предиктивен фактор за отговор към терапията. Това прави расата основен, независим от времето, свързан с пациента прогностичен фактор.

#### **Менопаузален статус**

Менопаузалния статус е доказан прогностичен фактор за общата преживяемост и преживяемостта свободна от рецидив.<sup>16</sup> Той е важен също за процеса на взимане на решение за терапията. В препоръките на Европейската Асоциация по Медицинска Онкология за диагноза, лечение и проследяване на пациенти с първичен карцином избора на лечение първично се определя от менопаузалния статус на пациента.<sup>17</sup> Менопаузалния статус е основен, свързан с пациента и независим от времето прогностичен фактор.

### **Придружаващи заболявания**

Много проучвания намират, че пациентите с карцином на млечната жлеза, които имат придружаващи заболявания, имат по бедна прогноза от тези, които нямат.<sup>18,19</sup> В проучване на значението на придружаващите заболявания се докладва, че пациентите с придружаващи заболявания по-често не получават стандартно лечение като вид хирургична интервенция, химиотерапия или лъчетерапия, в сравнение с пациентите без заболявания и съответно техния шанс за завършване на курса на лечение е по-малък.<sup>20</sup>

Придружаващите заболявания са първият фактор променящ се с времето, който разглеждаме. При всички фактори, които се променят с времето, може да се приложи идеята, че единично измерване на дадена величина е фактор описващ състоянието в конкретен момент, докато измерване на промяната във величината, описва скоростта на изменение. Все още не всички прогностични и предиктивни фактори са изследвани повече от веднъж при даден болен, за да се оцени тяхната промяна.

Придружаващите заболявания са основен, свързан с пациента и зависим от времето фактор в дадените примери.

### **Преживяемост след диагноза**

Времето след поставяне на диагнозата е друг фактор свързан с пациента. В своя преглед на прогностичните фактори за дългогодишна преживяемост при карцинома на млечната жлеза от 2008 година I. Soerjomataram и съавтори докладват проучвания доказващи, че колкото по-дълго живее една болна с карцином на млечната жлеза, толкова повече се подобрява нейната прогноза.<sup>21</sup> Преживяемост свободна от заболяване по-малко от 2 години показва значително по-висока вероятност от рецидив или смърт. Резултатите са съвместими с други доклади, особено при наличие на костни метастази.<sup>22</sup>

Пример за това е проучване от 2015 изследващо преживяемостта при пациентки с карцином на млечната жлеза и костни метастази. Авторите намират, че взимайки в предвид интервала свободен от костни метастази, преживяемостта се подобрява с всяка изминала година след първата.<sup>23</sup> Това показва, че преживяемостта свободна от събития е прогностичен фактор за общата преживяемост, а също и свързан с пациента, зависим от времето и описващ промяната фактор, който променя приложената терапия.

### **Индекса на телесна маса (BMI)**

Мета-анализ от 2014г. изследва връзката между индекса на телесната маса и преживяемостта при жени с карцином на гърдата. Той включва 79 публикации 82 проучвания, проследяващи 213 075 пациентки. Авторите изследват индекса на телесна маса преди диагнозата, по-малко от 12 месеца след диагнозата и повече от 12 месеца след диагнозата. Техните резултати ясно подкрепят факта, че при пациентки с карцином на млечната жлеза, по-високия индекс на телесна маса е свързан с по-ниска обща и специфична преживяемост, независимо от това кога е отчетен.<sup>24</sup>

### **Депресията**

Проучване на A. Vodermaier и съавтори доказва депресията като прогностичен фактор. Тя е изследвана като биноминална променлива- пациентите са разделени на такива с и без депресия. Авторите анализират наличието на депресия в зависимост от стадия на болния. Те установяват, че депресията има значение за специфичната и общата преживяемост при пациенти I<sup>ви</sup> и II<sup>ри</sup> стадий.<sup>25</sup>

N. Zainal и съавтори изследват наблюдателни проучвания сред пациенти с карцином на млечната жлеза. В тяхното проучване депресията също е разгледана като биноминална характеристика, определена на базата на дискусия или клинична оценка.<sup>26</sup> Ние приемаме депресията като зависима от времето променлива описваща състоянието в конкретен момент, тъй като тя може да се прояви във всеки един момент от лечението на пациента или след неговото приключване. Друго проучване изследва намаляването на симптомите на депресия в асоциация с по-дълга преживяемост при пациенти с метастатичен карцином и намира подобряване на преживяемостта.<sup>27</sup> Намаляването на симптомите на депресия е отделен прогностичен фактор описващ промяната

### **Съотношението на неутрофилите към лимфоцитите**

Мета-анализ от 2015г. изследва публикуваните проучвания върху това съотношение и включва 4 293 пациенти. Авторите изследват връзката между съотношението на неутрофилите и лимфоцитите и общата, специфичната и преживяемостта свободна от заболяване. Резултатите показват, че повишената стойност на това съотношение е свързана с влошена обща и преживяемост свободна от заболяване.<sup>28</sup> Предиктивна стойност на съотношението на неутрофилите към лимфоцитите се нуждае от доказване.<sup>29</sup> Следователно единичната оценка на съотношението преди лечението е допълнителен, зависим от времето и описващ състоянието прогностичен фактор. Намерихме и едно проучване, което изследва промяната на съотношението

на неутрофилите и лимфоцитите като прогностичен фактор при болни в IV<sup>ти</sup> стадий на карцином на млечната. То показва, че това съотношение може да бъде и фактор описващ промяната.<sup>30</sup>

### **Прогностични фактори, свързани с тумора**

#### **Хистологичен тип**

Хистологичния тип е доказан прогностичен фактор при карцинома на млечната жлеза.<sup>31</sup> В проучване на разликите в хистологичните видове на този карцином на и отговора на неoadювантна терапия, се установява, че общата и преживяемостта свободна от заболяване е значително по-кратка за болните с метапластичен или инвазивен лобуларен карцином. Въпреки слабия отговор, пациентите с муцинозен и апокринен карцином, имат добра прогноза. Следователно дори хистологичния тип да не се взема в предвид в препоръките за лечение има доказателства, че той може да промени лечението.<sup>32</sup> Следователно хистологичния тип е свързан с тумора, основен и независим от времето прогностичен фактор.

#### **Рецептор за естроген (ER), рецептор за прогестерон (PR), рецептор за епидермален растежен фактор 2 (HER2), p53 и Ki-67**

Рецептора за естроген, прогестерон и епидермалния растежен фактор 2 са сред най-често изследваните прогностични фактори свързани с тумора. Те имат доказана прогностична<sup>33, 34</sup> и предиктивна стойност.<sup>35,36</sup> Освен това през 2011г. R. Nishimura и съавтори публикуват проучване изследващо промяната на ER, PgR, HER2, p53 и Ki-67 при появата на рецидивен карцином на млечната жлеза. Промяна е наблюдавана при всички изследвани фактори. Следователно ние можем да ги класифицираме като свързани с тумора, основни, зависими от времето, описващи състоянието в конкретен момент прогностични фактори.<sup>37</sup>

#### **Патологичния отговор или съотношението между тумора и отговора към терапия**

През 2011 г мета-анализ проверява хипотезата, дали патологичния отговор към неoadювантната терапия е прогностичен за далечните резултати. Анализът включва 16 проучвания и 3776 пациенти. Резултатите потвърждават патологичния отговор като прогностичен индикатор за преживяемостта и предполагат, че пациентите постигнали пълен отговор след терапията имат по-добра прогноза.<sup>38</sup> В случай на частичен отговор, пациента може да има полза от по-продължително лечение за да постигне пълен отговор. В случай на липса на отговор или дори прогресия на заболяването, хирургичната интервенция може да се преосмисли в по-ранни етапи на лечението. Така

пациентите могат поне да бъдат предпазени от получаването на токсични лекарства, от които нямат полза.<sup>39</sup>

Друг начин да се оцени отговора на тумора, е чрез съотношението между тумора и отговора. То отразява частта от тумора останала след като пациента премине неоадювантната терапия и преди всякаква хирургична интервенция. Доказано е, че това съотношение е предиктивно за преживяемостта при пациенти с I-III<sup>ти</sup> стадий карцином на гърдата, при които е проведена неоадювантна терапия.<sup>40</sup> Това прави съотношението между тумора и отговора, основен, свързан с тумора и описващ промяната фактор.

### **Загубата на E- кадхерин**

E-кадхеринът представлява адхезионна молекула на туморната клетка. Неговата ниска експресия или загуба на експресия се свързва с туморна дедиференциация и повишен метастатичен потенциал. Доказан е като независим фактор за преживяемостта свободна от заболяване<sup>41</sup> и общата преживяемост<sup>42</sup> при пациенти с карцином на млечната жлеза. В проучване на Yoshida R. и съавтори се установява, че експресията на E-кадхерин е намалена или липсва в метастатичните лимфни възли, независимо от експресията в първичния тумор. Авторите предполагат, че промяната в експресията на E-кадхерин е свързана не само с далечните метастази, но и с метастазите в лимфните възли.<sup>43</sup> Също загубата на E-кадхерин се свързва с по-напреднал стадий, подкрепяйки идеята, че това е маркер за агресивност.<sup>44</sup> Не можахме да открием проучване, което да изследва промяната в експресията на E-кадхерин в случай на рецидив, затова не можем да бъдем сигурни, че този фактор е независим от времето. В настоящата класификация той е допълнителен и свързан с тумора прогностичен фактор.

### **Времето за удвояване на тумора**

В своята книга „Естествена история и прогностични маркери“ R. Margolese и съавтори оценяват времето за удвояване размера на тумора при първичен карцином на млечната жлеза. Те сравняват скоростта на растеж на тумора в няколко проучвания и намират, че средното време за удвояване на размера е между 215 и 325 дни. Авторите заключават, че ако карциномът се развива от единична клетка и расте с постоянна скорост на удвояване на размера, ще са му необходими около 20 години за да достигне размер 1-2 см в диаметър. Тумор с по-голяма скорост на нарастване, като например 100 дни, ще се нуждае от 10 години за да стане клинично доловим. Значително по бързо растящ тумор (време за удвояване на размера 20 дни), ще се прояви само 2

години по-рано. Тумор с размер 2 мм, нарастващ със средното установено време за удвояване на размера, ще се нуждае от 4 години за да достигне размер 1 см. Трябва да се вземе в предвид и, че скоростта на нарастване, не е постоянна за тумора. Тези наблюдения могат да обяснят сравнително по-бедната прогноза показана в много проучвания за по-младите жени (<35 години). Авторите предполагат, че тези жени имат в по-голямата си част бързо растящи, по-агресивни тумори, тъй като бавно растящите не биха имали време да станат клинично доловими до тази възраст. Следователно времето за удвояване размера на тумора е допълнителен фактор описващ промяната.<sup>45</sup>

### **Прогностични фактори свързани с околната среда:**

#### **Социален статус**

Проучване от 2006г. оценява и обяснява социалните неравенства в преживяемостта от карцином на млечната жлеза в швейцарския кантон на Женева, където цената на здравеопазването и очакваната продължителност на живот са едни от най-високите в света. Това проучване включва 3 920 жени, жителки на Женева, които са диагностицирани с инвазивен карцином преди да достигнат 70 годишна възраст, за 20 годишен период от време между 1980г. и 2000г. Пациентките са разделени в 4 социално-икономически групи, според последната им месторабота. Когато се сравняват пациентките сред различните групи, тези, от нисък социален клас, имат повишен риск от смърт от карцином. Авторите установяват също, че тези жени по-често са чужденки, по-рядко са диагностицирани по време на скрининг и по-често са в напреднал стадий. Установява се и разлика в приложеното лечение. Те по-рядко претърпяват органосъхраняващи операции и по-рядко получават хормоно- и химиотерапия, най-вече при наличие на позитивни лимфни възли. Когато всички тези фактори се вземат в предвид, пациентките от по-ниска социална група имат значително по-висок риск от смърт.<sup>46</sup> Не можахме да намерим проучване, което да изследва значението на промяната в социалния статус при пациентки с карцином на млечната жлеза. И за това приемаме, че това е допълнителен и независим от времето прогностичен фактор свързан с околната среда.

#### **Вид операция**

Това е зависим от времето, описващ състоянието, основен фактор на околната среда. Той е оценен и доказан като прогностичен.<sup>47</sup> Обема на оперативната интервенция определя и прилагането на

лъчетерапия в процеса на лечение.<sup>48,46</sup> Вида на операцията е фактор, който може да се промени с времето, тъй като обемът на интервенцията може да се увеличи.

### **Достъп до лечение**

Достъпът до лечение е също изследван като фактор на околната среда в проучването на I. Soerjomataram и съавтори,<sup>21</sup> описано по-горе. Те установяват, че достъпа до лечение се е подобрил във времето в повечето индустриализирани страни и по-добра преживяемост се наблюдава във всички възрастови групи. Това показва, че достъпа до лечение е основен фактор на околната среда, който зависи от времето. То описва състоянието на пациента в конкретен момент.

### **Година на диагноза**

Потърсихме проучвания, които да сравняват преживяемостта в зависимост от годината на диагноза, за да докажем подобряването на лечението на карцинома на млечната жлеза през годините. Анализ на раковите регистри на Австралия, Канада, Дания, Норвегия, Швеция и Великобритания между 1995 и 2007 намира, че преживяемостта се подобрява за всички 4 типа карцином включени в проучването. За карцинома на млечната жлеза 5-годишната преживяемост е 85%, за пациенти диагностицирани между 1995-1999; 87% за пациенти диагностицирани между 2000г. и 2002г. и 88,1% за пациенти диагностицирани между 2005г. и 2007г.<sup>49</sup> Други проучвания също докладват подобни резултати<sup>50</sup> Това подобрене, може да се дължи на подобрене във всички етапи на лечението, като например въвеждането на мултидисциплинарната грижа в клиничната практика.<sup>51</sup>

### **Лъчетерапия**

Мета-анализ на ефекта от лъчетерапията, включващ 17 рандомизирани контролирани проучвания и повече от 10 000 пациенти доказва, че лъчетерапията, приложена след органосъхраняваща операция, намалява наполовина риска от рецидив. За сравнение абсолютната полза от лъчетерапията варира съществено според характеристиките на пациента и може да бъде предсказана в момента на определяне на терапията.<sup>150</sup> Лъчетерапията е допълнителен фактор на околната среда, описващ прогнозата за болния в конкретен момент.

### **Качество на живот**

Много проучвания изследват зависимостта между качеството на живот и прогнозата при пациентки с карцином на млечната жлеза. Като пример ще разгледаме проучване на M. Erplein и

съавтори. В проучването е включена информация за 2 230 жени, попълнили анкета при диагнозата и около 6 месеца след поставяне на диагнозата и информация от 1 845 жени попълнили анкета и на 36 тия месец след диагнозата. Това проучване намира, че сред пациентите преживели до 6 тия месец от диагнозата, социалното благополучие е значително свързано с понижен риск от рецидив и смърт. На 36 тия месец авторите не откриват асоциация на нито един от факторите на качеството на живот със смъртността и рецидивите. Ние класифицирахме качеството на живот като зависим от допълнителен фактор, зависим от времето фактор описващ моментното състояние.

### **Тютюнопушене**

Много проучвания изследват връзката между тютюнопушенето и смъртността от карцином на млечната жлеза. Едно от тях сравнява настоящите и бивши пушачи с никога не пушилите. Първоначално авторите не откриват значима зависимост. Когато взимат в предвид възрастта на диагноза те установяват, че сред настоящите пушачи специфичната смъртност се повишава в зависимост от експозицията, интензитета и продължителността на тютюнопушенето. Авторите извършват и мета-анализ, който показва статистически значимо повишаване на специфичната смъртност при пушачите в момента на диагноза в сравнение с никога не пушилите.<sup>52</sup> Друго скорошно проучване също намира повишен риск от рецидив и смъртност в зависимост от дозата.<sup>53</sup> Класифицирахме тютюнопушенето като допълнителен фактор на околната среда, променящ се с времето по смисъл на продължителност на тютюнопушенето и пакетогодини.

### **Заклучение**

В крайна сметка ни беше трудно да определим онези прогностични фактори, които не се променят с времето. Много от факторите са изследвани само в един момент от живота на пациента, по-често това е момента на диагнозата, и не са измервани отново в случай на по-късно събитие. По тази причина няма проучвания оценяващи значението на тяхната промяна за далечните резултати. Така някои от показателите, които ние смятаме, че биха се променили във времето, са описани в литературата само на базата на единично измерване.

Има проучвания, доказващи че значението на прогностичните фактори намалява с времето в зависимост от продължителността на проследяване<sup>54</sup> и с напредване на карциномния процес.<sup>2</sup> Те докладват, че кривите на преживяемостта, в зависимост от туморните прогностични фактори, показват голям спад на преживяемостта през първите 5 години след диагнозата, след което се стабилизират.<sup>50</sup> От тук нататък по-важни остават факторите свързани с пациента.

## ВТОРА ГЛАВА

Задачата, която си поставихме в тази глава, е да се оцени стойността на прогностичните фактори при болните лекувани в Клиника по хирургия „Александър Станишев“ на УМБАЛ „Александровска“ за периода от Януари 2010г. до Юли 2015г.

### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В изследването са включени 160 пациентки с хистологично доказан първичен инвазивен карцином на млечната жлеза. В отделни таблици са разгледани характеристиките на пациентите (таблица 2) и характеристиките на тумора (таблица 5).

#### 1. Характеристики на пациентките

Таблица 2. Характеристики на пациентите

| Фактор            | Общ брой пациенти |              | Анализ на прогностичната стойност |              |
|-------------------|-------------------|--------------|-----------------------------------|--------------|
|                   | Брой (160)        | %            | Брой (94)                         | %            |
| <b>възраст</b>    | <b>160</b>        | <b>100,0</b> | <b>94</b>                         | <b>100</b>   |
| до 39             | 13                | 8,1          | 10                                | 10,64        |
| от 40-69          | 124               | 77,5         | 76                                | 80,85        |
| над 70            | 23                | 14,4         | 8                                 | 8,51         |
| <b>стадий</b>     | <b>142</b>        | <b>88,8</b>  | <b>88</b>                         | <b>93,62</b> |
| стадий I          | 45                | 28,1         | 27                                | 28,72        |
| стадий II         | 57                | 35,6         | 31                                | 32,98        |
| стадий III        | 30                | 18,8         | 24                                | 25,53        |
| стадий IV         | 9                 | 5,6          | 6                                 | 6,38         |
| <b>CEA</b>        | <b>76</b>         | <b>47,5</b>  | <b>55</b>                         | <b>58,51</b> |
| повишен           | 10                | 6,3          | 6                                 | 6,38         |
| <b>Ca 15-3</b>    | <b>125</b>        | <b>78,1</b>  | <b>77</b>                         | <b>81,91</b> |
| повишен           | 22                | 13,8         | 11                                | 11,70        |
| <b>NLR</b>        | <b>50</b>         | <b>31,3</b>  | <b>39</b>                         | <b>41,49</b> |
| повишено          | 23                | 14,4         | 11                                | 11,70        |
| <b>PLR</b>        | <b>49</b>         | <b>30,6</b>  | <b>38</b>                         | <b>40,43</b> |
| повишено          | 17                | 10,6         | 13                                | 13,83        |
| <b>фибриноген</b> | <b>110</b>        | <b>68,8</b>  | <b>53</b>                         | <b>56,38</b> |
| повишен           | 20                | 12,5         | 8                                 | 8,51         |

## 2. Характеристики на тумора

От пациентите включени в изследването Ki 67 е известен само при 32 болни, което направи невъзможно определянето на молекуления субтип при по-голямата част от тях. По тази причина разпределението на туморите по луминален тип е извършено на базата на класификация приложена от С. Parise и V. Caggiano през 2014г. Според нея луминалният тип може да се определи само с помощта на хормоналният, HER2 статуса и диференцираността на тумора.<sup>55</sup> Разпределението на туморите според молекуления субтип е представено на таблица 3.

Таблица 3. Класификация на туморите по молекулен тип според рецепторния статус

| луминален тип       | рецептори   |
|---------------------|-------------|
| луминален А         | ER+PR+HER2- |
|                     | ER+PR-HER2- |
|                     | ER-PR+HER2- |
| луминален В, HER2 - | ER+PR+HER2- |
|                     | ER+PR-HER2- |
|                     | ER-PR+HER2- |
| луминален В, HER2 + | ER+PR+HER2+ |
|                     | ER+PR-HER2+ |
|                     | ER-PR-HER2+ |
| тройно негативен    | ER-PR-HER2- |
| HER2 преекспресиращ | ER-PR-HER2+ |

На базата на дадената класификация, пациентите от изследването се класифицират както следва на таблица 4.

Таблица 4. Разпределение на туморите по луминален тип

| молекулен субтип     | 140 (160) | 81(94) |
|----------------------|-----------|--------|
| лиминален А тип      | 58        | 30     |
| луминален В тип      | 54        | 31     |
| тройно негативен тип | 18        | 14     |
| HER2 преекспресиращ  | 10        | 6      |

Разпределението на пациентите според всички останали характеристики на тумора е представено на таблица 5.

Таблица 5. Разпределение на туморните характеристики

| Фактор                                    | Общ брой пациенти |             | Анализ на прогностичната стойност |              |
|---|-------------------|-------------|-----------------------------------|--------------|
|   | брой (160)        | %           | брой (94)                         | %            |
| <b>T</b>                                  | <b>159</b>        | <b>99,4</b> | <b>93</b>                         | <b>98,9</b>  |
| T1  | 70                | 43,8        | 42                                | 44,7         |
| T2  | 60                | 37,5        | 32                                | 34,0         |
| T3  | 13                | 8,1         | 9                                 | 9,6          |
| T4  | 16                | 10,0        | 10                                | 10,6         |
| <b>множественост</b>                      | <b>156</b>        | <b>97,5</b> | <b>91</b>                         | <b>96,8</b>  |
| множествени                               | 18                | 11,3        | 9                                 | 9,6          |
| <b>диференцираност</b>                    | <b>141</b>        | <b>88,1</b> | <b>82</b>                         | <b>87,2</b>  |
| G1  | 16                | 10,0        | <b>12</b>                         | 12,8         |
| G2  | 49                | 30,6        | 25                                | 26,6         |
| G3  | 76                | 47,5        | <b>45</b>                         | 47,9         |
| <b>хистологичен вид</b>                   | <b>159</b>        | <b>99,4</b> | <b>94</b>                         | <b>100,0</b> |
| дуктални                                  | 127               | 79,4        | <b>78</b>                         | 83,0         |
| лобуларни                                 | 16                | 10,0        | <b>7</b>                          | 7,4          |
| други                                     | 16                | 10,0        | <b>9</b>                          | 9,6          |
| <b>инфилтрация на околната тъкан</b>      | <b>137</b>        | <b>85,6</b> | <b>82</b>                         | <b>87,2</b>  |
| с инфилтрация                             | 126               | 78,8        | <b>71</b>                         | 75,5         |
| <b>статус на аксиларните лимфни възли</b> | <b>138</b>        | <b>86,3</b> | <b>86</b>                         | <b>91,5</b>  |
| позитивен                                 | 68                | 42,5        | <b>47</b>                         | 50,0         |
| <b>N</b>                                  | <b>138</b>        | <b>86,3</b> | <b>86</b>                         | <b>91,5</b>  |
| N0  | 69                | 43,1        | 39                                | 41,5         |
| N1  | 44                | 27,5        | 27                                | 28,7         |
| N2  | 16                | 10,0        | 14                                | 14,9         |

|                                     |            |             |           |             |
|-------------------------------------|------------|-------------|-----------|-------------|
| N3                                  | 9          | 5,6         | 6         | 6,4         |
| <b>LNR</b>                          | <b>133</b> | <b>83,1</b> | <b>82</b> | <b>87,2</b> |
| LNR>0,2                             | 30         | 18,8        | 22        | 23,4        |
| <b>ER</b>                           | <b>156</b> | <b>97,5</b> | <b>90</b> | <b>95,7</b> |
| позитивен                           | 128        | 80,0        | 70        | 74,5        |
| <b>PR</b>                           | <b>156</b> | <b>97,5</b> | <b>90</b> | <b>95,7</b> |
| позитивен                           | 111        | 69,4        | 62        | 66,0        |
| <b>HER2</b>                         | <b>153</b> | <b>95,6</b> | <b>88</b> | <b>93,6</b> |
| позитивен                           | 27         | 16,9        | 18        | 19,1        |
| <b>тройно негативен</b>             | <b>18</b>  | <b>11,3</b> | <b>14</b> | <b>14,9</b> |
| <b>тройно позитивен</b>             | <b>8</b>   | <b>5,0</b>  | <b>7</b>  | <b>7,4</b>  |
| <b>лимфно-васуларна<br/>инвазия</b> | <b>132</b> | <b>82,5</b> | <b>78</b> | <b>83,0</b> |
| позитивна                           | <b>71</b>  | 44,4        | 45        | 47,9        |
| <b>наличие</b> на                   | <b>150</b> | <b>93,8</b> | <b>89</b> | <b>94,7</b> |
| <b>неинвазивна<br/>компонента</b>   |            |             |           |             |
| позитивно                           | 54         | 33,8        | 31        | 33,0        |
| <b>наличие</b> на                   | <b>159</b> | <b>99,4</b> | <b>93</b> | <b>98,9</b> |
| <b>метастази</b>                    |            |             |           |             |
| M1                                  | 9          | 5,6         | 6         | 6,4         |

### 3. Фактори свързани с околната среда и лечението

В настоящия труд като лечебни методи са разгледани хирургичното лечение и прилагането на неоадювантна терапия. Нямаме данни за приложената адювантна терапия на пациентите.

#### 1. Хирургично лечение

Разпределението на оперативните интервенции по обем е дадено на следната таблица.

Таблица 6. Разпределение на пациентите според обема на оперативната интервенция и стадия на заболяването.

| стадий | квадрантектomia | мастектомия | общо |
|--------|-----------------|-------------|------|
| 1      | 32              | 13          | 45   |
| 2      | 31              | 27          | 58   |
| 3      | 7               | 22          | 29   |
| 4      | 1               | 4           | 5    |
| x      | 4               | 2           | 6    |
| общо   | 75              | 68          | 143  |

2. **Брой премахнати лимфни възли** – изследвани лимфни възли има при 134 (от 160) болни, като броят им варира от 1 до 35.

Настоящото изследване провери и хипотезата има ли статистически значима разлика в преживяемостта между болните, при които са премахнати по-малко от 6 лимфни възела (необходимият минимум според TNM) и такива, при които са премахнати повече от 7 лимфни възела. С до 6 дисецирани лимфни възела са 20 болни.

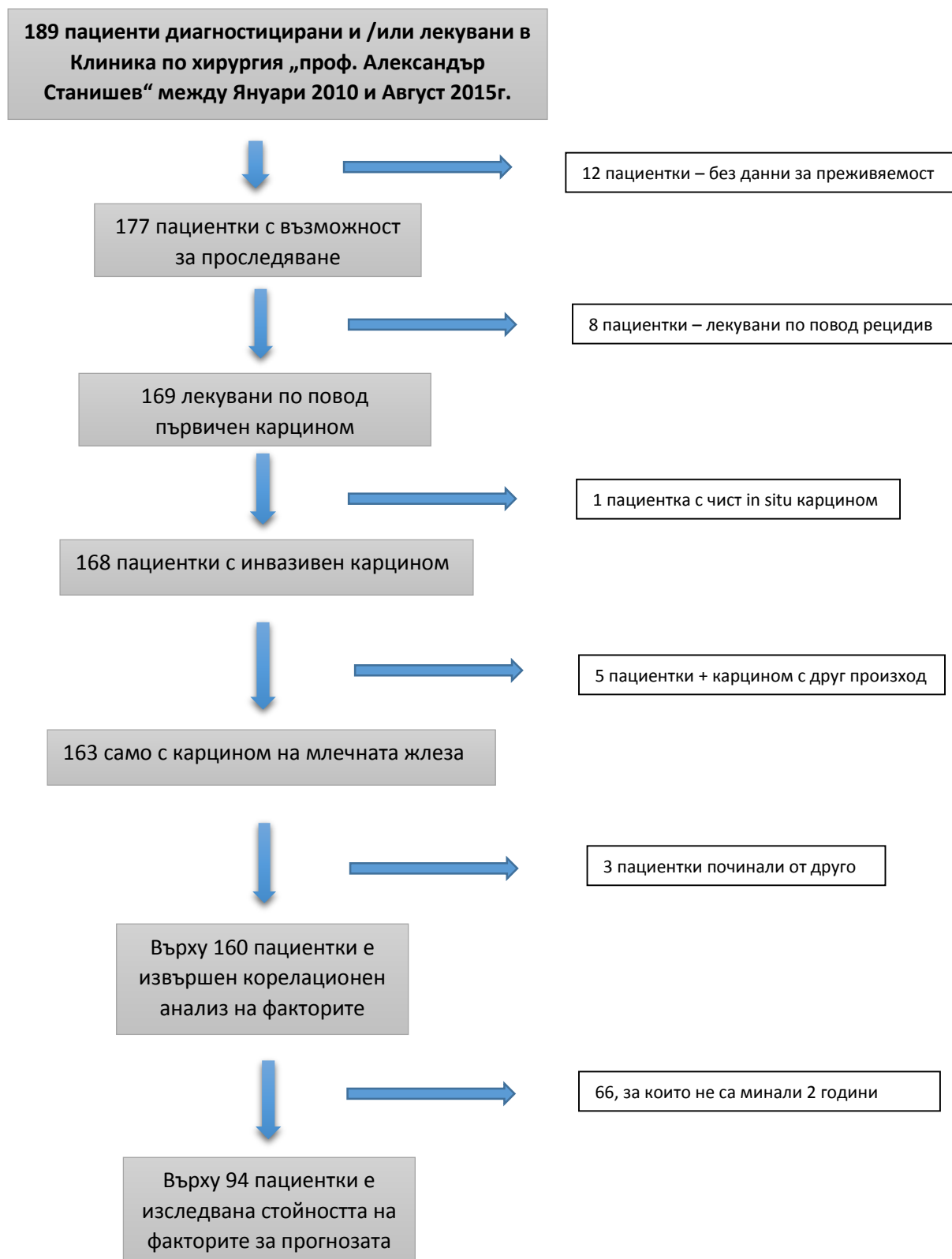
### 3. Неoadювантна терапия:

На неoadювантна терапия са изпратени 20 болни, част от които след приключване на терапията са радикално оперирани.

### Протокол на изследването

За описания период в Клиниката по хирургия „Проф. Александър Станишев“ са лекувани 189 болни с хистологично доказан карцином на млечната жлеза. От тях без данни за далечната преживяемост и/или преживяемост свободна от рецидив са 12 болни. От останалите 177, 7 болни са лекувани по повод на рецидив, а 1 болна е с доказан чист ин ситу карцином, поради което са изключени от изследването. В анализа остават 169 болни– жени на възраст от 30 до 86 с хистологично доказан първичен инвазивен карцином на млечната жлеза.

Протоколът за включване на пациенти в изследването е представен на фигура 1.



Фигура 1. Протокол за включване на пациентите в изследването на прогностичните фактори.

Изследването на болните лекувани в Клиниката по хирургия е извършено ретроспективно. Данните свързани с диагнозата и лечението на пациентите са взети от историите на заболяването, а данните за виталният статус и датата на смърт от Националният Раков Регистър.

За да се изследват прогностичните и предиктивни фактори при пациентите в клиниката се установи **преживяемостта (обща преживяемост)** на всеки един пациент (определена като времето от диагнозата до датата на смъртта), **преживяемостта свободна от заболяване** (определена като времето от диагнозата до датата на диагностициране на метастаза или рецидив или смъртта на пациента) и **времето свободно от събитие** (определено като времето от диагнозата до диагностицирането на рецидив или метастаза).

**Всички пациентки са проследени до 19.08.2015г- крайна дата на проучването.**

**Използваните статистически методи включват:**

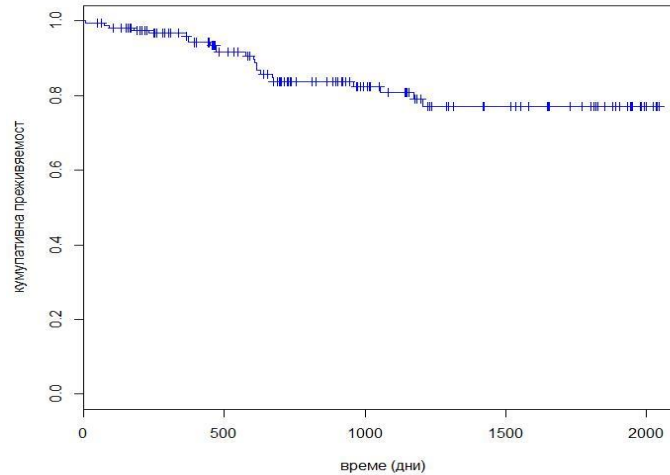
Kaplan Meier криви на преживяемостта,<sup>56</sup>Log rank,<sup>57</sup> Cox regression hazard model<sup>58</sup>  
Chi-square тест Тест на Фишер<sup>59</sup> и ANOVA.<sup>60</sup>

Анализът на преживяемостта е извършен на SPSS 16 и RStudio v0.99. Корелационен анализ е извършен на GUI for R – 2.15.

## РЕЗУЛТАТИ

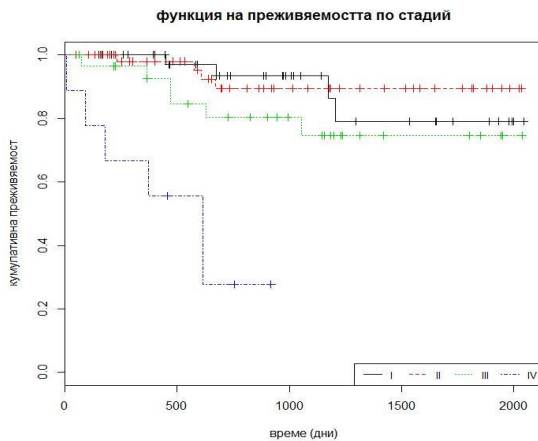
Всички изследвани показатели са тествани за връзка с преживяемостта с log rank метод. Намерени са 8 значими резултата. Някои от по – важните резултати са представени във вид на графика.

### Обща преживяемост



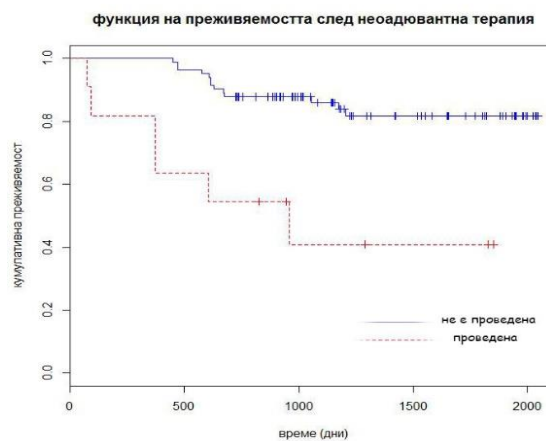
Фигура 2. Обща преживяемост на пациентите

### Преживяемост според стадия в момента на диагноза и при пациентите с и без проведена неoadювантна терапия



**Log rank p<0.001**

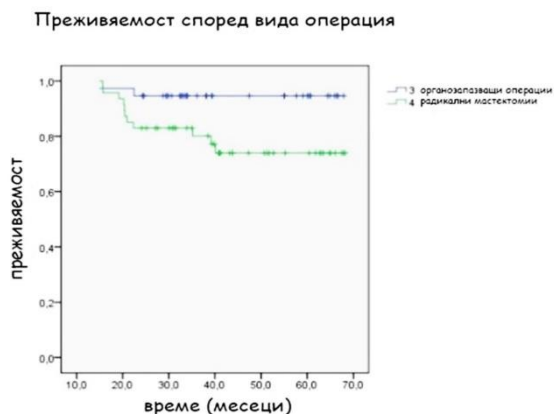
Фигура 3. Преживяемостта според стадия на пациентите



**Log rank p<0.001**

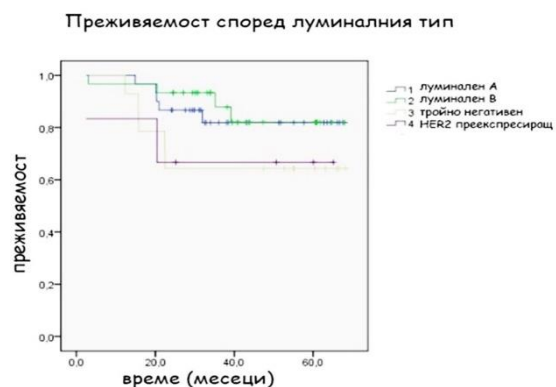
Фигура 4. Преживяемост според провеждането на неoadювантна терапия

### Преживяемост на пациентите в зависимост от вида на операцията и в зависимост от луминалния тип



**Log rank p=0,039**

Фигура 5. Преживяемост според вида на оперативната интервенция



**Log rank p=0,287**

Фигура 6. Преживяемост на пациентите според луминалния тип

Значимостта на прогностичните фактори за 2 годишната преживяемост (94 болни) е показана на отделни таблици за факторите свързани с пациента, тумора и лечението (таблица 7, 8 и 9). Значимостта е оценена с Cox regression models.

**Таблица 7. Значимост за преживяемостта на факторите свързани с пациента**

| Изследвани прогностични фактори   | 2 годишна преживяемост (p) |
|-----------------------------------|----------------------------|
| Възраст (до 39; 40-69; над 69)    | 0,295                      |
| CEA (норма/повишен)               | 0,985                      |
| <b>Ca 15-3 (норма/повишен)</b>    | <b>0,002</b>               |
| NLR (2,5)                         | 0,972                      |
| PLR (160)                         | 0,996                      |
| <b>Фибриноген (норма/повишен)</b> | <b>0,038</b>               |

**Таблица 8. Значимост за преживяемостта на факторите свързани с тумора**

| Изследвани прогностични фактори                          | 2 годишна преживяемост (p) |
|--|----------------------------|
| <b>Размер (mm)</b>                                       | <b>0,034</b>               |
| <b>T категория на TNM</b>                                | <b>0,001</b>               |
| Множественост  | 0,701                      |
| Диференцираност  | 0,347                      |
| <b>хистологичен вид ( дуктален/лобуларен)</b>            | <b>0,002</b>               |
| инфилтрация на околната тъкан,                           | 0,393                      |
| статус на аксиларните лимфни възли (позитивни/негативни) | 0,702                      |
| N категория на TNM                                       | 0,971                      |
| LNR (0,2)  | 0,528                      |
| <b>ER (позитивен/негативен)</b>                          | <b>0,047</b>               |
| <b>PR (позитивен/негативен)</b>                          | <b>0,048</b>               |
| HER-2 (позитивен/негативен)                              | 0,779                      |
| луминален тип  | 0,154                      |
| тройно негативен тип                                     | 0,141                      |
| Тройно позитивен тип                                     | 0,724                      |
| туморни емболи в лимфни съдове                           | 0,2                        |
| туморни емболи във венозни съдове                        | 0,646                      |
| Обобщено лимфно-васкуларна инвазия                       | 0,566                      |
| наличие на in situ компонента (дукталните)               | 0,107                      |
| <b>M категория на TNM</b>                                | <b>0,001</b>               |

**Таблица 9. Значимост за преживяемостта на факторите свързани с лечението**

| Изследвани прогностични фактори | 2 годишна преживяемост (p) |
|---------------------------------|----------------------------|
| <b>неoadювантна терапия</b>     | <b>0,001</b>               |
| Вид операция ( радикална)       | 0,058                      |
| Брой премахнати лимфни възли    | 0,928                      |

Когато при оценката на статистически значимите фактори се взе под внимание стадия на пациентите, своята статистическа значимост запази единствено хистологичния тип ( $p < 0,001$ ). Когато към модела за оценка на значението на хистологичния вид за преживяемостта, се добави вида операция (квадрантектомия или мастектомия), хистологичният вид запази своята статистическа значимост ( $p = 0,01$ ) за далечната преживяемост.

## **ОБСЪЖДАНЕ**

Всички изследвани фактори са оценени еднократно в момента на диагнозата. От проучването са изключени болните, лекувани по повод на рецидив, поради недостатъчна информация относно първичния тумор. По тези причини връзката на изследваните фактори с времето не може да бъде оценена.

Друг съществен недостатък на настоящето проучване е малкият брой пациенти, най-вече включените в анализа на преживяемостта, и краткото време на проследяване. До крайната дата на проследяване от 160 болни са починали 23; при 1 е регистриран рецидив, а при 4 далечни метастази. Малкият брой на събитията опорочава както изследването на преживяемостта свободна от заболяване, така и на общата преживяемост. Възможно е при едно по-продължително проследяване повече от изследваните фактори да демонстрират своята значимост.

### **Характеристики на пациента**

#### **1. Възраст**

За разлика от други проучвания, за които стана дума в предишната глава на настоящия труд, тук възрастта не успя да покаже статистическа значимост за преживяемостта, независимо дали е изследвана като количествена променлива, дали пациентите са разделени в групи под 50 и над 50 години (данните не са показани) или са разделени на млади възрастни до 39 години, от 40 до 69 години и над 70 години.

#### **2. Стадий**

Стадият е основен индикатор за прогнозата на болните. Нашите резултати показват една особена тенденция, а именно, че пациентите във втори стадий изместват тези в първи по преживяемост.

Въпреки това статистически значима разлика между преживяемостта в различните стадии съществува. Според нас тези резултати, се дължат на краткия период на проследяване на пациентите – средно 40,2 месеца.

### **3. Туморни маркери**

Туморните маркери са повишени при много малка част от пациентите. Дори специфичният за млечната жлеза Ca 15-3 е повишен само при 12% от болните, което е белег за тяхната малка диагностична чувствителност. Въпреки това стойността на Ca 15-3 успява да достигне статистическа значимост за преживяемостта, с което показва своето място в лечебно-диагностичния процес.

### **4. Съотношението на неутрофилите към лимфоцитите и съотношението на тромбоцитите към лимфоцитите ,**

Тези два сравнително нови прогностични маркера са доказали своето диагностично и прогностично значение. Малкият брой пациенти и събития, не ни позволи да намерим подходяща разделна стойност за тези две съотношения. В настоящия анализ приложихме най-често използваните разделни стойности, приложими за нашите резултати.<sup>61,62</sup>

### **5. Фибриноген**

Включихме фибриногена в анализа на преживяемостта на базата на не малко проучвания върху неговата прогностична стойност за преживяемостта, голяма част, от които публикувани съвсем наскоро.<sup>63,64</sup> Той доказва своята значимост за преживяемостта, макар и да загуби прогностична стойност, когато в модела се включи стадия на болните.

## **2. Характеристики на тумора**

### **1. Размер**

Размерът на тумора доказва своето значение, както като количествена характеристика (в мм), така и в T категорията на TNM. Самостоятелното значение на размера на тумора за преживяемостта е доказано многократно. В проучване от 2005 сред повече от 21 000 пациентки е установена зависимост между размера на тумора и преживяемостта, както при пациентките с налични метастази в лимфните възли, така и при тези без.<sup>65</sup>

## 2. Множественост

Значението на множествеността на раковия процес е много противоречиво, а оценката на значението на множествените карциноми е трудна. Това се дължи на няколко фактора първият, от които, е липсата на единна терминология дефинираща множествените карциноми. Много проучвания отдават значение и доказват, че наличието на повече от един фокус при карциномите на млечната жлеза, е фактор, оказващ влияние на далечната преживяемост и преживяемостта свободна от заболяване<sup>66,67</sup>. Някои проучвания дори предполагат различната биология на мултицентричните и мултифокалните карциноми на гърдата в сравнение с единичните карциноми.<sup>171</sup>

В настоящото проучване е възприето понятието множествен карцином по примера на 7-мата ревизия на TNM-класификацията. То обхваща множествени синхронни ипсилатерални първични карциноми. В тази класификация е определено и минимално отстояние от 0,5 см между два макроскопски фокуса на даден карцином, за да може да се нарече той множествен.<sup>68</sup>

В проведеното изследване наличието на два или повече фокуса на инвазивен карцином не оказва значимо влияние върху преживяемостта. Това се дължи най-вече на огромната разнородност на описаните множествени карциноми. По подробно и продължително проучване върху значително по-голям брой пациенти е необходимо за да може да се оцени тази връзка.

## 3. Диференцираност

Диференцираността на тумора е един от най-старите изследвани и доказани прогностични маркери при карцинома на млечната жлеза. В настоящето проучване стойността му за прогнозата не можа да достигне статистическа значимост.

## 4. Хистологичен вид

Хистологичният вид е един от най-силно значимите прогностични фактори в това проучване, тъй като той остава значим дори когато в модела се включи стадия на болния. Това се дължи на положителните резултати при болните с лобуларен карцином. От 94 болни, върху които е извършен анализа на прогностичните фактори 6 са с лобуларен карцином, от които са починали 4.

## **5. Инфилтрация на околната тъкан; туморни емболи в лимфни съдове; туморни емболи във венозни съдове; лимфно-васкуларна инвазия**

Тези показатели не винаги са отбелязвани в патологичния доклад. Лимфно-васкуларната инвазия е свързана с наличието на позитивни аксиларни лимфни възли и е независим фактор за прогнозата в много проучвания. <sup>69,70</sup> Тя е част от индексите за оценка на нодалния статус след позитивна сентинелна биопсия на Memorial Sloan Kettering Cancer Center<sup>71</sup> и Stanford Online Calculator<sup>72</sup> В проучване от 2011 Emad A. Rakha и съавтори дори предлагат да бъде добавена към TNM класификацията.<sup>73</sup>

Изследване на Junzo Yamaguchi и съавтори от 2008г. анализира значението за прогнозата на инвазията в околната мастна тъкан, наличието на туморни емболи в лимфни и венозни съдове, както и общата стойност на двата фактора. Изследването обхваща 310 болни с инвазивен дуктален карцином, при които както факторите по отделно така и заедно имат значение за преживяемостта. Наличието на туморни емболи в лимфни и кръвоносни съдове е разглеждано като един фактор.<sup>74</sup> В нашето проучване също се открива асоциация между инфилтрацията на околната мастна тъкан и нодалния статус (теста на Фишер показва  $p=0.042$ ) и лимфно-васкуларната инвазия и нодалния статус ( $p=0,001$ ,  $\chi^2$  тест). Въпреки това и двата фактора, както и по отделно наличието на туморни емболи в лимфни или кръвоносни съдове не показва значимост за преживяемостта.

## **6. Брой метастатични лимфни възли**

Настоящото проучване не успя да намери връзка между метастатичните лимфни възли и преживяемостта. Това най-вероятно е в резултат на краткото време за проследяване на пациентите, тъй като статуса на лимфните възли е един от основните, вече доказани, фактори за прогнозата и все още е основен за препоръчаната лечебна стратегия <sup>26</sup>.

Съотношението на лимфните възли (Lymph node ratio, LNR) е величина, дефинирана като броят метастатични към общия брой премахнати лимфни възли. Според някои автори тя описва по-добре статуса на лимфните възли в аксилата от N-категорията на TNM-класификацията<sup>75,76</sup>, тъй като съдържа в себе си и броя премахнати лимфни възли. В проучванията изследващи прогностичната стойност на LNR броят на анализирани лимфни възли е често различен, което се определя и от индивидуалните анатомични особености на пациента. Премахването на необходимостта от минимум 6 изследвани лимфни възела има за недостатък, разнородност на получените резултати, но позволява да се извърши стадиране и при пациенти, при които не е

достигнат този минимум. Друга разлика между съотношението на лимфните възли и N-категорията се проявява при наличието на повече от 7 метастатични лимфни възли. N-категорията би поставила такъв болен в група N2, или N3 (ако са повече от 10), докато при използването на съотношението на лимфните възли този болен може да е в почти всяка рискова група в зависимост от общия брой изследвани лимфни възли. Няколко проучвания доказват LNR като по-чувствително в този случай и по-добре корелиращо с общата преживяемост<sup>77,78</sup>. Ние не можахме да потвърдим значимостта на метастатичните лимфни възли чрез нито един от описаните методи - нито като абсолютна стойност, в N категорията или чрез определянето на съотношението на лимфните възли.

## 7. ER, PR, HER-2

Рецепторният статус е безкомпромисен прогностичен фактор при карциномите на млечната жлеза. Всеки един от рецепторите е доказал своето прогностично и предиктивно значение индивидуално и в комбинация между тях, което е довело до създаването на класификация на базата на рецепторния статус.<sup>79</sup> Развитието на изследването на биомаркерите води от своя страна до много възможности за класифициране в зависимост от прогнозата. Откриването и доказването на Ki 67 като прогностичен и предиктивен фактор<sup>80</sup> допълва молекулната класификация на карциномите и води до въвеждането на луминалния тип на туморите. Днес луминалният тип е водещ в определянето на адювантната терапия на пациента.<sup>26</sup>

Настоящото проучване доказва значението на експресията на рецептора за естроген и прогестерон, но не и на рецептора за епидермален растежен фактор 2, нито като цяло на класификацията според луминалният тип на тумора.

## 8. Наличие на in situ компонента

Проучване от 2014г. на М. Dieterich и съавтори изследва наличието на неинвазивна компонента като част от инвазивния дуктален карцином като прогностичен фактор за появата на рецидив. Авторите установяват, че пациентите, при които е налична in situ компонента, са значително по-млади, с по-малки тумори, по-малко засегнати лимфни възли. Нивото на рецидивите сред чистите инвазивни карциноми е по-високо, а времето свободно от далечни метастази по-кратко. Така наличието на неинвазивна компонента се определя като протективен фактор.<sup>81</sup> Ние не откриваме подобни зависимости, а само тенденция за връзка с далечната преживяемост ( $p=0,092$ , log rank test).

## Фактори свързани с околната среда и лечението

### 1. Хирургично лечение

В анализа на връзката с преживяемостта са включени само пациентите, на които е извършена радикална оперативна интервенция – квадрантектомия или мастектомия. Интересно е да се отбележи, че връзката между преживяемостта и обема на оперативната интервенция достига гранична значимост, когато е приложена Кокс регресия ( $p=0,058$ ), и е значима ( $p=0,038$ ), ако се приложи log rank теста и то за сметка на по – лоша преживяемост на болните, при които е извършена мастектомия. Това се обяснява с разпределението на болните според обема на операцията и стадия (таблица 9), където е видно, че мастектомии са извършвани при пациентки с по-напред стадий. Ето защо, когато към регресионния модел се прибави стадия на пациента, връзката губи своята статистическа значимост и потвърждава световните резултати, че няма статистически значима разлика за преживяемостта в зависимост от обема на оперативната интервенция.<sup>82</sup>

### 2. Брой премахнати лимфни възли

Сентинелната биопсия, при която се премахват до 3 лимфни възела при пациенти с клинично негативна аксила, е стандартна практика.<sup>26</sup> През 2011г. Armando E. Giuliano и съавтори поставят въпроса за необходимостта от аксиларна дисекция, дори при позитивни (1 или 2) сентинелни лимфни възли. Пациентите са проследявани минимум 5 години, тъй като проучването приключва през 2004г. Основен извод от това изследване е, че сред пациентите с 1 или 2 метастатични сентинелни лимфни възли, самостоятелното приложение на сентинелна биопсия не дава по-лоши далечни резултати (обща и преживяемост свободна от заболяване ) в сравнение с аксиларната дисекция.<sup>83</sup> През 2015г. в Европейския Журнал по Хирургична Онкология е публикуван мета-анализ, обхващащ 12 проучвания и 130 757 пациенти от 5 рандомизирани контролирани проучвания и 7 наблюдателни проучвания, които подкрепят тези резултати.<sup>84</sup>

На базата на тези резултати си зададохме въпроса, за необходимостта от промяна на N-категорията на TNM-класификацията за стадиране на пациенти с карцином на млечната жлеза. За да се определи N-категорията е необходимо изследване на повече от 6 лимфни възли. Описаните проучвания доказват, че дори само 3 лимфни възела са достатични за стадиране на аксилата, независимо от техния статус.

Настоящото проучване не открива статистически значима разлика в преживяемостта при пациенти с изследвани повече или по-малко от 6 лимфни възела. Все пак трябва да отбележим, че статуса на лимфните възли също не успя да докаже своята стойност. По-дълго проследяване на пациентите е необходимо за по-голяма достоверност на получените резултати.

### **3. Неoadювантна терапия**

Приложението на неoadювантна терапия в лечението на карцинома на млечната жлеза е намерило своето място и доказало своята значимост.<sup>85</sup>

Неoadювантната терапия е единственият изследван фактор на лечението, който има статистически значима връзка с преживяемостта в настоящия труд. Неочаквано тази връзка е обратна и пациентите, на които е приложена неoadювантна терапия демонстрират по-лоша обща преживяемост от останалите (получили или не неoadювантна терапия). Когато в модела включихме стадия на пациентите, тази значимост се загуби, което просто показва, че неoadювантна терапия е прилагана при пациенти в по-напреднал стадий.

### ТРЕТА ГЛАВА

Настоящата глава от дисертационния труд има за задача да **изследва приносите на биобанкирането в изследването на прогностичните и предиктивни фактори при карцинома на млечната жлеза.**

#### **Методология на създаването на биобанка за карциноми на млечната жлеза**

През 2013 година като докторантски проект, финансиран от Медицински Университет-София, беше поставено началото на тъканна биобанка за карциноми на млечната жлеза. През 2015 година броят на включените в нея пациенти достигна 109.

Заложени за изследване са фактори от повечето класификационни групи, за които стана дума по-рано в настоящия научен труд. Пациентите, включени в тъканната банка са диагностицирани и лекувани в Клиника по хирургия „Проф. Александър Станишев“ на УМБАЛ „Александровска“ и Клиника по хирургия на УМБАЛ „ Царица Йоанна –ИСУЛ“. При постъпването на пациент, с доказан карцином на млечната жлеза или съмнение за такъв, лекуващият лекар запознава пациента с диагностичния и терапевтичен план и възможностите за участие в тъканната банка. На всички пациенти се предоставя разработена специално за биобанката информация за болния, в която са разяснени ползите, целите и методите за създаването на тъканни банки. Предоставени са информирани съгласия за взимане на част от туморна тъкан и кръв от пациента, както и за изследване на генетичен материал.

**В тъканната банка са включени само пациенти, подписали всички информирани съгласия, при които диагнозата карцином на млечната жлеза е хистологично доказана.**

В случаите, в които диагнозата на пациента е известна предоперативно, здравата и туморна тъкан се взима от хирурга по време или веднага след края на оперативната интервенция. Двете проби са на достатъчно отстояние една от друга, за да се постигне чистота на резекционните линии и се взимат по начин, който не нарушава последващата патологична диагностика на тумора.

В случаите, в които диагнозата е неизвестна преди операцията, туморната тъкан се взима от патолога след извършване на спешна хистологична диагностика, а здравата тъкан се взима отново от хирурга интраоперативно.

Взетите проби се поставят в крио-епруветки с РНК- стабилизиращ реагент и се съхраняват в хладилник на 4 градуса до два дни след взимане на пробите. Кръвните проби се взимат преди

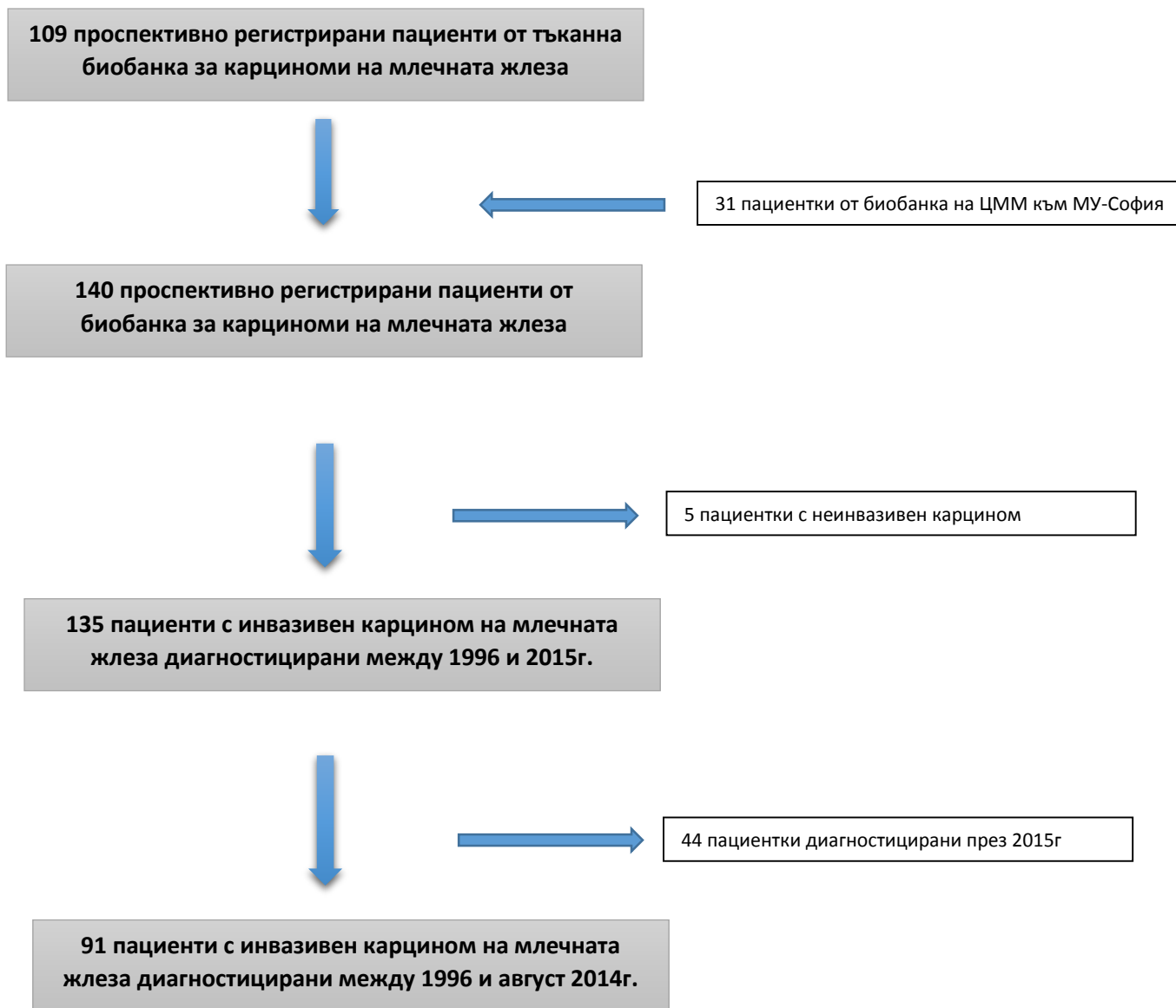
операцията, в случаите на доказан карцином или в ранния следоперативен период, ако диагнозата е поставена интраоперативно, и се съхраняват в хладилник в рамките на същия ден. След събиране на всички проби и информирани съгласия те се доставят в Центъра по Молекулна Медицина (ЦММ) към Катедра по химия и биохимия на Медицински Университет София, където се изолира ДНК от кръвните проби. **Изолиране на ДНК:** Изолирането на ДНК от венозна кръв се осъществява при използване на полуавтоматизирана апаратура за изолиране с магнитни частици (Chemagic Magnetic Separation Module) и с използване на китове за изолиране на ДНК от кръв (лимфоцити) (Chemagic DNA Blood kits), на фирмата производител, следвайки установените лабораторни протоколи и препоръките на производителя (Chemagen AG). По този начин се създава ДНК и плазмена биобанка от периферна кръв. Тъканните проби се съхраняват чрез дълбоко замразяване на  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Допълнително на всеки пациент се предоставя създадена по проекта анкетна карта (разработена от ЦММ на МУ-София, не е показана) съдържаща въпроси, относно рисковите фактори за развитие на карцином на млечната жлеза, наследствената му предразположеност и диетичният му режим. Анкетната карта, заедно с епикризата, хистологичният резултат и решението на онкологичният комитет са събрани и използвани за създаването на обща база данни на всички пациенти. Пациентите са проследявани по отношение на клиничното развитие на заболяването на всеки 6 месеца от диагнозата.

Така създадената биобанка е основа за последващи епидемиологични, генетични и транслационни изследвания.

### Протокол на изследванията

От всички изследвани пациенти 109 са от създадената и описана по-горе тъканна биобанка, а 31 (за които няма съхранена туморна тъкан) са допълнени от Центъра по Молекулна Медицина към Катедра по химия и биохимия на Медицински Университет София за целите на настоящия труд.



Фигура 7. Протокол на включване и изключване на пациенти в изследването на прогностичните фактори.

### Характеристика на пациентите

На таблица 10 е представено разпределението на пациентите според техните клинични и патологични характеристики. Разгледани са както всички пациенти включени в създадената биобанка (заедно с още 31 пациенти на ЦММ), така и характеристиките на 91 пациенти, при които е извършен анализ на прогностичните фактори (пациентки с инвазивен карцином, за които е минала поне 1 година от датата на диагноза). В таблица 10 са описани характеристиките на пациента и тумора при първото поставяне на диагнозата (отнася се за билатералните и рецидивните карциноми).

Таблица 10 .Характеристики на пациентите

| Фактор                 | Общ брой пациенти |               | Анализ на прогностичната стойност |               |
|------------------------|-------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|
|                        | брой (140)        | %             | брой (91)                         | %             |
| <b>възраст</b>         | <b>140</b>        | <b>100,00</b> | <b>91</b>                         | <b>100,00</b> |
| до 39                  | 20                | 14,29         | 16                                | 17,58         |
| 39-69                  | 104               | 74,29         | 65                                | 71,43         |
| над 70                 | 16                | 11,43         | 10                                | 10,99         |
| <b>стадий</b>          | <b>124</b>        | <b>88,57</b>  | <b>82</b>                         | <b>90,11</b>  |
| Ca in situ             | 5                 | 3,57          | 0                                 | 0,00          |
| I ви стадий            | 48                | 34,29         | 32                                | 35,16         |
| II ри стадий           | 39                | 27,86         | 27                                | 29,67         |
| III ти стадий          | 26                | 18,57         | 18                                | 19,78         |
| IVти стадий            | 6                 | 4,29          | 5                                 | 5,49          |
| <b>луминален тип</b>   | <b>110</b>        | <b>78,57</b>  | <b>79</b>                         | <b>86,81</b>  |
| луминал А              | 47                | 33,57         | 35                                | 38,46         |
| луминал В              | 41                | 29,29         | 27                                | 29,67         |
| тройно негативни       | 13                | 9,29          | 11                                | 12,09         |
| HER2 преекспресиращ    | 9                 | 6,43          | 6                                 | 6,59          |
| <b>диференцираност</b> | <b>107</b>        | <b>76,43</b>  | <b>72</b>                         | <b>79,12</b>  |
| G1                     | 5                 | 3,57          | 3                                 | 3,30          |
| G2                     | 71                | 50,71         | 48                                | 52,75         |
| G3                     | 31                | 22,14         | 21                                | 23,08         |

|   |            |              |           |              |
|---|------------|--------------|-----------|--------------|
| <b>статус на аксиларните лимфни възли</b> | <b>107</b> | <b>76,43</b> | <b>72</b> | <b>79,12</b> |
| позитивен                                 | 45         | 32,14        | 33        | 36,26        |
| негативен                                 | 62         | 44,29        | 39        | 42,86        |
| <b>билатерални</b>                        | <b>15</b>  | <b>10,71</b> | <b>13</b> | <b>14,29</b> |

**В създадената биобанка се извършват изследвания в няколко направления.**

- 1) Изследване на евентуалните прогностични фактори свързани с околната среда
- 2) Изследване на значението на наличието на полиморфизми на VEGF при пациентите за прогнозата
- 3) Изследване на значението на протеомният профил на туморите за прогнозата

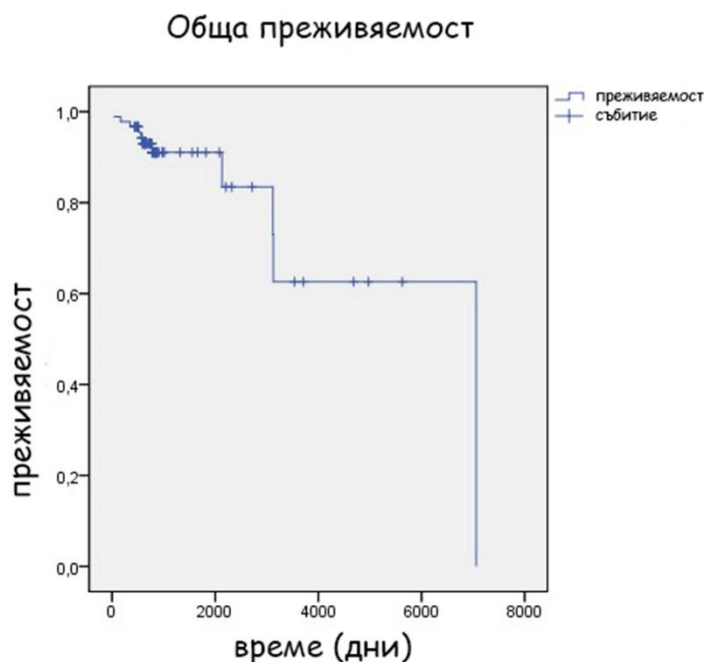
## ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОГНОСТИЧНИТЕ ФАКТОРИ СВЪРЗАНИ С ОКОЛНАТА СРЕДА

За анализ на факторите свързани с околната среда информация е взета от попълнените от болните анкетни карти. В анализа за оценка на прогностичната стойност са включени 91 пациента (от 140), за които е минала поне 1 година от датата на диагноза.

### РЕЗУЛТАТИ

Пациентите са проследени до 11.11.2015 – крайна дата на проучването. До тази дата сред 91 пациентки включени в анализа на прогностичната стойност на факторите са регистрирани 6 рецидива и 15 случая на далечни метастази, а 11 от пациентите са починали. Общата преживяемост е представена на фигура 8. Средния период на проследяване е 38, 4 месеца.

Фигура 8. Обща преживяемост на пациентите от биобанката



За оценка на прогностичната стойност на даден фактор използвахме влиянието му върху общата преживяемост (за събитие се приема смъртта на пациента) или върху преживяемостта свободна от заболяване (за събитие се приема смъртта, появата на рецидив или метастаза). С Fisher exact test изследвахме и връзката между даден фактор и появата на далечни метастази и рецидиви (91). За

оценка на връзката на даден фактор с други характеристики на тумора използвахме данни за всички 140 пациентки от биобанката.

### **1. Брой раждания**

От направения анализ установихме, че ражданията нямат статистически значима връзка с преживяемостта, независимо дали се разглеждат като бинарен фактор или според абсолютния брой. При изследването на този фактор с други характеристики на тумора се установи, че хистологичният тип е гранично свързан с наличието на деца ( $p=0,062$ ), така и най-вече с техния брой ( $p=0,026$ ). Броят раждания корелира и със статуса на аксиларните лимфни възли ( $p=0,019$ ).

### **2. Продължителност на кърменето**

Този фактор е изследван при пациентките, които имат поне 1 дете. Разгледали сме го в няколко аспекта. В зависимост от това дали пациентката е кърмила изобщо, в зависимост от броя месеци на кърмене на първото дете, в зависимост от общия брой месеци, кърмене. От пациентките, които имат деца, само 7 не са кърмили нито един месец. Асоциацията на кърменето с преживяемостта не достига статистическа значимост ( $p=0,271$ ). Това би могло да се дължи на факта, че броя на пациентките, които никога не са кърмили, е прекалено малък. Асоциация не се откри и между преживяемостта и месеците кърмене на първо дете и общия брой месеци на кърмене. Потърсихме и връзка на продължителността на кърменето с някои характеристики на тумора (размер, множественост, хистологичен вид, нодален статус, диференцираност, наличие на туморни емболи в лимфни и кръвоносни съдове) при всички 140 пациентки. Връзка установихме между кърменето изобщо и наличието на туморни емболи в лимфни съдове ( $p=0,026$ ), която се загуби, когато изследвахме кърменето в категории по месеци (0, до 12 и повече от 12)  $p=0,098$ ; гранично е значението на хистологичният вид ( $p=0,072$ ) и множествеността ( $p=0,064$ ). В групата на кърменето по категории връзка се установи с наличието на метастази в момента на диагнозата ( $p=0,024$ ).

### **3. Прием на хормони**

Анамнеза за прием на каквито и да е хормонални препарати (от орални контрацептиви до опити за ин витро оплождане) има при 25 болни. В модела не е включен вида или продължителността на приемане. Не се установява статистически значима разлика за общата преживяемост, преживяемостта свободна от заболяване и някоя от характеристиките на тумора. Все пак трябва

да отбележим че от 7-те наблюдавани рецидива 4(91) са при пациенти с анамнеза за прием на хормонални препарати. Този резултат постига едва гранична статистическа значимост ( $p=0,053$ )

4. Следващите изследвани фактори, могат да се обединят като **фактори свързани с диетата**.

Това са приемът на месо, плодове и хляб и тестени изделия.

При анализ на връзката с преживяемостта нито една от описаните диетични особености, няма връзка с далечните резултати при пациентите.

Изследвахме връзката на диетата с някои характеристики на тумора. Значими резултати се откриха при приема на плодове и стадия на пациента ( $p=0,047$ ); наличието на метастази при диагнозата ( $p<0,004$ ); тройно негативни субтип ( $p=0,05$ ) и HER2 преекспресията ( $p=0,051$ ). Приемът на сладки и тестени изделия корелира с размера на тумора ( $p=0,052$ ). Интересен е и факта, че от 7-те(от 91) болни с рецидив 5 съобщават за прием на тестени и сладки изделия 2-3 пъти седмично, а при нито една от болните приемащи такива храни рядко, не се наблюдава рецидив. Тази връзка достига статистическа значимост  $p= 0,011$ .

### 5. Прием на алкохол

Поради малкият брой болни, които съобщават за ежедневен прием на алкохол, обединихме тази група с болните, които употребяват алкохол 2-3 пъти седмично. Между нито една от изследваните групи не се установи статистически значима разлика за далечните резултати. Все пак връзка с приемът на алкохол преди операцията се установява с HER2 преекспресията ( $p=0,004$ ) и N-категорията на TNM-класификацията ( $p=0,049$ ). Сред 91 пациентки с данни за проследяване, приемът на алкохол се оказва значим за ранните събития ( $p=0,049$ ) и с гранична връзка само с наличието на метастази. Интересно, че да се отбележи, че тази връзка е по-скоро израз на протективната роля на алкохола към тези показатели. Например от пациентките с метастази (15) само 2 съобщават за чест прием на алкохол, а най-голям е броят на не употребяващите. Тази връзка се губи ако се обединят тези, които консумират алкохол рядко, с тези които не консумират.

### 6. Тютюнопушене

Тютюнопушенето е представено като категорийна характеристика, определена както следва: болни, които никога не са пушили и болни, които са пушили или пушат в момента на диагнозата. Не се установява статистически значима връзка между тютюнопушенето и далечната

преживяемост. Установява се статистически значима връзка само между тютюнопушенето и тройно негативния субтип ( $p=0,025$ ).

7. Следващите три фактора могат да се обединят като **свързани с работната среда**.

Това е облъчването с йонизиращи лъчение (6 болни); работата с химични вещества (10 болни) и полагането на мощен труд (10 болни). Гранична връзка се установи между работата с йонизиращи лъчения и статуса на аксиларните лимфни възли ( $p=0,058$ ), а значима с N-категорията на TNM-класификацията ( $p=0,019$ ). При изследване на работата с химични вещества се откри зависимост с билатералните карциноми ( $p=0,005$ ). От 13 пациентки с билатерални карциноми, 4 съобщават за работа с химични агенти.

## ОБСЪЖДАНЕ

От описаните по горе резултати е видно, че нито един от изследваните фактори на околната среда не е статистически значим за близката и далечна преживяемост на пациентите. Получените резултати са очаквани. Част от тях се обясняват с недостатъците на проучването - малък брой пациенти, кратък период на проследяване и необходимостта от по-голямо прецизиране на въпросите и отговорите в анкетните карти. Резултатите показват интересни тенденции, които са обект на бъдещи проучвания.

Извод от настоящето проучване е, че факторите на околната среда имат много противоречив ефект върху прогнозата на пациентите. Причина за това е комплексното действие на много показателни, голяма част от които са трудни за оценка или дори неизвестни. Например в попълваната анкетна карта няма въпрос, оценяващ психичното състояние на пациента, а това е фактор с доказано значение. Друга причина е разнородността на публикуваните изследвания по отношение изследваните категории, разделянето във времето и периода на проследяване (крайните точки на проучванията). Непрекъснато нараства броят проучвания изследващи значението на факторите на околната среда за далечните резултати, но заключенията от тях не остават, окончателни. Това отваря бъдещо поле за изследване в тази област на големи описателни проучвания и добре организирани рандомизирани контролирани проучвания.<sup>86</sup>

## ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОГНОСТИЧНИТЕ ФАКТОРИ СВЪРЗАНИ С ЧОВЕКА

### ПОЛИМОРФИЗМИ НА ВАСКУЛАРНИЯ ЕНДОТЕЛЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР

**В настоящия труд са изследвани 2 полиморфизма на VEGF: rs2010963 или още известен като -634G>C и rs3025039 или +936C>T**

И двата изследвани полиморфизма повлияват експресията на гена. За първият (-634G > C) е известно, че генотипа -634GC се свързва с по-висока експресия на VEGF, а -634GG със значително по-ниска.<sup>87</sup> При вторият полиморфизъм (+936C > T), се загубва потенциалното място за връзка с транскрипционен фактор, който по принцип усилва експресията на гените.<sup>88</sup> **Можем да заключим, че наличието на единият от изследваните полиморфизми - 634G>C повишава експресията на VEGF, а при наличието на другият – 936 C>T тя намалява.**

Мета-анализ от 2015г. базиран на 10,340 пациенти с карцином на гърдата и 10,388 контроли доказва, че и двата изследвани полиморфизма повлияват предразположението към карцинома на млечната жлеза и растежа на тумора, но по противоположен начин. Когато се вземе в предвид расовата принадлежност на пациентите се установява, че -634G алела е свързан с намалена предразположеност към карцином при азиатци, а пациенти с генотип -634GG имат по-малък размер на тумора при диагноза (по-ниска серумна концентрация на VEGF).

Пациенти с генотип +936CC (хомозиготи по честия алел) имат значително по-голяма предразположеност към развитие на карцином на млечната жлеза и, при диагноза, значително по-голям размер на тумора, от колкото пациенти с други генотипове.<sup>89</sup>

Получените до момента противоречиви резултати демонстрират необходимостта от бъдещи изследвания на значението на полиморфизмите в свързните с ангиогенезата гени, като VEGF, за развитието и лечението на карцинома на млечната жлеза.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### Характеристики на пациентите

За оценка на прогностичната стойност на двата полиморфизма са използвани данни за 91 пациенти от тъканната биобанка за карцином на млечната жлеза, вече описана в настоящия труд. Това са пациенти, за които са минали поне две години от датата на диагноза. Връзката на

полиморфизмите с други фактори на тумора е оценена при всички 140 пациенти от биобанката. Характеристиките и на двете групи пациенти са разгледани в таблица 10.

### Обработка на пробите

Пробите на пациентите и контролите са извлечени, обработени и съхранени, съобразно вече установените правила за изграждане на биобанка и съпровождащата я клинична база данни.

Откриването на еднонуклеотидни полиморфизми (SNP) в гена за VEGF (634 G>C; +936 C>T) е извършен на апарат за PCR в реално време с помощта на TaqMan™ (Life Technologies) технология. Подробно целият процес е вече описан.<sup>90</sup>

## РЕЗУЛТАТИ

Разпределението на генотиповете е представено на таблица 11.

Таблица 11. Разпределение на пациентите според техния генотип

| полиморфизъм                 | брой (140) | %           | брой (91) | %           |
|------------------------------|------------|-------------|-----------|-------------|
| <b>rs2010963/ -634G&gt;C</b> | <b>136</b> | <b>97,1</b> | <b>88</b> | <b>96,7</b> |
| 634CC                        | 26         | 18,6        | 14        | 15,4        |
| 634GC                        | 61         | 43,6        | 35        | 38,5        |
| 634GG                        | 49         | 35,0        | 39        | 42,9        |
| <b>rs3025039/ 936C&gt;T</b>  | <b>137</b> | <b>97,9</b> | <b>90</b> | <b>98,9</b> |
| 936TT                        | 3          | 2,1         | 1         | 1,1         |
| 936CT                        | 32         | 22,9        | 19        | 20,9        |
| 936CC                        | 102        | 72,9        | 70        | 76,9        |

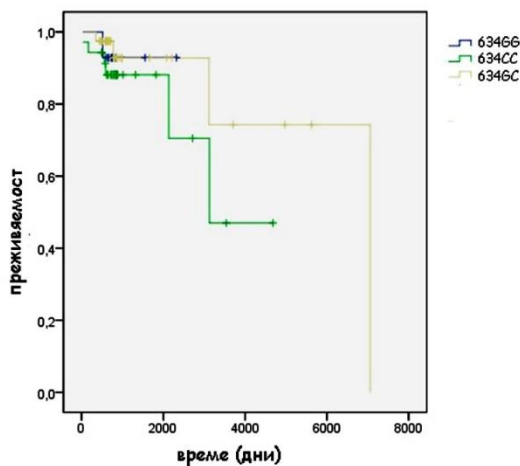
Интересно е да се отбележи, че от 5<sup>-те</sup> ин ситу карцинома в биобанката 4 имат генотип 936CC и един има 936TT. Болната с 936TT генотип е оперирана няколко пъти за инвазивни рецидиви, а през януари 2015 е диагностицирана с далечни метастази.

**Значение на +936C/T и -634G>C за преживяемостта на пациенти с карцином на млечната жлеза.**

В настоящия анализ не успяхме да докажем значение за преживяемостта на нито един от полиморфизмите. Все пак ограниченията на настоящето проучване на прогностичните фактори важат и тук – малък брой пациенти и кратък период на проследяване. Зависимостта на преживяемостта от генотипа на пациентите са представени на фигура 9 и фигура 10.

Log rank p=0,430

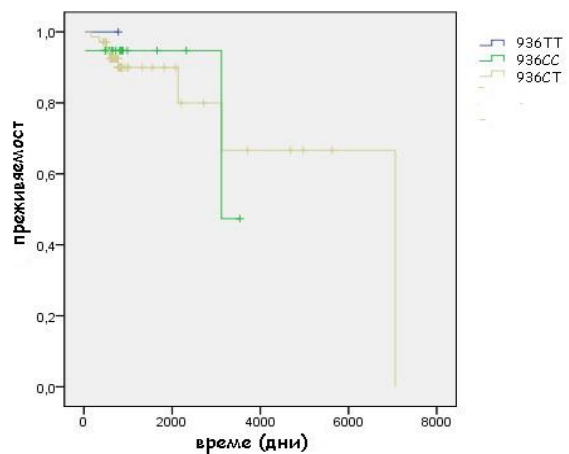
Функция на преживяемостта в зависимост от генотипа rs2010963



Фигура 9. Функция на преживяемостта в зависимост от генотипа при - 634G>C

Log rank p=0, 953

Функция на преживяемостта в зависимост от генотипа rs3025039



Фигура 10. Функция на преживяемостта в зависимост от генотипа при +936 C>T

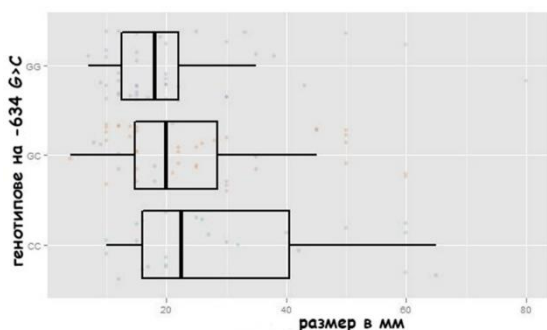
Изследвахме и разпределението на генотиповете в различните категории на прогностичните фактори и събития при всички 140 пациенти от биобанката.

**rs 2010963 / -634 G>C**

Статистически значима връзка се установи с билатералните карциноми. Генотипът е известен при 14 от 15<sup>-те</sup> билатерални карцинома, включени в биобанката. Нито един от тях не е с генотип 634CC. Това показва, че наличието на полиморфизъм се свързва с появата на билатерален карцином. Теста на Фишер показва значимост на връзката (p=0,038)

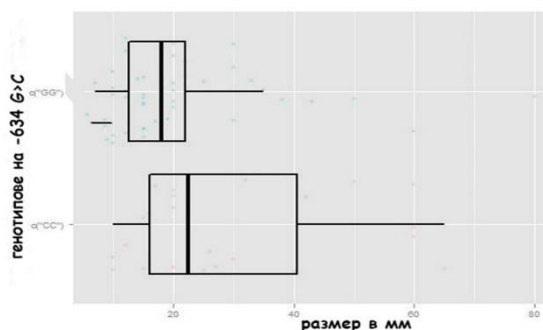
Установихме връзка с гранична значимост между този полиморфизъм и размера на тумора. Теста на Фишер, не достига статистическа значимост  $p=0,096$  (когато се сравнява разпределението на туморите спрямо Т-категорията на TNM).

За да представим нагледно тази връзка използвахме ANOVA test, която ни позволи да включим в модела количествена променлива, каквато е размера на тумора в мм, и да разгледаме размерите на тумора в трите генотипни групи. Резултатите са показани на фигура 11. Когато се сравнят трите генотипа, не се установява статистически значима разлика в средните стойности на размерите. Когато се сравнят само двата хомозиготни генотипа, резултатите са по-близко до значими (фигура 12).



$p= 0.1648835$

Фигура 11. Зависимост между размера на тумора и генотипа, ANOVA



$p= 0.05969069$

Фигура 12. Зависимост между размера на тумора и генотипа, t-test

**Може да се заключи, че пациентите, при които е открит -634 G>C полиморфизъм, имат по-голям размер при диагноза, което може да се свърже с повишена експресия на VEGF и се потвърждава от литература.**

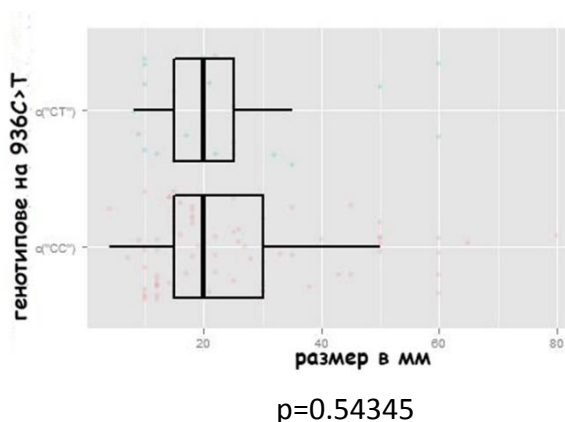
#### rs3025039 / +936C>T

Макар да не успява да докаже своята значимост при анализа на преживяемостта, когато се разглежда наличието на събития по групи се установява, че има връзка между наличието на събитие и генотипа на пациента ( $p=0,048$ ). Тази връзка обаче се дължи на факта, че при 2 от 3-те пациентки с генотип 936TT вече има регистрирани метастази. 13 от останалите 16 болни с метастази или рецидив са с генотип 963 CC. Откритата значимост на връзката на генотипа с появата

на рецидиви и далечни метастази в този случай се дължи най-вероятно на малкият брой пациенти и вероятно **няма реална стойност**.

Друга значима връзка се установи с хистологичния вид ( $p=0,038$ ). Това се дължи от една страна вече описаната връзка на 936CC с неинвазивните карциноми. Освен това се забелязва, че броят на хетерозиготите сред лобуларните карциноми е по-голям от колкото сред дукталните.

Генотипът 963 CC преобладава и сред множествените карциноми, макар тази връзка да не достига статистическа значимост ( $P=0,087$ ). Не се установява никаква зависимост между този полиморфизъм и размера на тумора (Фигура 13).



**Фигура 13. Зависимост между размера на тумора и генотипа, t –test**

## ОБСЪЖДАНЕ

Ползата от изследването на тези полиморфизми се крие в хипотезата, че растежа на тумора зависи от ангиогенезата. Основоположник на тази теория е Folkman, който през 1971 публикува в “New England Journal of Medicine” хипотезата, че ако туморния растеж зависи от ангиогенезата, то инхибирането на ангиогенезата може да е терапевтично.<sup>91</sup> Теорията предсказва, че туморите не биха били способни да нарастват над 1-2мм, без непрекъснато да си изграждат нови кръвоносни съдове. Тази концепция е сега широко приета и подкрепена от експериментални проучвания и клинични наблюдения.<sup>92</sup>

Проучване от 2011г. сред 120 пациенти установява, че повишените средни серумни нива на VEGF са значително по-високи при пациенти с карцином на млечната жлеза, от колкото при пациенти с доброкачествени заболявания (т.е. той е диагностичен маркер). Авторите докладват и позитивна

корелация между серумното и тъканното ниво на VEGF. Повишените стойности на този растежен фактор се асоциират с нискодиференцирани тумори с по-големи размери, метастази в аксиларните лимфни възли, отрицателен хормонален статус, позитивна експресия на HER2 и лоша прогноза.<sup>93</sup> Други изследвания предполагат ролята на VEGF в таргетната терапия.<sup>94</sup>

Бевацизумаб (Bevacizumab, BEV) е моноклонално антитяло, което се свързва с VEGF и го неутрализира.<sup>95</sup> През Февруари 2008г. е одобрен за лечение от U.S. Food and Drug Administration (FDA) в комбинация Паклитаксел за лечение на пациенти с метастатичен HER2-негативен карцином на млечната жлеза, които още не са получили химиотерапия за метастазите. През Ноември 2011 U.S. Food and Drug Administration съобщава, че премахва карцинома на гърдата от индикациите за лечение с Бевацизумаб, защото не е доказал своята ефективност и безопасност. Самото лекарство не е премахнато от пазара и лекарите могат да изберат да го приложат, независимо дали е одобрено за употреба при метастатичния карцином на гърдата или не.<sup>96</sup>

В Българските “Национални медицински стандарти за системно лекарствено лечение, оценка на лечебен ефект и проследяване на злокачествени солидни тумори при възрастни” от 2015г. Бевацизумаб не е изключен от лечението на карцинома на млечната жлеза. Той може да се приложи при I<sup>ba</sup> линия химиотерапия при пациенти, получавали адювантни антрациклини в комбинация с Паклитаксел; химиотерапия при резистентност на антрациклини и таксани.<sup>97</sup>

През 2014г. на конгреса на Европейската Асоциация по Медицинска Онкология се докладва обзор на значението на VEGF, като биомаркер. Авторите установяват, че BEV подобрява преживяемостта свободна от събития при пациенти с над средното серумно ниво на VEGF, но не и при тези с под средното ниво. Тези резултати отново поставят въпроса за ролята на Бевацизумаб при карцинома на млечната жлеза, особено при **селектирани пациенти**. Авторите предлагат да се преоцени значението му за терапията, като прилагането на Бевацизумаб да се основава на измерването на VEGF.<sup>98</sup>

Друго проучване от 2014г. също открива приложение на Бевацизумаб, но в неоадювантната терапия. Това изследване доказва, че в стадий II и III на тройно негативни карциноми, добавянето на Бевацизумаб към неоадювантната терапия подобрява патологичния отговор<sup>99</sup>. През следващата година резултатите от NSABP B-40 показват, че добавянето на Бевацизумаб в неоадювантното лечение на HER2 негативни карциноми подобрява и общата преживяемост.<sup>100</sup>

През 2015г. P.R. Blank и съавтори публикуват анализ на съотношението цена –полза при изследването на **VEGF–А** като предиктивен фактор за отговор към BEV (като част от неoadювантната терапия при ранен HER-2 негативен карцином на млечната жлеза). Ползата от лечението се оценява в **години живот според качеството (quality-adjusted life-years, QALYs)**. Те установяват, че цената на лечение на един пациент варира от 37'042 евро без BEV, до 78'367евро, ако BEV се приложи в лечението на всички пациенти. Лечението без BEV добавя **14.031 години живот според качеството за пациент**. Ако прилагането на Бевацизумаб се ръководи от нивото на VEGF-A се достигат между 14.220 (при използването на гранична концентрация от 450 pg/mL) и 14.235 (при използването на гранична концентрация от 339 pg/mL) **години живот според качеството**. Когато се сравни с терапията без BEV, най-предпочитаната стратегия (при гранична стойност 450 pg/mL) оскъпява лечението с 11'191 евро и дава допълнително 0.189 (14.220-14.031) **години живот според качеството** за пациент. В заключение на своя анализ авторите предполагат, че тестването на VEGF-A може да бъде чувствителен метод, който да ръководи прилагането на BEV в лечението на хормон позитивен и HER2-негативен карцином на млечната жлеза. <sup>101</sup>

Проучване от 2011 година изследва полиморфизмите на VEGF във връзка с терапията с BEV. То не установява връзка на полиморфизмите с преживяемостта, но авторите обясняват това с малкия брой събития. Полиморфизмът - 634 G > C е значително свързан с токсичността, която е най -голяма при пациентите с -634CC генотип. Анализ на + 936C > T полиморфизма показва, че хомозиготите по честия алел +936CC имат тенденция за по-кратко време до прогресия на заболяването, в сравнение с носителите на другия алел. <sup>102</sup> В нашето проучване метастази и рецидиви са наблюдавани при 18 пациенти, от които са 13 хомозиготи по честия алел +936C, 3 са хетерозиготи и 2са хомозиготи по T алела.

През 2015 г Al. Neip и съавтори публикуват проучване върху ролята на генетичите варианти на VEGF за неoadювантната терапия при пациенти с карцином на млечната жлеза, получаващи BEV. Те изследват 125 полиморфизма като предиктори на патологичния отговор при пациенти получаващи стандартна химиотерапия и такива, при които към терапията е добавен BEV. Те установяват 5 полиморфизма свързани с по-добър отговор към BEV, но когато взимат под внимание множественото тестване на променливите, тази връзка се загубва. Тогава авторите разделят туморите по групи в зависимост от рецепторния статус. Те предполагат, че лечебната ефективност може да зависи от рецепторния статус при 5 от 10<sup>-те</sup> полиморфизма с най-малка стойност на p, като този ефект е най-голям при тройно негативните карциноми. Пациенти

хомозиготи по честия алел с тройно негативни тумори имат полза от лечението с BEV, докато при другите пациенти такава полза не се отчита. Първи в този списък е rs3025039.<sup>103</sup>

Изследването на нивото на VEGF има доказано прогностично значение за далечните резултати при пациенти с карцином на млечната жлеза. Наличието на някои полиморфизми на гена за VEGF води до повишаване на серумната концентрация на растежния фактор. Установена е връзка между тази серумна стойност и отговора към терапия с Бевацизумаб, което го прави и предиктивен фактор. Наличието на -634 G>C полиморфизъм е доказан индикатор за повишена експресия на VEGF. Няколко проучвания потвърждават значението на този полиморфизъм за далечните резултати, което го прави прогностичен фактор.

При вторият изследван полиморфизъм е установено, че хомозиготите по честия алел +936C имат тенденция за по-кратко време до прогресия на заболяването, в сравнение с носителите на другия алел +936T. За същия полиморфизъм е установено, че пациенти хомозиготи по честия алел с тройно негативни тумори имат полза от лечението с Бевацизумаб, докато при другите пациенти такава полза не се отчита.

Въпросите, които можем да си поставим, е дали информацията за полиморфните варианти на VEGF, която вече имаме, би ни помогнала да селектираме група пациенти, повлияващи се от терапия с Бевацизумаб. Настоящото проучване е проспективно и голяма част от пациентите в него са диагностицирани през последната година. Ранните рецидиви и далечните метастази при тези пациентки предстои да се наблюдават в следващите години и знанието за техния генотип би помогнало за персонализиране на терапията им и подобряване на преживяемостта.

Тройно-негативни болни хомозиготи по честия алел на rs3025039 (+936C) сред болните от описаната биобанка са 9, от тях 3 са хетерозиготи и при 1 пациент генотипа не е известен. При 3 (от 9) болни са регистрирани далечни метастази, а самите болни са починали. При останалите 6 към крайната дата на проучването няма регистрирани събития. Бевацизумаб е включен в медицинския стандарт за лечение на карцинома на млечната жлеза в България. Това го прави **достъпен избор за лечение, в случай на събитие, при така селектираните болни.**

## ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОГНОСТИЧНИТЕ ФАКТОРИ СВЪРЗАНИ С ТУМОРА

### ПРОТЕОМЕН ПРОФИЛ НА ТУМОРНАТА ТЪКАН

В настоящия труд като фактор свързан с тумора е изследван протеомният профил на туморната тъка. Използвани са част от 50 от туморните проби от създадената биобанка.

### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### Характеристики на пациентите:

Туморни тъканни проби от 49 пациентки от създадената и описана по-горе биобанка, съхранявани в RNA-later стабилизиращ разтвор, бяха предоставени за протеомен анализ в лаборатория към Катедра по биологични науки на Университета в Есекс, Обединеното кралство. Всички туморни проби са идентифицирани и свързани с хистологични и клинични данни. Тъканните проби са от 49 болни ( една пациентка е с билатерален карцином) на възраст от 31 до 84 години (средно 58,5), подбрани на случаен принцип от биобанката. Характеристиките на болните са представени в таблица 12 (49 пациенти и 50 тъканни проби).

Таблица 12. Характеристики на пациентите, включени в анализа на протеомния профил

| Фактор                   | Брой      | %          |
|--------------------------|-----------|------------|
| <b>възраст</b>           | <b>50</b> | <b>100</b> |
| до 39                    | 5         | 10         |
| 39-69                    | 36        | 72         |
| над 70                   | 9         | 18         |
| <b>стадий</b>            | <b>44</b> | <b>88</b>  |
| 0 (ин ситу)              | 2         | 4          |
| I <sup>ви</sup> стадий   | 14        | 28         |
| II <sup>ри</sup> стадий  | 14        | 28         |
| III <sup>ти</sup> стадий | 10        | 20         |
| IV <sup>ти</sup> стадий  | 4         | 8          |
| <b>луминален тип</b>     | <b>44</b> | <b>88</b>  |
| луминал А                | 19        | 38         |
| луминал В                | 14        | 28         |
| тройно негативни         | 6         | 12         |

|   |           |           |
|---|-----------|-----------|
| HER2 преекспресиращ                       | 5         | 10        |
| <b>диференцираност</b>                    | <b>42</b> | <b>84</b> |
| G1  | 3         | 6         |
| G2  | 24        | 48        |
| G3  | 15        | 30        |
| <b>статус на аксиларните лимфни възли</b> | <b>43</b> | <b>86</b> |
| позитивен                                 | 22        | 44        |
| негативен                                 | 21        | 42        |
| <b>билатерални</b>                        | <b>4</b>  | <b>8</b>  |

Болните са проследявани до 19.08.2015 – крайна дата на проучването.

**Обработка на протеиновите проби.** Целият процес на подготовка и обработка на пробите е описан от L. Alldridge, G. Metodieva и съавтори.<sup>104</sup> Качественият и количественият анализ на пептидите се извършва с мас спектрометрия.

**Принципи на мас-спектрометрията.** Мас-спектрометрията е чувствителна техника използвана за откриване, идентифициране и измерване на молекулите на базата на съотношението между тяхната маса и заряд<sup>105</sup>. В основата на мас-спектрометрията стои принципът, че частиците, които имат електрически заряд, се отклоняват под влиянието на магнитно поле, за разлика от частиците без заряд.

**Анализ на данните.** Резултатите от мас-спектрометъра са анализирани с помощта на CPAS (Computational Proteomics Analysis System) и X! Tandem. Базата данни Uniprot е използвана за да се идентифицират протеините.

Софтуерът, използван за анализ на получените спектри работи на принципа на вероятностите. Съотношението между масата и заряда на пептидите се търси в база данни, създадена от съотношенията маса/заряд на протеините на целия човешки геном. Резултатите показват процента на съвпадение с определения рейтинг на даден пептид и се филтрират за най-голяма статистическа вероятност.

В анализа са включени протеини с тегло над 100 килодалтона. Идентифицирани са по около 1900 протеина в проба. Наличието на повече от 10 разпознати пептида от даден протеин, ни дава сигурност, че последния е разпознат.

## РЕЗУЛТАТИ

Средно време на проследяване- 22,4 месеца ( от 6,5 до 220 месеца). За това време са починали 5 пациенти и са наблюдавани други две събития: появата на локален рецидив при една от болните, и появата на далечни метастази при друга болна. Тъй като времето за проследяване е кратко, а наблюдаваните събития са малко, решихме да обединим всички събития (смърт, метастази или рецидив), като едно събитие и да изчислим времето до това събитие (общото понятие **преживяемост свободна от заболяване**, дефинирано по-рано в настоящия труд).

Основният въпрос, който си зададохме, е има ли протеини от профила на туморните проби, които да се различават статистически, по своя интензитет, в зависимост от наличието на събитие при пациента към крайната дата на проучването.

След извършване на статистическа обработка на данните и корекция за множествени тестове, получихме статистически значими следните протеини (таблица 13):

Таблица 13. Протеини със статистически по-голям интензитет на експресията при пациенти със събитие (метастаза, рецидив или смърт)

| Протеин   | Ген     | Swiss prot<br>идентификационен<br>номер | р-<br>стойност |
|---|---------|---|----------------|
| Isoform H14 of Myeloperoxidase (Isoform2_HUMAN)                 | MPO     | P05164-2                                | 0,000795       |
| Lysozyme  | LYZ     | F8VV32                                  | 0,000837       |
| Calcium-activated chloride channel regulator 2                  | CLCA2   | Q9UQC9                                  | 0,001093       |
| Fibrillin-1   | FBN1    | P35555                                  | 0,004651       |
| Fibronectin type III domain-containing protein 1<br>(izoform 2) | FNDC1   | Q4ZHG4-2                                | 0,010831       |
| Collagen alpha-1(XVIII) chain                                   | COL18A2 | P39060                                  | 0,011899       |
| Protein S100-A9   | S100a9  | P06702                                  | 0,020865       |
| Perlecan  | HSPG2   | P98160                                  | 0,031885       |

## ОБСЪЖДАНЕ

### Разгледано е само значението на значимите протеини като прогностични и предиктивни фактори

#### 1. Миелопероксидаза (изоформа 2)

Миелопероксидазата МПО е хем протеин, синтезиращ се по време на миелоидната диференциация. Той представлява лизозомен протеин основен компонент на неутрофилните азурофилни гранули.<sup>106</sup>

Най-често е изследвано значението на различните полиморфизми на гена за миелопероксидаза за далечните резултати при пациенти с карцином на гърдата. Установено е, че генотиповете с по-голяма активност на миелопероксидазата са свързани с по-добра преживяемост при пациенти на циклофосамид съдържаща терапия, особено ако са лекувани в последствие и с тамоксифен<sup>107</sup>. Тя също е маркер за кардиотоксичността на химиотерапията.<sup>108</sup> **Това прави МПО едновременно прогностичен и предиктивен фактор.** Няколко проучвания показват, че пациентите, чиито тумори са инфилтрирани от клетки богати на МПО имат по-добра прогноза.<sup>109,110</sup> Резултатите от настоящето проучване подкрепят тезата, че инфилтрацията на клетки на имунната система в туморите (като израз на доказани по-голям интензитет на МПО) е негативен фактор за прогноза. Освен изследванията при колоректалния карцином гранулоцитната инфилтрация е свързана с влошена прогноза при карцинома на белия дроб<sup>111</sup> и хепатоцелуларния карцином<sup>112</sup>. Това прави инфилтрацията на гранулоцити противоречив фактор за прогнозата при различните тумори. Проучванията за значението на експресията на ензима върху карциномите на гърдата до сега само на експериментално ниво<sup>113</sup>, като доказателства за прогностичната стойност има само за някои полиморфизми.

#### 2. Лизозим

**Лизозимът представлява** гликозидна хидролаза- ензим, който уврежда клетъчната стена като катализира хидролизата в пептидогликаните. Той също присъства в цитоплазмените гранули на макрофагите и полиморфонуклеарните неутрофили.

В проучване на Francisco Vizoso и съавтори от 2001 година се изследва експресията на лизозим от клетки на карцинома на млечната жлеза, с помощта на имунохистохимични методи. От общо изследвани 177 карцинома, при 126 се установява експресия на лизозим, но с различна

интензивност. Нивото на експресия е по-голямо при високодиференцираните и умеренодиференцираните тумори. Също нивата на лизозим са по-високи в малките тумори и при пациенти с негативни лимфни възли. Резултатите показват, че ниско съдържание на лизозим предсказва по-кратко време свободно от заболяване и влошена обща преживяемост, което противоречи с нашите резултати. Лизозимната експресия е независим прогностичен фактор за преживяемостта свободна от заболяване и общата преживяемост при пациенти с негативна аксила<sup>114</sup>. През 2002г. Carlos Serra и съавтори разглеждат значението на лизозима като прогностичен фактор при карцинома на млечната жлеза при мъже. Противно на предходното изследване уни- и мултивариантни анализи показват, че експресията на лизозим от тумора е значителен и независим индикатор за лоша прогноза.<sup>115</sup>

### **3. CLCA2**

Калций активиран регулатор на хлоридния канал 2, принадлежи към семейство от 4 подобни протеина, срещани при човека (CLCA1, CLCA2, CLCA3, CLCA4).<sup>116</sup> Проучване на Vijay Walia и съавтори от 2012 година установява, че експресия по-висока от средната, на човешкия калций активиран регулатор на хлоридния канал 2 (CLCA2) е асоциирана с една трета по-голям риск от метастази при 18 годишно проследяване. Маркерът е необходим за епителната диференциация, загубва се по време на туморната експресия и е свързан с метастазирането<sup>117</sup>

Интересна е връзката на човешкия CLCA2 с p53. Протеините от фамилията на p53 активират промотора на CLCA2 като се свързват директно с него. Ектопичната експресия на CLCA2 инхибира миграцията на карциномните клетки<sup>118</sup>. Това определя неговото едновременно прогностично и терапевтично приложение.<sup>119</sup>

### **4. Фибрилин 1**

Фибрилините са структурни компоненти на екстрацелуларните калций-свързващи микрофибрили. Микрофибрилите богати на фибрилин 1 имат голяма сила за поддържане на извънклетъчния матрикс на съединителната тъкан.<sup>120</sup>

Връзка между фибрилина и някои други карциноми е вече установена. Проучване от 2013г. дори предлага хиперметилацията на промотора на гена за фибрилин като високо специфичен и чувствителен маркер за колоректален карцином.<sup>121</sup> Проучванията за ролята на фибрилина при овариалния карцином са все още на експериментално ниво.<sup>122</sup>

Едно изследване от 2015г. разглежда взаимодействията между тумора и екстрацелуларния матрикс. Резултатите от него подкрепят тезата, че развитието и прогресията на рака, не е изцяло автономен процес, а може да се повлияе от взаимодействието между раковите клетки и заобикалящата ги микро среда, в която клетките на стромата и екстрацелуларния матрикс имат основно значение. Няколко проучвания изследват профила на екстрацелуларния матрикс в асоциация с клиничната прогресия при пациенти от I<sup>ви</sup> до III<sup>ти</sup> стадий карцином на млечната жлеза /или валидират своите резултати в независими свободни бази данни . Установява се връзка между гена за фибрилин 1 (FBN1) и далечните метастази и смърт в уни и мултивариантни проучвания, с по- добра прогноза при пациентите, при които този ген е преекспресирани.<sup>123</sup>

### **5. Фибронектин тип 3**

Фибронектина формира мрежата от нишки, която свързва клетките с екстрацелуларния матрикс. Човешкия фибрилин е мултимодуларен протеин, който съществува и като разтворим димер и като неразтворим компонент на екстрацелуларния матрикс. Фибронектина е преекспресирани при тройно-негативните тумори в сравнение с HER2 позитивните.<sup>124</sup> В проучване от 2002г. анализиращо експресията на протеините на екстрацелуларния матрикс при 134 операбилни болни с карцином на млечната жлеза се установява, че експресията на фибронектин е позитивно свързана със засягането на лимфните възли и KI 67, но не успява да докаже значението си за преживяемостта. <sup>125</sup>

### **6. Колаген алфа 1(XVIII) верига**

Този колаген е също един от протеините на екстрацелуларния матрикс. Протеолитични процеси в няколко участъка на С домейна водят до произвеждането на ендостатин – силен антиангиогенен протеин, който е способен да инхибира ангиогенезата и туморния растеж.<sup>126</sup>

Проучване на Gaëlle Brideau и съавтори от 2007г. докладва инхибиране на туморната ангиогенеза от ендостатина в ранните стадии на кожен карцином. Авторите установяват също, че ендостатина инхибира адхезията и миграцията на някои клетки върху фибронектина ин витро. Те предполагат, че ендостатина може да инхибира туморната лимфангеогенеза като понижава нивата на VEGF-C в тумора, инхибира миграцията на мастоцитите и регулира тумор асоциираното възпаление. <sup>127</sup>

През септември 2005г. ендостатина (Ендостар) е одобрен за лечение на недребноклетъчен карцином на белия дроб. От ендогенните инхибитори на ангиогенезата, ендостатина има най-

широкия антиканцерогенен спектър. Той инхибира регулаторните гени за ангиогенезата на повече от 12 % от човешкия геном, и все още е най-малко токсичното антираково средство при мишки . При хората ендостатина не е токсичен и към него не се развива резистентност.<sup>273</sup>

Ендостатина е свързан с рецепторите на повърхността на клетката включително интегрини и VEGFR2. Той потиска няколко ключови компонента на сигналната каскада на VEGF и в същото време стимулира сигналната каскада на тромбоспондин, друг мощен ангиостатичен протеин. Ендостатина е изучаван във фаза 1 и 2 на клинични проучвания при пациенти с метастатични карциноми и е показал ниска ефективност. Сега нова по-стабилна версия на ендостатина се въвежда в клиничната практика в лечението на карцинома на белия дроб и стомаха.<sup>128</sup>

## 7. Протеин S100-A9

S100A9 е калций и цинк свързващ протеин, играещ основна роля в регулацията на възпалителните процеси и имунния отговор. Проучване от 2015г., изследващо 144 туморни проби и ин витро анализ на клетъчни линии от карцином на млечната жлеза, установява връзка на експресията на S100A9 с хормон негативните тумори и Ki 67. Установява също, че този протеин се експресира в малигнените клетки и в тумор инфилтриращите.<sup>129</sup>

Едно по-старо изследване от 2010г. върху тъкан от 182 инвазивни карцинома и 45 контроли установява, че туморната експресия на S100A9 е свързана с по-лоша прогноза и напреднал стадий на заболяването. Авторите откриват връзка с размера на тумора, негативния рецепторен статус и диференцираността и го предлагат като прогностичен биомаркер.<sup>130</sup> Настоящи проучвания изследват tasquinimod, известен със способността си да се свързва с S100A9, в лечението на солидни тумори , като простатния карцином.<sup>131</sup>

## 8. Специфичен за базалната мембрана хепаран сулфат протеогликан 2

**Перлеканът** е също познат като мембранно специфичен хепаран сулфат протеогликан или хепатан сулфат протеогликан 2 (HSPG2). Синтезира се от васкуларния ендотел и гладката мускулатура. Представлява интегрален компонент на базалните мембрани. Играе основна роля във **васкуларизацията**. Основен за васкуларния отговор при нараняване.

Перлеканът има про-ангиогенна функция. При отделянето на протеази по време на растежа и инвазията на тумора перлеканът се разцепва на две вериги ендорепелин и LG3 пептид. Ендорепелина е анти-ангеогенен и анти туморен пептид, който инхибира ендотелната клетъчна

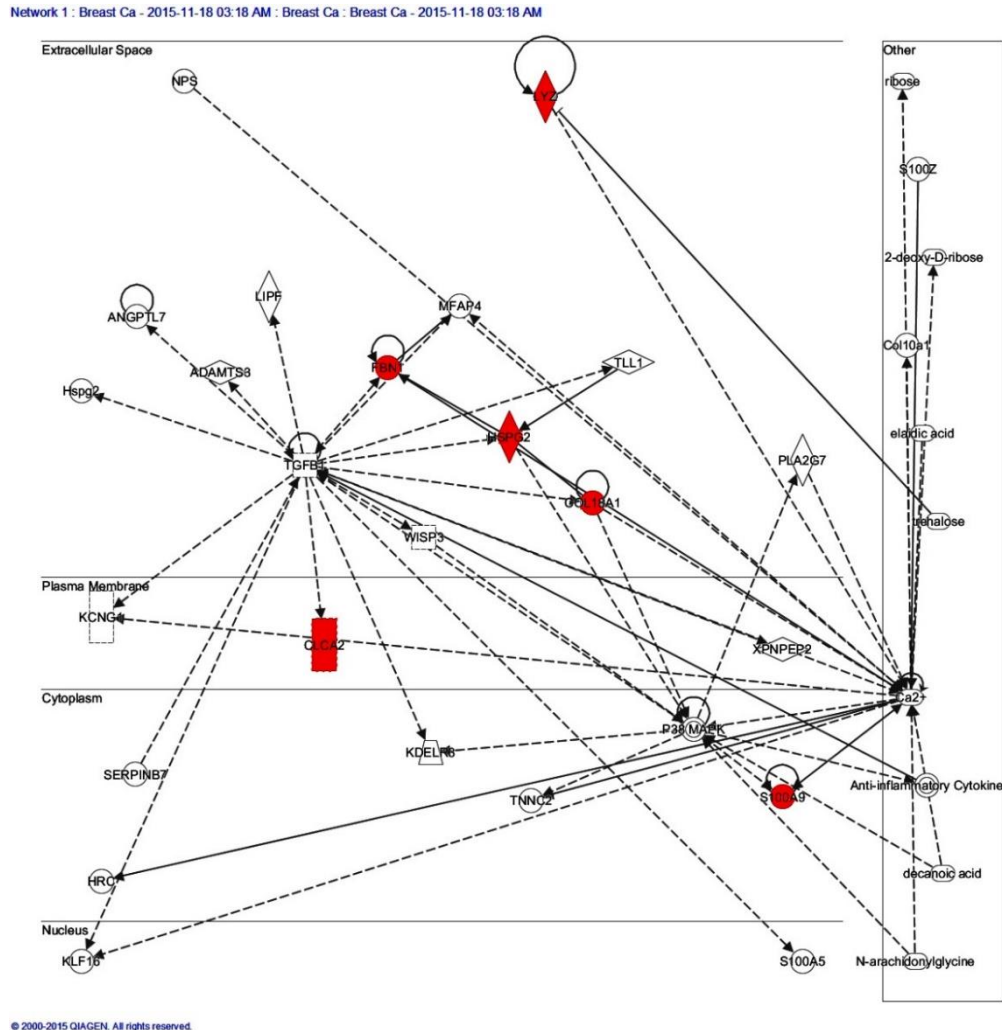
миграция, колаген индуцираната ендотелиална морфогенеза и растежа на кръвоносни съдове в хориоалантоиновата мембрана. Той е мощен инхибитор на ангиогенезата като едновременно се свързва с VEGFR2 и  $\alpha 2\beta 1$  интегрин. Активирането на  $\alpha 2\beta 1$  интегрин води до разграждане на актина и блокиране на ендотелиалната клетъчна миграция и свързването с **фибронектин и колаген тип 1**. Активирането на VEGFR2 индуцира дефосфорилация на рецептора чрез активиране на SHP-1 и супресира проангиогенната верига, най-вече като отслабва експресията на VEGFA.<sup>132</sup> LG3 пептида също има анти-ангеогенни характеристики, които обаче изискват свързване с калциеви йони.

На базата на изследването на протеините в клетъчни линии на карцином и на нормална тъкан LG3 пептида на перлекана е предложен като диагностичен маркер за карцином на млечната жлеза.<sup>133</sup> Доказано е, че системното доставяне на рекомбинантен ендорепелин към мишки, носещи туморен ксенографт, причинява значителна супресия на туморния растеж и скоростта на обмяна.<sup>134</sup>

Ефектите на ендорепелина са демонстрирани във вече доста ин виво и ин витро изследвания, поставяйки го в категорията на молекулите с истински терапевтичен потенциал. Екзогенния ендорепелин се свързва специфично с кръвоносните съдове в тумора, намалява растежа и метаболизма на карциномите. Още повече той се свързва с  $\alpha 2\beta 1$  интегрин, мощен про-ангиогенен рецептор, който е преекспресиран в активно пролифериращите ендотелни клетки. Използването на ендорепелин в клиничната практика би имало нисък риск за пациента и ниска токсичност, тъй като той не се свързва с нормалните кръвоносни съдове.<sup>51</sup>

Автофагията е биологичен механизъм за чистене на увредени протеини и продукти на оксидативния стрес, отделени в околната среда на тумора. Този процес може да помогне за решаването на тумора чрез спасяването на клетки, претърпели различни модификации или индуцирайки автофагия - клетъчна смърт на туморните кръвоносни съдове. Разцепени фрагменти от екстрацелуларния матрикс - протеогликани имат основна роля за регулация на ангиогенезата и клетъчната ендотелиална автофагия. Основна характеристика на прогресията на рака е ремоделирането на базалната мембрана и отделяне на разградени части от нейните компоненти. Ендостатина, получен от колаген XVIII и ендорепелина, C терминален сегмент на перлекана, имат двойна активност като едновременно модифицират ангиогенезата и ендотелиалната клетъчна автофагия. Манипулирането на тези ендогенни форми, може да представлява терапевтичен подход за ерадикация на рака.<sup>135</sup>

Опитахме се да намерим връзка между изследваните протеини, както и между тези протеини и експресията и функцията на VEGF. За целта използвахме първо Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®). IPA е уеб базиран софтуер за анализ, интеграция и интерпретация на информацията получена от експерименти с генома, протеома и метаболома. Това е могъщ инструмент за търсене и анализиране разкриващ значението на информацията и идентифициращ нови мишени или кандидати за биомаркери в контекста на биологичните системи.<sup>136</sup> Заложихме 8-те протеина, оказали се със статистически значима разлика в експресията при пациентките със събитие (метастаза, рецидив или смърт) в сравнение с тези без събитие. Мястото на всеки един от тези протеини, без миелопероксидазата, който не фигурира в базата данни, в клетката е представено на фигура 14.



Фигура 14. Разпределение на протеините в цитоплазмата и екстрацелуларния матрикс

Някои от протеините са намират в цитоплазмата, докато други са част от екстрацелуларното пространство. Вижда се още, че дори да нямат директно взаимодействие 7 от 8-те протеина имат общи пътища за действие. Това се подкрепя и от анализа на функциите на протеините.

Всички 7 протеина участват в клетъчната смърт и оцеляване, откриват се при гастроинтестиналните и малигнените процеси и като цяло при карциномите, при нараняване, или други абнормности. 6 от тях (без лизозима) имат функция при апоптозата. 4 са с доказана функция при карцинома на млечната жлеза. Това са COL18A1, FBN1, HSPG2 и S100A9. Подробно общите процеси, в които участват протеините, са дадени в таблица 14.

**Таблица 14. Общи пътища на значимите за преживяемостта протеини**

| Функция и заболяване            | p-Value  | Молекули  | Брой молекули |
|---------------------------------|----------|---|---------------|
| клетъчна смърт                  | 3.32E-05 | CLCA2, COL18A1, FBN1, FNDC1, HSPG2, LYZ, S100A9 | 7             |
| рак на ГИТ                      | 1.20E-02 | CLCA2, COL18A1, FBN1, FNDC1, HSPG2, LYZ, S100A9 | 7             |
| карциноми                       | 3.74E-02 | CLCA2, COL18A1, FBN1, FNDC1, HSPG2, LYZ, S100A9 | 7             |
| апоптоза                        | 2.04E-04 | CLCA2, COL18A1, FBN1, FNDC1, HSPG2, S100A9      | 6             |
| пролиферация                    | 1.48E-03 | CLCA2, COL18A1, FBN1, HSPG2, LYZ, S100A9        | 6             |
| тумори в малкия таз             | 4.14E-03 | COL18A1, FBN1, FNDC1, HSPG2, LYZ, S100A9        | 6             |
| урогенителни карциноми          | 4.85E-03 | COL18A1, FBN1, FNDC1, HSPG2, LYZ, S100A9        | 6             |
| меланом                         | 4.67E-02 | CLCA2, COL18A1, FBN1, FNDC1, HSPG2, S100A9      | 6             |
| оцеляване на организма          | 3.64E-06 | COL18A1, FBN1, HSPG2, LYZ, S100A9               | 5             |
| движение на клетката            | 1.02E-03 | CLCA2, COL18A1, FBN1, LYZ, S100A9               | 5             |
| кървене                         | 1.47E-05 | COL18A1, FBN1, HSPG2, S100A9                    | 4             |
| ревматизъм                      | 7.60E-04 | FBN1, HSPG2, LYZ, S100A9                        | 4             |
| аденокарцином на цекума         | 1.35E-03 | COL18A1, FNDC1, HSPG2, S100A9                   | 4             |
| оцеляване на клетката           | 2.09E-03 | CLCA2, COL18A1, LYZ, S100A9                     | 4             |
| карциноми на горен ГИТ          | 4.90E-03 | FBN1, HSPG2, LYZ, S100A9                        | 4             |
| карциноми на долен ГИТ          | 5.62E-03 | FBN1, HSPG2, LYZ, S100A9                        | 4             |
| клетъчна миграция               | 6.94E-03 | CLCA2, COL18A1, LYZ, S100A9                     | 4             |
| карцином на гърдата и яйчниците | 7.23E-03 | COL18A1, FBN1, HSPG2, S100A9                    | 4             |
| смърт на организма              | 1.63E-02 | FBN1, HSPG2, LYZ, S100A9                        | 4             |
| некроза                         | 2.11E-02 | CLCA2, COL18A1, LYZ, S100A9                     | 4             |

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

С настоящия дисертационен труд предлагаме един нов поглед върху прогностичните и предиктивните фактори при карцинома на млечната жлеза и карциномите по принцип. В първата глава е заложена идеята за зависимостта от времето. Няма универсален прогностичен фактор или индекс, който да е толкова всеобхватен, че да може да се приложи при всички пациенти. Дори обратното, с въвеждането на концепцията за персонализирана медицина прогнозата се определя върху конкретни характеристики на болния или малка група болни. Индивидуалните особености на пациента определят и неговия отговор към терапията, но дори тези особености не са постоянни, а непрекъснато се променят от взаимодействията помежду си и с течение на времето. По този начин определянето на прогнозата за болния не е еднократно събитие. Тя е непрекъснат процес на усъвършенстване на знанията ни и разбирането ни за човека и болестта.

Във втората глава на настоящия труд потърсихме факторите с най-голямо значение за преживяемостта сред пациентите лекувани в Клиниката по хирургия „Проф. Александър Станишев“ на УМБАЛ „Александровска“. Установихме, че размера на тумора, статуса на рецепторите за естроген и прогестерон, хистологичния тип, специфичния туморен маркер за гърда и стойността на фибриногена са от значение за преживяемостта на болния. Единствено хистологичният тип запазва своята прогностична значимост, ако в модела се включи и стадия на пациента. Резултатите в тази част имат само потвърдителен характер. Изброените прогностични фактори са вече доказани и са част от стандартния процес на взимане на решения. От заложените за изследване фактори в настоящото проучване, само малка част доказват своето значение. Един по-дълъг период на проследяване би дал възможност за изява и на други показатели, което е предмет на последващо изследване и интерпретация.

Третата глава довежда новите подходи в изучаването на биомаркерите при леглото на болния и дава ясни насоки за приложението на научно-изследователската работа в клиничната практика. Съвременния подход в изследването на биомаркерите включва събирането и съхранението на уникална информация за човека, както свързана с заобикалящата го среда и навици, така и заложена в неговото ДНК или намерена в неговите тъканите. В тази част разглеждаме приносите на биобанкирането за развитие на науката и значението им за ежедневната клинична практика.

От разгледаните външни фактори за пациента ( брой раждания, кърмене, прием на хормони, диетичен режим, тютюнопушене, облъчване с йонизиращи лъчения и нощен труд) нито един не показва да има значение за преживяемостта. Все пак някои от тези показатели, като наличието на деца и техният брой, е свързан с хистологичния вид; кърменето изобщо е свързано с наличието на туморни емболи в лимфни съдове ( $p=0,026$ ), а в групата на кърменето по категории връзка се установи с наличието на метастази в момента на диагнозата ( $p=0,024$ ); сред пациентките, при които е наблюдаван рецидив, по-често са тези, които са приемали хормонални препарати. Диетичният режим показва някои обещаващи резултати като например приема на плодове се свързва със стадия на пациента ( $p=0,047$ ); наличието на метастази при диагнозата ( $p<0,004$ ); тройно негативния субтип ( $p=0,05$ ) и HER2 преекспресията ( $p=0,051$ ). Приемът на сладки и тестени изделия корелира с размера на тумора ( $p=0,052$ ) и наличието на рецидиви ( $p=0,011$ ). Приемът на алкохол преди операцията се свързва с HER2 преекспресията ( $p=0,004$ ) и N-категорията на TNM-класификацията ( $p=0,049$ ) и се оказва значим за ранните събития ( $p=0,049$ ), макар по-скоро да има протективна роля. Тютюнопушенето се свързва с тройно негативния субтип ( $p=0,025$ ); йонизиращите лъчения с N-категорията на TNM ( $p=0,019$ ); работата с химични вещества с билатералните карциноми ( $p=0,005$ ).

Макар тези резултати да не доказват нито един от изследваните фактори като прогностичен за много от тях се установява връзка с вече доказани фактори за добра или по-лоша прогноза.

От една страна факторите, свързани с тумора, губят своята значимост при по-дълго проследяване и по-значими стават факторите свързани с пациента и околната среда. От друга страна факторите на околната среда показват своето значение при изследване на по-големи групи хора.

Сред евентуалните генетични прогностични и предиктивни фактори избрахме да изследваме два от полиморфизмите на васкуларния ендотелен растежен фактор, които досега не са изследвани сред български пациенти. Единият от тях - 634G>C повишава експресията на VEGF, а другият – 936 C>T я намалява. Не намерихме връзка между тези полиморфизми и преживяемостта. Установихме, че пациентите, при които е открит -634 G>C полиморфизъм, имат по-голям размер на тумора при диагноза, което може да се свърже с повишената експресия на VEGF, а наличието на +936C>T е свързано с билатералните карциноми, хистологичния вид и има гранична стойност за множествеността на тумора. По-голямо значение и приложение има самото установяване на наличието на даден полиморфизъм. Проучвания от последната година (2015г.) доказват, че пациенти хомозиготи по честия алел на +936C>T с тройно негативни тумори имат

полза от лечението с Бевацизумаб, докато при другите пациенти такава полза не се отчита. Това ни позволява да селектираме група пациенти, при които лечението с Бевацизумаб би било от съществена полза. В нашата биобанка такива пациенти са шест. Това превръща един от основните недостатъци на проучването – краткия период на проследяване, в негово основно предимство за лечението на тези пациенти. Ранните рецидиви и далечните метастази при тези пациентки предстои да се наблюдават в следващите години и знанието за техния генотип би помогнало за персонализиране на терапията им и подобряване на преживяемостта.

Последната част на настоящия труд потърси протеини от протеомния профил на туморната тъкан, които биха имали значение за преживяемостта. Сред изследваните 50 проби от туморна тъкан се установяват 8 протеина, които се различават статистически по своя интензитет при починалите болни или тези с метастази или рецидив от пациентите, при които не е наблюдавано събитие. Подробно е разгледана функцията на тези протеини и техните взаимодействия. Успяхме да установим връзка между всички открити протеини. Така миелопероксидазата и лизозима се намират в азурофилните гранули на неутрофилните гранулоцити и играят основна роля във възпалението. Доказана е също връзката между перлекана, фибронектина и колагена. Макар тези протеини да не са част от един и същи път на канцерогенезата, те могат взаимно да повлияят функцията си.

Резултатите от нашето проучване показват повишени нива на колаген алфа 1 в туморната тъкан на пациентите, при които е наблюдавано събитие. Част от този колаген е ендостатина. Разгледахме генотипа на тези пациенти за наличието на полиморфизми на VEGF. Установихме, че при всички починали пациенти (5), в групата с изследван протеинов профил, е налице честия алел +936 C, като 4 са хомозиготи, и 1 хетерозигот. Наличието на този генотип предполага и физиологична експресия на VEGF.

Интересно е значението на съотношението между ендостатина, който потиска ангиогенезата, и васкуларния ендотелен растежен фактор, който я промотира. Едно проучване от 2014 на Y. Ни и съавтори изследва предоперативните нива на серумния VEGF и ендостатина при 98 болни с недребноклетъчен карцином на белия дроб и 51 здрави контроли. Авторите установяват, че съотношението между VEGF и ендостатина е значително по-високо при пациенти с операбилен карцином в сравнение със здравите контроли. Съотношението при пациенти, които са все още живи 60 месеца след диагнозата е 8.3, докато съотношението при починалите е 12.9.

Субгруповият анализ на пациентите с NO установява значимо повишаване на преживяемостта при по-ниски стойности на това съотношение.<sup>137</sup>

Едно друго проучване изследва серумните нива на VEGF и ендостатина при 59 болни с карцином на млечната жлеза предоперативно и 3 седмици след операцията. При част от пациентите следоперативно нивото на VEGF намалява значително, докато нивото на ендостатина се запазва. Този резултат показва по нисък риск от рецидив в сравнение с пациентите, при които се запазва високото ниво на VEGF.<sup>138</sup>

Взаимоотношенията между VEGF и ендостатина при карцинома на гърдата предстоят да бъдат изследвани. Макар да показват известна тенденция, резултатите от настоящето проучване са базирани на прекалено малък брой пациенти, за да ни позволяват да направим заключение.

Настоящото изследване има няколко основни недостатъка. Пациентите, включени в изследването на прогностичните фактори, са малко. Това затруднява и субгруповия анализ и не позволява да търсим прогностични фактори в отделни групи пациенти. Проследяването на пациентите във всички изследвани кохорти е кратко. Едно по-дълго проследяване би разкрило силата на други прогностични фактори, които ние не успяхме да докажем или да намали значението на доказаните прогностични фактори.

Настоящото изследване създава огромно поле за бъдещи изследвания на прогнозата при болни с карцином на млечната жлеза.

## ИЗВОДИ

1. Повечето изследвани прогностични и предиктивни фактори се променят с времето. Не всички фактори са изследвани в повече от един момент от живота на болния. По тази причина няма проучвания оценяващи значението на тяхната промяна за далечните резултати.
2. От заложените за изследване евентуални прогностични фактори при болните диагностицирани и лекувани в Клиника по хирургия на УМБАЛ „Александровска“ своето значение потвърждават: размера на тумора, статуса на рецепторите за естроген и прогестерон, хистологичния тип, специфичния туморен маркер за гърда и стойността на фибриногена.
3. Биобанкирането е в основата на развитието, валидирането и въвеждането на методи за откриване на биомаркери, прогнозиране поведението и естествената история на рака.
4. Факторите на околната среда имат много противоречив ефект върху прогнозата на пациентите. Причина за това е комплексното действие на много показателни, голяма част от които са трудни за оценка или дори неизвестни.
5. Изследваните полиморфизми на васкуларния ендотелен растежен фактор -634G>C и +936 C>T нямат връзка с преживяемостта на болните. Литературните данни показват, че с помощта на тези полиморфизми могат да се селектират пациенти, които да имат полза от приложението на таргетна терапия.
6. Протеомният профил на туморната тъкан доказва своето значение като прогностичен фактор, потвърждава установени и разкрива нови цели за таргетна терапия. Изучаването му може да разкрие нови взаимодействия в процеса на карциногенезата и нови подходи в борбата с карциномите.

## ПРИНОСИ

1. За първи път в България са изследвани полиморфизми на гена за васкуларния ендотелен растежен фактор сред българската популация.
2. За първи път в България е селектирана група пациенти на базата на наличните полиморфизми, подходящи за лечение с таргетна терапия.
3. За първи път в България се установява връзката между някои от протеините в профила на тумора и преживяемостта при пациенти с карцином на млечната жлеза.
4. Създадена е нова обобщена класификация на прогностичните и предиктивни фактори при карцинома на млечната жлеза.
5. Създадена е биобанка на туморни тъкани на пациенти с карцином на млечната жлеза, което предлага основа за бъдещи изследвания.
6. Установено е значението на факторите на околната среда за прогнозата.
7. Потвърдена е прогностичната стойност на размера на тумора, статуса на рецепторите за естроген и прогестерон, хистологичния тип, специфичния туморен маркер за гърда и стойността на фибриногена.

## БИБЛИОГРАФИЯ

- 
- <sup>1</sup> International Agency for Research in Cancer. GLUBUCAN 2012 GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Breast Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=breast](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=breast)
  - <sup>2</sup> Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology* Volume 13, No. 8, p790–801, August 2012
  - <sup>3</sup> Alteri R, Bandi P, Brinton L, Casares C, Cokkinides V, Gansler T, et al. Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012. Publication of the American Cancer Society, Atlanta, Georgia
  - <sup>4</sup> Rosenberg P, Barker K, Anderson W. National Cancer Institute, Bethesda, Estrogen receptor status and the future burden of invasive and in-situ breast cancers in the United States
  - <sup>5</sup> De Angelis R, Sant M, Coleman M, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, and the EUROCARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EUROCARE-5—a population-based study *Lancet Oncol* 2014; 15: 23–34
  - <sup>6</sup> van de Water W, Markopoulos Ch, van de Velde C, Seynaeve C, Hasenburg A, Rea D, et al. Association Between Age at Diagnosis and Disease-Specific Mortality Among Postmenopausal Women With Hormone Receptor–Positive Breast Cancer *JAMA*. 2012;307(6):590-597
  - <sup>7</sup> Yu JI, Park W, Choi DH, Huh SJ, Nam SJ, Kim SW et al. Clinical Outcomes and Prognostic Factors of Pathologic N3 Breast Cancer Treated With Modern Standard Treatments. *Clin Breast Cancer*. 2015 Jun 18. pii: S1526-8209(15)00120-2.
  - <sup>8</sup> Brandt J, Garne JP, Tengrup I, Manjer J. Age at diagnosis in relation to survival following breast cancer: a cohort study. *World J Surg Oncol*. 2015 Feb 7;13:33
  - <sup>9</sup> Jayasinghe UW, Taylor R, Boyages J. Is age at diagnosis an independent prognostic factor for survival following breast cancer? *ANZ J Surg*. 2005 Sep; 75(9):762-7.
  - <sup>10</sup> Sio T, Chang K, Jayakrishnan R, Wu D, Politi M, Malacarne D, et al. Patient age is related to decision-making, treatment selection, and perceived quality of life in breast cancer survivors *World Journal of Surgical Oncology* 2014; 12:230

- <sup>11</sup> NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Breast Cancer. Version 3.2015.
- <sup>12</sup> Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations *Ann Oncol* (2012) 23 (suppl 6):vi7-vi12.
- <sup>13</sup> Perez CA, Zumsteg ZS, Gupta G, Morrow M, Arnold B, Patil SM, et al. Black race as a prognostic factor in triple-negative breast cancer patients treated with breast-conserving therapy: a large, single-institution retrospective analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jun; 139(2):497-506.
- <sup>14</sup> Copson E, Maishman T, Gerty S, Eccles B, Stanton L, Cutress R, et al. POSH study steering group and Diana Eccles Ethnicity and outcome of young breast cancer patients in the United Kingdom: the POSH study *British Journal of Cancer* (2014) 110, 230–241.
- <sup>15</sup> Caudle A, Gonzalez-Angulo A, Hunt K, Liu P, Pusztai L, Symmans W, et al. Predictors of Tumor Progression During Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer *JCO*, 2010; vol. 28 no. 11 1821-1828
- <sup>16</sup> Demicheli R, Bonadonna G, Hrushesky W, Retsky M, Valagussa P. Menopausal status dependence of the timing of breast cancer recurrence after surgical removal of the primary tumour. *Breast Cancer Res.* 2004; 6:R689-96
- <sup>17</sup> Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, Cardoso F, on behalf of the ESMO Guidelines Working Group Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up *Ann Oncol* (2013)
- <sup>18</sup> Land L, Dalton S, Jensen M, Ewertz M. Influence of comorbidity on the effect of adjuvant treatment and age in patients with early-stage breast cancer. *British Journal of Cancer.* 2012; 107, 1901–1907.
- <sup>19</sup> Cappellani A, Vita M, Zanghì A, Cavallaro A, Piccolo G, Majorana M, et al. Prognostic factors in elderly patients with breast cancer. *BMC Surgery* 2013, 13(Suppl 2):S2
- <sup>20</sup> Søggaard M, Thomsen R, Bossen K, Sørensen H, and Mette Nørgaard The impact of comorbidity on cancer survival: a review *Clin Epidemiol.* 2013; 5(Suppl 1): 3–29
- <sup>21</sup> Soerjomataram I, Louwman M, Ribot J, Roukema J, Coebergh J. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Feb; 107(3): 309–330.
- <sup>22</sup> Zhao X, Xu X, Zhang Q, Jia Z, Sun Si, Zhang J, et al. Prognostic and predictive value of clinical and biochemical factors in breast cancer patients with bone metastases receiving "metronomic" zoledronic acid *BMC Cancer.* 2011; 11: 403.
- <sup>23</sup> Cetin K, Christiansen Ch, Sværke Cl, Jacobsen J, Sørensen H. Survival in patients with breast cancer with bone metastasis: a Danish population-based cohort study on the prognostic impact of initial stage of disease at breast cancer diagnosis and length of the bone metastasis-free interval. *BMJ Open* 2015;5:e007702
- <sup>24</sup> Chan D, Vieira A, Aune D, Bandera E, Greenwood D, McTiernan A et al. Body mass index and survival in women with breast cancer—systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies *Ann Oncol.* 2014; Volume 25, Issue 10
- <sup>25</sup> Vodermaier A, Linden W, Rnic K, Young S, Ng A, Ditsch N, et al. Prospective associations of depression with survival: a population-based cohort study in patients with newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 143:373–384
- <sup>26</sup> Zainal N, Nik-Jaafar N, Baharudin A, Sabki Z, Ng Ch. Prevalence of Depression in Breast Cancer Survivors: a Systematic Review of Observational Studies *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* Volume 14, Issue 4, 2013; pp.2649-2656
- <sup>27</sup> Davi J, Collie K, Rancourt K, Neri E, Kraemer H, Spiegel D. Decrease in Depression Symptoms Is Associated With Longer Survival in Patients With Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis. *JCO* February 1, 2011 vol. 29no. 4 413-420
- <sup>28</sup> Chena J, Dengb Q, Panb Y, Hebb B, Yingc H, Suna H, et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer. *FEBS Open Bio* Volume 5, 2015, Pages 502–507
- <sup>29</sup> Koh C, Bhoo-Pathy N, Ng K, Jabir R, Tan G, See M, et al. Utility of pre-treatment neutrophil–lymphocyte ratio and platelet–lymphocyte ratio as prognostic factors in breast cancer *British Journal of Cancer.* 2015; 113, 150–158. doi:10.1038/bjc.2015.183
- <sup>30</sup> Shin H, Kim J, Son B, Lee J, Kim H, Ko B, et al. Neutrophil Lymphocyte Ratio Change After Systemic Therapy is Predictive of Cancer Specific Survival in Stage IV Breast Cancer *Global Breast Cancer Conference 2015 & 4th International Breast Cancer Symposium*
- <sup>31</sup> Huober J, Gelber S, Goldhirsch A, Coates A, G. Viale, Öhlschlegel C et al. Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. *Ann Oncol.* 2012; 23 (11): 2843-2851.
- <sup>32</sup> Nagaoa T, Kinoshitaa T, Hojoa T, Tsudab H, Tamuraa K, Fujiwaraa Y. The differences in the histological types of breast cancer and the response to neoadjuvant chemotherapy: The relationship between the outcome and the clinicopathological characteristics *The Breast.* Volume 21, Issue 3. June 2012; Pages 289–295

- <sup>33</sup> Kyndi M, Sørensen F, Knudsen H, Overgaard M, Nielsen H, Overgaard J. Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and Response to Postmastectomy Radiotherapy in High-Risk Breast Cancer: The Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 26:1419-1426.
- <sup>34</sup> Jacquemier J, Boher J, Roche H, Esterni B, Serin D, Kerbrat P et al. Protein expression, survival and docetaxel benefit in node-positive breast cancer treated with adjuvant chemotherapy in the FNCLCC - PACS 01 randomized trial *Breast Cancer Res.* 2011; 13(6): R109.
- <sup>35</sup> Liedtke C, Mazouni C, Hess K, André F, Tordai A, Mejia J, et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer *JCO* March 10, 2008; vol. 26 no. 8 1275-1281
- <sup>36</sup> Yerushalmi R, Woods R, Sca M, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential *The Lancet Oncology* Volume 11, Issue 2, February 2010; Pages 174–18
- <sup>37</sup> Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Tashima R, Toyozumi Y, Arima N. Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis. *World Journal of Surgical Oncology* 2011; 9:13
- <sup>38</sup> Konga X, Moranb M, Zhanga N, Hafftyc B, Yang Q. Meta-analysis confirms achieving pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy predicts favourable prognosis for breast cancer patients *European Journal of Cancer* Volume 47, Issue 14, September 2011; Pages 2084–2090
- <sup>39</sup> Lobbes M, Prevos R, Smidt M. Response monitoring of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy using breast MRI – a review of current knowledge. *Journal of Cancer Therapeutics and Research* 2012, 1:34
- <sup>40</sup> Miller M, Ottesen RA, Niland JC, Kruper L, Chen SL, Vito C. Tumor response ratio predicts overall survival in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2014 Oct; 21(10):3317-23.
- <sup>41</sup> Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ. Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology.* 1996; 105(4):394-402
- <sup>42</sup> Brzozowska A, Sodolski T, Duma D, Mazurkiewicz T, Mazurkiewicz M. Evaluation of prognostic parameters of E-cadherin status in breast cancer treatment *Ann Agric Environ Med.* 2012; 19(3): 541-546.
- <sup>43</sup> Yoshida R, Kimura N, Harada Y, Ohuchi N. The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol.* 2001 Mar;18(3):513-20.
- <sup>44</sup> Younis L, Sakka H, Haque<sup>1</sup>. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer *Int J Health Sci (Qassim).* 2007 Jan; 1(1): 43–51.
- <sup>45</sup> Margolese R, Hortobagyi G, Buchholz T. *Natural History and Prognostic Markers* Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.
- <sup>46</sup> Bouchardy Ch, Verkooijen H, Fioretta G. Social class is an important and independent prognostic factor of breast cancer mortality *Int. J. Cancer:* 119, 1145–1151. 2006; Wiley-Liss, Inc.
- <sup>47</sup> Héry M, Bonnetterre J, Roché H, Luporsi E, Kerbrat P, Namer M et al. Epirubicin-based chemotherapy as adjuvant treatment for poor prognosis, node-negative breast cancer: 10-year follow-up results of the French Adjuvant Study Group 03 trial *Bulletin du Cancer.* 2006; Volume 93, issue 10
- <sup>48</sup> Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *The Lancet*, Volume 378, Issue 9804, 12–18 November 2011, Pages 1707-1716
- <sup>49</sup> Coleman M, Forman D, Bryant H, Butler J, Maringe R, Nur U et al. the ICBP Module 1 Working Group. Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995–2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): an analysis of population-based cancer registry data *Volume 377, Issue 9760, 8–14 January 2011; Pages 127–138*
- <sup>50</sup> Dawood Sh, Broglio K, Gonzalez-Angulo A, Buzdar A, Hortobagyi G, Giordano S. Trends in Survival Over the Past Two Decades Among White and Black Patients With Newly Diagnosed Stage IV Breast Cancer *J CO.* 2008; vol. 26no. 30 4891-4898
- <sup>51</sup> Kesson E, Allardice G, George W, Burns H, Morrison D. Effects of multidisciplinary team working on breast cancer survival: retrospective, comparative, interventional cohort study of 13 722 women. *BMJ* 2012;344:e2718
- <sup>52</sup> Bérubé S, Lemieux J, Moore L, Maunsell E, Brisson J. Smoking at time of diagnosis and breast cancer-specific survival: new findings and systematic review with meta-analysis Bérubé et al. *Breast Cancer Res.* 2014; 16:R42
- <sup>53</sup> Pierce JP, Patterson RE, Senger CM, Flatt SW, Caan BJ, Natarajan L et al. Lifetime cigarette smoking and breast cancer prognosis in the After Breast Cancer Pooling Project. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Jan;106(1):djt359
- <sup>54</sup> Takeuchi H, Baba H, Kano T, Maehara Y. The time-related changes of the importance of prognostic factors in breast cancer. A sequential multivariate analysis of 1423 Japanese patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;94(3):273-8.
- <sup>55</sup> Parise C, Caggiano V. Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *Journal of Cancer Epidemiology.* Volume 2014; Article ID 469251, 11 pages

- <sup>56</sup> Goel M, Khanna P, Kishore J. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate Int J Ayurveda Res. 2010 Oct-Dec; 1(4): 274–278.
- <sup>57</sup> Bland J, Altman D. The logrank test BMJ. 2004 May 1; 328(7447): 1073.
- <sup>58</sup> Cox D. Regression models and life tables. Journal of the Royal Statistical Society 1972; B34:187-220.
- <sup>59</sup> McDonald J.H. Handbook of Biological Statistics. 2014, 3rd ed. pages 77-85 version.
- <sup>60</sup> Mankiewicz P. The Story of Mathematics (Paperback ed.). Princeton, NJ: Princeton University Press. 2004; p. 158. ISBN 9780691120461.
- <sup>61</sup> Chen J, Deng Q, Pan Y, He B, Ying H, Sun H et al. , Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer FEBS Open Bio. 2015; 5: 502–507.
- <sup>62</sup> Zhou X, Du Y, Huang Z, Xu J, Qiu T, Wang J et al. Prognostic Value of PLR in Various Cancers: A Meta-Analysis PLoS One. 2014; 9(6): e101119.
- <sup>63</sup> Krenn-Pilko S, Langsenlehner U, Stojakovic T, Pichler M, Gerger A, Kapp KS, Langsenlehner T. An elevated preoperative plasma fibrinogen level is associated with poor disease-specific and overall survival in breast cancer patients. Breast. 2015 Oct; 24(5):667-72.
- <sup>64</sup> Wen J, Yang Y, Ye F, Huang X, Li S, Wang Q, Xie X. The Preoperative Plasma Fibrinogen Level Is an Independent Prognostic Factor for Overall Survival of Breast Cancer Patients Who Underwent Surgical Treatment. Breast 2015 Oct 16; 24(6):745-50.
- <sup>65</sup> Elkin EB, Hudis C, Begg CB, Schrag D. The effect of changes in tumor size on breast carcinoma survival in the U.S.: 1975-1999. Cancer. 104(6):1149-57, 2005 -
- <sup>66</sup> Weissenbacher TM, Zschage M, Janni W, Jeschke U, Dimpfl T, Mayr D et al. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified? Breast Cancer Res Treat. 2010 Jul; 122(1):27-34
- <sup>67</sup> Ustaalioglu BO, Bilici A, Kefeli U, Şeker M, Oncel M, Gezen C, et al. The importance of multifocal/multicentric tumor on the disease-free survival of breast cancer patients: single center experience. Am J Clin Oncol. 2012 35(6):580-6
- <sup>68</sup> Rabban J. The New Edition (7th) AJCC Staging System for Breast Cancer A Summary of Key Changes
- <sup>69</sup> Song Y, Shin S, Cho J, Park M, The Role of Lymphovascular Invasion as a Prognostic Factor in Patients with Lymph Node-Positive Operable Invasive Breast Cancer. J Breast Cancer. 2011 Sep; 14(3): 198–203.
- <sup>70</sup> Woo CS, Silberman H, Nakamura SK, Ye W, Sposto R, Colburn W et al. Lymph node status combined with lymphovascular invasion creates a more powerful tool for predicting outcome in patients with invasive breast cancer. Am J Surg. 2002 Oct; 184(4):337-40.
- <sup>71</sup> Van Zee KJ, Manasseh DM, Bevilacqua JL, Boolbol SK, Fey JV, Tan LK et al. A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. Ann Surg Oncol. 2003 Dec; 10(10):1140-51.
- <sup>72</sup> Scow JS, Degnim AC, Hoskin TL, Reynolds C, Boughey JC. Assessment of the performance of the Stanford Online Calculator for the prediction of nonsentinel lymph node metastasis in sentinel lymph node-positive breast cancer patients. Cancer. 2009 Sep 15; 115(18):4064-70.
- <sup>73</sup> Rakha E, Martin S, Lee A, Morgan D, Pharoah P, Hodi Z, et al. The Prognostic Significance of Lymphovascular Invasion in Invasive Breast Carcinoma. Cancer. 2011; Volume 118, Issue 15
- <sup>74</sup> Yamaguchi J, Ohtani H, Nakamura K, Shimokawa I, Kanematsu T. Prognostic Impact of Marginal Adipose Tissue Invasion in Ductal Carcinoma of the Breast. Am J Clin Pathol 2008;130:382-388
- <sup>75</sup> Wu S, He Zh, Li Q, Sun J, Li F, Lin H et al. Prognostic Value of Metastatic Axillary Lymph Node Ratio for Chinese Breast Cancer Patients PLoS One. 2013; 8(4): e61410
- <sup>76</sup> Xiao XS, Tang HL, Xie XH, Li LS, Kong YN, Wu MQ, et al. Metastatic axillary lymph node ratio (LNR) is prognostically superior to pN staging in patients with breast cancer--results for 804 Chinese patients from a single institution. Asian Pac J Cancer Prev. 2013; 14(9):5219-23.
- <sup>77</sup> Zhu C, Wu XZ. Proposal of new classification for stage III breast cancer on the number and ratio of metastatic lymph nodes J Surg Oncol. 2012 Nov; 106(6):696-702.
- <sup>78</sup> Lee H, Ko S, Yoon C, Kang S, Hur M, Kim E et al. Prognostic significance of metastatic axillary lymph node ratio in stage IIIC (pN3) breast cancer. The Breast. 2007; Volume 16, Supplement 1, Pages S26
- <sup>79</sup> Onitilo A, Engel J, Greenlee R, Mukesh B. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. Clinical Medicine & Research. 2009; vol. 7 no. 1-2 4-13
- <sup>80</sup> Jonat W, Arnold N. Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? Ann Oncol. 2011; 22 (3): 500-502.
- <sup>81</sup> Dieterich M, Hartwig F, Stuberta J, Klöcking S, Kundt G, Stengeld B et al. Accompanying DCIS in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma is predictive of improved local recurrence-free survival. The Breast. 2014; Volume 23, Issue 4, Pages 346–351

- <sup>82</sup> Litière S, Werutsky G, Fentiman I, Rutgers E, Christiaens M, Van Limbergen E, et al. Breast conserving therapy versus mastectomy for stage I–II breast cancer: 20 year follow-up of the EORTC 10801 phase 3 randomised trial. *The Lancet*. 2012 Volume 13, No. 4, p412–419
- <sup>83</sup> Giuliano A, Hunt K, Ballman K, Beitsch P, Whitworth P, Blumencranz P, et al. Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis. *JAMA*. 2011; Vol 305, No. 6
- <sup>84</sup> Lia C, Zhangb P, Lia R, Wua C, Zhanga X, Zhua H. Axillary lymph node dissection versus sentinel lymph node biopsy alone for early breast cancer with sentinel node metastasis: A meta-analysis *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2015; Volume 41, Issue 8, Pages 958–966
- <sup>85</sup> Fisher C, Ma C, Gillanders W, Aft R, Eberlein T, Gao F, et al. Margenthaler Neoadjuvant Chemotherapy Is Associated with Improved Survival Compared with Adjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer Only after Complete Pathologic Response *Annals of Surgical Oncology*. 2012; Volume 19, Issue 1, pp 253–258
- <sup>86</sup> Cho J, Jung S, Lee J, Shim E, Kim N, Kim Z et al. A Review of Breast Cancer Survivorship Issues from Survivors' Perspectives *J Breast Cancer*. 2014; 17(3): 189–199.
- <sup>87</sup> Koukourakisa M, Papazogloub D, Giatromanolakic A, Bougioukasd G, Maltezosb E, Siviridisc E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004; Volume 46, Issue 3, Pages 293–298
- <sup>88</sup> Yan Y, Liang H, Li T, Guo Sh, Li M, Li Sh, Qin X. Vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis of 13 case–control studies *Tumor Biol*. 2014; 35:2687–2692
- <sup>89</sup> Ma J, Hu W, Zhang P, Sun Y, Wang N, Teng X, Qiao Q. The Association Between VEGF +936C/T and -634G/C Polymorphisms and Breast Cancer Susceptibility, Tumor Growth, and Metastases: Evidence From 20,728 Subjects. *Cancer Invest*. 2015; 33(7):312–7
- <sup>90</sup> Додова Р. Влияние на генетични и геномни промени върху развитието на рака на гърдата в българската популация (Дисертационен труд) Медицински Университет София 2015
- <sup>91</sup> Folkman J. Tumor angiogenesis. Therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285:1182–1186
- <sup>92</sup> Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst*. 1972; 48:347–356
- <sup>93</sup> Alia E, Shetab M, Mohsenc M. Elevated serum and tissue VEGF associated with poor outcome in breast cancer patients. *Alexandria Journal of Medicine* 2011; Vol.47, Issue 3, , Pages 217–224
- <sup>94</sup> Gasparini G. Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer *The Oncologist*. 2000; vol. 5 Supplement 1 37–44
- <sup>95</sup> Ferrara N, Hillan K, Gerber H, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer *Nature Reviews Drug Discovery* 3,2004; 391–400
- <sup>96</sup> "Press Announcements - FDA Commissioner announces Avastin decision". U.S. Food and Drug Administration. 18 Nov 2011. Retrieved 31 Oct 2014.
- <sup>97</sup> Власковска М, Дудов А, Куртева Г, Христова Св, Хаджиева Т, Калев Д. и съавтори. Национални медицински стандарти за системно лекарствено лечение, оценка на лечебен ефект и проследяване на слокачествени солидни тумори при възрастни. 2015; Списние на Българското Онкологично Дружество
- <sup>98</sup> Lima J, Rodrigues D, Carcano F, Cruz M, Dos Santos L. Anti-Cancer Agents & Biologic Therapy Breast Cancer, Metastatic Translational Research. *Annals of Oncology*. 2014; 25 (suppl\_4): iv116–iv136.
- <sup>99</sup> Sikov W, Berry D, Perou C, Singh B, Cirrincione C, Tolaney S et al. Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (Alliance). *JCO*. 2015; vol. 33 no. 1 13–21
- <sup>100</sup> Bear H, Tang G, Rastogi P, Geyer Sh, Liu Q, Robidoux A et al. Neoadjuvant plus adjuvant bevacizumab in early breast cancer (NSABP B-40 [NRG Oncology]): secondary outcomes of a phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 2015; Volume 16, Issue 9, Pages 1037–1048
- <sup>101</sup> Blank P, Loibl S, Linderholm B, Caramuta S, Nekljudova V, Szucs T et al. Cost-effectiveness analysis of VEGF-A testing to predict response to bevacizumab (BEV) as a component of neo-adjuvant therapy of early HER's-2 negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2015; 26 (suppl 3):iii16–iii17.
- <sup>102</sup> Etienne-Grimaldi M, Formento P, Degeorges A, Pierga J, Delva R, Pivot X et al. Prospective analysis of the impact of VEGF-A gene polymorphisms on the pharmacodynamics of bevacizumab-based therapy in metastatic breast cancer patients *Br J Clin Pharmacol*. 2011; 71(6): 921–928.

- <sup>103</sup> Hein AI, Lambrechts D, Minckwitz G, Haberle L, Eidtmann H, Tesch H et al. Genetic variants in VEGF pathway genes in neoadjuvant breast cancer patients receiving bevacizumab: Results from the randomized phase III GeparQuinto study. *Int. J. Cancer*. 2015; 137, 2981–2988
- <sup>104</sup> Alldridge L, Metodieva G, Greenwood Ch, Al-Janabi K, Thwaites L, Sauven P, Metodiev M. Proteome Profiling of Breast Tumors by Gel Electrophoresis and Nanoscale Electrospray Ionization Mass Spectrometry *J. Proteome Res*. 2008; 7 (4), pp 1458–1469
- <sup>105</sup> Willard H. H. (1988) Instrumental methods of analysis. Belmont, Calif.: Wadsworth Pub. Co. xxi, 895pp.
- <sup>106</sup> GeneCards® Human Gene Database. MPO Gene (Protein Coding) [http://pathcards.genecards.org/card/transcriptional\\_misregulation\\_in\\_cancer](http://pathcards.genecards.org/card/transcriptional_misregulation_in_cancer)
- <sup>107</sup> Ambrosone Ch, Barlow W, Reynolds W, Livingston R, Yeh I, Choi J et al. Myeloperoxidase Genotypes and Enhanced Efficacy of Chemotherapy for Early-Stage Breast Cancer in SWOG-8897. *J Clin Oncol*. 2009; 27(30): 4973-79.
- <sup>108</sup> Ky B, Putt M, Sawaya H, French B, Januzzi JL Jr, Sebag IA et al. Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes, and trastuzumab. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63(8):809-16.
- <sup>109</sup> Droeser R, Hirt Ch, Eppenberger-Castori S, Zlobec I, Viehl C, Frey D et al. High Myeloperoxidase Positive Cell Infiltration in Colorectal Cancer Is an Independent Favorable Prognostic Factor *PLoS One*. 2013; 8(5): e64814.
- <sup>110</sup> Däster S, Eppenberger-Castori S, Hirt Ch, Soysal S, Delko T, Nebiker Ch et al. Absence of myeloperoxidase and CD8 positive cells in colorectal cancer infiltrates identifies patients with severe prognosis *Oncol Immunology*. 2015; Volume 4, Issue 12
- <sup>111</sup> Ilie M, Hofman V, Ortholan C, Bonnetaud C, Coëlle C, Mouroux J, Hofman P. Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011; 118: 1726–1737
- <sup>112</sup> Li YW, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Gao Q, Xiao YS et al. Intratumoral neutrophils: a poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma following resection. *J Hepatol* 2011; 54: 497–505
- <sup>113</sup> Mueller B. Myeloperoxidase in the Progression of Breast Cancer Descriptive Note : Final rept. 28 Aug 2009-27 Aug 2012 <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA575227>
- <sup>114</sup> Vizoso F, Plaza E, Vázquez J, Serra C, Lamelas M, González L, et al. Lysozyme Expression by Breast Carcinomas, Correlation With Clinicopathologic Parameters, and Prognostic Significance. *Annals of Surgical Oncology*. 2001; Volume 8, Issue 8, pp 667-674
- <sup>115</sup> Serra C, Vizoso F, Alonso L, Rodríguez J, González L, Fernández M et al. Expression and prognostic significance of lysozyme in male breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002; 4(6): R16.
- <sup>116</sup> Pauli BU, Abdel-Ghany M, Cheng HC, Gruber AD, Archibald HA, Elble RC. Molecular characteristics and functional diversity of CLCA family members. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27(11):901-5.
- <sup>117</sup> Walia V, Yu Y, Cao D, Sun M, McLean JR, Hollier BG et al. Loss of breast epithelial marker hCLCA2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and indicates higher risk of metastasis. *Oncogene*. 2012; 31(17):2237-46.
- <sup>118</sup> Sasaki Y, Koyama R, Maruyama R, Hirano T, Tamura M et al. CLCA2, a target of the p53 family, negatively regulates cancer cell migration and invasion. *Cancer Biol Ther*. 2012; 13(14):1512-21
- <sup>119</sup> Walia V, Ding M, Kumar S, Nie D, Premkumar LS, Elble RC. hCLCA2 Is a p53-Inducible Inhibitor of Breast Cancer Cell Proliferation. *Cancer Res*. 2009; 69(16):6624-32
- <sup>120</sup> Handford P. Fibrillin-1, a calcium binding protein of extracellular matrix *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2000; Volume 1498, Issues 2–3, Pages 84–90
- <sup>121</sup> Guo Q, Song Y, Zhang H, Wu X, Xia P, Dang C. Detection of hypermethylated fibrillin-1 in the stool samples of colorectal cancer patients. *Med Oncol*. 2013; 30(4):695
- <sup>122</sup> Wang Z, Liu Y, Lu L, Yang L, Yin Sh, Wang Y et al. Fibrillin-1, induced by Aurora-A but inhibited by BRCA2, promotes ovarian cancer metastasis. *Oncotarget*. 2015; 6(9):6670-83.
- <sup>123</sup> Giussani M, Merlino G, Cappelletti V, Tagliabue E, Daidone M. Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression *Seminars in Cancer Biology*. 2015; 35 p 3–10
- <sup>124</sup> Schulz D, Böllner C, Thomas G, Atkinson M, Esposito I, Höfler H et al. Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE and mass spectrometry *J. Proteome Res*. 8.2009; pp. 3430–3438
- <sup>125</sup> Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL et al. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer*. 2002; 38(18):2362-70.
- <sup>126</sup> Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, Thibaud-Nissen F, Astashyn A, Ermolaeva O et al. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res*. 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80781>

- <sup>127</sup> Brideau G, Mäkinen MJ, Elamaa H, Tu H, Nilsson G, Alitalo K et al. Endostatin overexpression inhibits lymphangiogenesis and lymph node metastasis in mice. *Cancer Res.* 2007; 67(24):11528-35.
- <sup>128</sup> Sund M, Kalluri R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28(0): 177–183.
- <sup>129</sup> Bergenfelz C, Gaber A, Allaoui R, Mehmeti M, Jirstrom K, Leanderson T et al. S100A9 expressed in ER(-)PgR(-) breast cancers induces inflammatory cytokines and is associated with an impaired overall survival. *Br J Cancer.* 2015; 113(8):1234-43
- <sup>130</sup> Noetzel E, Schütz A, Bernhagen J, Hartmann A, Dahl E, Knüchel-Clarke R. Abstract LB-218: S100A9 is a novel biomarker for poor survival of breast cancer patients *Cancer Res* April 15, 2010 70; LB-218
- <sup>131</sup> Williamson S, Hartley A, Heer R. A review of tasquinimod in the treatment of advanced prostate cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2013; 7: 167–174.
- <sup>132</sup> Douglass S, Goyal A, Iozzo R. The role of perlecan and endorepellin in the control of tumor angiogenesis and endothelial cell autophagy *Connective Tissue Research* 2015; Vol. 56, Issue 5
- <sup>133</sup> Chang JW, Kang UB, Kim DH, Yi JK, Lee JW, Noh DY et al. Identification of circulating endorepellin LG3 fragment: Potential use as a serological biomarker for breast cancer. *Proteomics Clin Appl.* 2008; 2(1):23-32
- <sup>134</sup> Bix G, Castello R, Burrows M, Zoeller JJ, Weech M, Iozzo RA, et al. Endorepellin in vivo: targeting the tumor vasculature and retarding cancer growth and metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98, 1634–1646.
- <sup>135</sup> Poluzia C, Iozzo R, Schaefer L. Endostatin and endorepellin: A common route of action for similar angiostatic cancer avengers. *Advanced Drug Delivery Reviews* Volume 97, 1 February 2016, Pages 156–173
- <sup>136</sup> Ingenuity IPA - Integrate and understand complex 'omics data <http://www.ingenuity.com/products/ipa>
- <sup>137</sup> Hu Y, Hu M, Shi G, Han Y, Li B. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin correlates with the prognosis of operable non-small cell lung cancer. *EJSO* 40.2014; 1136e1142
- <sup>138</sup> Zhao J, Yan F, Ju H, Tang J, Qin J. Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 2004; 204(1):87-95.

#### ПУБЛИКАЦИИ:

1. Седлоев Т, Коруков Б, Спиридонов Й, **Василева М**, Хаджидеков В, Христова С, Дамянов Д. Прогностични значение на аксиларния нодален статус при болни с карцином на гърдата във втори и трети стадий на заболяването след комплексно лечение – неoadювантна химиотерапия, хирургично лечение и адювантна терапия. Рак на млечната жлеза. Онкопластичен подход. Медарт, 2012, стр 70-80, ISBN: 978-954-397-027-8
2. **Василева М**, Седлоев Т, Ангелов К, Велев Г, Додова Р, Дачева Д, Миткова А, Кънева Р, Влахова А, Диков Т, Христова С, Маслянков С, Тодоров Г. Методология на получаването и съхранението на туморни тъкани при карцинома на млечната жлеза. XIV национален конгрес по хирургия с международно участие, 2014, Том 2, стр. 803-806, ISBN: 1314-297
3. **Vasileva M**, Sedloev T, Angelov K, Dacheva D, Dodova R, Mitkova A, Vlahova A, Dikov T, Velev G, Masliankov S, Kaneva R, Hristova S, Pavlov V, Todorov G. Annual report of Medical University of Sofia breast cancer biobank. Abstracts and papers 5<sup>th</sup> Turkish-Bulgarian Breast&Endocrine surgery club meeting, 2015, p22-26
4. Sedloev T, Bassarova A, Angelov K, **Vasileva M**, Asenov Y. Combination of Juvenile Papillomatosis, Juvenile Fibroadenoma and Intraductal Carcinoma of the Breast in a 15-Year-old Girl. Anticancer Research, vol 35, number 9: 5027-5030 (2015), ISSB: 0250-7005, IF - 1.826

#### УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ

1. Участие в 2<sup>ри</sup> Международен Конгрес за Персонализирана Медицина - Up Close and Personalized, Париж, Франция, Юли, 2013 **Mariela Vasileva**, Kostadin Angelov, Theophil Sedloev, Alena Chyprina, George Todorov. Prognostic and predictive factors in breast cancer-systematic review.
2. Участие в 9<sup>ти</sup> Европейски Конгрес за Рак на Гърдата (EBCC-9), Глазгоу, Шотландия, Март, 2014, **Mariela Vasileva**, Theophil Sedloev, Kostadin Angelov, George Todorov. Analysis of the recently investigated prognostic factors of breast cancer. EJC supplements, volume 50, March 2014.