



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

**КАТЕДРА ПО НУКЛЕАРНА МЕДИЦИНА, ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ И
МЕДИЦИНСКА ОНКОЛОГИЯ**

Д-р Георги Димитров Димитров

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

Дисертационен труд

За придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование 7. „Здравеопазване и спорт“

Професионално направление 7.1. Медицина

Докторска програма „Медицинска онкология“

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

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

Доц. д-р Весела Иванова Тодорова, дм

София, 2024

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

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

ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОНС “ДОКТОР”

Д-р Георги Димитров Димитров

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

София, 2024г.

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

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



СЪДЪРЖАНИЕ

Списък със съкращения.....	5
На латиница	5
На кирилица	7
Въведение	8
1. Литературен обзор	10
1.1 Епидемиология на рака на гърдата	10
1.1.1 Преживяемост	12
1.2 Етиология на карцинома на гърдата	13
1.3 Диагностициране на рака на гърдата	14
1.4 Стадиране на рака на гърдата	15
1.5 Патология на карцинома на гърдата	17
1.6 Молекулярни подтипове карцином на гърдата	20
1.6.1 Луминален карцином на гърдата	20
1.6.2 HER2 обогатен подтип на карцином на млечната жлеза.....	23
1.6.3 базалноклетъчен карцином на гърдата.....	24
1.6.4 неклассифициран тип карцином на гърдата	25
1.7 Лечение на рака на гърдата	26
1.7.1 Неoadювантно лечение	27
1.7.2 прицелна терапия за карцином на гърдата.....	28
1.8 Оценка на терапевтичния отговор	32
1.9 Пълен патологичен отговор	33
1.9.1 Потенциални биомаркери за предсказване на ППО	35
1.10 Нерешени въпроси в предсказването на терапевтичния отговор от неoadювантна терапия	38
2 Цел и задачи на дисертацията.....	40
3 Материали и методи	42

3.1 Туморни проби и пациенти	42
3.2 Обработка на туморните блокчета	44
3.3 Оборудване, реактиви и антитела	44
3.4 Оцветяване с Хематоксилин и Еозин (H&E)	44
3.5 Имунохистохимия - (ИХХ)	45
3.6 Транскриптомен анализ	47
3.7 Статистически анализ	47
4 Резултати.....	49
4.1 Резултати от всички туморни подгрупи	50
4.1.1 Еднофакторен анализ на клиничните параметри	50
4.1.2 Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри	53
4.1.3 Еднофакторен анализ на имунохистохимичните биомаркери.....	57
4.1.4 Многофакторен логистичен регресивен анализ	62
4.1.5 Сходства и разлики между английската и българската кохорти при всички молекулярни подтипове КМЖ	63
4.1.6 Конкордантност и Дискордантност на Биомаркерите	65
4.2 Резултати в HR-отрицателната подгрупа	67
6.2.1 Еднофакторен анализ на честота на ППО при HR-отрицателни КМЖ	67
4.2.2 Еднофакторен анализ на клиничните параметри при HR-отрицателни КМЖ	67
4.2.3 Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри при HR-отрицателни КМЖ	70
4.2.4 Имунохистохимични параметри при HR-отрицателни кмж.....	73
4.3 Резултати от подгрупата с ТНКМЖ	77
4.3.1 Еднофакторен анализ на честотата на ППО при ТНКМЖ	77
4.3.2 Еднофакторен анализ на клиничните параметри при ТНКМЖ.....	78
4.3.3 Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри при ТНКМЖ.....	79
4.3.4 Имунохистохимични параметри при ТНКМЖ.....	81

4.3.5 Многофакторен логистичен регресивен анализ на ТНКМЖ	84
4.4 Транскриптомен анализ	86
4.4.1 Експресия на <i>MME</i> (CD10)	86
4.4.2 Експресия на <i>p53</i>	86
4.4.3 Експресия на EGFR	86
5 Обсъждане	89
6 Изводи	100
7 Заключение	102
8 Приноси на дисертационния труд	103
9 Научни публикации и съобщения свързани с дисертационния труд	104
9.1 Участия в научни форуми с публикувани резюмета	104
10 Библиография	105
11 Приложения	123
12 Благодарности	127

СПИСЪК СЪС СЪКРАЩЕНИЯ

НА ЛАТИНИЦА

АКТ	Протеин киназа Б
ВАК	BCL-2 homologous antagonist/killer
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein-1
BRCA1/2	Breast Cancer associated gene 1/2
CD10	Cluster of differentiation 10
СК	Cytokeratin
CNB	Core needle biopsy
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole (double stranded DNA staining)
DCIS	Ductal carcinoma in situ
DFS	Disease-free survival
E-CADHERIN	Epithelial calcium-dependent adhesion molecule
EGF-R	Epithelial growth factor receptor
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
ER	Estrogen receptor
ERBB2	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FDG-PET-CT	Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography
EC	Epirubicin and cyclophosphamide
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FNA	Fine needle aspiration
GATA3	Guanosine-adenine-thymine-adenine binding protein
GDP	Guanosine 5'-Diphosphate
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosine 5'-Triphosphate
GTPase	Activating Proteins Guanine Nucleotide Exchange Factors
H&E	Hematoxylin and eosin stain
HR	Hormone receptor

HER2	Human epidermal receptor 2/ neuroblastoma associated
JNK	Jun N-terminal kinase
LCIS	Lobular carcinoma in situ
LNIS	Ductal neoplasia in situ
MAB	monoclonal antibody
MAP-K	Mitogen activated protein kinase
MET	Mesenchymal to epithelial transition
MME	Membrane Metalloendopeptidase
MMP	Matrix metalloproteinases
MYC	Myelocytomatosis oncogene
OM	Original magnification
OS	Overall survival
P-CADHERIN	Placental calcium-dependent adhesion molecule
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PR	Progesterone receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAC	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAS	Rat sarcoma oncogene
RNA	Ribonucleic acid
SALL4	Sal-like protein 4
TGF-beta	Transforming growth factor beta
(t)P53	Tumor protein 53

НА КИРИЛИЦА

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

ВЪВЕДЕНИЕ

Карциномът на млечните жлези (КМЖ) е едно от най-честите злокачествени заболявания сред жените в цял свят, представляващ приблизително 26% от всички случаи на рак в тази група (1). Специфични тумор-агностични фактори усъвършенстват терапията, насочена към различни подгрупи на заболяването (2). Неoadювантната терапия за карцином на гърдата (в стадий II – III) е подход, при който оперативната интервенция се извършва след прилагане на системно лечение (химиотерапия, хормонална терапия и/или имунотерапия) в зависимост от туморната биология (3). Този подход позволява намаляване на размера на тумора преди операцията и оценка на чувствителността към определеното системно лечение. Антрациклин базираната неoadювантната химиотерапия (НАХТ), един от най-често прилаганите в клиничната практиката режими, довежда до пълен патологичен отговор (ППО) при приблизително 30% от пациентите с ранен карцином на гърдата (4). Този терапевтичен резултат показва положителна корелация с по-добра прогноза, което го прави привлекателна клинично-патологична цел. Сред признатите прогностични и предиктивни биомаркери за карцином на гърдата, естрогенният рецептор (ER) и рецепторът на епидермалния човешки растежен фактор 2 (HER2) се определят като едни от най-силните индикатори както за прогнозата, така и за предвиждането на отговора към системното лечение (5, 6). Други фактори като митотичния индекс Ki-67 са показали спорни резултати с предсказването на този отговор (7). Степента на туморната диференциация (G) съгласно Модифицирана система за оценяване на Скарф-Блум-Ричардсън според Елстън-Елис и последващият резултат от НАХТ имат важна роля в определянето на прогнозата (8). До момента връзката между туморната биология и предсказването на отговора към системната терапия остава неясна, като това изисква изучаването на допълнителни предиктивни фактори. Изследвания, насочени към експресията на голям брой молекули, свързани с различни туморни биологии, са показали разнообразни резултати в отношение на честотата на терапевтичния отговор към системното лечение, въпреки това, все още липсва консенсус в тази област (9). Целта на това проучване е да изясни връзката между различни клинични, патохистологични и имунохистохимични фактори и ППО, след 4-6 курса антрациклин базирана НАХТ при пациентки с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза, диагностицирани в стадий IIIa/b и стратифицирани по експресията на ER, PR, HER2, EGFR, CK5, CD10, p53 и SALL4.

01

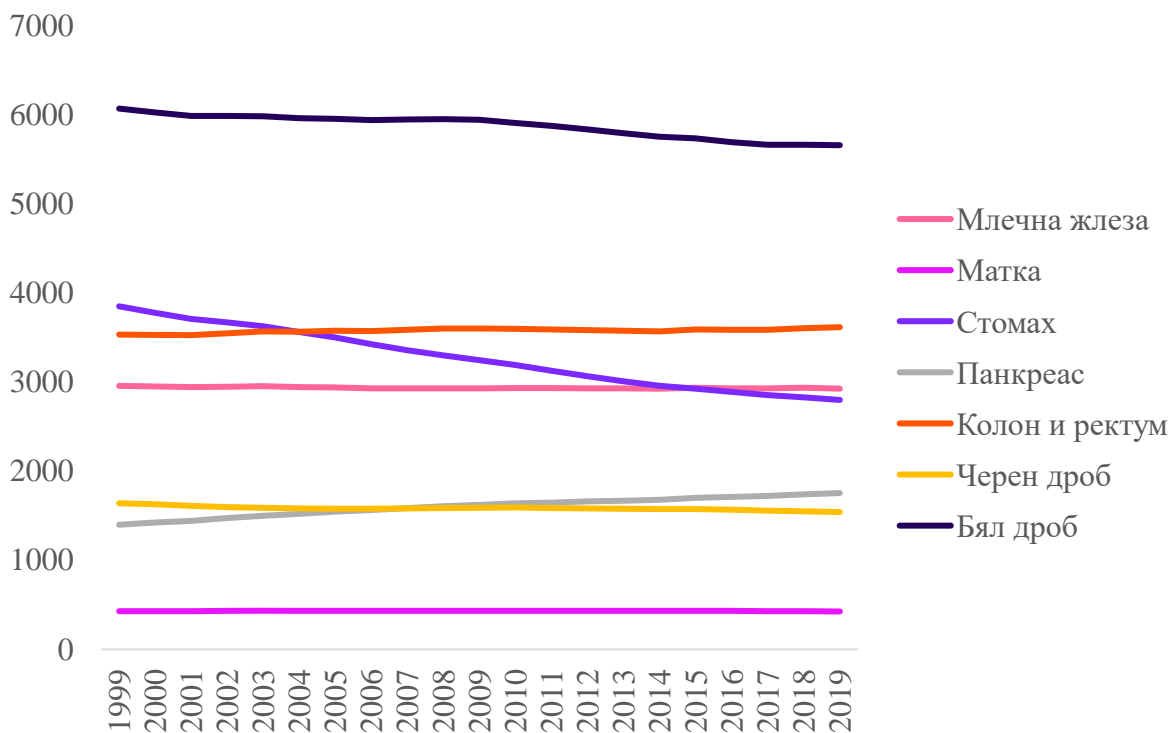
ГЛАВА ПЪРВА

Литературен Обзор

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1 ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА РАКА НА ГЪРДАТА

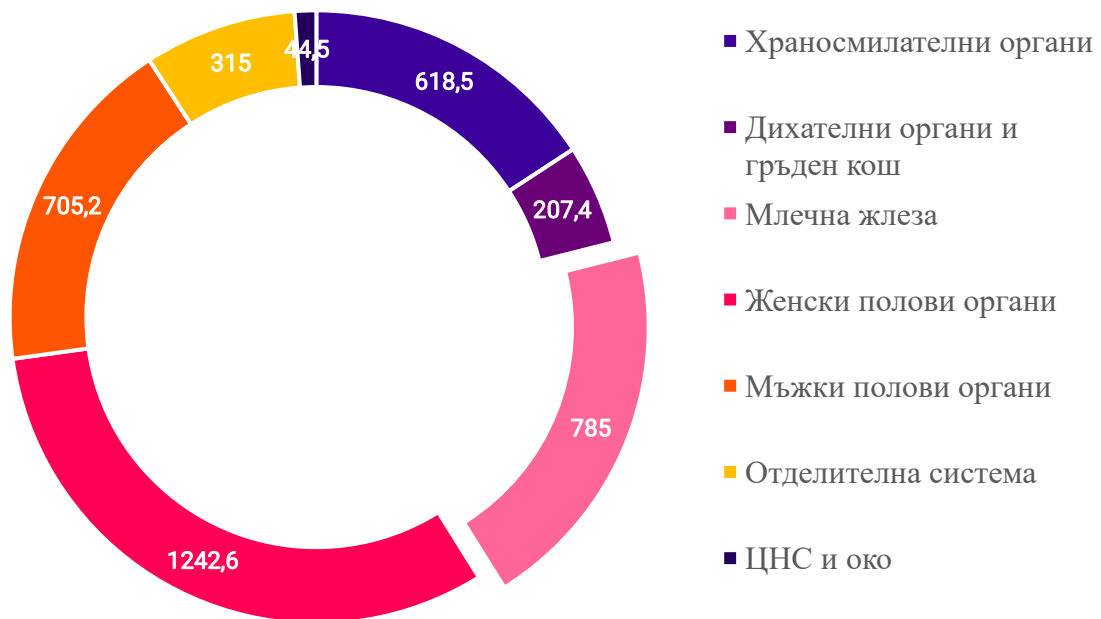
Карциномът на млечните жлези (КМЖ) е едно от най-честите онкологични заболявания сред жените в развитите страни, заемащо почти една трета от всички случаи на рак при тази група (**Фигура 1**). То засяга една от осем жени в световен мащаб (1). Според най-актуалната статистика, годишно се документират около 100 000 случая на инвазивен карцином на гърдата, като най-високата честота се наблюдава сред пациентки на възраст между 45 и 69 години. Нарастващата заболяемост през последните десетилетия може да се обясни с подобрената продължителност на живота на населението и съвременните методи за ранно откриване на болестта (напр. чрез скрининг). Годишно се регистрират около 90 000 смъртни случая в общо 27-те европейски държави, пряко свързани с метастатичното разпространение на КМЖ (1).



Фигура 1 Тенденции в смъртността от рак (на 100 000) в световен мащаб при възраст 65 години, 1999–2019.

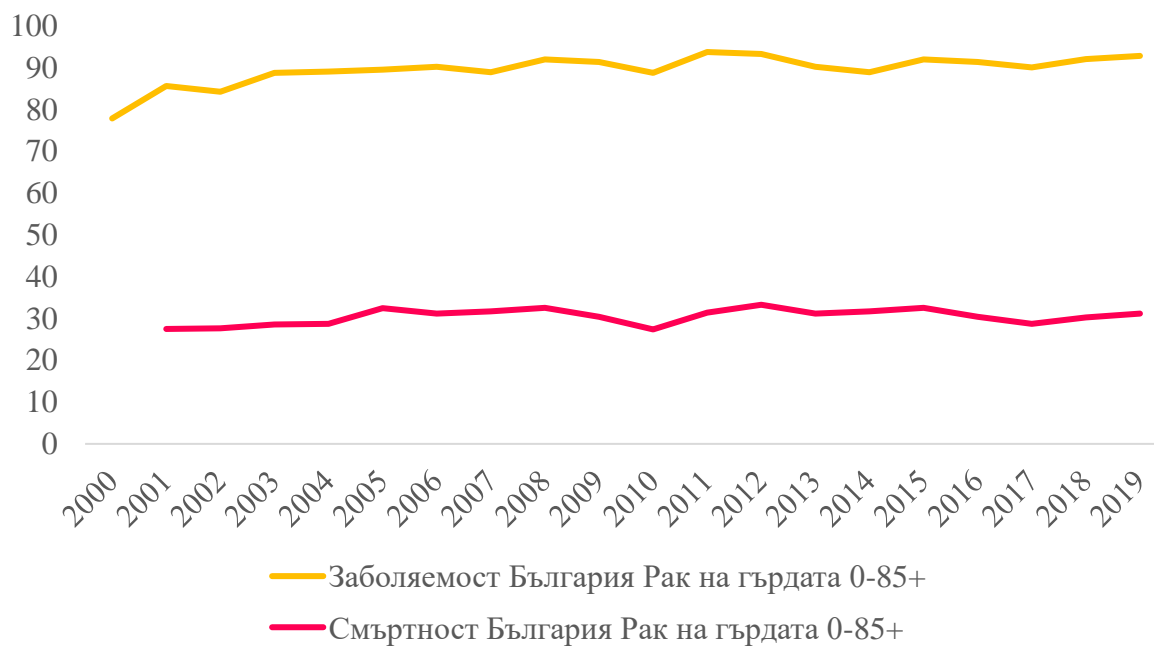
Данните от епидемиологични проучвания показват, че в източноевропейския регион няма видим напредък в намаляването на заболяемостта и болестността от карцином на гърдата. В сравнение с общите тенденции в световен мащаб, които показват намаление на двата показателя в множество различни видове злокачествени заболявания (10).

В България, през 2019г. КМЖ е на 2-ро място по честота на разпространеност спрямо другите онкологични заболявания в страната (**фигура 2**).



Фигура 2 Регистрирани заболявания от злокачествени новообразувания по локализация (на 100 000 души от населението) в България.

През 2019г. в България се регистрирани 4 061 новодиагностицирани случая на КМЖ, водещ до болестност около 104 случая КМЖ на 100 000 души, и общо 1 533 смъртни случая представляващи смъртност от 35.6 на 100 000 души (**Фигура 3**) (11). Въпреки, че е налично намаляване на заболяемостта (с -0.8% в сравнение с предходните десет години), тази тенденция е минимална и е възможно да се дължи на недостатъчната съвместимост с медицинските препоръки и липсата на ефективни скринингови програми в държавата (12, 13).



Фигура 3 Стандартизирана заболяемост и смъртност (световен стандарт на 100 000) в България от рак на гърдата при жените.

Заболеемостта и болестността от карцином на гърдата в Източна Европа и по-конкретно в България остават високи. Страната ни се нарежда на 52-ро място със смъртност от 19.58 на 100 000 население, което прави КМЖ 5-та по честота причина за преждевременна смърт в държавата. Установено е, че смъртността е най-висока при много възрастните (>75 годишна възраст) и за съжаление и при много младите (<35 годишна възраст).

1.1.1 ПРЕЖИВЯЕМОСТ

Съвременните методи за лечение на КМЖ доведоха до намаляване на смъртността причинена от това заболяване. За последните 15 години се наблюдава забележително подобрене в процента на преживяемост, особено сред пациентите в стадий IV. Пет-годишната относителна преживяемост при пациенти с КМЖ е показана на (Фигура 4).



Фигура 4 Петгодишната преживяемост при пациенти с КМЖ в зависимост от стадия (в световен мащаб).

1.2 ЕТИОЛОГИЯ НА КАРЦИНОМА НА ГЪРДАТА

КМЖ е злокачествена неоплазма, произлизаща от епителни клетки в жлезистите млечни канали или лобулите на гърдата (14). Болестта се развива на фона на генетични мутации или епигенетични аномалии. Етиологията на заболяването е комплексна и включва различни фактори, които могат да увеличат риска от развитие на КМЖ. Важно е да се отбележи, че някои от тези риск фактори са по-значими от други и те често взаимодействат помежду си (15):

➤ **Ендогенни фактори:**

- **Полова и генетична наследственост:** Жените имат по-голям риск от КМЖ в сравнение с мъжете. Наследствените фактори играят значителна роля. Наличието на генетични мутации като *BRCA1* и *BRCA2*, увеличава значително риска от развитие на КМЖ (10-20 пъти).
- **Възраст:** Рискът от КМЖ се увеличава с възрастта. Повечето случаи се диагностицират при жени над 50 годишна възраст (10 пъти).

- **Семейна анамнеза за рак на гърдата:** При наличие на роднини (майка, сестра, дъщеря) с история на КМЖ, рискът се увеличава (2-3 пъти).
- **Лична анамнеза за рак на гърдата или други онкологични заболявания:** Наличие на КМЖ в миналото или друг вид рак увеличава риска (2-10 пъти).
- **Репродуктивни фактори:** Рискът е увеличен при жени, които нямат деца, както и при първескини след 30-годишна възраст. Късно начало на менструациите и ранно или късно начало на менопаузата също са свързани с по-висок риск.

➤ **Екзогенни фактори:**

- **Хормонална терапия:** Приемът на определени хормонални лекарства или терапии след менопаузата увеличава риска от КМЖ.
- **Затлъстяване:** Установена е връзка между наднорменото тегло и риска от КМЖ, особено след менопаузата.
- **Алкохол и тютюнопушене:** Консумацията на алкохол и тютюнопушенето са асоциирани с по-висок риск от КМЖ (1,3-1,5 пъти).
- **Експозиция на радиация:** Високите дози на ионизираща радиация (напр. лъчелечение) увеличават риска за КМЖ (5-20 пъти).
- **Липса на физическа активност и неправилно хранене:** Липсата на физическа активност и диета с високо съдържание на мазнини и ниско съдържание на плодове и зеленчуци увеличават риска за КМЖ.

1.3 ДИАГНОСТИЦИРАНЕ НА РАКА НА ГЪРДАТА

Без правилна и навременна диагностика на КМЖ, последователността на лечебния процес се нарушава, а рисковете и евентуалните трагични последици се увеличават значително. Най-честите начини за откриване на КМЖ включват:

- **Самоизследване:** Мнозина пациенти откриват промени в гърдите си по време на самостоятелен преглед, като опипване на "бучки" или необичайни деформации. Този метод често се прилага по време на ежедневната хигиена.
- **Профилактични прегледи:** Редовните профилактични прегледи при специалисти, като хирурзи или онколози, са от съществено значение за ранното откриване на КМЖ. По време на такива прегледи специалистите извършват мануално изследване

на гърдите и могат да препоръчат допълнителни изследвания, ако забележат нещо необичайно.

- **Образни изследвания:** За скрининг или потвърждаване на диагнозата и оценка на разпространението на заболяването, се използват образни методи като мамография и ултразвуково изследване. Мамографията е особено полезна за жени над 50 години, докато ултразвуковото образно изследване е препоръчано при по-млади жени с поплътни гърди (т.е. < 30 годишна възраст) (16).

Няколко проучвания са показали, че степента на плътност на гърдата, оценена по време на скрининг с мамография, представлява значим рисков фактор за бъдещо развитие на злокачествено заболяване. Допълнително тази плътност, която зависи от съотношението на влакнестата съединителна тъкан към паренхимната тъкан на гърдата, може да бъде количествено измерена с помощта на компютърни алгоритми. Клиничното им приложение позволява постигането на по-последователни и обективни резултати, в сравнение с тези, получени чрез субективни оценки, като например категоризацията по BI-RADS (17). Окончателната диагноза КМЖ изисква морфологично разпознаване чрез биопсия.

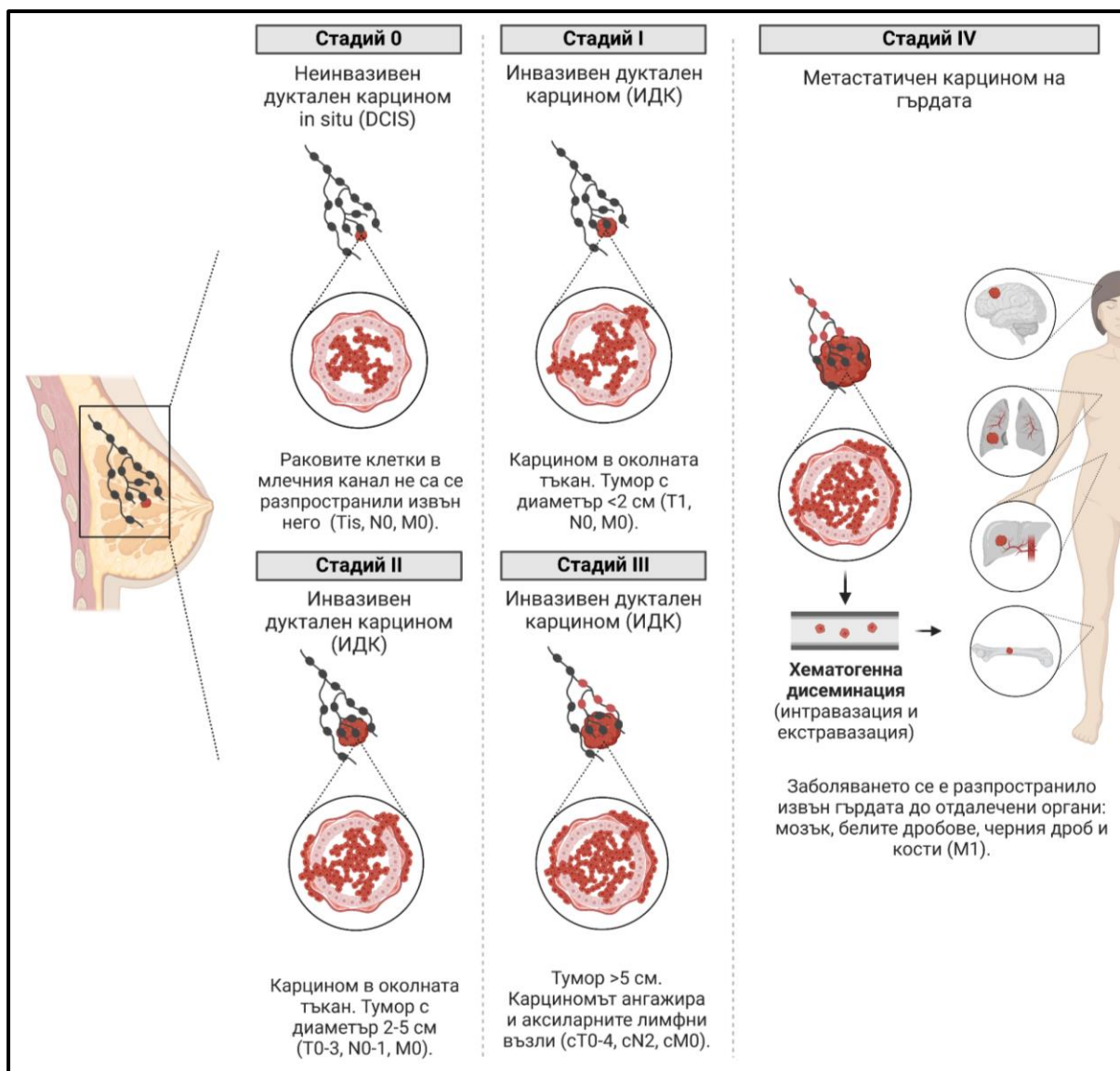
Аспирационната биопсия с помощта на фина игла (18), не се препоръчва за солидни формации, тъй като цитологичния анализ не позволява да се направи разлика между инвазивна и неинвазивна лезия. Все пак това е добър подход за потвърждаване на доброкачествени заболявания (основно кистозни).

Дебелоиглената (TRU-CUT) биопсия (при по-големи тумори) или ексцизионната биопсия (повърхностни и по-малки лезии; ~1см) позволяват микроскопска хистопатологична оценка на пробата от съмнителната лезия, както и имунохистохимична верификация (19, 20).

1.4 СТАДИРАНЕ НА РАКА НА ГЪРДАТА

Стадирането на рака на гърдата е процес, при който се определя разпространението на злокачествените клетки в тялото и се оценява стадия на заболяването. Конвенционалните образни методи като компютърна томография (КТ) и магнитно-резонансна томография (МРТ) се използват за тази цел, заедно с нуклеарните образни методи като сцинтиграфията и (FDG) ПЕТ/КТ. Наличието на метастатични

ипсилатерални аксиларни лимфни възли (ЛВ) с или без далечни метастази, са най-важните прогностични фактори, които могат да бъдат извлечени от стадирането на болестта. Терапевтичният подход за локално и системно заболяване се различават. На този етап „златен стандарт“ е клиникопатологичната класификация TNM по AJCC и стadiите на заболяването определени чрез нея (**Фигура 5**) (21). Стадиите на КМЖ се изразяват като число по скала от 0 до IV въз основа на размера на първичния тумор (Т) броя засегнати ЛВ (N) и наличие на далечна дисеминация (M). Стадий 0 описва локализирано и неинвазивно заболяване (напр. *in situ* карцином); стадий IV описва системно заболяване, което се е разпространило извън гърдата в други части на тялото.



Фигура 5 Стадиране на КМЖ по TNM на AJCC.

1.5 ПАТОЛОГИЯ НА КАРЦИНОМА НА ГЪРДАТА

Повечето онкологични заболявания на млечните жлези (~ 90%) са карциноми, което означава, че произхождат от епителните елементи на паренхима на гърдата. Този вид рак се разделя на два основни подтипа: неинвазивен (като карцином *in situ*) и инвазивен. Класификацията зависи от това дали туморът прониква през базалната мембрана и започва да се развива извън нея.

По-голямата част от случаите на карцином на гърдата (приблизително две трети) произхождат от епителните клетки, които облицоват млечните канали, и този тип се нарича дуктален карцином. Този вариант се проявява като твърдо образуване с наличие на микрокалцификати или архитектурни изкривявания при мамографско изследване. Останалата една трета от карциномите на гърдата се развиват от клетките на лобуларния епител и се наричат лобуларни карциноми. За разлика от дукталния карцином, лобуларният вариант има тенденция да расте дифузно, което го прави по-малко забележим при провеждането на образни изследвания (22).

Съществуват и други по-рядко срещани хистологични варианти на карцином на гърдата, включително инфламаторни, медуларни, апокринни, муцинозни и тубуларни карциноми (**Фигура 6**) (22). Въпреки, че тези подтипове са по-редки, те играят важна роля в диагнозата и лечението на тази болест.

По време на микроскопското изследване се оценява степента на туморна диференциация съгласно Модифицирана система на Скарф-Блум-Ричардсън според Елстън-Елис: високо диференциран (G1), умерено диференциран (G2) или ниско диференциран (G3) тумор (20). По-ниско диференцираният тумор е по-агресивен. Съвременният напредък в молекулярните технологии позволи класифицирането на туморите въз основа не само на тяхната морфология, а и на техния молекулярен генотип и фенотип (23). Това от своя страна дава възможност за по-подробна и конкретна диагноза, която сама по себе си ще позволи индивидуален подход към лечението на пациента (20).

Съвременната патоморфологична диагностика на карцинома на гърдата включва и имунохистохимични изследвания (ИХХ), които позволяват класификацията на случаите в точни и обективни категории. Този подход е особено важен, тъй като класификацията, базирана само на хистоморфологични разлики в туморите, обикновено не предоставя достатъчно прецизни прогнозни и предиктивни данни за заболяването.

С въвеждането на анализи на генна експресия и изследване на имунофенотипните характеристики на туморите се установи, че карциномът на гърдата не е еднородно заболяване, а по-скоро хетерогенен комплекс, съдържащ нарастващ брой различни биологични подтипове (9). Напоследък бяха създадени "молекулни портрети" на туморите на гърдата чрез йерархично групиране на гените въз основа на техните подобия и експресионни профилни честоти.

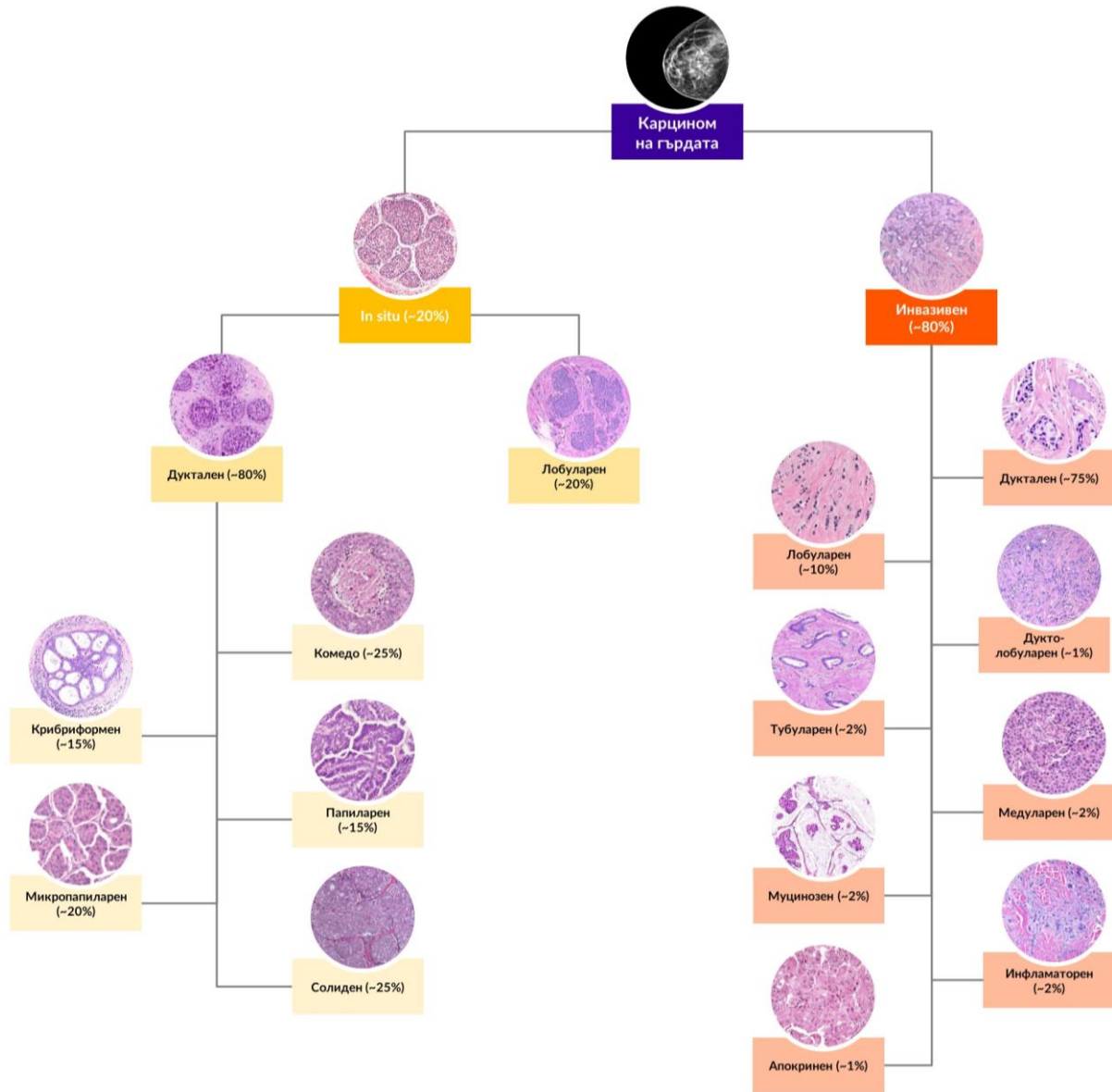
Подтиповете на карцином на гърдата могат да бъдат разделени в пет основни групи: Луминален А и Б, HER2-обогатен, Базалноклетъчен и неклассифициран тип (24, 25). Тези подтипове се различават по честота и разпространение в различни етнически групи, риск факторите, терапевтичния отговор, клиничната проява, общата (OS), както и свободната от болест преживяемост (DFS) (26).

Карциномните метастази са основен фактор допринасящ за по-високата смъртност, обикновено са резултат от инфилтриращи карциноми, които са „еволюирали“ с потенциал да мигрират към други органи. Това е процес, започващ от туморна инфилтрация първо в локални тъкани чрез епително-мезенхимния преход (EMT), а по-късно разпространяването на раковите клетки в дистални тъкани и пространства чрез обратния мезенхимално-епителен преход (MET). За съжаление тази прогресия е свързана с напредване на стадия на болестта и с по-лоша прогноза (27).

Научните данни показват, че аберантното активиране на сигналния път MAPK чрез ERK1 / 2 (28, 29) и/или дерегулиране на фосфоинозитид-3 киназата (PI3K/Akt) (30) може да доведе до ускоряване на туморния растеж и придобиване на по-инвазивен и агресивен туморен фенотип. Деретулирането може да доведе и до модулация и производство на различни протеолитични ензими, като матричните металопротеинази (MMP), които разграждат базалните и ретикуларните ламини. Това е начин на насърчаване на инвазията, миграцията и разпространението на раковите клетки в системната циркулация. Доказано е, че производството на такива MMP-та е свързано с особена свърхактивност на ERK1 / 2 (31, 32).

Генетичните мутации в туморните супресорни гени *BRCA1 / BRCA2*, (отговарящи за кодирането на възстановителни протеини) коригиращи двуверижни увреждания на ДНК и свързания с тях шаперон *BARD1*, са силно асоциирани с развитието на карцинома на гърдата, агресивното поведение на тумора, хемотерапевтичната му резистентност и по-лоша прогноза за пациента (33).

По този начин различни генетични дефекти могат да влияят и променят генната експресия. Което от своя страна може да доведе до образуването на онкологично заболяване и да промотира неговата прогресия.



Фигура 6 Хистологична стратификация на карцинома на гърдата.

1.6 МОЛЕКУЛЯРНИ ПОДТИПОВЕ КАРЦИНОМ НА ГЪРДАТА

Анализът на туморната генна експресия с помощта на ДНК микрочипове позволява разпознаването на няколко фундаментално различни подтипа на карцином на гърдата (Таблица 1) (34). За типизирането на тези подтипове рутинно се използва имунохистохимично изследване на естрогеновия рецептор (ER) и прогестероновия рецептор (PR), както и на свръхекспресия на HER2 протеина и/или амплификация на съответния онкоген - *ERBB2*. Използването на Ki-67 за определяне на митотичния индекс все още не е стандартизирано, като понастоящем стойности под 15% се считат за нисък индекс, 15-20% за среден, а над 20% за висок репликационен индекс. Ki-67 предоставя допълнителна информация, която подпомага определянето на агресивността на тумора и прогнозиране на химиотерапевтичния отговор. Оценката на Ki-67 често е субективна и зависи от опита и квалификацията на патолога. Липсата на автоматизирани и стандартизирани методи за количествено определяне може да доведе до интер- и интраобсерверна вариабилност (35).

1.6.1 ЛУМИНАЛЕН КАРЦИНОМ НА ГЪРДАТА

Луминалният карцином на гърдата се характеризира с експресия на естрогенов рецептор (ER+) и/или прогестеронов рецептор (PR+) (23). Допълнителни маркери като GATA3, туморсупресорните протеини от групата на BCL2 (включващи BCL2, BAK и BAX), както и цитокератин (СК) 8/18, също са изследвани в луминалния тип тумори. Въпреки това, типизирането на луминалния подтип остава независимо от експресията на тези и други маркери като СК5/6 или рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR). Присъствието на тези молекули е свързано с терапевтичния отговор на тумора и може да се използва за разработване на оптимизирани терапевтични подходи.

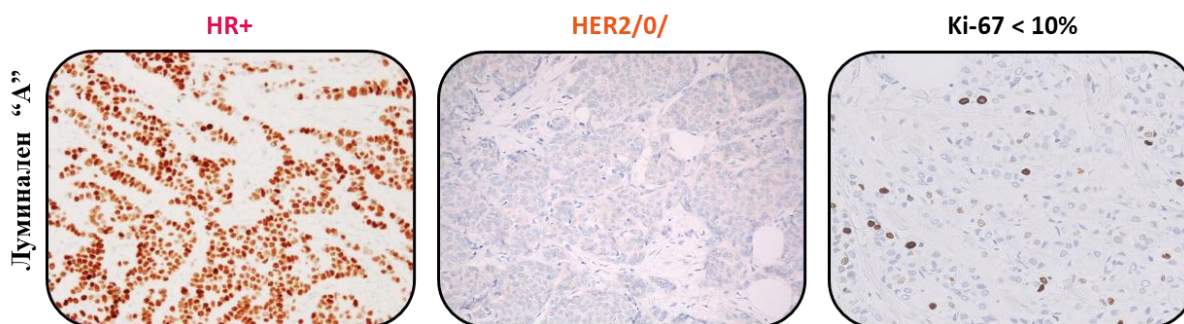
Въз основа на наличието или отсъствието на HER2 амплификация и степента на клетъчна пролиферация, луминалните карциноми на млечната жлеза се разделят на две основни групи: луминален „А“ и луминален „Б“. Луминалният „А“ подтип се характеризира с висока експресия на хормонални рецептори (HR), липса на HER2 амплификация и нисък митотичен индекс, което го прави по-малко агресивен и с по-добра прогноза. От друга страна, луминалният „Б“ подтип може да включва HER2 позитивни тумори и се отличава с по-висок митотичен индекс и по-агресивен клиничен ход (35). Тези различия в молекулярния профил и биологичното поведение на

подтиповете подчертават нуждата от индивидуализиран тумор-агностичен подход при лечението на пациентите с луминален карцином на гърдата.

1.6.1.1 ЛУМИНАЛЕН „А“ ПОДТИП НА КАРЦИНОМ НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА

Множество от гените, открити в луминалния „А“ подтип на карцином на млечната жлеза, се експресират и в здравия луминален епител, покриващ млечните канали (23). Типичният имунохистохимичен профил на луминалния тип карцином включва положителна експресия на естрогенов рецептор (ER+) и/или прогестеронов рецептор (PR+) заедно с липса на експресия на HER2. Повечето инвазивни лобуларни карциноми имат профил, характерен за луминален А (Фигура 7).

Литературата предоставя различни данни за честотата на карцинома от този подтип, като средният диапазон е между 32% и 61% от всички случаи на злокачествени заболявания на гърдата. Това е положителен факт, тъй като луминалният „А“ подтип е свързан с най-благоприятна прогноза и дългосрочно оцеляване на пациентите (36). Тази тенденция се дължи на по-ниската агресивност на луминалните „А“ тумори и по-високата чувствителност към хормонална терапия, което води до по-добри терапевтични резултати.

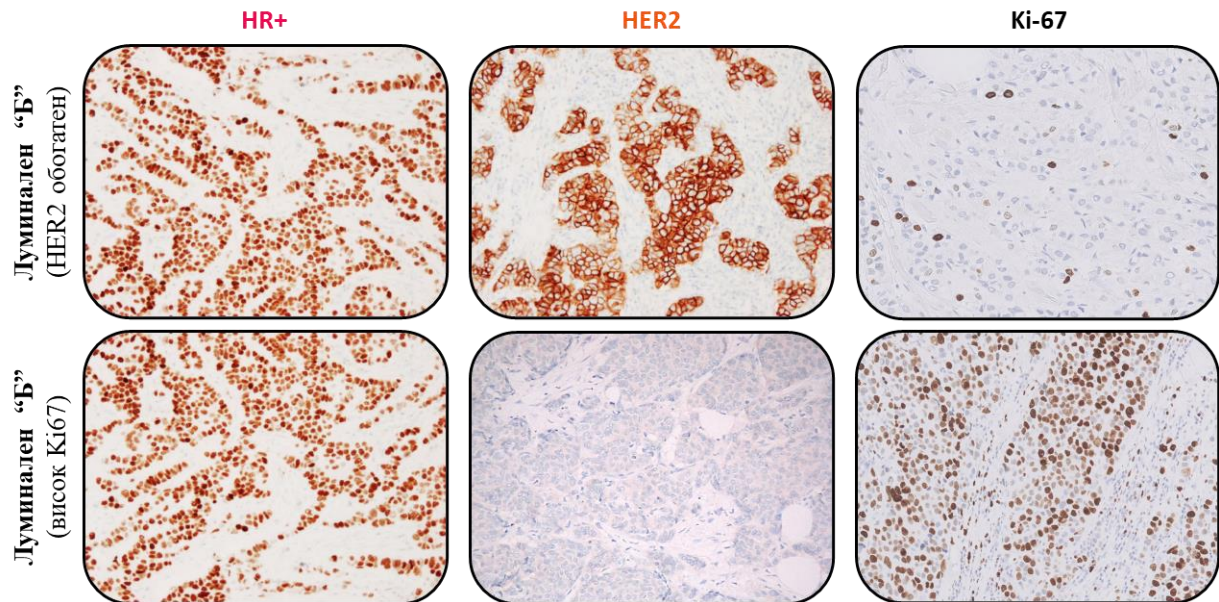


Фигура 7 Луминален „А“ КМЖ.

Характеризира се чрез положителна ИХХ експресия на хормоналните рецептори (HR+), липса на HER2 и нисък Ki-67.

1.6.1.2 ЛУМИНАЛЕН „Б“ ПОДТИП НА КАРЦИНОМ НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА

Според съвременните модификации в класификациите на подтипове карцином на гърдата, луминалната „Б“ група е разделена на две подгрупи: луминален „Б“ (HER2-отрицателна) и луминален „Б“ (HER2-положителна). Подтипът луминален „Б“ (HER2-отрицателен) включва случаи с позитивност за естрогенов рецептор (ER) и/или прогестеронов рецептор (PR), HER2 негативност и висок митотичен индекс, измерен чрез Ki-67. В контраст, подтипът луминален „Б“ (HER2-положителен) обхваща случаи с позитивност за ER и/или PR, положителен HER2 статус и всяко ниво на експресия на Ki-67 (37). Тази група представлява между 9% и 24% от всички случаи на карцином на млечната жлеза и се характеризира с по-агресивен клиничен ход в сравнение с луминалния А подтип. Луминален „Б“ подтиповете демонстрират по-лоша прогноза и изискват по-интензивно лечение, което често включва комбинация от хормонална терапия и химиотерапия. Включването на HER2-позитивните тумори в луминалния „Б“ подтип налага използването на прицелни терапии, като трастузумаб, за да се постигне по-добър терапевтичен резултат. Това разделение на луминалния „Б“ подтип на две подгрупи подчертава нуждата от прецизна диагностика и индивидуализиран подход в лечението на карцином на гърдата (Фигура 8).



Фигура 8 Луминален „Б“ КМЖ.

Характеризира се чрез положителна ИХХ експресия на хормоналните рецептори (HR+), липса на HER2 и висок Ki-67 или чрез HR+, обогатен на HER2 и нисък Ki-67.

1.6.2 HER2 ОБОГАТЕН ПОДТИП НА КАРЦИНОМ НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА

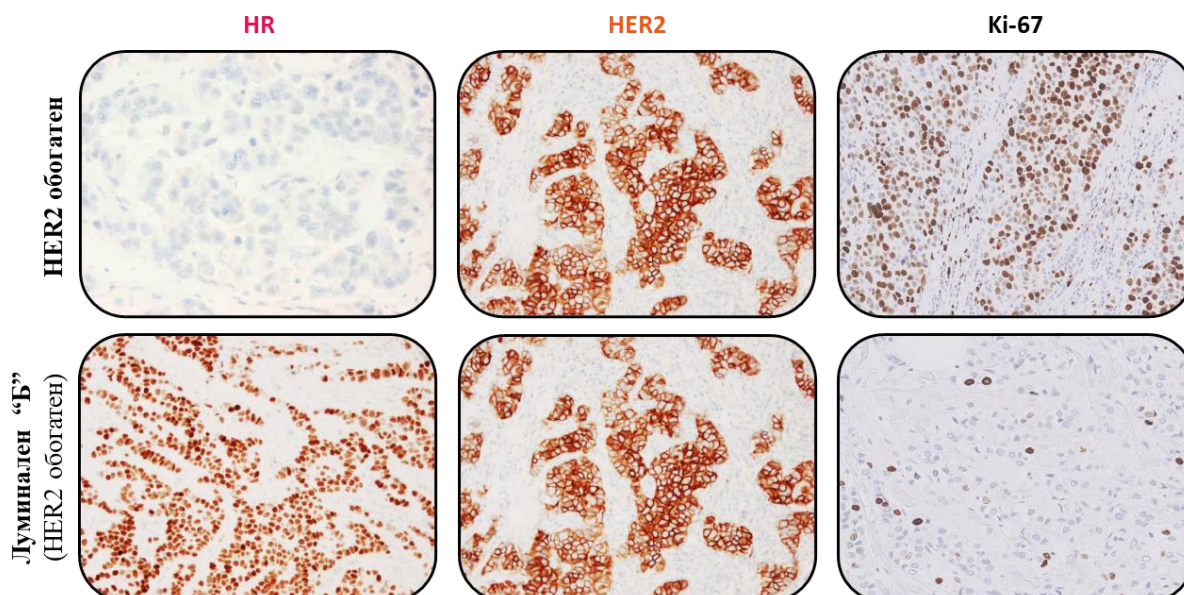
Класическият HER2 обогатен подтип на карцином на млечната жлеза (**Фигура 9**) се характеризира с липса на експресия на естрогенов рецептор (ER-) и прогестеронов рецептор (PR-) и свръхекспресия на HER2 (+++) при имунохистохимията (равномерно и интензивно оцветяване на периферната мембрана за HER2 в повече от 10% от инвазивните туморни клетки), или амплификация на гена *ERBB2*, демонстрирана чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (HER2/CEP17 със съотношение $\geq 2,0$ или съотношение $< 2,0$ със среден брой от 6,0 HER2 копия на клетка) (38). Честотата на HER2 положителните подтипове е 10-15% от всички случаи на карцином на млечната жлеза. HER2 положителните тумори се разделят на две подгрупи, базирани на експресията на ER (23):

1. HR-отрицателен подтип (HER2+/ER- нелуминален):

Тези тумори морфологично наподобяват базално-подобните тумори и се характеризират с агресивен клиничен ход.

2. HR-положителен подтип (HER2+/ER+):

Тези тумори могат да експресират и PR и имат характеристики, сходни с луминален „Б“ подтип.



Фигура 9 HER2 обогатен подтип на карцином на млечната жлеза

Характеризира се чрез положителна ИХХ експресия на хормоналните рецептори HER2 (+++) или чрез ISH със съотношение $\geq 2,0$ на HER2/CEP17 или $< 2,0$ със среден брой от 6,0 HER2 копия на клетка. Често с високи стойности на Ki-67.

В повечето случаи, HER2 обогатените тумори не експресират p53. Експресията на цитокератин 8/18 е хетерогенна и умерена. Ако реакцията за EGFR е положителна, тя най-често е фокална и ограничена до <5% от популацията на туморните клетки. HER2 обогатените тумори често се асоциират с наличието на дуктален карцином *in situ* (DCIS), ниска степен на диференциация (G3) и лоша прогноза. Въпреки това, с откриването на моноклоналните анти-HER2 антитела като трастузумаб и пертузумаб, продължителността на живота при HER2 положителни пациенти значително се увеличи (39). Този напредък в терапията предоставя нови възможности за лечение и подобрява прогнозата за пациентите с HER2 положителни тумори, демонстрирайки значението на прицелните терапии в съвременната онкология.

1.6.3 БАЗАЛНОКЛЕТЪЧЕН КАРЦИНОМ НА ГЪРДАТА

Базалоклетъчните карциноми на гърдата (около 10% от всички случаи) не експресират нито ER, PR нито HER2 (тройно негативен). Те често експресират CK5 / 6 и / или EGFR демонстрирано чрез анализи на генни микрочипове и имунохистохимия (40). Въпреки, че повечето тройно негативни тумори на гърдата се групират в подгрупата на базално-подобните карциноми, тези термини не са синоними; има до 30% експресионно несъответствие между двете групи (41).

Базално-подобния карцином се характеризира със солидна архитектура, неясни граници, изразена лимфоцитна инфилтрация, оскъдна строма, ниска диференциация, високо ядрено / цитоплазматично съотношение, висок митотичен индекс и наличие на некроза (особено по типа на комедо некроза) (42). Базално-подобния карцином демонстрира и висока честота на мутации в *(t)p53* и *BRCA1* туморсупресорите (23). Значима част (90,8%) от базално-подобните тумори имат метапластични характеристики (42). Метапластичните карциноми на гърдата, в повечето случаи, демонстрират положителна реакция към EGFR, CK5 / 6, CK14, CK17 и p63 (43).

Специфичните маркери експресирани от миеоепителните клетки [актин на гладката мускулатура, p63, кълъстер на диференциация (CD) 10], не са проучени достатъчно за прилагане в класифицирането на този подтип тумори (44). Наличието на DCIS, свързан с инвазивен базално-подобен карцином, демонстрира същия имунофенотип като при инвазивния тумор и това предоставя доказателства че ранна *in situ* лезия, е прекурсор на

инвазивен карцином (23). В тези случаи Р-кадхеринът (P-cadherin) се експресира в 75% от пробите и може да се счита за достоверен маркер за определяне на базално-подобни DCIS и инвазивни тумори.

Този подтип карцином е свързан с по-висок процент на рецидиви и преждевременна смърт, независимо от статуса на лимфните възли и туморния размер (45).

1.6.4 НЕКЛАСИФИЦИРАН ТИП КАРЦИНОМ НА ГЪРДАТА

Честотата на неклассифицирания карцином на гърдата е под 10%. Базалните клетки в здравия млечен канал имунохистохимично са положителни за цитокератин 5/6 (СК5/6), докато луминалните клетки експресират цитокератини 8/18 (СК8/18) (46, 47). Базалните клетки представляват смес от различни клетъчни типове с висок пролиферативен потенциал, докато луминалните клетки са по-диференцирани. Все още не е ясно дали тези клетъчни типове включват популация от стволови клетки, способни на самообновяване.

Неклассифицираният карцином на гърдата е предимно тройно негативен тумор, който е сходен с базално-подобния карцином по отношение на молекулярния профил. Прогнозата и преживяемостта при неклассифицирания карцином на гърдата са подобни на тези при базално-подобния карцином. Пролиферативният индекс Ki-67 е по-висок в сравнение с луминалните подтипове. Некласифицираният тип често е негативен за всичките пет маркера: ER, PR, HER2, СК5 и EGFR.

Важно е да се отбележи, че терминът „неклассифициран“ в тази класификация не е синоним на „не е посочено друго“. Той обозначава специфичен подтип тумор, който не попада в установените категории и изисква допълнителни изследвания за по-добро разбиране и лечение.

Таблица 1 - Характеристики на основните молекулярни подтипове на карцинома на гърдата

Подтипове	Молекулярни Характеристики	Биологични действия	Особени типове (хистологични)
Луминален А	ER+, HER2-, CK8/18+	ER, ECM	<ul style="list-style-type: none"> ○ Невроендокринен ○ Муцинозен А и Б ○ Карцином
Луминален Б	ER-/+, HER2 -/+ CK8/18/12+, Ki-67>10%	ER, ECM, Пролиферация	<ul style="list-style-type: none"> ○ Невроендокринен ○ Муцинозен А и Б ○ Карцином
HER2-обогатен ⁽⁺⁺⁺⁾	HER2+, ER-, ± CK8/18, ± CK5/6	HER-2, пролиферация, имунен отговор, туморна инвазия	<ul style="list-style-type: none"> ○ Плеоморфен ○ Лобуларен ○ Апокринен
Базалоклетъчен	ER/PR-, HER2-, CK5/14+, EGFR+	Имунен отговор, ECM, пролиферация	<ul style="list-style-type: none"> ○ Аденоиден ○ Медуларен ○ Метастатичен
Некласифициран	ER/PR-, EGFR-, CK5-	ECM, Пролиферация	-

1.7 ЛЕЧЕНИЕ НА РАКА НА ГЪРДАТА

Оперативното лечение се счита за златен стандарт при пациентите с ранен рак на гърдата и се прилага като първи избор, при стадирано като стадий IIa (cT0-2 cN0-1 cM0) или по-ранен такъв (48). Органо съхраняващата операция (ОСО) с биопсия на сентинелен лимфен възел (БСЛВ) или аксиларна лимфна дисекция (АЛД) е предпочитана. Последващото локално лъчелечение може да се извърши по време на, под формата на интраоперативна лъчетерапия (ИОРТ) (49), или на по-късен етап след туморната резекция (EBRT) (38). В световен мащаб необходимостта от мастектомия е значително намалела, поради прилагането на скринингови програми, които позволяват откриването на тумори още в ранните стадии на заболяването. За да се унищожат потенциалните неоткриваеми микрометастази след операцията, пациентите често получават адювантна системна терапия, включително химиотерапия, ендокринна с/без таргетна последвана от

лъчелечение (**Таблица 2**). Този подход е доказал предимствата в подобряването на OS и DFS във всички подтипове КМЖ (3).

1.7.1 НЕОАДЮВАНТНО ЛЕЧЕНИЕ

Пациентите, стадиран като IIб (сT2-3 cN1 cM0) или по-напреднал стадий, са подходящи за неoadювантна системна терапия. Тази форма на лечение включва прилагането на химиотерапия с или без таргетна терапия или имунотерапия преди дефинитивното оперативно лечение. Неoadювантната терапия има за цел да намали размера на първичния тумор преди операцията и предоставя допълнителни възможности за оценка на туморния отговор и чувствителност към системното лечение (48). Няколко проучвания показваха, че прилагането на един и същи режим химиотерапия в неoadювантен спрямо адювантен аспект е свързано с подобни прогностични резултати (50-52). ~50% от пациентките подложени на неoadювантно лечение, са подходящи за последваща органосъхраняваща операция. Системен мета-анализ доказва, че прилагането на неoadювантна химиотерапия (НАХТ) при пациенти с КМЖ, води до по-нисък процент на мастектомия от тези, подложени на операция преди адювантно системно лечение, без да възпрепятства локалния контрол (53).

При някои пациентки се постига значително намаляване на размера на тумора след НАХТ, водещо до затруднено откриване по-време на операцията. За това е важно да се постави метален „маркер“ в първичният тумор по време на дебелоиглената биопсия преди започването на системното лечение. Липсата на добър терапевтичен отговор към НАХТ е лош прогностичен знак (54).

Размера на тумора, считан за подходящ за НАХТ, варира между 10-40мм в зависимост от биологичния подтип на болестта и протоколите на специфичното лечебно заведение. Данни от анализи на неoadювантна химиотерапия показват, че ниско диференцирани тумори и по-млада възраст могат допълнително да идентифицират подгрупи пациентки (напр. в рамките на луминален или тройно-негативен подтип на КМЖ), които имат значима полза от неoadювантна химиотерапия (55).

Освен клиничните предимства, неoadювантната терапия дава възможност за оценяване на поведението на болестта чрез периодични образни изследвания и биопсии по-време на и след провеждане на предоперативното лечение. Това позволява откриването на

специфични за тумора или пациента характеристики свързани с добър отговор или резистентност към даденото системно лечение.

Понастоящем липсва консенсус относно най-ефективния химиотерапевтичен режим за КМЖ и са необходими допълнителни клинични проучвания за изясняване на тази дилема (56, 57). Най-често прилаганите схеми на неoadювантна химиотерапия съдържат антрациклин (доксорубин или епирубин) (**Таблица 3**) в комбинация с циклофосфамид с/без последователно прилагане на таксани (паклитаксел или доцетаксел).

Изграждането на най-добрия персонализиран подход за лечение на рак на гърдата изисква подробен анализ на редица прогностични и предиктивни фактори. Този индивидуализиран подход има за цел да избере терапия, която ефективно ще таргетира и унищожи раковите клетки, предотвратявайки метастазите и бъдещи рецидиви. Оценката на общата преживяемост (OS) на пациента е от решаващо значение и след въвеждането на неoadювантната терапия, степента на преживяемост се е увеличила значително, предоставяйки надежди и подобрени качества на живот на пациентите.

За постигане на най-добри резултати е необходим мултидисциплинарен подход, за правилното подбиране на пациенти които ще извлекат максимална полза от този вид лечение.

1.7.2 ПРИЦЕЛНА ТЕРАПИЯ ЗА КАРЦИНОМ НА ГЪРДАТА

Лечението на КМЖ разчита главно на не специфичните подходи като хирургия, радиация и системната химиотерапия. Тъй като тези подходи показват липса на селективност и са с висока токсичност, има спешна нужда от нови лекарства с по-специфични, евентуално целенасочени действия за лечението на рак (48, 56, 58, 59). Напредъка в молекулярната онкология и прилагането на различни клетъчни геномни изследвания, доведе до идентифициране на промени в туморогенния процес. Вследствие на това бе постигнато откриването на нови терапевтични агенти, насочени към специфични мутации и ключови сигнални молекули. Това трансформира развитието и насоката на медикаментите, използващи се за лечение на рак. Появата на таргетната терапия (ТТ) и персонализираните подходи за лечение в медицината доведе до началото на нова ера в сферата на онкологията (**Таблица 4**) (57).

Таблица 2 - Лечение на КМЖ в зависимост от стадий

СТАДИЙ	ОПЕРАТИВНО ЛЕЧЕНИЕ	ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ	СИСТЕМНА ТЕРАПИЯ
СТАДИЙ 0; DCIS	Най-често ОСО ± БСЛВ	След ОСО	Адювантна ендокринна терапия, ако DCIS е с положителни хормонални рецептори.
СТАДИЙ I-II	ОСО или мастектомия, в комбинация с БСЛВ ± АЛД (Голяма част от ангажираните РЛВ, могат да бъдат премахнати с първичната операция).	Ложе: След ОСО или мастектомия при ангажирани граници; Стандартната ЛТ при EBRT използва: 1,8 - 2,0 Gy дневни фракции за 5 - 5,5 седмици (обща доза, 45 - 50 Gy). Аксила: • При >3 ангажирани аксиларни лимфни възела е строго препоръчано. • При 1-3 такива (след АЛД) се преценява с индивидуален за пациента подход.	• Адювантна ендокринна/химио/таргетна терапия в зависимост от случая. В зависимост от индивидуалния случай, хормоналната терапия, ХТ и таргетната терапия могат да бъдат неоадювантни, адювантни или комбинация от тях.
СТАДИЙ III	В повечето случаи ОСО или мастектомия за локално авансирал КМЖ + АЛД.	След резекция: облъчване на гръден кош/туморно ложе, клавикуларни и аксиларни РЛВ [при АЛД ^(c)] ± възли по хода на а. Thoracica interna).	В повечето случаи лечението на III-ти стадий започва с неоадювантна системна терапия с последваща операция.
СТАДИЙ IV	В някои случаи може да се извърши палиативна операция за контролиране на локалните симптоми (например "toilet" мастектомия).	Палиативната терапия в IV-ти стадий се състои от системно лечение (ХТ, ендокринна, таргетна и евентуално имунотерапия при ТНКМЖ). Лъчелечение при необходимост.	

Таблица 3 - Основния протокол за прилагане на режима ЕС

Продължителност на цикъла: 21 дни. Продължителност на терапията: 4-6 цикъла.			
Медикамент	Доза	Прилагане	Първа доза
Epirubicin	75 mg/m ² IV	Прилагайте със IV физиологичен разтвор (0.9% NS), за 3 до 20 минути.	Ден 1
Cyclophosphamide	600 mg/m ² IV	Разрежда се с 250мл NS или 5% серум-глюкозе (D5W) и се прилага за 30 до 60 минути.	
Мерки преди започване на терапията:			
Хидратация		<ul style="list-style-type: none"> Пациентите трябва да се хидратират с достатъчно (2 до 3 L/ден) с цел добра диуреза, за да намалят риска от хеморагичен цистит. ВИСОК (>90% честотата на повръщане). 	
Риск от гадене и повръщане		<ul style="list-style-type: none"> Epirubicin е везикант, fluorouracil и cyclophosphamide са иританти; избягвайте екстравазация. 	
Качества на Везикант/Иритант		<ul style="list-style-type: none"> Първичната профилактика с G-CSF не се препоръчва. 	
Профилактика за инфекции		<ul style="list-style-type: none"> При пациенти с чернодробна недостатъчност може да се наложи по-ниска начална доза на fluorouracil; При пациенти с бъбречно увреждане може да се наложи по-ниска начална доза cyclophosphamide; При пациенти с бъбречно или чернодробно увреждане може да се наложи по-ниска начална доза Epirubicin. 	
Дозиране при чернодробна/бъбречна недостатъчност			
Сърдечни проблеми		<ul style="list-style-type: none"> Epirubicin е показал дозозависимо развитие на необратима кардиомиопатия, честотата на която е свързана с кумулативната доза. Оценете изходната фракция на изтласкване на лявата камера (LVEF) преди започване на терапията. Epirubicin е противопоказан при пациенти приживели скорошен миокарден инфарктинфаркт, LVEF <50%, тежки аритмии или предишно лечение с максимални кумулативни дози антрациклини. 	
Параметри за следене:			
		<ul style="list-style-type: none"> Трансаминази и азотни тела преди всеки нов цикъл. ПКК преди и по време на всеки нов цикъл. Диария и друга токсичност (палмарно-плантарна еритродизестезия). Кумулативната доза на Epirubicin (720mg/m²). Периодично преценявайте LVEF по време на ЕС терапията. 	
*При промяна в телесното тегло с най-малко 10%, дозите се преизчисляват			

Таблица 4 - Прицелни медикаменти прилагани в различни стадии и подтипа на КМЖ

ФОРМУЛИРОВКА	ТАРГЕТ	МЕДИКАМЕНТИ	ИНДИКАЦИИ
Регулатори на естроген рецептора	ER	Tamoxifen	HR+ DCIS и КМЖ.
		Fulvestrant	Метастатичен/неоперабилен HR+ КМЖ.
Моноклонални антитела	HER2	Trastuzumab	HER2+ КМЖ в неоадювантен/адювантен или метастатичен стадий.
		Pertuzumab	
		Margetuximab	Метастатичен HER2+ КМЖ след поне 2-линии с анти-HER2 лечение.
Конюгат антитяло-лекарство	HER2	T-DM1	HER2+ КМЖ в адювантен аспект или метастатичен стадий.
		T-Dxd	HER2+ КМЖ в метастатичен стадий.
	Trop-2	Sacituzumab govitecan	Авансирал КМЖ след поне две линии лечение.
Тирозин киназни инхибитори	HER2	Lapatinib	Авансирал HER2+ КМЖ. Прилагат се заедно с Trastuzumab и Capecitabine.
		Tucatinib	
		Neratinib	Ранен високорисков HER2+ КМЖ, след едногодишно адювантно лечение с Trastuzumab.
Тирозин киназни инхибитори	CKD4/6	Ribociclib	Авансирал HR+/HER2- КМЖ на фона на хормонално лечение.
		Palbociclib	
		Abemaciclib	Авансирал HR+/HER2- КМЖ или в адювантен аспект на фона на хормонално лечение.
PARP инхибитори	PARP	Olaparib	Авансирал (<i>BRCA-mut</i>) HER2-КМЖ или в адювантен аспект.
		Talazoparib	Авансирал (<i>BRCA-mut</i>) HER2-КМЖ.
mTOR инхибитори	mTOR	Everolimus	Авансирал HR+/HER2- КМЖ заедно с Exemestane след прогресия на нестероиден АИ.
PI3K инхибитори	PIK3CA	Alpelisib	Авансирал HR+/HER2- КМЖ заедно с Fulvestrant след прогресия на хормонотерапия.
Акт инхибитори	Акт	Capivasertib	Авансирал HR+/HER2- КМЖ с мутация в <i>PIK3CA/AKT1/PTEN</i> , лекуван в комбинация с Fulvestrant след прогресия на една линия хормонотерапия.

Основните характеристики и предимства на прицелното лечение при КМЖ са:

- **Молекулярно таргетиране:** Тази форма на терапия се основава на специфични молекули или белтъци, важни за растежа и развитието на раковите клетки. Този вид терапия може да бъде приложен при различните подтипове на карцином на млечната жлеза: HER2-обогатен (напр. Trastuzumab), HR-положителен (напр. Fulvestrant) и ТНКМЖ (напр. Sacituzumab govitecan)
- **Персонализирано лечение:** Таргетната терапия позволява индивидуализация на лечението, чрез подбиране на лекарства, които са най-ефективни за дадения подтип заболяване (т.е. тумор-агностична терапия), определено чрез генетични и/или биологични тестове.
- **Комбиниране с други методи на лечение:** Таргетната терапия може да се използва в комбинация с други методи на лечение, като хирургия, химиотерапия или лъчелечение, за да се постигнат по-добри резултати.

Въпреки че индивидуалните терапии започнаха да навлизат в рутинната практика, областта на персонализираната медицина е все още в зародиш. Поради което трябва да бъдат проучени допълнителни терапевтични таргети и препарати.

1.8 ОЦЕНКА НА ТЕРАПЕВТИЧНИЯ ОТГОВОР

Един от основните методи за оценка на терапевтичния отговор е RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). RECIST 1.1 предоставя стандартизирани критерии за оценка на терапевтичния отговор при солидни тумори, което е от съществено значение за определяне на ефективността на лечението. Този метод предлага обективни мерки за промяната в размера на туморите, като използва компютърни томографии (КТ) или магнитно резонансни томографии (МРТ) за прецизно измерване на туморните отговори. Критериите, предложени от RECIST 1.1, включват ясни дефиниции за отговорите на лечението: пълен отговор, частичен отговор, стабилно заболяване и прогресия на заболяването.

Пълен отговор се определя с изчезване на всички видими лезии. Частичен отговор се определя като намаление с най-малко 30% на най-големия диаметър на таргетните туморни лезии спрямо началното измерване. Стабилно заболяване се наблюдава, когато няма значително увеличение на размера на туморите или поява на нови лезии. Прогресия

на заболяването се дефинира като увеличение с най-малко 20% на най-големия диаметър на проследяваните лезии или поява на нови такива (60).

1.9 ПЪЛЕН ПАТОЛОГИЧЕН ОТГОВОР

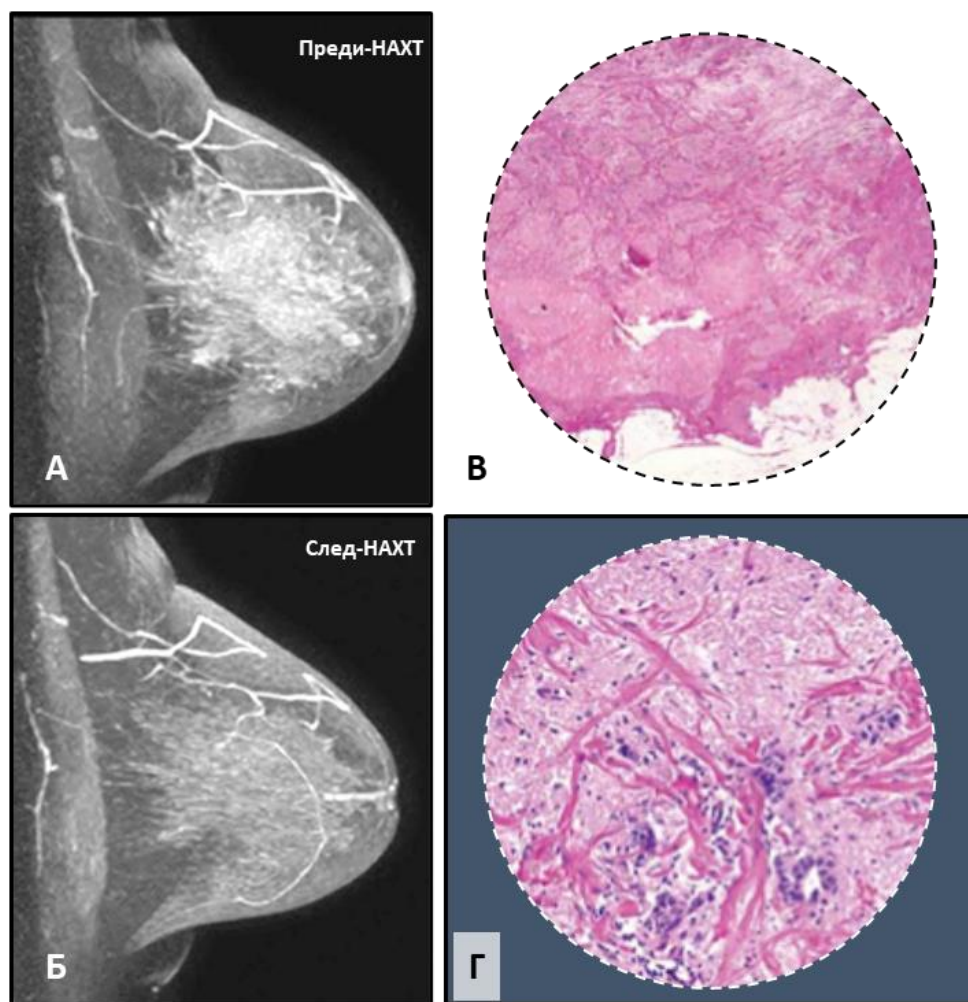
Пълният патологичен отговор (ППО) се определя като отсъствие на остатъчни инвазивни ракови клетки, след завършването на неoadювантната системна терапия. Това се доказва чрез хистологична оценка на резецирания образец от гърдата, и на всички проби взети от регионалните лимфни възли (т.е. урT0/Tis урN0 по AJCC TNM системата на стадиране). След НАХТ, в ~ 30% от случаите туморът напълно изчезва, което се дефинира като пълен патологичен отговор (**Фигура 10**) (61). Пациентите, които са постигнали ППО след НАХТ, показват повишени стойности на OS и DFS (4, 62). Понастоящем се провеждат изследвания с цел идентифициране на молекулярни туморни биомаркери и характеристики, предсказващи ППО.

Предишни проучвания демонстрират, че ППО се наблюдава по-често при пациенти, получаващи антрациклин базирана НАХТ. В допълнение, 78% от тези пациенти са диагностицирани с инвазивен дуктален карцином в III-ти стадий (сT0-3 cN2 cM0 или сT4 cN0-2 cM0), 67% са били естроген рецептор отрицателни и ~ 30% са с тройно негативни тумори (63, 64). Множество мета-анализи потвърждават, че докато прогностичната стойност на ППО е най-голяма при пациенти с агресивни биологични подтипове КМЖ (тройно-негативни или HER2-положително заболяване), пациентките с HR-положителна болест постигащи ППО, също демонстрират подобрена преживяемост спрямо тези които не достигат този терапевтичен отговор. При пациентите с хормонално чувствително заболяване добавянето на адюванта ендокринна терапия води до допълнително подобряване на DFS и OS (65).

Редица стратегии за лечение на КМЖ са демонстрирали подобрения в честотата на ППО: прилагането на различни прицелни терапии като анти-HER2 лечение при HER2-обогатен КМЖ и дори определени цитостатици като карбоплатина при ТНКМЖ, оптимизират персонализираното лечение на рака на гърдата (66).

Настоящата стратегия за лечение не се различава между подтиповете КМЖ без специфични таргети (напр. HER2 или ER). Въпреки, че класифицирането чрез генетичен

анализ ще реши този проблем, поради финансови и логистични причини, към момента този подход е непрактичен за ежедневната клинична практика.



Фигура 10 Типични находки при пациенти с ППО.

Пълен отговор означава, че липсват данни за остатъчен тумор на МРТ и при хистологично изследване. (А) Преди-НАХТ е налична хиперинтензна формация в гърдата. (Б) След-НАХТ се установява значително сигнално затихване наподобяващо съединителна тъкан; пълен отговор по критериите RECIST 1.1. (В-Г) Пълният патологичен отговор хистологично се характеризира с отсъствие на туморна тъкан и замяната и с фибозна (Г).

1.9.1 ПОТЕНЦИАЛНИ БИОМАРКЕРИ ЗА ПРЕДСКАЗВАНЕ НА ППО

Проучванията показват, че различни имунохистохимични биомаркери, инициращи туморогенезата, са свързани с чувствителността към химиотерапия и пълен патологичен отговор (67). Независимо от това, експресията на *SALL4* не бе изследвана директно в този контекст. Тази молекула играе важна роля в ембриогенезата, чрез промотирането на плюрипотентността при стволовите клетки (68). *SALL4* е свързан с диагностицирането и прогнозирането на няколко солидни тумора, включително карцином на гърдата, карцином на дебелото черво и хепатоцелуларни карциноми (69-71). Доказано е, че сигналният трансдюсер и активатор на транскрипция 3 (STAT3) директно активира експресията на *SALL4* в КМЖ (71, 72). Установено е, че дерегулираната експресия на *SALL4* модулира клетъчната пролиферация и метастатичното разпространение при белодробния и колоректалния карциноми (70, 73). Високата експресия на *SALL4* в *in vitro* клетъчни култури от КМЖ е свързана с резистентност към химиотерапия (74). ези находки превръщат *SALL4* в привлекателна изследователска цел.

Експресията на миоепителния маркер CD10 (*MME*) се използва като независим диагностичен и прогностичен фактор при няколко солидни тумора с висок метастатичен потенциал. CD10 играе ключова роля в регулацията на нормалните клетки предшественици на млечната жлеза, като същевременно е свързан с наличието на стволово-подобни ракови клетки (РСК) (75). Тези ракови стволови клетки се характеризират със способността си за самообновяване и дедиференциация, което допринася за хетерогенността и агресивността на туморите. Проучванията показват, че експресията на *MME* може да служи като предсказващ биомаркер за ефекта от неoadювантната химиотерапия при пациенти с карцином на млечната жлеза. Пациентите с висока експресия на CD10 в туморните клетки са склонни да имат по-добър отговор на химиотерапията, което може да се дължи на по-високата чувствителност на тези клетки към цитостатичните ефекти на лекарствата (44, 76). CD10 също играе роля в модуляцията на туморната микросреда, включително взаимодействията между раковите клетки и стромалните компоненти. Тази молекула участва в разграждането на екстрацелуларния матрикс, което улеснява инвазията и метастазирането на туморните клетки (76). Допълнителни изследвания са необходими, за да се изясни точното значение на CD10 като предсказващ маркер и неговата роля в модулирането на терапевтичния отговор от ситемното лечение.

Цитокератин-5 (СК5) е широко използван като маркер за класификация на солидни тумори. Проучванията показват, че експресията на тази молекула се различава значително между доброкачествени и злокачествени тумори (77). Доказано е, че пациенти с карцином на млечната жлеза, експресиращи СК5, имат по-добри прогностични резултати в сравнение с тези, при които липсва експресията на този биомаркер (78). Това може да се дължи на специфични биологични механизми, които се активират при присъствието на СК5, и които потенциално влияят на туморогенезата и прогресията на заболяването. Експресията на СК5 се наблюдава в базално-подобните подтипове на КМЖ, които се характеризират с по-висока агресивност и неблагоприятна прогноза. Въпреки това, наличието на СК5 при определени пациенти с КМЖ е свързано с по-добър терапевтичен отговор към системно лечение, което прави този маркер потенциално полезен за идентифициране на подгрупи пациенти, които могат да се възползват от специфични терапевтични подходи. Допълнителни изследвания са необходими, за да се изясни точната роля на СК5 в предсказването на ППО от НАХТ.

Установено е, че експресията на рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR / HER1) модулира не само чувствителността към химиотерапия в различни клетъчни линии и тумори на гърдата, но и устойчивостта към ендокринната терапия, постигната чрез дерегулация на ERK1 / 2 (79, 80). Повишена експресия на EGFR е открита във фракции, съдържащи РСК (81). EGFR играе критична роля в различни клетъчни процеси, включително клетъчна пролиферация, диференциация и апоптоза, като неговата дерегулация често се свързва с агресивни туморни фенотипове и лоша прогноза. Свърхекспресията на EGFR в клетъчните линии и туморните проби на гърдата често е свързана с повишена инвазивност и висок метастатичен потенциал. Съществува разногласие за връзката между експресията на EGFR и честотата на пълен патологичен отговор. При проучване на пациентки с тройно-негативен карцином на млечната жлеза, свърхекспресията на EGFR е свързана с по-висока честота на ППО, което предполага потенциално благоприятен прогностичен фактор (82). Обратно, други проучвания не съобщават за подобна асоциация между EGFR и терапевтичния отговор от НАХТ (83). Това несъответствие може да се дължи на хетерогенността на туморите, различия в методологиите на изследване или различни популации от пациенти. Допълнителни изследвания са необходими, за да се изясни точното значение на EGFR като предсказващ маркер и неговата роля в модулирането на терапевтичния отговор от системното лечение.

протеинът p53, който също се използва като хистопатологичен маркер и често се среща в дефектна форма при тумори, има установена връзка с отговора на химиотерапията (84). p53 е известен като „пазител на генома“ поради своята роля в регулирането на клетъчния цикъл, апоптозата и репарацията на ДНК. Мутациите в *TP53* са сред най-честите генетични изменения при различни видове рак, включително карцинома на млечната жлеза, и често водят до неконтролируема клетъчна пролиферация и туморогенеза. Няколко проучвания са изследвали връзката между p53 и пълния патологичен отговор. Повечето от тях не показват статистически значима връзка между имунохистохимичната експресия на p53 или мутационния статус на p53 и отговора към неoadювантната химиотерапия (85-87). Въпреки това, две проучвания установяват връзка между свръхекспресията на p53 и висока честота на ППО при ТНКМЖ (88, 89). Тези находки предполагат, че мутационният статус на p53 може да играе различна роля в различните подтипове на карцинома на млечната жлеза. В тройно-негативните тумори, които по принцип са по-агресивни и с по-лоша прогноза, свръхекспресията на p53 може да индикира по-висока чувствителност към НАХТ. Това вероятно е свързано с механизмите на клетъчна смърт, индуцирани от химиотерапията, при които дефектният p53 може да играе роля в повишаване на апоптозата. Обратно, при други подтипове на карцинома на млечната жлеза, ролята на p53 остава по-малко ясна.

Проучванията показват, че в зависимост от конкретната мутация, p53 може да има различни ефекти върху туморната биология и отговора на лечение. Например, някои мутации водят до загуба на функция на p53, докато други могат да създадат нови, онкогенни функции, които допълнително усложняват връзката между p53 и терапевтичния отговор (88, 89). Освен това, p53 може да взаимодействат с други молекули и сигнални пътища, които също влияят върху отговора на химиотерапията. Тези взаимодействия могат да включват други туморни супресори, онкогени и сигнални молекули като MDM2, която регулира стабилността на p53, и ATM, участващи в ДНК репарацията (90). Въпреки това, асоциацията на p53 с предсказването на ППО остава загадка, тъй като заключенията от проучванията до момента се разминават в този аспект.

1.10 НЕРЕШЕНИ ВЪПРОСИ В ПРЕДСКАЗВАНЕТО НА ТЕРАПЕВТИЧНИЯ ОТГОВОР ОТ НЕОАДЮВАНТНА ТЕРАПИЯ

Предсказването на терапевтичния отговор от неoadювантната терапия при карцином на млечната жлеза е от решаващо значение за подобряване на лечението и резултатите за пациентите. Въпреки това, все още се сблъскваме с няколко предизвикателства, които се фокусират около оптимизирането на тумор-агностичната терапия и използването на биомаркери за предсказване на отговора от дадено лечение.

1. **Туморна хетерогенност:** Хетерогенността на туморите е предизвикателство за точната оценка на терапевтичния отговор и изисква разработването на методи за справяне с тази вариабилност.
2. **Идентификация на предсказващи биомаркери:** Необходимо е да се открият и валидират нови биомаркери, които могат да предскажат терапевтичния отговор при различни подтипове на карцином на млечната жлеза.
3. **Клинична валидация на биомаркерите:** Необходими са стратегии за клинична валидация на новооткрити биомаркери, за да се потвърди тяхната ефективност в реални клинични условия,
4. **Ефекти на микросредата на тумора:** Разбирането на влиянието на микросредата на тумора върху терапевтичния отговор е от съществено значение за подобряване на прогнозата.
5. **Тумор-агностична терапия и прецизна медицина:** Разбирането на биологичните механизми, които стоят в основата на различните терапии, и техните асоциации с определени биомаркери е критично за оптимизирането на тяхното клинично приложение.

Разрешаването на тези предизвикателства изисква мултидисциплинарен подход и откриването на нови и лесно достъпни биомаркери.



02

ГЛАВА ВТОРА

Цел и задачи

2 ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

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

За постигане на тази цел сме поставили следните задачи:

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

03

ГЛАВА ТРЕТА

Материали и методи

3 МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1 ТУМОРНИ ПРОБИ И ПАЦИЕНТИ

Това ретроспективно проучване включва 130 пациентки със спорадичен инвазивен дуктален карцином на млечните жлези в стадий IIIa/б (cT0-3 cN2 cM0 или cT4 cN0-2 cM0). Отрицателната фамилна анамнеза за наследствено заболяване и липса на данни за мутации в *BRCA1/2*, са основни критерии за включване в изследването. Случаите са от архивите на болниците Черинг Крос, Лондон (**Приложение 1**) и „УМБАЛ Царица Йоанна“, София (**Приложение 2**). В Английската кохорта, са изследвани общо 168 фиксирани във формалин парафинови блокчета (100 дебелоиглени и 68 ексцизионни биопсии). В Българската кохорта, са изследвани общо 49 фиксирани във формалин парафинови туморни проби (30 дебелоиглени и 19 ексцизионни биопсии) само от пациентки диагностицирани с трийно-негативен карцином на млечната жлеза (ТНКМЖ). Включените пациентки са преминали 4-6 цикъла антрациклин базирана неoadювантна терапия по схема ЕС (Epirubicin – 75 mg/m² I.V., ден 1; Cyclophosphamide – 600 mg/m² I.V., ден 1, през 21 дни) в периода между 2010 и 2020 година, само в споменатите две лечебни заведения. След НАХТ е проведено дефинитивно оперативно лечение с обем, зависим от терапевтичния отговор. Последващото адювантно лечение е адаптирано към специфичната туморна биология и отговора към НАХТ.

Критериите за включване се основават на следните фактори:

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

Исключващи критерии:

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

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Включени са и проби, за които се смята, че ППО не е достигнато и съдържат > 0% остатъчни туморни клетки във всички срезове (т.е. не са $ypT0/Tis\ ypN0$ по AJCC TNM системата на стадиране) (91). Точно 90 (от общо 130) проби отговарят на тези критерии и всички те имат налични туморни биопсии преди лечение. Останалите 40 (от общо 130) проби са класифицирани като ППО. Използваният „шаблон“ за събиране на данни с цел системно провеждане на анализите е показана в (Таблица 5).

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

Таблица 5. Пациентска карта с основните критерии за провеждането на анализите в това ретроспективно проучване.

3.2 ОБРАБОТКА НА ТУМОРНИТЕ БЛОКЧЕТА

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

3.3 ОБОРУДВАНЕ, РЕАКТИВИ И АНТИТЕЛА

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

3.4 ОЦВЕТЯВАНЕ С ХЕМАТОКСИЛИН И ЕОЗИН (H&E)

Вградените в парафин блокчета, направени след дебелоиглени или ексцизионни биопсии, бяха срязани (5 µm) с помощта на Microm Rotary Microtome. След което тъканните срезове са поставени на микроскопски предметни стъкла Superfrost. Впоследствие, предметните стъкла са сушени в пещ за ~ 20 минути. Оцветяването H&E се извършва с помощта на автоматизатори: автостайнър Leica XL и стъкло покривател CV5000. В тези машини предметните стъкла първо бяха обработени с ксилол, абсолютен

алкохол и вода, за да се ‘хидратира’ тъканта. След това същите са оцветени с ядреното багрило хематоксилин. Стъклата се изплакват с вода и киселинен алкохол, за да се отстрани излишъкът. Последва оцветяване на предметните стъкла с еозин, повторно изплакване и дехидратиране, по обратния ред на „хидратацията“ (преминаване обратно през вода, абсолютен алкохол и ксилол), след което така оцветените проби бяха покрити с покривно стъкло с помощта на CV5000. Срезове бяха разгледани под светлинен микроскоп.

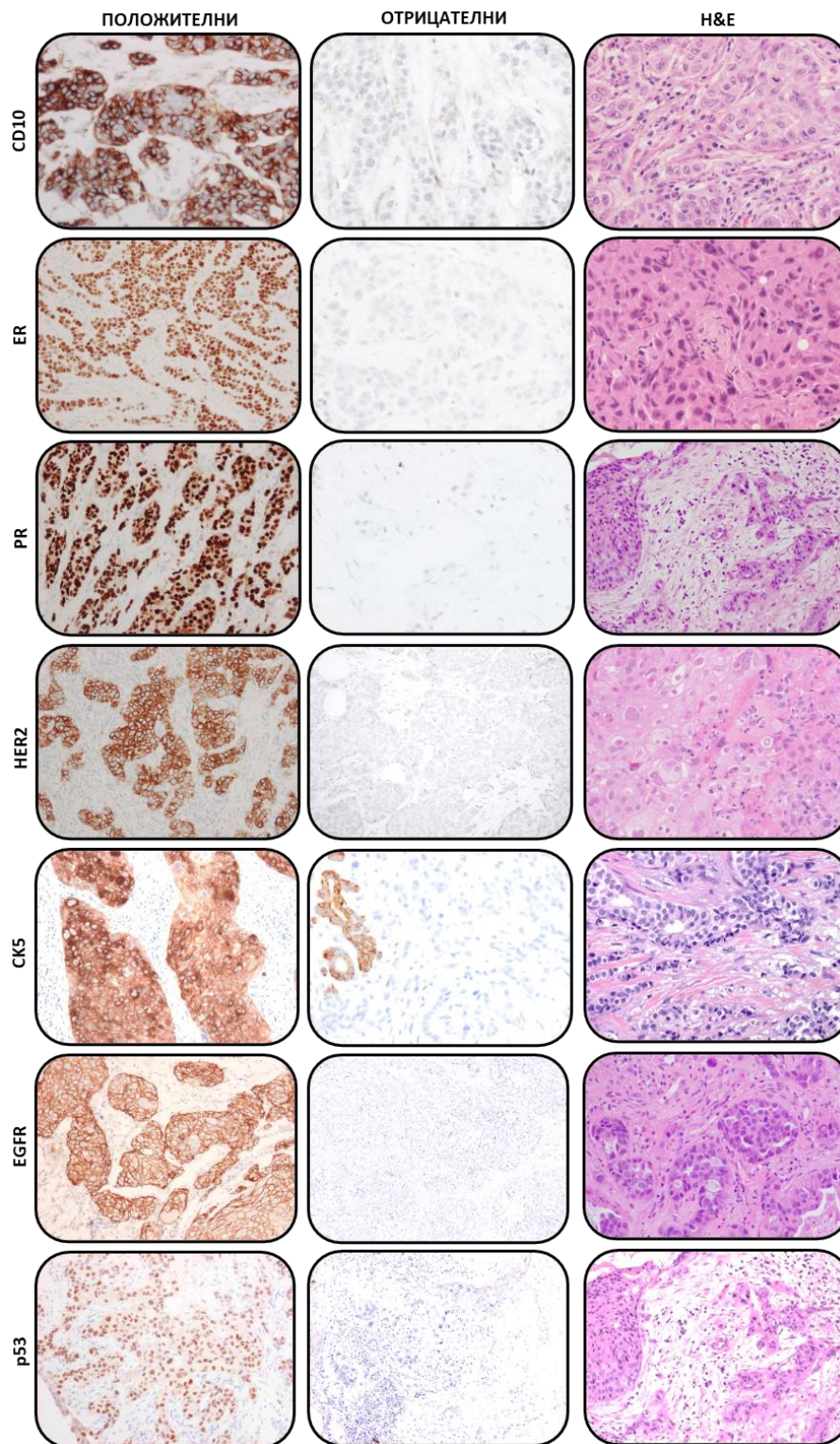
3.5 ИМУНОХИСТОХИМИЯ - (ИХХ)

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

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

- Повече от 1% от туморните клетки показват положително оцветяване за ER/PR.
- Повече от 10% от туморните клетки показват положително оцветяване за CK5, CD10, EGFR и SALL4; изпълнени са критериите за HER2 свръхекспресия и мутантен тип p53 (92).

Резултатите от ИХХ, получени след оцветяване на пробите, позволяват сравнение и визуализация на ER, PR и HER2. Силно ядрено оцветяване (кафяво оцветяване) се наблюдава в ER и PR пробите, докато силно мембранно оцветяване се наблюдава в пробите на HER2. Този резултат е очакван, тъй като хормоналните рецептори са ядрени рецептори, докато HER2 е мембранно закрепена рецепторна тирозин киназа. Подобни находки са наблюдавани за CK5 и EGFR със силно мембранно оцветяване, показващо правилното местоположение на тези протеини. Наблюдава се силно мембранно оцветяване в положителните CD10 проби, докато в положителните случаи на p53 се открива силно ядрено маркиране (**Фигура 11**).



Фигура 11 Имунохистохимично оцветяване на инвазивен дуктален карцином G3, при увеличение X10-20.

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

3.6 ТРАНСКРИПТОМЕН АНАЛИЗ

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

3.7 СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Статистически анализ е извършен с използването на софтуерните пакети SPSS 26.0 и GraphPad Prism 6. Асоциациите между променливите (например: възраст, стадий на заболяването, брой на циклите на неoadювантна химиотерапия, туморна диференциация, наличие на DCIS компонента, еластоза и/или некроза в дебелоиглените биопсични проби, имунохистохимичен профил на ER, PR, HER2, CD10, CK5, EGFR и p53) и постигането на пълно патологично ремисия (ППО) бяха оценени с помощта на Хи-квадрат тест на Пиърсън, а също така бяха изчислени и съотношението на шансовете (OR) със съответните доверителни интервали (CI). Статистическата значимост се определена при стойности $p \leq 0.05$.

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



04

ГЛАВА ЧЕТВЪРТА

Резултати

4 РЕЗУЛТАТИ

Всичките сто и тридесет пациентки диагностицирани със стадий IIIa (n=63) и IIIб (n=67) са получили 4-6 цикъла на антрациклин базирана неоадювантна химиотерапия, през периода 2010-2020гг. Лечението е дозирано въз основа на Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status ≤ 2 , телесната повърхност, бъбречната функция (CrCl > 10 мл / мин), наличието на и тежестта на чернодробно увреждане (< 3 х горна граница на AST и/или ALT) и общия коморбиден статус на пациентката, за постигането на оптимални резултати. Преди започване на лечението са взети дебелоиглени биопсии за диагностика и ИХХ профилиране. Оценихме връзката на ППО с характеристиките на пациентите (възраст, стадий IIIa / IIIб и брой цикли НАХТ), тумора (хистологична диференциация, наличие на DCIS, еластоза и/или некроза в биопсията) и ИХХ експресия на следните биомаркери: ER, PR, HER2, CK5, EGFR, SALL4, CD10 и протеин (t)p53 (Фигура 11). Общо са изследвани 217 туморни проби включващи:

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

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

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

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

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

4.1 РЕЗУЛТАТИ ОТ ВСИЧКИ ТУМОРНИ ПОДГРУПИ

4.1.1 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА КЛИНИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ

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

Таблица 6 - Еднофакторен анализ на клиничните параметри

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

4.1.1.1 КЛИНИЧЕН СТАДИЙ

В Английската група от пациентки, 29% (29/100) са постигнали ППО, подкрепяйки съобщените по-рано констатации в съществуващата научна литература. От 29-те пациентки постигнали ППО в тази кохорта, 42% (n=12) са стадирани като IIIa и 58% (n=17) са стадирани като IIIb. От пациентките стадирани като IIIa (n=47), 25% (n=12) са постигнали ППО. От пациентките стадирани като IIIb (n=53), 32% (n=17) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО в полза на пациентки в стадий IIIb в тази група [OR 0.7261 (95%CI 0.3032 - 1.7387); p = 0.4724].

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

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

4.1.1.2 ВЪЗРАСТ

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

В Българската кохорта, от 11-те пациентки постигнали ППО, 54% (n=6) са <52 годишна възраст и 46% (n=5) са ≥52г. От пациентките определени като <52 годишна възраст

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

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

4.1.1.3 БРОЙ ЦИКЛИ НАХТ

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

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

При събиране на двете кохорти (n=130), процентът постигнали ППО е 31% (n=40). От пациентките провели < 6 курса (n=71), 24% (n=17) са постигнали ППО. От пациентките подложили се на точно 6 цикъла НАХТ (n=59), 39% (n=23) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често

постигане на ППО в полза на пациентките провели точно шест курса НАХТ в общата популация [OR 0.4928 (95% CI 0.2315 - 1.0490); $p = 0.0664$]. Р-стойността в общия анализ е близка до критичната стойност ($p \leq 0.05$). Това означава, че при друг обем на извадката, резултатът може да се промени.

4.1.2 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ХИСТОПАТОЛОГИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ

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

Таблица 7 - Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри

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

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

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

В Английската кохорта (n=100), 30% (n=30) са с наличие на DCIS компонента в туморната биопсия и при 70% (n=70) не е открит този параметър. От пациентките с наличие на DCIS (n=30), 50% (n=15) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър (n=70), 39% (n=14) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО в полза на пациентките с DCIS, в хистологичния препарат от дебелоиглената биопсия, в тази кохорта [OR 0.2500 (95%CI 0.0992 - 0.6303); p = 0.0033].

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

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

4.1.2.2 ТУМОРНА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ

В Английската кохорта, от 29-те пациентки постигнали ППО, 69% (n=20) са с G3 заболяване и 21% (n=9) са с < G3 (т.е. G1-2). От пациентките определени като G3 (n=51), 39% (n=20) са постигнали ППО. От пациентките определени като < G3 (n=49), 18% (n=9)

са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ниско диференцирани тумори [OR 0.3488 (95% CI 0.1396 to 0.8715); $p = 0.0242$].

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

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

4.1.2.3 ТУМОРНА ЕЛАСТОЗА

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

От 11-те пациентки постигнали ППО в Българската кохорта ($n=30$), 0% ($n=0$) са с наличие на еластоза в туморната проба, т.е. при 100% ($n=11$) от случаите не е открит този параметър. От пациентките с наличие на еластоза ($n=1$), 0% ($n=0$) са постигнали ППО. От пробите с липса на този параметър ($n=29$), 38% ($n=11$) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често

постигане на ППО при пациентки с наличие на еластоза в тази кохорта [OR 1.8649 (95%CI 0.0699 - 49.7688); p = 0.7100].

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

4.1.2.4 ТУМОРНА НЕКРОЗА

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

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

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

4.1.3 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ИМУНОХИСТОХИМИЧНИТЕ БИОМАРКЕРИ

ИХХ експресията на следните биомаркери се оцени, от дебелоиглените биопсии, в общата туморна популация: ER, PR, HER2, CK5, EGFR, SALL4, CD10 и протеин (t)p53 (Таблица 8). Следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър и кохорта.

Таблица 8 - Еднофакторен анализ на имунохистохимичните параметри

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

4.1.3.1 ЕСТРОГЕН РЕЦЕПТОР (ER)

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

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

4.1.3.2 ПРОГЕСТЕРОН РЕЦЕПТОР (PR)

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

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

4.1.3.3 РЕЦЕПТОР 2 НА ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМАЛЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР (HER2)

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

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

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

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

4.1.3.5 СПАЛТОПОДОБЕН ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР 4 (SALL4)

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

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

4.1.3.6 РЕЦЕПТОР НА ЕПИДЕРМАЛЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР (EGFR)

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

От 11-те пациентки постигнаха ППО в Българската кохорта (n=30), 27% (n=3) са с наличие на положителен EGFR, а при 73% (n=8) не е открит този параметър. От пробите

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

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

4.1.3.7 ЦИТОКЕРАТИН 5 (СК5)

От 29-те пациентки постигнали ППО в Английската кохорта (n=100), 31% (n=9) са с наличие на СК5, а при 69% (n=20) не е открит този параметър. От пробите експресиращи СК5 (n=24), 37% (n=9) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=76), 26% (n=20) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие СК5 експресия в тази кохорта [OR 0.5952 (95%CI 0.2253 - 1.5724); p = 0.2952].

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

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

4.1.3.8 КЛЪСТЕР НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ 10 (CD10)

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

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

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

4.1.3.9 ПРОТЕИН 53 (P53)

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

От 11-те пациентки постигнали ППО в Българската кохорта (n=30), 36% (n=4) са с положителен p53, а при 64% (n=7) не е открит този параметър. От пробите експресиращи p53 (n=7), 57% (n=4) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=23), 30% (n=7) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с положителна експресия на p53 в тази кохорта [OR 0.3281 (95% 0.0576 - 1.8706); p = 0.2096]. Този резултат, вероятно се дължи на малкият брой пациентки в Българската група.

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

4.1.4 МНОГОФАКТОРЕН ЛОГИСТИЧЕН РЕГРЕСИВЕН АНАЛИЗ

Само биомаркерите, които са значими при еднофакторния статистически анализ, се включват в многофакторния анализ за идентифициране на възможни връзки между параметрите. Многофакторният анализ потвърждава, че експресията на ER [OR 9.95 (95% CI 1.24-79.93); p = 0.031] е предсказващ белег за липса на ППО и доминира в регресионния логистичен анализ. Резултатите показват, че ER е свързан с експресията на PR [OR 7.12 (95% CI 1.55-67.25); p = 0.043]. Анализът също демонстрира асоциация между наличието на CD10 [OR 0.04 (95% CI 0.01-0.28); p = 0.001] и p53 [OR 0.57 (95% CI 0.22-0.92); p = 0.049] с ППО при HR-положителни тумори (**Таблица 9**).

Многофакторният регресионен анализ не показва статистически значима разлика за връзка между другите параметри и липсата на DCIS компонент в дебелоигления биопсичен материал с по-ниска честота на ППО [OR 3.89 (95%CI 0.97-15.56); p=0.054]. P-стойността в анализа е близка до критичната стойност ($p \leq 0.05$), което означава, че при по-голям обем на извадката, резултатът може да се промени.

Таблица 9 - Многофакторен логистичен регресивен анализ на факторите свързани с ППО

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

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

Българската (n=30: 30 ТНКМЖ) и Английската (n=100: 24 ТНКМЖ, 60 луминални, 16 HER2-обогатени) подгрупи демонстрират повече сходства, отколкото разлики в 3 от 11 параметъра (**Фигура 12**). Разминавания се наблюдават само при следните параметри:

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

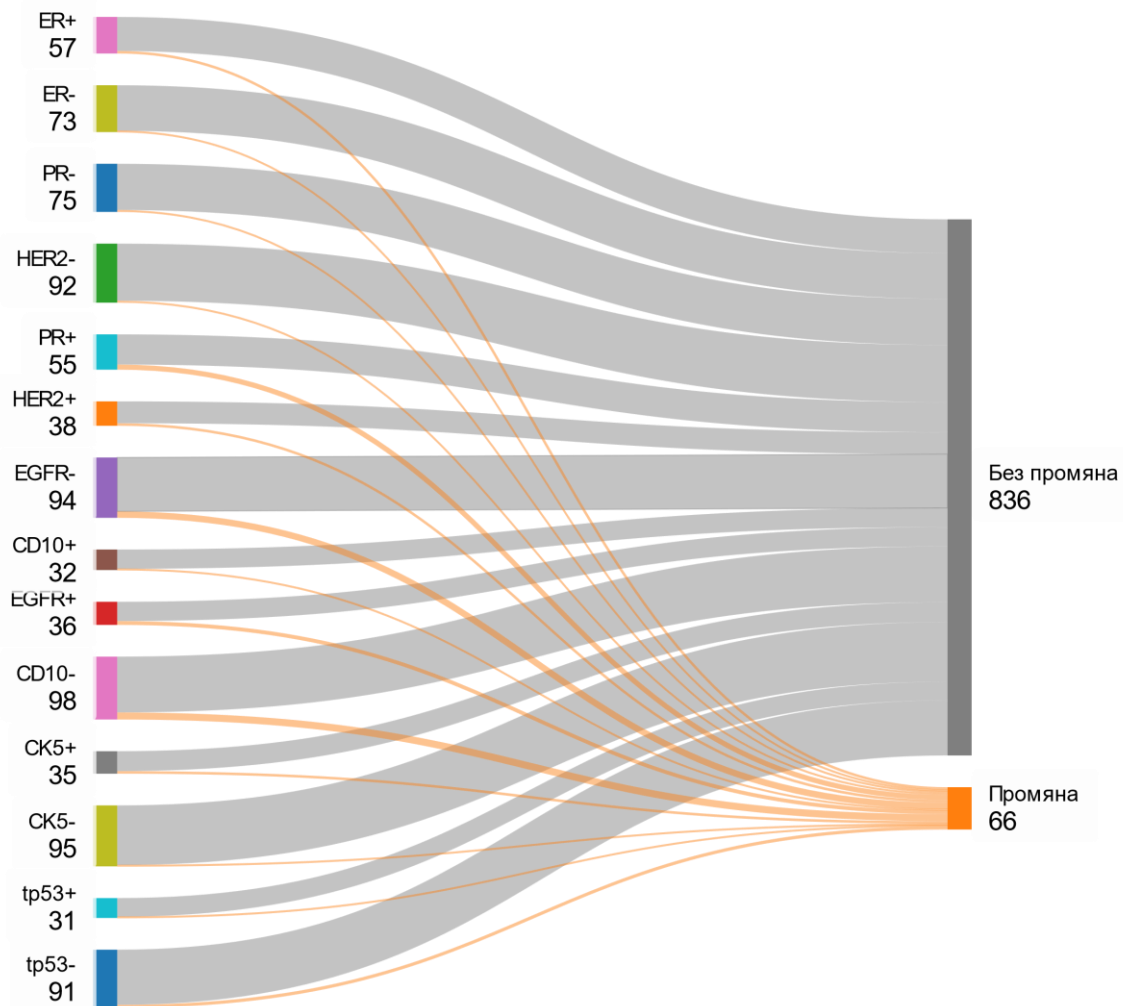
Тези разминавания вероятно се дължат на малкия брой пациентки в Българската група съдържаща само пациентки с ТНКМЖ. Експресията на CD10 също не е статистически значима в Българската кохорта [OR 0.2041 (95%CI 0.0413 - 1.0083); $p = 0.0512$]. Р-стойността в този анализ е близка до критичната стойност ($p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

4.1.6 КОНКОРДАНТНОСТ И ДИСКОРДАНТНОСТ НА БИОМАРКЕРИТЕ

Конкордантността на биомаркерите се отнася до съответствието на техните експресии в различни типове проби и времеви точки, докато дискордантността описва несъответствието между тях. В нашето изследване, след анализ на ексцизионните биопсии от тумори, които не са постигнали ППО (n=87), и сравнение с резултатите от дебелиоглените проби от същите пациентки, не се наблюдава значима промяна в експресията на биомаркерите след НАХТ (**Фигура 13**). Промените са както следва:

- **ER (Естрогенен рецептор):**
 - ER+ [n=53] → Без промяна
 - ER- [n=71] → Без промяна
 - ER+ [n=4] → Промяна
 - ER- [n=2] → Промяна
- **PR (Прогестеронов рецептор):**
 - PR+ [n=47] → Без промяна
 - PR- [n=72] → Без промяна
 - PR+ [n=8] → Промяна
 - PR- [n=3] → Промяна
- **HER2:**
 - HER2+ [n=34] → Без промяна
 - HER2- [n=89] → Без промяна
 - HER2+ [n=4] → Промяна
 - HER2- [n=3] → Промяна
- **EGFR:**
 - EGFR+ [n=30] → Без промяна
 - EGFR- [n=84] → Без промяна
 - EGFR+ [n=6] → Промяна
 - EGFR- [n=10] → Промяна
- **CD10 (Неутрална ендопептидаза):**
 - CD10+ [n=30] → Без промяна
 - CD10- [n=87] → Без промяна
 - CD10+ [n=2] → Промяна
 - CD10- [n=11] → Промяна
- **p53:**
 - p53+ [n=29] → Без промяна
 - p53- [n=86] → Без промяна
 - p53+ [n=2] → Промяна
 - p53- [n=5] → Промяна

Тази липса на съществена промяна в експресията на биомаркерите след терапевтична интервенция подчертава тяхната стабилност във времето, въпреки агресивното лечение (Приложение 3).



Фигура 13 Санки диаграма на промяната в експресията на избраните биомаркери.

4.2 РЕЗУЛТАТИ В HR-ОТРИЦАТЕЛНАТА ПОДГРУПА

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

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

В този отдел се разглеждат всички HR-отрицателни проби и тяхната асоциация с честотата на отговора към НАХТ (**Фигура 14**). Тъй като Българската кохорта съдържа само проби от пациентки с ТНКМЖ, тя бе включена в този анализ.

4.2.2 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА КЛИНИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

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

4.2.2.1 КЛИНИЧЕН СТАДИЙ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

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

При събиране на двете кохорти (n=73), 42% (n=31) от случаите се характеризират с ППО. От тези постигнали ППО, 65% (n=20) се определят като стадий IIIa, докато останалите 35% (n=11) са класифицирани като стадий IIIb. В групата на стадий IIIa (n=32), 62% (n=20) от пациентките са постигнали ППО, докато в групата на стадий IIIb (n=41) само

РЕЗУЛТАТИ

27% (n=11) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при пациентки в стадий IIIб [OR 4.5455 (95% CI 1.6810 – 12.2910); p = 0.0029]. Резултатът се интерпретира по следния начин - пациенти стадирани като IIIа (т.е. cT0-3 cN2 cM0) постигат ППО често в случай, че са определени с HR-отрицателно заболяване.

Таблица 10 - Еднофакторен анализ на клиничните параметри при HR-отрицателни пациентки

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

4.2.2.2 ВЪЗРАСТ И ППО ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

Средната възраст в HR-отрицателната кохорта също е изчислена като 52г. В Английската група от пациентки, 46% (20/43) са постигнали ППО. От 20-те пациентки постигнали ППО, 60% (n=12) са <52 годишна възраст и 40% (n=8) са ≥52г. От пациентките определени като <52 годишна възраст (n=24), 48% (n=12) са постигнали ППО. От пациентките определени като ≥52г годишна възраст (n=19), 44% (n=8) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки в по-младата възраст [OR 0.8667 (95% CI 0.2567 - 2.9255); p = 0.8177].

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

4.2.2.3 БРОЙ ЦИКЛИ НАХТ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

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

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

която е провела по-малко от 6 цикъла (n=44), 36% (n=16) са постигнали ППО. Сред пациентките, които са провели точно 6 цикъла НАХТ (n=29), 52% (n=15) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за често постигане на ППО при пациентките провели точно шест курса НАХТ в общата HR-отрицателна кохорта [OR 0.5333 (95% CI 0.2057 – 1.3829); p = 0.1960].

4.2.3 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ХИСТОПАТОЛОГИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

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

Таблица 11 - Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри при HR-отрицателни КМЖ

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

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

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

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

4.2.3.2 ТУМОРНА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

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

Сред постигналите ППО (n=31) пациентки в комбинираната кохорта, 65% (n=20) са диагностицирани с ниско диференцирани (G3) тумори, докато 35% (n=11) са класифицирани като < G3. От тези с G3 тумори (n=35), 57% (n=20) са постигнали ППО. Сред пациентките, категоризирани със заболяване < G3 (n=38), 29% (n=11) са

постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ниско диференцирани тумори в общата популация [OR 0.3056 (95% CI 0.1159 – 0.8055); p = 0.0165].

4.2.3.3 ТУМОРНА ЕЛАСТОЗА ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

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

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

4.2.3.4 ТУМОРНА НЕКРОЗА ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 55% (n=11) са с наличие на туморна некроза в хистологичната проба, а при 45% (n=9) не е открит този параметър. От пациентките с наличие на некроза (n=17), 65% (n=11) са постигнали ППО. От случаите с липса на този параметър (n=26), 35% (n=9) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с наличие на туморна некроза в тази кохорта [OR 0.2888 (95%CI 0.0802 - 1.0402); p = 0.0575]. Това означава, че при друг обем на извадката, резултатът може да се промени.

В HR-отрицателната група пациентки (n=73), които са постигнали ППО (n=31), 51% (n=16) са имали първоначална туморна некроза в сравнение с 49% (n=15) без нея. Сред

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

4.2.4 ИМУНОХИСТОХИМИЧНИ ПАРАМЕТРИ ПРИ HR-ОТРИЦАТЕЛНИ КМЖ

Резултатите са представени в **Таблица 12**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

Таблица 12 - Еднофакторен анализ на имунохистохимичните параметри при HR-отрицателни КМЖ.

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

4.2.4.1 ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМАЛЕН РЕЦЕПТОР ЗА РАСТЕЖЕН ФАКТОР 2 (HER2)

От 20-те пациентки постигнаха ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 40% (n=8) са с наличие на положителен HER2, а при 60% (n=12) не се откри този параметър. От пробите определени като HER2-обогатени (n=16), 50% (n=8) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=27), 44% (n=12) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие HER2-обогатяване лекувани по схема EC [OR 0.8000 (95% CI 0.2316 - 2.7634); p = 0.7242].

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

4.2.4.2 СПАЛТОПОДОБЕН ТРАНСКРИПЦИОНЕН ФАКТОР 4 (SALL4)

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

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

4.2.4.3 ЕПИДЕРМАЛЕН РЕЦЕПТОР ЗА РАСТЕЖЕН ФАКТОР (EGFR)

От 20-те пациентки постигнаха ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 30% (n=6) са с наличие положителен EGFR, а при 70% (n=14) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи EGFR (n=21), 28% (n=6) са постигнаха ППО.

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

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

4.2.4.4 ЦИТОКЕРАТИН 5 (СК5)

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

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

4.2.4.5 КЛЪСТЕР НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ 10 (CD10)

От 20-те пациентки постигнали ППО в HR-отрицателната Английска кохорта (n=43), 75% (n=15) са с наличие на положителен CD10, а при 25% (n=5) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи CD10 (n=19), 79% (n=15) са постигнали ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=24), 21% (n=5) са постигнали

ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на CD10 [OR 0.0702 (95%CI 0.0160 - 0.3079); p = 0.0004].

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

4.2.4.6 ПРОТЕИН 53 (P53)

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

Сред комбинираната HR-отрицателна кохорта (n=73), 42% са постигнали ППО (n=31). 65% (n=20) са имали положителна експресия на p53, докато 35% (n=11) не са имали такава. В случаите, експресиращи p53 (n=39), 51% (n=20) са постигнали ППО. Сред тези с липса на p53 (n=34), 32% (n=11) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при HR-отрицателни пациентки с наличие на мутирал p53 [OR 0,4543 (95%CI 0,1750 - 1,1798); p = 0.1051].

4.3.2 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА КЛИНИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ ПРИ ТНКМЖ

Резултатите са представени в **Таблица 13**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

Таблица 13 - Еднофакторен анализ на клиничните параметри при пациентки с ТНКМЖ

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

4.3.2.1 КЛИНИЧЕН СТАДИЙ ПРИ ТНКМЖ

В групата от пациентки диагностицирани с ТНКМЖ (n=54), 42% (n=23) са постигнали ППО. От 23-те пациентки постигнали ППО, 61% (n=14) са стадириани като IIIa и 39% (n=9) са стадириани като IIIб. От пациентките стадириани като IIIa (n=23), 61% (n=14) са постигнали ППО. От пациентките стадириани като IIIб (n=31), 29% (n=9) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-рядко постигане на ППО при пациентки в стадий IIIб в тази кохорта [OR 3.8025

(95%CI 1.2144 - 11.9056); $p = 0.0218$]. Резултата се интерпретира по следния начин: пациентки стадиранни като IIIa (т.е. cT0-3 cN2 cM0) постигат ППО по-често при условие, че са диагностицирани с ТНКМЖ.

4.3.2.2 ВЪЗРАСТ И ППО ПРИ ТНКМЖ

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

4.3.2.3 БРОЙ ЦИКЛИ НАХТ ПРИ ТНКМЖ

ТНКМЖ пациентките включени в проучването (n=54) са провели <6 (n=22) или точно 6 (n=32) цикъла НАХТ по схема ЕС през 21 дни. От 23-те пациентки постигнали ППО в тази кохорта (n=23), 39% (n=9) са провели <6 курса и 61% (n=14) се подложиха на точно шест цикъла лечение. От пациентките провели <6 курса (n=22), 41% (n=9) са постигнали ППО. От пациентките подложили се на точно 6 цикъла НАХТ (n=32), 43% (n=14) са постигнали ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентките провели точно шест курса НАХТ в тройно-негативната кохорта [OR 0.8265 (95%CI 0.2778 - 2.4594); $p = 0.7320$].

4.3.3 ЕДНОФАКТОРЕН АНАЛИЗ НА ХИСТОПАТОЛОГИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ ПРИ ТНКМЖ

Резултатите са представени в **Таблица 14**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

Таблица 14 - Еднофакторен анализ на хистопатологичните параметри при ТНКМЖ

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

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

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

4.3.3.2 ТУМОРНА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИ ТНКМЖ

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

4.3.3.3 ТУМОРНА ЕЛАСТОЗА ПРИ ТНКМЖ

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

4.3.3.4 ТУМОРНА НЕКРОЗА ПРИ ТНКМЖ

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

4.3.4 ИМУНОХИСТОХИМИЧНИ ПАРАМЕТРИ ПРИ ТНКМЖ

Резултатите са представени в **Таблица 15**, след което следва описание на съдържанието, поотделно, за всеки един параметър.

Таблица 15 - Еднофакторен анализ на имунохистохимичните параметри при ТНКМЖ.

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

4.3.4.1 ЕПИДЕРМАЛЕН РЕЦЕПТОР ЗА РАСТЕЖЕН ФАКТОР (EGFR)

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

4.3.4.2 ЦИТОКЕРАТИН 5 (СК5)

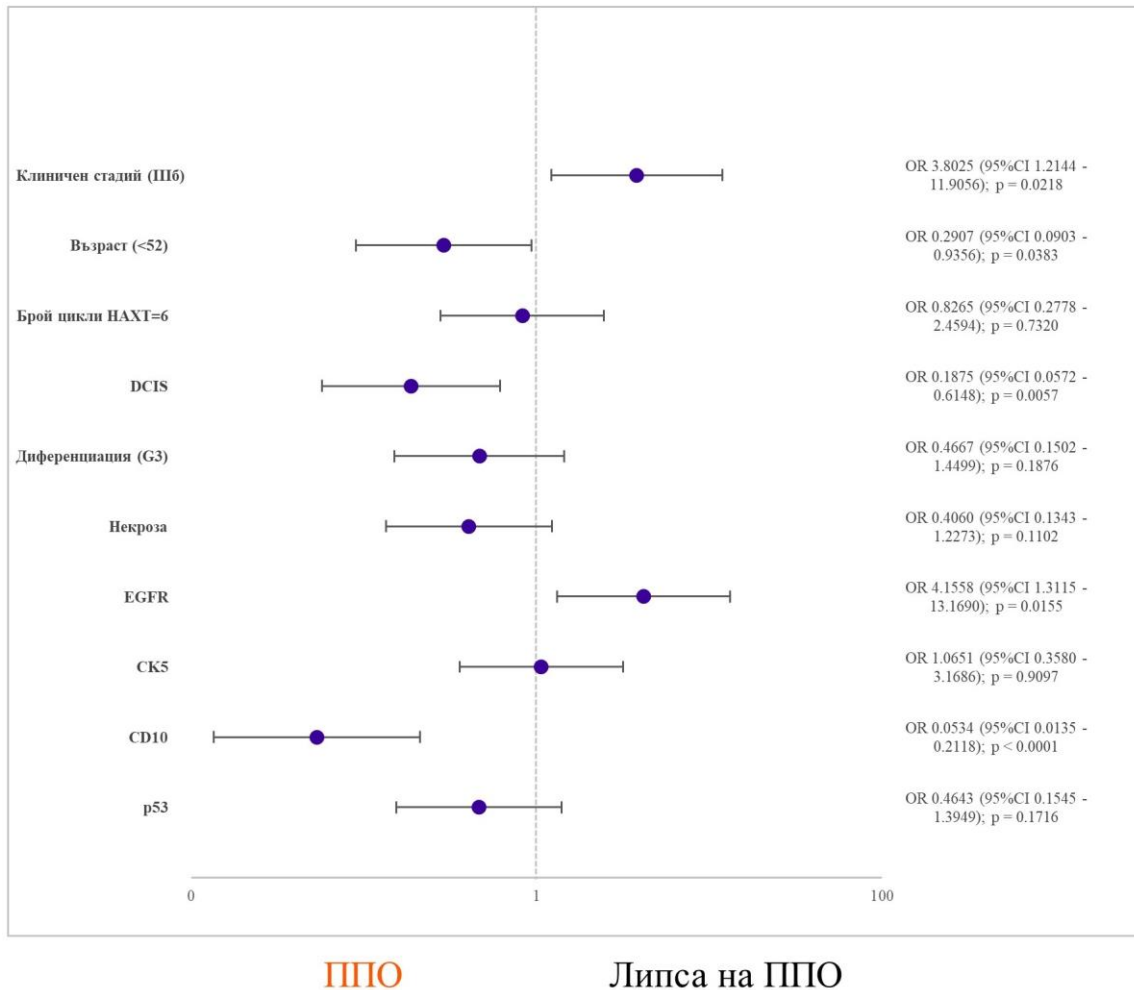
От 23-те пациентки постигнаха ППО в кохортата с ТНКМЖ (n=54), 56% (n=13) са с наличие на положителен СК5, а при 45% (n=10) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи СК5 (n=31), 42% (n=13) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=23), 43% (n=10) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че липсва статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ТНКМЖ и наличие на СК5 [OR 1.0651 (95%CI 0.3580 - 3.1686); p = 0.9097].

4.3.4.3 КЛЪСТЕР НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ 10 (CD10)

От 23-те пациентки постигнаха ППО в кохортата с ТНКМЖ (n=54), 78% (n=18) са с наличие на положителен CD10, а при 22% (n=5) не се откри този параметър. От пробите определени като експресиращи CD10 (n=23), 78% (n=18) са постигнаха ППО. От пробите с липса на този биомаркер (n=31), 16% (n=5) са постигнаха ППО. Еднофакторният анализ показва, че е налична статистически значима разлика за по-често постигане на ППО при пациентки с ТНКМЖ и наличие на CD10 [OR 0.0534 (95%CI 0.0135 - 0.2118); p < 0.0001].

4.3.4.4 ПРОТЕИН 53 (P53)

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



Фигура 15 Блобограма на резултатите за кохортата с ТНКМЖ.

4.3.5 МНОГОФАКТОРЕН ЛОГИСТИЧЕН РЕГРЕСИВЕН АНАЛИЗ НА ТНКМЖ

Параметрите които бяха значими при еднофакторния статистически анализ бяха включени и в многофакторния. Изследването потвърди, че експресията на CD10 [OR 0.145 (95% CI 0.01-0.28); $p < 0.001$] може да се използва като самостоятелен предсказващ биомаркер за ППО. Резултатите ни показват, че съществува статистически значима връзка между експресията на CD10 и ТНКМЖ [OR 0.105 (95% CI 0.067-0.136); $p < 0.01$]. Липсата на EGFR експресия при бробите от ТНКМЖ се асоциира с положителна CD10 експресия и повишена честота за ППО [OR 0.06 (95% CI 0.01-0.48); $p < 0.01$]. (Таблица 16).

Многофакторният регресионен анализ не показва статистически значима разлика за връзка между другите параметри и липсата на DCIS компонент в дебелоигления

РЕЗУЛТАТИ

биопсичен материал от ТНКМЖ с по-ниска честота на ППО [OR 2.29 (95% CI 0.43-12.26); $p=0.067$]. Р-стойността в анализа е близка до критичната стойност ($p \leq 0.05$), което означава, че при по-голям обем на извадката, резултатът може да се промени.

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

Таблица 16 - Многофакторен логистичен анализ на туморните биомаркери при ТНКМЖ

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

4.4 ТРАНСКРИПТОМЕН АНАЛИЗ

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

4.4.1 ЕКСПРЕСИЯ НА *MME* (CD10)

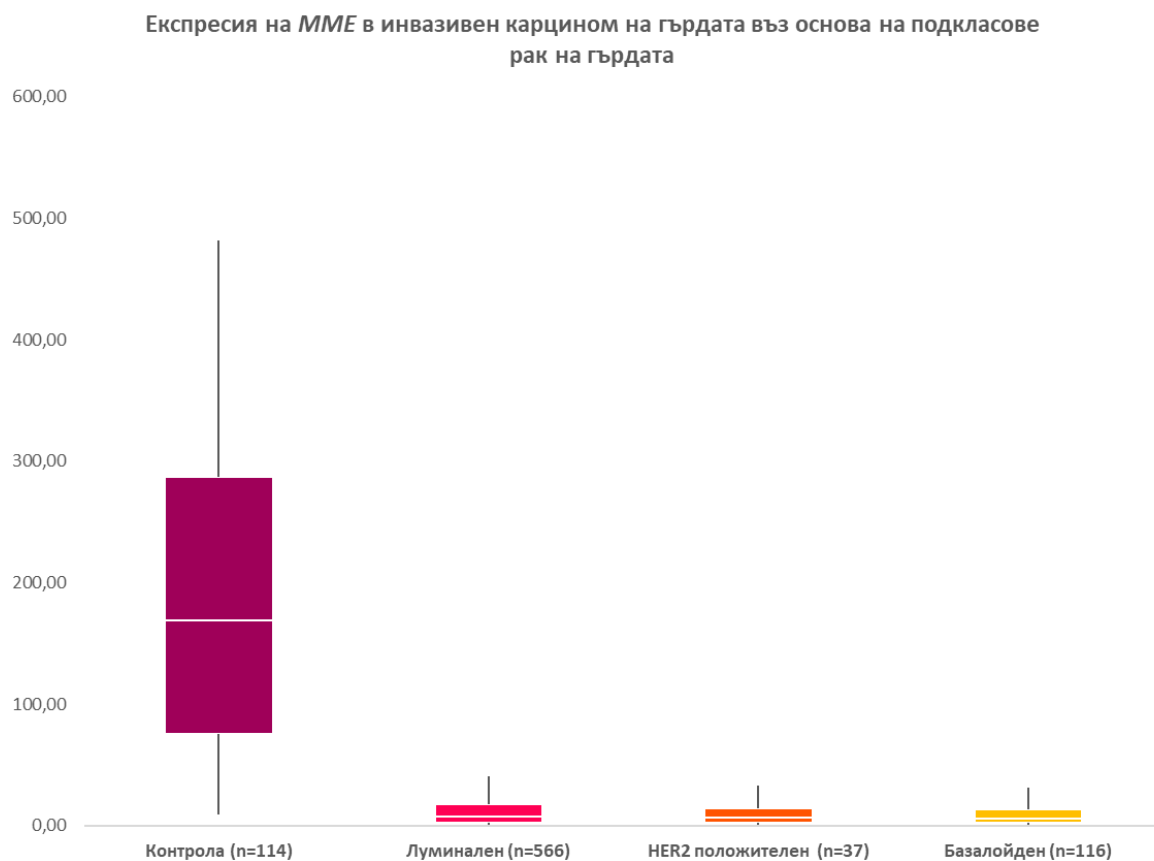
Пробите от здравите тъкани експресираха CD10 (кодирана от *MME* на хромозома 3) около 20 пъти повече от туморните (93.228 и 4.518 съответно) с наличие на статистическа значимост; $p < 0.0001$. Тази тенденция се наблюдава при всички подтипове рак на гърдата (**Фигура 16**). ДНК метилирането на генния промотор е вероятният причинител на подтискането на експресията на *MME* в туморните проби (93).

4.4.2 ЕКСПРЕСИЯ НА *P53*

Честотата на експресията на p53 протеина варира в зависимост от подтипа на КМЖ, като е най-ниска при луминално заболяване и най-висока при ТНКМЖ и HER2-обогатени подтипове ($p < 0.001$) (93).

4.4.3 ЕКСПРЕСИЯ НА EGFR

Експресията на *EGFR* е най-висока при ТНКМЖ в сравнение с други подтипове рак на гърдата ($p < 0.001$). В нетуморна тъкан от млечна жлеза, експресията на този биомаркер е 4-10 пъти по-висока спрямо нивата отчетени при КМЖ (93).



Фигура 16 Сравнение на разликите в експресията на *MME* между здрави контроли и тъкан от КМЖ.



05

ГЛАВА ПЕТА

Обсъждане

5 ОБСЪЖДАНЕ

Наскорошният напредък в молекулярната онкобиология и възможността за прогнозирането на лекарствена резистентност, подчертават значимостта на туморното молекулярно профилиране (94). Наличието на тъканни архиви допринесе значително за идентифицирането и проучването на свръхекспресирани или потиснати молекулярни биомаркери като: HER2, p53, ER и други. Впоследствие, се разработиха няколко, в момента рутинно прилагани, таргетни медикамента. Част от пациентите с карцином на гърдата не отговарят на критериите за този вид персонализирано лечение. При тях цитостатичната химиотерапия играе основна роля в системното лечение. Определен брой пациенти демонстрират добър отговор след ХТ и ~30% от тях постигат пълен патологичен отговор (95).

Антрациклин базираната цитостатична химиотерапия е един от най-често прилаганите режими както при пациентки с ранен КМЖ, така и при такива с авансирало заболяване (3). Неоадювантната химиотерапия увеличава шансовете за дефинитивно оперативно лечение (R0 резекция) заедно с вероятността за органосъхраняваща операция, намалява риска от следоперативен рецидив и определя чувствителността на заболяването към ХТ (96). Пълният патологичен отговор след НАХТ е свързан с дългосрочна преживяемост (OS) и е независим предиктор за благоприятни клинични резултати (DFS) при всички молекулярни подтипове КМЖ (97, 98). Съвременното научно изследване предостави данни, които подчертават ползите от включването на антрациклини в терапията на пациенти с КМЖ, като това увеличава честотата на ППО (99). Това проучване включва пациенти, диагностицирани, чрез дебелоиглена биопсия с Луминален Б, HER2-отрицателен рак на гърдата или ТНКМЖ. Тези данни допълнително подкрепят идеята, че пациентите с ТНКМЖ са склонни да отговарят по-добре на системно лечение и по този начин по-често постигат ППО. До момента липсва надежден биомаркер позволяващ подкатегоризация на пациенти с ТНКМЖ постигнали ППО.

Разработена е предиктивна скала, която предоставя възможност за индивидуално предсказване на ППО при пациенти с КМЖ след прилагане на неоадювантна химиотерапия (100). Тази скала включва пет компонента: статуса на ER, процента на Ki-67, наличие на експресия/амплификация на HER2, размера на тумора преди началото на НАХТ и броя курсове химиотерапия. Предиктивната скала, макар и полезна е обобщаваща и включва само класически фактори. Това води до липса на специфичност

при прилагането в случаи с по-различни клинични и биологични параметри. Този аспект на скалата може да бъде подобрен, като се включат по-специфични и индивидуални фактори за по-точно предсказване на ППО при различни групи пациенти.

Няколко проучвания разширяват хоризонта за търсене на различни предиктивни фактори за ППО, използвайки разнообразни терапевтични режими. Все още липсва успех в тази област (101).

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

Нашите анализи в общата популация пациентки (n=130), включваща всички молекулярни подтипове на КМЖ, показаха, че от клиничните критерии (стадий IIIa/b, възраст и брой цикли НАХТ) липсва статистическа значимост в полза на по-напреднал стадий, по-напреднала възраст и повече цикли на лечение. Наблюдава се тенденция за по-висока честота на ППО при по-млади пациентки (<52 години) и при по-ранен стадий (IIIa). В едно от основните проучвания по тази тема, публикувано в “Journal of clinical oncology” бяха изследвани няколко ключови фактора, свързани с пълния патологичен отговор при пациенти с рак на млечната жлеза. Анализът показва, че първоначалният стадий на ангажиране на лимфните възли, възрастта на пациентите и степента на разпространение на болестта не се различават значително между пациентите с ППО и тези без ППО. Въпреки това, бяха забелязани някои интересни разлики. По-голям процент от пациентите с ППО имаха HR-отрицателни тумори и се характеризираха като ниско диференцирани (G3). Тези тумори също бяха с по-малък размер в сравнение с туморите на пациентите без ППО. Многофакторният анализ, извършен в това изследване подчерта, че влиянието на ER статуса и туморната диференциация върху честотата на ППО са независими предиктори от първоначалния туморен размер (102).

От нашите анализи на хистопатологичните параметри, наличието на DCIS компонента в пробата от дебелоиглената биопсия, и/или ниско диференциран тумор (G3), са демонстрирали статистическа значимост за постигане на ППО. Тези находки са известни в литературата и нашите данни ги подкрепят (8, 103). В проучването ни, наличието на *in*

situ компонента се отбелязва най-вече при ниско диференцираните карциноми. Известно е, че ниско диференцираните тумори отговарят по-често на цитостатични системни химиотерапевтици (104, 105). Някои проучвания са доказали, че наличието на DCIS фокуси, на фона на инвазивен дуктален карцином, корелира с по-висока обща преживяемост (106). Други проучвания са показали, че наличието на некроза в пробата от дебелоиглената биопсия (преди НАХТ), корелира с по-високи честоти на ППО (107). Допълнителни научни изследвания показват, че комбинацията от степента на туморната диференциация и наличието на некроза в момента е най-добрият предиктор за биологичното поведение на болестта (108). Нашето проучване показва, че съществува тенденция за по-често постигане на ППО при наличие на некроза, но само при HR-отрицателната кохорта. Следователно, тези факти могат да обяснят защо по-голямата част от туморите, в които присъстват и фокуси на DCIS, постигат ППО по-често.

В нашето проучване наличието на еластоза не показва тенденции нито към по-често постигане на ППО, нито към липса на отговор след антрациклин базирана НАХТ. Механизмите за поява на еластоза в тъканите на млечните жлези не са ясни. Предполага се, че еластичните влакна не се произвеждат само от фибробласти, а и от ендотелни и неопластични клетки (109). Наличието на корелация между еластозата с подобрена преживяемост и благоприятни туморни характеристики (напр. висока степен на диференциация и нисък Ki-67) не се потвърди в редица проучвания (110, 111). Друга установена връзка е тази на еластозата с експресията на естрогенния рецептор (ER). Тези данни подкрепят нашите находки.

Анализирането на имунохистохимичните биомаркери в нашата обща кохорта пациентки показва, че наличието на ER е самостоятелен предиктор за липса на ППО. Тези резултати подкрепят литературните данни от множество проучвания доказващи, че ER-положителни тумори, демонстрират резистентност към цитостатична системна терапия както в неoadювантен, така и в адювантен аспект (112-114). Литературата съобщава, че ER-положителното заболяване, представляващо приблизително 50 - 60% от случаите на рак на гърдата, е относително нечувствително към химиотерапевтично лечение, в сравнение с други подтипове КМЖ, и с честота на ППО варираща около 10% (115).

Специфичните механизми на HR-положителните КМЖ за понижената чувствителност към химиотерапията включват:

- **Хормонална зависимост:** Растежа на HR-положителният рак на гърдата се ръководи от естроген. Химиотерапията е насочена към бързо делящи се клетки, но HR-позитивните заболявания отговарят по-слабо на този вид системно лечение, тъй като техният растеж е бавен (116).
- **Механизми за възстановяване на ДНК:** Химиотерапията уврежда ДНК в раковите клетки и до клетъчна смърт. HR-позитивните тумори имат по-ефективни механизми за възстановяване на ДНК (117).
- **Взаимодействие с други сигнални каскади:** HR-позитивният КМЖ може да осъществи взаимодействие между сигнализирането чрез естрогенния рецептор и други пътища свързани с клетъчно оцеляване (напр. PI3K/AKT/mTOR) (118).

Нашите резултати показват, че сред трите основни подтипа КМЖ, най-ниските честоти на ППО от антрациклин базирана НАХТ са при хормонално чувствителните тумори, което подкрепя данните от световната литература. Клинични проучвания показват, че при HR-положителните пациентки, ендокринна терапия съобразена с антропологичните им параметри, е за предпочитане дори и в неoadювантен аспект (3). Генетични изследвания са показали възможности за допълнително молекулярно типизиране на HR-положителни/HER2-отрицателни тумори чрез анализ на 80 гена. Проучването показва ~15% вероятност за рекласифициране на луминалния подтип КМЖ в базален, демонстриращ тенденции сходни с тези на ТНКМЖ за постигане на ППО (119).

Присъствието на PR също е свързано с по-слаб терапевтичен отговор към цитостатично лечение (120). Нашите данни показват, че експресията на PR е силно зависима от наличието на ER. По този начин използването на прогестеронови рецептори като независим предиктивен маркер за ППО не е редно, тъй като повечето тумори, експресиращи PR, имат повишени нива и на ER (121). Липсата на ER експресия, само по себе си, не демонстрира убедителни статистически значими стойности предсказващи ППО или липса на отговор (122).

Нашият анализ показва, че при HR-положително заболяване, наличието на CD10 и експресия на мутирал (t)p53 е свързано с по-високи честоти на ППО. Научната литература съобщава, че ER-индуцираното потискане на медирания от p53 апоптотичен отговор, води до стареене на туморните клетки и последваща резистентност към химиотерапия. При ER-отрицателни КМЖ, мутираният (t)p53 води до натрупването на генетични аномалии и съответно до по-висока геномна нестабилност

и чувствителност към цитостатици (123). Нашите данни не показаха зависимост от наличието на p53 с по-висока честота на ППО при пациентки с HR-отрицателно заболяване или ТНКМЖ. Това се потвърждава и от други проучвания, въпреки по-честото разпространение на *TP53-мут* в тези по-агресивни фенотипове на КМЖ (124). Чрез многофакторният логистичен регресивен анализ, при пациентки постигнаха ППО, потвърдихме връзката между експресията на CD10 и p53 в HR-положителната кохорта, с по-висока честота на ППО.

Наличието на CD10 и връзката с ППО е установена при всички туморни подгрупи в нашия анализ. Най-високата статистическа значимост се постигна при HR-отрицателната група и кохортата с ТНКМЖ. Мултифакторният анализ демонстрира статистическа значимост за наличието на CD10 при ТНКМЖ. Проучванията показват, че CD10 играе роля в модуляцията на пътя Фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), чрез активиране на тумор супресора „фосфатаза с двойна субстратна специфичност“ - PTEN (125). Това действие може да предотврати активирането на каскадата чрез Akt / PKB, която е замесена както в нормалния клетъчен растеж, така и в растежа на туморните клетки. Редица проучвания показаха, че активирането на каскадата PI3K/AKT/mTOR води и до лекарствена резистентност при КМЖ (125-127). Stern et al. съобщават, че пациенти с КМЖ при които липсва експресия на PTEN, лекувани с химиотерапия в контекста на прочуването „BCIRG-006“, показват по-лоши DFS и OS, в сравнение с тези с положителен PTEN потвърден имунохистохимично (128). Тези данни показват, че чрез функционалното активиране на PTEN, медирано от CD10, се осъществява потискане на сигналната каскадата PI3K/AKT/mTOR, водещо до повишаване на чувствителността към химиотерапия и е свързано с по-благоприятна прогноза без значение от мутационния статус на PIK3CA.

Проучване в три онкологични центъра в България анализира честотата на PIK3CA мутациите при пациенти с метастатичен HER2-негативен/HR-позитивен карцином на гърдата и оцени преживеваемостта свободна от прогресия (PFS) между групите с див тип и мутационно позитивни пациенти. Анализирани са 250 тъканни проби, събрани между 2016 и 2022 година, като PIK3CA мутациите са открити в 29.2% от случаите. Резултатите показаха, че мутационният статус на PIK3CA не компроментира ефективността на системното лечение на първа линия (129).

Използвайки базата данни TCGA чрез UALCAN (Портал за анализ на данни за рака на Университета Алабама), демонстрирахме статистически значима разлика в експресията на *MME (CD10)* във всички подтипове карциноми на млечната жлеза в сравнение със здравата тъкан. Тенденция за редуцирана експресия се наблюдава при всички подтипове рак на гърдата, а метилирането на промотора е най-вероятната причина за потискането на експресията на *MME* в туморните проби (93). Заглушаването на CD10 дерегулира потискащите ефекти, с които този сигнален път контролира клетъчната смърт. По този начин се повишава резистентността към цитостатици (**Фигура 17**). Отношението на тази молекула към прогнозата бе показана в няколко проучвания, установяващи наличието ѝ при по-агресивните фенотипове рак на гърдата (130, 131).

Нашият анализ показва, че свръхекспресията на EGFR е свързана с намалена вероятност за постигане на пълен патлогичен отговор при пациенти с HR-отрицателно заболяване и в подгрупата с тройно-негативен карцином. Този резултат е със статистическа значимост. Подобни данни се откриват и в научната литература, която подкрепя нашите резултати и допълнително доказва, че експресията на EGFR при пациенти с TNKMЖ е свързана с по-слаб отговор към химиотерапия и с по-ниска обща преживяемост (132). Изследванията показват, че EGFR, заедно с неговата сигнална каскада, играе ключова роля в регулирането на процеси като епително-мезенхимен преход, клетъчна миграция и туморна инвазия (133). Високата експресия на EGFR може да бъде използвана като независим фактор, предсказващ по-лоша прогноза при пациенти с рак на гърдата (79). Чрез провеждането на многофакторен логистичен регресивен анализ, при пациентки постигнали ППО, демонстрирахме връзка между експресията на CD10 при липса на EGFR в HR-отрицателната кохорта, с по-висока честота на ППО. Когато изследвахме наличието на промени в експресията на различните биомаркери преди и след НАХТ, не открихме статистически значима разлика в туморните профили. Световната литература показва, че при пациенти с EGFR-положителни тумори, при които след НАХТ липсва експресия на този рецептор, са с по-добра прогноза (134). До момента не са налични данни за връзка между промяната в експресията на другите дискутирани тук биомаркери преди и след НАХТ и по-благоприятния краен клиничен резултат.

Липсва консенсус в световната литература за ролята на биомаркерите SALL4 и CK5, които и в нашето проучване не показаха статистически значима тенденция за ППО или липса на такава, след антрациклин базирана НАХТ. Предклинично изследване показва, че заглушаването на SALL4 инхибира растежа на лекарствено-резистентни клетки от

КМЖ чрез спиране на клетъчния цикъл и обръщане на химиорезистентността на тумора (74). SALL4 е силно експресиран при пациентки с HR-положителен КМЖ резистентни към хормонално лечение и корелира с фенотип на стволови клетки експресиращи Oct4, Nanog и SOX2 (135). В проучването на Liu et al. е демонстрирано, че експресията на SALL4 при КМЖ е свързана с клетъчния растеж, туморната инвазия и избягването от апоптоза (136). До момента липсват проучвания асоцииращи SALL4 с терапевтичния отговор към системна терапия при КМЖ. Нашият анализ показва липса на статистически значима връзка между тази молекула и честотата на ППО.

Цитокератин 5 (СК5) е междинен филамент откриваем в епителните клетки. В контекста на рака на гърдата, СК5 се използва като биомаркер за класифициране на тумори на гърдата в различни подтипове, с варираща прогноза (137). Налични са данни които демонстрират тенденции за подобрена прогноза при пациенти със СК5-положителни тумори (138). Други проучвания показват, че клетки експресиращи СК5 притежават свойства на ракови стволови клетки и могат да представляват химиорезистентна популация при КМЖ (139, 140). Експресията на СК5 е статистически значимо свързана със соматични *BRCA1* мутации и с по-лоша прогноза (141). Нашите данни подкрепят, макар и статистически незначимо и двете становища. При анализа на HR-положителната кохорта е налична склонност към по-добър терапевтичен отговор. За разлика от нея, в HR-отрицателната кохорта и при пациентките с ТНКМЖ тази тенденция липсва.

Изследванията показват, че макар и да има случаи на промени в експресията на биомаркерите след НАХТ, те не са статистически значими (142). Нашите резултати подчертават стабилността на експресията на ключови биомаркери като естрогенов рецептор (ER), прогестеронов рецептор (PR), човешки епидермален растежен фактор рецептор 2 (HER2), рецептор за епидермален растежен фактор (EGFR), миепителен маркер CD10, цитокератин-5 (СК5) и протеин p53 в контекста на терапията. Тази стабилност е важна за предсказването на отговора на лечението и последващите терапевтични стратегии. Стабилната експресия на тези биомаркери след НАХТ има няколко ключови предимства. Първо, тя позволява по-точна оценка на прогнозата и реакцията на лечението. Например, стабилността на ER и PR експресията може да помогне за по-добро предсказване на отговора към ендокринната терапия. По същия начин, стабилната експресия на HER2 е критична за пациентите, които се лекуват с HER2-таргетиращи терапии особено поради хетерогеността на тумора. Стабилната експресия на EGFR, CD10, СК5 и p53 след НАХТ показва, че тези биомаркери могат да

бъдат надеждни предиктори за терапевтичния отговор и за определяне на оптимална стратегия за терапевтични стъпки.

Прилагането на неoadювантно системно лечение в клиничната практика при пациенти с карцином на гърдата, се е увеличило драстично през последните години. Това важи особено за България, тъй като значителна част от пациентите постъпват вече с авансирало заболяване, а този подход позволява постигането на възможно най-благоприятен резултат. Мета-анализ показва, че наситен (dose-dense) режим НАХТ значително подобрява честотата на ППО при пациенти с ниски нива на експресия на хормонални рецептори, без да увеличава нежеланите реакции (143). Друг анализ, проведен от Групата за сътрудничество на участниците в ранните проучвания на рака на гърдата (EBCTCG) през 2019 г., установи, че в сравнение със стандартната цикличност на ХТ, 10-годишните DFS и OS са значително подобрени в популацията, провеждала системно лечение с наситен режим(144). Златният стандарт за дефинитивно лечение на КМЖ остава хирургичното лечение, дори и при наличие на пълен отговор (3). Въпреки това, текал проучвания изучаващи вероятността премахването на операцията при пациенти с пълен отговор да компрометира прогностичните показатели (145). Към момента, провеждането на аксиларна лимфна дисекция при пациенти постигнали пълен отговор все още се дискутира (146).

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

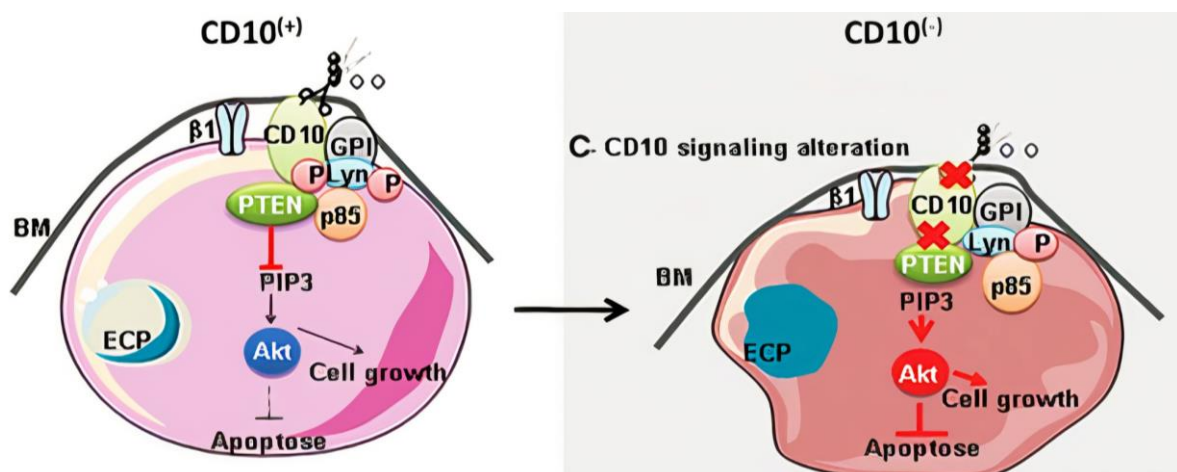
Второ, нашето проучване обединява различни биологични подтипове на пациентки с инвазивен дуктален карцином в стадий III, което довежда до ограничен брой случаи в подгруповия анализ. Този подход е необходим, за да се създаде общ образ за връзката между параметрите и пълния патологичен отговор, но оставя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

Трето, работата ни не анализира въздействието на различни демографски групи. Известно е, че етносът играе роля в прогнозата при пациенти с рак на млечната жлеза, но текущите данни са ограничени до сравнения между афро-американци и бели испанци (147). Този аспект трябва да се изследва в бъдеще, за да се разберат по-

подробно връзките между анализираниите параметри и качеството на терапевтичния отговор.

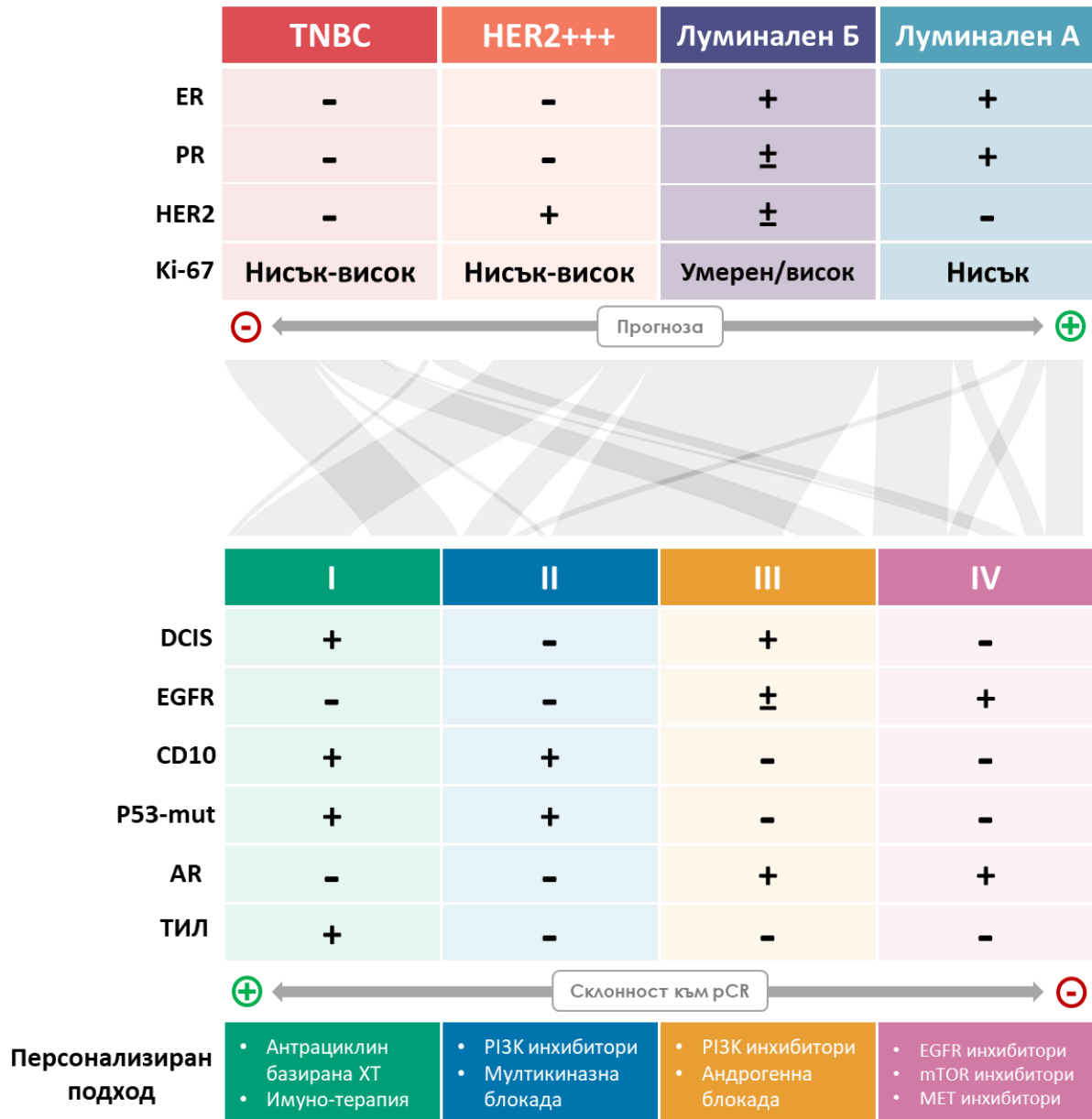
За да потвърдим и разширим нашите наблюдения, са необходими допълнителни изследвания с по-голям обем от данни, предимно в проспективен план и желателно с наситени режими на системно лечение. Тези изследвания ще са насочени към потвърждаване на връзката между факторите предсказващи ППО и крайният резултат,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

Откриването на молекулярни и генетични белези, позволяващи предсказването на пълен патологичен отговор е от голямо медицинско и социално-икономическо значение. Възможността за идентифициране на реагиращи на терапия подтипове КМЖ, ще осигури по-добри клинично-патологични резултати поради по-индивидуализирания лечебен подход (**Фигура 18**). Едновременно, ще се елиминират неблагоприятните ефекти от ненужната химиотерапия при вече известните резистентни подтипове на заболяването. Впоследствие, този подход за персонализирана медицина ще доведе до намаляване на социално-икономическата тежест, ще даде по-висок шанс за възстановяване на работоспособността на пациентите и ще позволи по-бързо завръщане към нормален и качествен начин на живот.



Фигура 17 Адаптиран модел за ролята на CD10 при карцинома на гърдата.

Адаптирано от - M. Sumitomo, R. Shen, D. M. Nanus, *Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. Biochimica et biophysica acta* 1751, 52 (Aug 1, 2005).



Фигура 18 Персонализиране на терапевтичните подходи в зависимост от подтипа на КМЖ

06

ГЛАВА ШЕСТА

Изводи и Заключение

6 ИЗВОДИ

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

1. Клинични характеристики и връзка с ППО:

Извод: Анализът на клиничните характеристики на пациентките (n=130) с инвазивен дуктален карцином на млечната жлеза в стадий IIIa/б показва, че клиничните фактори като стадий IIIa/б (cT0-3 cN2 cM0 или cT4 cN0-2 cM0), над или под средната възраст на кохортата (т.е. 52г) и брой цикли НАХТ (т.е. точно С6 или < С6), нямат статистическо значимо влияние върху вероятността за постигане на пълен патологичен отговор след антрациклин базирана неoadювантна химиотерапия.

2. Хистопатологични морфологични особености и ППО:

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

3. Имунохистохимични биомаркерни експресии и ППО:

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

4. Сравнение на биомаркерни експресии преди и след НАХТ:

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

5. Характеристики на HR-отрицателни пациентки и ППО:

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

6. Характеристики на пациентки с ТНКМЖ и ППО:

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

7. Сравнение между Английската и Българската кохорти:

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

8. Обобщение и асоцииране на резултатите от проведените анализи с тези от световната литература:

Извод: Нашите резултати са в съответствие с данните от световната литература и потвърждават значението на биомаркерите и клиничните характеристики за предсказване на ППО при антрациклин базирана неoadювантна химиотерапия. Наличието на ТНКМЖ и HR-отрицателните подтипове демонстрират по-висока честота на ППО, като специфични биомаркери като CD10 и EGFR показват важна роля в този процес.

7 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нашето проучване показва, че пациентките с тройно-негативен карцином на млечната жлеза постигат ППО по-често от тези с луминален подтип заболяване. Наличието на HR е силен предсказващ фактор, предсказващ липса на ППО към антрациклин базирана НАХТ при пациентки с инвазивен дуктален карцином. Липсата на ER сама по себе си не е надежден предиктор за честотата на ППО. При анализ на всички пациенти (n=130), данните ни показват, че ниско диференцирани карциноми (G3), съдържащи DCIS компонента в пробата от дебелоиглената биопсия и експресиращи CD10 на фона на мутирал p53, постигат ППО по-често в HR-положителната кохорта. Клинични фактори като по-напреднал стадий на заболяването (Шб), по-млада възраст (<52 години) и провеждането на точно шест цикъла НАХТ не показаха статистически значими предимства за постигане на ППО в общата кохорта.

Многофакторният регресионен анализ показва, че положителният ER се асоциира с PR, както и наличие на CD10 експресия при мутирал p53. При пациентки с HR-отрицателно заболяване или ТНКМЖ, по-напредналото заболяване (Шб) е свързано с по-висока честота на ППО, особено при по-млада възраст (<52 години). Наличието на CD10 при липса на EGFR е свързано с по-често постигане на ППО в HR-отрицателната и ТНКМЖ кохорти със статистическа значимост. Многофакторният регресионен анализ в тези кохорти показва, че положителният CD10 се асоциира с не-луминални подтипове на карцинома на млечната жлеза и с липса на EGFR експресия. Транскриптомен анализ за експресията на P13K регулатора *MME* (CD10) показва тенденция за редуцирана експресия при всички подтипове рак на гърдата, повишаваща резистентността към цитостатици.

Нашето проучване подкрепя и допълва данните от световната литература, определяйки нови потенциални подтипове на карцинома на млечната жлеза чрез изследване на допълнителни биомаркери с различно клинично поведение и чувствителност към антрациклин базирана системна терапия. Подобни открития позволяват изготвянето на персонализирани и тумор-агностични подходи за системно лечение. В настоящия момент развитието на тези индивидуализирани подходи е от решаващо значение за създаване и усъвършенстване на специфични лечебни протоколи, покриващи различни подтипове рак на гърдата.

8 ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с научно-теоретичен характер:

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

Приноси с научно-практичен характер:

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

9 НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ СВЪРЗАНИ С
ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

9.1 УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ С ПУБЛИКУВАНИ РЕЗЮМЕТА

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

10 БИБЛИОГРАФИЯ

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2023 Jan;73(1):17-48. PubMed PMID: 36633525.
2. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *The Lancet*. 2021;397(10286):1750-69.
3. Gradishar WJ, Moran MS, Abraham J, Aft R, Agnese D, Allison KH, et al. Breast Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2022 Jun;20(6):691-722. PubMed PMID: 35714673.
4. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014 Jul 12;384(9938):164-72. PubMed PMID: 24529560. Epub 2014/02/18. eng.
5. Colleoni M, Montagna E. Neoadjuvant therapy for ER-positive breast cancers. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012 Sep;23 Suppl 10:x243-8. PubMed PMID: 22987970. Epub 2012/09/26. eng.
6. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy research and practice*. 2012;2012:743193. PubMed PMID: 23320171. Pubmed Central PMCID: 3539433.
7. Ács B, Zábó V, Vízkeleti L, Szász AM, Madaras L, Szentmártoni G, et al. Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Diagnostic pathology*. 2017 Feb 21;12(1):20. PubMed PMID: 28222768. Pubmed Central PMCID: PMC5320658. Epub 2017/02/23. eng.
8. Goorts B, van Nijnatten TJ, de Munck L, Moosdorff M, Heuts EM, de Boer M, et al. Clinical tumor stage is the most important predictor of pathological complete response rate after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 2017 May;163(1):83-91. PubMed PMID: 28205044. Pubmed Central PMCID: PMC5387027. Epub 2017/02/17. eng.
9. Zhang Y, Chen F, Chandrashekar DS, Varambally S, Creighton CJ. Proteogenomic characterization of 2002 human cancers reveals pan-cancer molecular subtypes and associated

pathways. Nature communications. 2022 May 13;13(1):2669. PubMed PMID: 35562349. Pubmed Central PMCID: 9106650.

10. Dafni U, Tsourti Z, Alatsathianos I. Breast Cancer Statistics in the European Union: Incidence and Survival across European Countries. Breast care (Basel, Switzerland). 2019 Dec;14(6):344-53. PubMed PMID: 31933579. Pubmed Central PMCID: PMC6940474. Epub 2020/01/15. eng.

11. A. T. Pilot Study on the incidence of breast cancer among the population of the North East region of Bulgaria. J of IMAB. 2021 Jul-Sep;27(3):3868-3872.

12. Chakalova G, Dimitrova N, Gavrilov I, Valerianova Z. Cancer burden of breast and gynecological cancers in Bulgaria: epidemiology and clinical aspects. Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology. 2013 Oct-Dec;18(4):1038-44. PubMed PMID: 24344035.

13. Sardanelli F, Aase HS, Alvarez M, Azavedo E, Baarslag HJ, Balleyguier C, et al. Position paper on screening for breast cancer by the European Society of Breast Imaging (EUSOBI) and 30 national breast radiology bodies from Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Israel, Lithuania, Moldova, The Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Serbia, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland and Turkey. European radiology. 2017 Jul;27(7):2737-43. PubMed PMID: 27807699. Pubmed Central PMCID: 5486792.

14. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. Lancet. 2009 Apr 25;373(9673):1463-79. PubMed PMID: 19394537.

15. Admoun C, Mayrovitz HN. The Etiology of Breast Cancer. In: Mayrovitz HN, editor. Breast cancer. Brisbane (AU)2022.

16. Loi S. The ESMO clinical practise guidelines for early breast cancer: diagnosis, treatment and follow-up: on the winding road to personalized medicine. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2019 Aug 1;30(8):1183-4. PubMed PMID: 31287498.

17. George Baitchev II, Ivan Inkov, Emilia Zlateva, Zdravko Kamenov, George Dimitrov. BREAST DENSITY EVALUATION: A COMPARISON BETWEEN ASSESSMENT BY A RADIOLOGIST AND THE COMPUTER-ASSISTED THRESHOLD TECHNIQUE. Int J Surg Med. 2015;1(2):48-52.

18. Taibe NS, Kord MA, Badawy MA, Shytaj IL, Elhefnawi MM. Progress, pitfalls, and path forward of drug repurposing for COVID-19 treatment. *Therapeutic advances in respiratory disease*. 2022 Jan-Dec;16:17534666221132736. PubMed PMID: 36282077. Pubmed Central PMCID: 9597285.
19. Schunemann HJ, Lerda D, Quinn C, Follmann M, Alonso-Coello P, Rossi PG, et al. Breast Cancer Screening and Diagnosis: A Synopsis of the European Breast Guidelines. *Annals of internal medicine*. 2020 Jan 7;172(1):46-56. PubMed PMID: 31766052.
20. Forbes C, Fayter D, de Kock S, Quek RG. A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of BRCA-mutated breast cancer. *Cancer management and research*. 2019;11:2321-37. PubMed PMID: 30962720. Pubmed Central PMCID: 6434912.
21. Sawaki M, Shien T, Iwata H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Japanese journal of clinical oncology*. 2019 Mar 1;49(3):228-31. PubMed PMID: 30541035.
22. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*. 2010 Nov 15;10(10):955-60. PubMed PMID: 21057215. Pubmed Central PMCID: 3047091.
23. Raica M, Jung I, Cimpean AM, Suciuc C, Muresan AM. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2009;50(1):5-13. PubMed PMID: 19221640.
24. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010 Apr 1;28(10):1684-91. PubMed PMID: 20194857.
25. Irigoyen MA, Garcia FV, Iturriagoitia AC, Beroiz BI, Martinez MS, Guillen Grima F. [Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*. 2011 May-Aug;34(2):219-33. PubMed PMID: 21904404. Subtipos moleculares del cancer de mama: implicaciones pronosticas y características clinicas e inmunohistoquimicas.
26. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and

short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2009 Apr;20(4):628-35. PubMed PMID: 19074747.

27. Korhonen T, Kuukasjarvi T, Huhtala H, Alarmo EL, Holli K, Kallioniemi A, et al. The impact of lobular and ductal breast cancer histology on the metastatic behavior and long term survival of breast cancer patients. *Breast*. 2013 Dec;22(6):1119-24. PubMed PMID: 23863867.

28. Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast cancer research : BCR*. 2009;11(5):209. PubMed PMID: 19818165. Pubmed Central PMCID: 2790844. Epub 2009/10/13. eng.

29. Haagensohn KK, Wu GS. The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer metastasis reviews*. 2010 Mar;29(1):143-9. PubMed PMID: 20111893. Pubmed Central PMCID: 4063276.

30. Munster PN, Marchion DC, Basso AD, Rosen N. Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer research*. 2002 Jun 1;62(11):3132-7. PubMed PMID: 12036925.

31. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer metastasis reviews*. 2003 Dec;22(4):395-403. PubMed PMID: 12884914. Epub 2003/07/30. eng.

32. Krueger JS, Keshamouni VG, Atanaskova N, Reddy KB. Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion. *Oncogene*. 2001 Jul 12;20(31):4209-18. PubMed PMID: 11464287. Epub 2001/07/21. eng.

33. Wu JY, Vlastos AT, Pelte MF, Caligo MA, Bianco A, Krause KH, et al. Aberrant expression of BARD1 in breast and ovarian cancers with poor prognosis. *International journal of cancer*. 2006 Mar 1;118(5):1215-26. PubMed PMID: 16152612.

34. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. PubMed PMID: 10963602.

35. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011 Nov 16;103(22):1656-64. PubMed PMID: 21960707. Pubmed Central PMCID: 3216967.
36. Zaha DC, Lazar E, Lazureanu C. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2010;51(1):85-9. PubMed PMID: 20191125.
37. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2011 Aug;22(8):1736-47. PubMed PMID: 21709140. Pubmed Central PMCID: 3144634.
38. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2002 Oct 17;347(16):1233-41. PubMed PMID: 12393820.
39. Swain SM, Miles D, Kim SB, Im YH, Im SA, Semiglazov V, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2020 Apr;21(4):519-30. PubMed PMID: 32171426.
40. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007 Mar;50(4):434-8. PubMed PMID: 17448018.
41. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004 Aug 15;10(16):5367-74. PubMed PMID: 15328174.
42. Popovska S, Ivanov I, Betova T, Yordanov Y. [Visceral metastases of triple negative breast cancers with contribution of cases and review of the literature]. *Akusherstvo i ginekologija*. 2014;53(6):52-6. PubMed PMID: 25993741.

43. Kozlowski J, Kozlowska A, Kocki J. Breast cancer metastasis - insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*. 2015;69:447-51. PubMed PMID: 25897105.
44. Puri V, Jain M, Thomas S. Stromal Expression of CD10 in Invasive Breast Carcinoma and Its Correlation with ER, PR, HER2-neu, and Ki67. *International journal of breast cancer*. 2011;2011:437957. PubMed PMID: 22295223. Pubmed Central PMCID: 3262576.
45. Jacquillat C, Weil M, Baillet F, Borel C, Auclerc G, de Maublanc MA, et al. Results of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the breast-conserving treatment of 250 patients with all stages of infiltrative breast cancer. *Cancer*. 1990 Jul 1;66(1):119-29. PubMed PMID: 2112976. Epub 1990/07/01. eng.
46. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2008 May;109(1):123-39. PubMed PMID: 17578664. Pubmed Central PMCID: 2443103.
47. Ross JS, Hatzis C, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *The oncologist*. 2008 May;13(5):477-93. PubMed PMID: 18515733.
48. Dimitrov G, Baytchev G, Inkov I, Dimitrov D. The advancement and history of breast cancer surgical therapy at a glance. *International Journal of Surgery and Medicine*. 2017 04/01;Vol. 2:1.
49. Sedloev T, Gabrovski I, Usheva S, Kovacheva S, Spiridonova T, Spiridonov J, et al. [Firs Case Report of Intraoperative Radiotherapy (IORT) for Early Breast Cancer in Bulgaria]. *Khirurgiia*. 2016;82(1):40-4. PubMed PMID: 29383929.
50. Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, et al. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997 Jul;15(7):2483-93. PubMed PMID: 9215816. Epub 1997/07/01. eng.
51. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005 Feb 2;97(3):188-94. PubMed PMID: 15687361. Epub 2005/02/03. eng.

БИБЛИОГРАФИЯ

52. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008 Feb 10;26(5):778-85. PubMed PMID: 18258986. Epub 2008/02/09. eng.
53. Mieog JSD, van der Hage JA, van de Velde CJH. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *British Journal of Surgery*. 2007;94(10):1189-200.
54. Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials. *The Lancet Oncology*. 2018 Jan;19(1):27-39. PubMed PMID: 29242041. Pubmed Central PMCID: PMC5757427. Epub 2017/12/16. eng.
55. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast cancer research and treatment*. 2010 Nov;124(1):133-40. PubMed PMID: 20697801. Epub 2010/08/11. eng.
56. Wang B, Jiang T, Huang M, Wang J, Chu Y, Zhong L, et al. Evaluation of the response of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy by combined contrast-enhanced ultrasonography and ultrasound elastography. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019 May;17(5):3655-63. PubMed PMID: 30988749. Pubmed Central PMCID: 6447770.
57. Takahashi Y, Iwamoto T, Suzuki Y, Kajiwara Y, Hatono M, Tsukioki T, et al. Evaluation of Therapeutic Target Gene Expression Based on Residual Cancer Burden Classification After Neoadjuvant Chemotherapy for HER2-Negative Breast Cancer. *Clinical breast cancer*. 2019 Sep 9. PubMed PMID: 31570267.
58. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019;321(3):288-300.
59. Vekov T, Lebanova H, Grigorov E. Pharmacotherapeutic recommendations for application of target oncological drug therapies for treatment of breast cancer in Bulgaria - therapeutic efficacy and cost effectiveness. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2015 Nov-Dec;20(6):1420-5. PubMed PMID: 26854436.
60. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1).

European journal of cancer. 2009 Jan;45(2):228-47. PubMed PMID: 19097774. Epub 2008/12/23. eng.

61. Ezzat AA, Ibrahim EM, Ajarim DS, Rahal MM, Raja MA, Stuart RK, et al. High complete pathological response in locally advanced breast cancer using paclitaxel and cisplatin. Breast cancer research and treatment. 2000 Aug;62(3):237-44. PubMed PMID: 11072788. Epub 2000/11/10. eng.

62. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2020 Jun 15;26(12):2838-48. PubMed PMID: 32046998. Pubmed Central PMCID: PMC7299787. Epub 2020/02/13. eng.

63. Ju NR, Jeffe DB, Keune J, Aft R. Patient and tumor characteristics associated with breast cancer recurrence after complete pathological response to neoadjuvant chemotherapy. Breast cancer research and treatment. 2013 Jan;137(1):195-201. PubMed PMID: 23149464. Epub 2012/11/15. eng.

64. Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, Weaver D, Edgerton S, Cowan D, et al. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. The New England journal of medicine. 2007 Oct 11;357(15):1496-506. PubMed PMID: 17928597. Epub 2007/10/12. eng.

65. Kaufmann M, von Minckwitz G, Mamounas EP, Cameron D, Carey LA, Cristofanilli M, et al. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. Annals of surgical oncology. 2012 May;19(5):1508-16. PubMed PMID: 22193884. Epub 2011/12/24. eng.

66. Loibl S, O'Shaughnessy J, Untch M, Sikov WM, Rugo HS, McKee MD, et al. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrightNess): a randomised, phase 3 trial. The Lancet Oncology. 2018 Apr;19(4):497-509. PubMed PMID: 29501363. Epub 2018/03/05. eng.

67. Gong C, Yao H, Liu Q, Chen J, Shi J, Su F, et al. Markers of tumor-initiating cells predict chemoresistance in breast cancer. PloS one. 2010;5(12):e15630. PubMed PMID: 21187973. Pubmed Central PMCID: 3004932. Epub 2010/12/29. eng.

68. Rao S, Zhen S, Roumiantsev S, McDonald LT, Yuan GC, Orkin SH. Differential roles of Sall4 isoforms in embryonic stem cell pluripotency. Molecular and cellular biology. 2010

Nov;30(22):5364-80. PubMed PMID: 20837710. Pubmed Central PMCID: 2976381. Epub 2010/09/15. eng.

69. Leake I. Cancer: Importance of oncofetal gene, SALL4, in a subset of hepatocellular carcinoma. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013 Jun 25. PubMed PMID: 23797869. Epub 2013/06/26. Eng.

70. Forghanifard MM, Moghbeli M, Raeisossadati R, Tavassoli A, Mallak AJ, Boroumand-Noughabi S, et al. Role of SALL4 in the progression and metastasis of colorectal cancer. *Journal of biomedical science*. 2013;20:6. PubMed PMID: 23363002. Pubmed Central PMCID: 3599462. Epub 2013/02/01. eng.

71. Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N. SALL4 is essential for cancer cell proliferation and is overexpressed at early clinical stages in breast cancer. *International journal of oncology*. 2011 Apr;38(4):933-9. PubMed PMID: 21274508. Epub 2011/01/29. eng.

72. Oikawa T, Kamiya A, Zeniya M, Chikada H, Hyuck AD, Yamazaki Y, et al. Sal-like protein 4 (SALL4), a stem cell biomarker in liver cancers. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1469-83. PubMed PMID: 23175232. Epub 2012/11/24. eng.

73. Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N. Overexpression of SALL4 in lung cancer and its importance in cell proliferation. *Oncology reports*. 2011 Oct;26(4):965-70. PubMed PMID: 21725617. Epub 2011/07/05. eng.

74. Chen YY, Li ZZ, Ye YY, Xu F, Niu RJ, Zhang HC, et al. Knockdown of SALL4 inhibits the proliferation and reverses the resistance of MCF-7/ADR cells to doxorubicin hydrochloride. *BMC molecular biology*. 2016 Mar 2;17:6. PubMed PMID: 26935744. Pubmed Central PMCID: PMC4776391. Epub 2016/03/05. eng.

75. Maguer-Satta V, Chapellier M, Delay E, Bachelard-Cascales E. CD10: a tool to crack the role of stem cells in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Dec 6;108(49):E1264; author reply E5. PubMed PMID: 22109559. Pubmed Central PMCID: 3241794. Epub 2011/11/24. eng.

76. Olah O, Majlat E, Koszo R, Vereb Z, Voros A. Predictive role of neostromal CD10 expression in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Pathology oncology research : POR*. 2022;28:1610598. PubMed PMID: 36685105. Pubmed Central PMCID: PMC9849231. Epub 2023/01/24. eng.

77. Bhalla A, Manjari M, Kahlon SK, Kumar P, Kalra N. Cytokeratin 5/6 expression in benign and malignant breast lesions. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2010 Oct-Dec;53(4):676-80. PubMed PMID: 21045391.
78. Zhu Y, Li K, Zhang J, Wang L, Sheng L, Yan L. The prognostic and predictive significance of cytokeratin 5/6 and epidermal growth factor receptor in metastatic triple-negative breast cancer treated with maintenance capecitabine. *Translational Cancer Research*. 2021;10(3):1193-203.
79. Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012 Nov;136(2):331-45. PubMed PMID: 23073759. Pubmed Central PMCID: PMC3832208. Epub 2012/10/18. eng.
80. Liu X, Adorno-Cruz V, Chang YF, Jia Y, Kawaguchi M, Dashzeveg NK, et al. EGFR inhibition blocks cancer stem cell clustering and lung metastasis of triple negative breast cancer. *Theranostics*. 2021;11(13):6632-43. PubMed PMID: 33995681. Pubmed Central PMCID: 8120216.
81. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell*. 2007 Nov;1(5):555-67. PubMed PMID: 18371393. Pubmed Central PMCID: 2423808. Epub 2008/03/29. eng.
82. Tang Y, Zhu L, Li Y, Ji J, Li J, Yuan F, et al. Overexpression of epithelial growth factor receptor (EGFR) predicts better response to neo-adjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of translational medicine*. 2012 Sep 19;10 Suppl 1(Suppl 1):S4. PubMed PMID: 23046633. Pubmed Central PMCID: PMC3445857. Epub 2012/10/25. eng.
83. Kraus JA, Beriwal S, Dabbs DJ, Ahrendt GM, McGuire KP, Johnson RR, et al. Predictors of pathologic complete response after standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast carcinoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2012 Jul;20(4):334-9. PubMed PMID: 22417856. Epub 2012/03/16. eng.
84. Chen MB, Zhu YQ, Xu JY, Wang LQ, Liu CY, Ji ZY, et al. Value of P53 status for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a meta-analysis. *PloS one*. 2012;7(6):e39655. PubMed PMID: 22768103. Pubmed Central PMCID: PMC3387248. Epub 2012/07/07. eng.

85. Van Bockstal MR, Noel F, Guiot Y, Duhoux FP, Mazzeo F, Van Marcke C, et al. Predictive markers for pathological complete response after neo-adjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Annals of diagnostic pathology*. 2020 Dec;49:151634. PubMed PMID: 32987254. Epub 2020/09/29. eng.
86. Bae SY, Lee JH, Bae JW, Jung SP. Differences in prognosis by p53 expression after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Annals of surgical treatment and research*. 2020 Jun;98(6):291-8. PubMed PMID: 32528908. Pubmed Central PMCID: PMC7263888. Epub 2020/06/13. eng.
87. Ademuyiwa FO, Chen I, Luo J, Rimawi MF, Hagemann IS, Fisk B, et al. Immunogenomic profiling and pathological response results from a clinical trial of docetaxel and carboplatin in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2021 Aug;189(1):187-202. PubMed PMID: 34173924. Pubmed Central PMCID: PMC8443324. Epub 2021/06/27. eng.
88. Kim T, Han W, Kim MK, Lee JW, Kim J, Ahn SK, et al. Predictive Significance of p53, Ki-67, and Bcl-2 Expression for Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy for Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of breast cancer*. 2015 Mar;18(1):16-21. PubMed PMID: 25834606. Pubmed Central PMCID: PMC4381118. Epub 2015/04/04. eng.
89. Sakuma K, Kurosumi M, Oba H, Kobayashi Y, Takei H, Inoue K, et al. Pathological tumor response to neoadjuvant chemotherapy using anthracycline and taxanes in patients with triple-negative breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2011 Mar;2(2):257-64. PubMed PMID: 22977494. Pubmed Central PMCID: PMC3440659. Epub 2011/03/01. eng.
90. Marvalim C, Datta A, Lee SC. Role of p53 in breast cancer progression: An insight into p53 targeted therapy. *Theranostics*. 2023;13(4):1421-42. PubMed PMID: 36923534. Pubmed Central PMCID: PMC10008729. Epub 2023/03/17. eng.
91. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv*. 2018;472:697-703.
92. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001 Sep 15;19(18):3817-27. PubMed PMID: 11559719. Epub 2001/09/18. eng.

93. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi B, et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*. 2017 Aug;19(8):649-58. PubMed PMID: 28732212. Pubmed Central PMCID: 5516091.
94. Freitas AJA, Causin RL, Varuzza MB, Hidalgo Filho CMT, Silva VDD, Souza CP, et al. Molecular Biomarkers Predict Pathological Complete Response of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients: Review. *Cancers*. 2021 Oct 31;13(21). PubMed PMID: 34771640. Pubmed Central PMCID: 8582511.
95. Omair A, Alkushi A, Alamri G, Almojel T, Alsadun S, Masuadi E, et al. Assessing the Correlation of Rate of Pathological Complete Response and Outcome in Post Neoadjuvant Chemotherapy Setting and Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Cureus*. 2023 Apr;15(4):e37449. PubMed PMID: 37181967. Pubmed Central PMCID: 10174711.
96. Zhu J, Jiao D, Guo X, Qiao J, Ma Y, Zhang J, et al. Predictive factors and prognostic value of pathologic complete response of ipsilateral supraclavicular lymph nodes in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Annals of translational medicine*. 2019 Nov;7(22):666. PubMed PMID: 31930067. Pubmed Central PMCID: 6944579.
97. Bonnefoi H, Litière S, Piccart M, MacGrogan G, Fumoleau P, Brain E, et al. Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy is an independent predictive factor irrespective of simplified breast cancer intrinsic subtypes: a landmark and two-step approach analyses from the EORTC 10994/BIG 1-00 phase III trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014 Jun;25(6):1128-36. PubMed PMID: 24618153. Pubmed Central PMCID: PMC4037859. Epub 2014/03/13. eng.
98. van Mackelenbergh MT, Loibl S, Untch M, Buyse M, Geyer CE, Jr., Gianni L, et al. Pathologic Complete Response and Individual Patient Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy Plus Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Therapy of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Early Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2023 Jun 1;41(16):2998-3008. PubMed PMID: 37075276. Epub 2023/04/19. eng.
99. Shan BJ, Shen XB, Jin W, Dong MH, Han XH, Lin L, et al. Standard-dose epirubicin increases the pathological complete response rate in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a multicenter retrospective study. *Gland surgery*. 2020 Aug;9(4):1026-35. PubMed PMID: 32953611. Pubmed Central PMCID: 7475373.

100. Pu S, Wang K, Liu Y, Liao X, Chen H, He J, et al. Nomogram-derived prediction of pathologic complete response (pCR) in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy (NCT). *BMC cancer*. 2020 2020/11/19;20(1):1120.
101. Han Y, Wang J, Xu B. Novel biomarkers and prediction model for the pathological complete response to neoadjuvant treatment of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer*. 2021;12(3):936-45. PubMed PMID: 33403050. Pubmed Central PMCID: 7778555.
102. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, et al. Clinical Course of Breast Cancer Patients With Complete Pathologic Primary Tumor and Axillary Lymph Node Response to Doxorubicin-Based Neoadjuvant Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 1999;17(2):460-. PubMed PMID: 10080586.
103. Chou HH, Kuo WL, Yu CC, Tsai HP, Shen SC, Chu CH, et al. Impact of age on pathological complete response and locoregional recurrence in locally advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Biomedical journal*. 2019 Feb;42(1):66-74. PubMed PMID: 30987708. Pubmed Central PMCID: PMC6468039. Epub 2019/04/17. eng.
104. Jones RL, Lakhani SR, Ring AE, Ashley S, Walsh G, Smith IE. Pathological complete response and residual DCIS following neoadjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *British journal of cancer*. 2006 Feb 13;94(3):358-62. PubMed PMID: 16421590. Pubmed Central PMCID: 2361141. Epub 2006/01/20. eng.
105. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Locally advanced breast cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*. 1999 Apr;13(2):457-72, vii. PubMed PMID: 10363140. Epub 1999/06/11. eng.
106. Kole AJ, Park HS, Johnson SB, Kelly JR, Moran MS, Patel AA. Overall survival is improved when DCIS accompanies invasive breast cancer. *Scientific reports*. 2019 2019/07/09;9(1):9934.
107. Pu RT, Schott AF, Sturtz DE, Griffith KA, Kleer CG. Pathologic features of breast cancer associated with complete response to neoadjuvant chemotherapy: importance of tumor necrosis. *The American journal of surgical pathology*. 2005 Mar;29(3):354-8. PubMed PMID: 15725804. Epub 2005/02/24. eng.
108. Mokbel K. Treatment of ductal carcinoma in situ of the breast: review of recent advances and future prospects. *International journal of fertility and women's medicine*. 2003 Sep-Oct;48(5):217-25. PubMed PMID: 14626378. Epub 2003/11/25. eng.

109. Krishnan R, Cleary EG. Elastin gene expression in elastotic human breast cancers and epithelial cell lines. *Cancer research*. 1990;50(7):2164-71.
110. Chen Y, Klingen TA, Wik E, Aas H, Vigeland E, Liestøl K, et al. Breast cancer stromal elastosis is associated with mammography screening detection, low Ki67 expression and favourable prognosis in a population-based study. *Diagnostic pathology*. 2014;9(1):1-8.
111. Rasmussen BB, Pedersen BV, Thorpe SM, Rose C. Elastosis in relation to prognosis in primary breast carcinoma. *Cancer research*. 1985;45(3):1428-30.
112. Ring AE, Smith IE, Ashley S, Fulford LG, Lakhani SR. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *British journal of cancer*. 2004 2004/12/01;91(12):2012-7.
113. Omranipour R, Jalili R, Yazdankhahkenary A, Assarian A, Mirzania M, Eslami B. Evaluation of Pathologic Complete Response (pCR) to Neoadjuvant Chemotherapy in Iranian Breast Cancer Patients with Estrogen Receptor Positive and HER2 Negative and impact of predicting variables on pCR. *European journal of breast health*. 2020 Jul;16(3):213-8. PubMed PMID: 32656523. Pubmed Central PMCID: PMC7337920. Epub 2020/07/14. eng.
114. Tang L, Shu X, Tu G. Exploring the influencing factors of the pathologic complete response in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study. *World Journal of Surgical Oncology*. 2022 2022/01/29;20(1):27.
115. Haque W, Verma V, Hatch S, Suzanne Klimberg V, Brian Butler E, Teh BS. Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast cancer research and treatment*. 2018;170:559-67.
116. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P, et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019 Oct 1;30(10):1541-57. PubMed PMID: 31373601. Epub 2019/08/03. eng.
117. Lee Y-H, Sun Y, Gerweck LE, Glickman RD. Regulation of DNA Damage Response by Estrogen Receptor β -Mediated Inhibition of Breast Cancer Associated Gene 2. *Biomedicines*. 2015;3(2):182-200. PubMed PMID: doi:10.3390/biomedicines3020182.

118. Bratton MR, Duong BN, Elliott S, Weldon CB, Beckman BS, McLachlan JA, et al. Regulation of ERalpha-mediated transcription of Bcl-2 by PI3K-AKT crosstalk: implications for breast cancer cell survival. *International journal of oncology*. 2010 Sep;37(3):541-50. PubMed PMID: 20664923. Pubmed Central PMCID: 3613138.
119. Whitworth PW, Beitsch PD, Pellicane JV, Baron PL, Lee LA, Dul CL, et al. Distinct Neoadjuvant Chemotherapy Response and 5-Year Outcome in Patients With Estrogen Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Breast Tumors That Reclassify as Basal-Type by the 80-Gene Signature. *JCO precision oncology*. 2022 (6):e2100463.
120. Osako T, Nishimura R, Okumura Y, Toyozumi Y, Arima N. Predictive significance of the proportion of ER-positive or PgR-positive tumor cells in response to neoadjuvant chemotherapy for operable HER2-negative breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012 Jan;3(1):66-71. PubMed PMID: 22969846. Pubmed Central PMCID: 3438790. Epub 2012/09/13. Eng.
121. Simone G, Paradiso A, Cirillo R, Mangia A, Rella G, Wiesel S, et al. [Receptor status (ER and PgR) determined with histochemical and biochemical methods in breast carcinoma]. *Pathologica*. 1991 Jul-Aug;83(1086):449-59. PubMed PMID: 1724316. Epub 1991/07/01. Assetto recettoriale (ER e PgR) determinato con metodo immunoistochimico e biochimico nel carcinoma mammario. ita.
122. Rodler E, Korde L, Gralow J. Current treatment options in triple negative breast cancer. *Breast disease*. 2010;32(1-2):99-122. PubMed PMID: 21778572. Epub 2011/07/23. eng.
123. Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirot B, Porcher R, et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *The Breast*. 2013 2013/08/01;22:S27-S9.
124. Darb-Esfahani S, Denkert C, Stenzinger A, Salat C, Sinn B, Schem C, et al. Role of P53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(42).
125. Sumitomo M, Shen R, Nanus DM. Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochimica et biophysica acta*. 2005 Aug 1;1751(1):52-9. PubMed PMID: 16054017. Epub 2005/08/02. eng.

126. Dong C, Wu J, Chen Y, Nie J, Chen C. Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in pharmacology*. 2021;12:628690. PubMed PMID: 33790792. Pubmed Central PMCID: PMC8005514. Epub 2021/04/02. eng.
127. Liu R, Chen Y, Liu G, Li C, Song Y, Cao Z, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death & Disease*. 2020 2020/09/24;11(9):797.
128. Stern HM, Gardner H, Burzykowski T, Elatre W, O'Brien C, Lackner MR, et al. PTEN Loss Is Associated with Worse Outcome in HER2-Amplified Breast Cancer Patients but Is Not Associated with Trastuzumab Resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015 May 1;21(9):2065-74. PubMed PMID: 25649019. Pubmed Central PMCID: PMC4417419. Epub 2015/02/05. eng.
129. Gencheva R, Petrova M, Krалева P, Hadjidekova S, Radanova M, Conev N, et al. Prevalence and prognosis of PIK3CA mutations in Bulgarian patients with metastatic breast cancer receiving endocrine therapy in first-line setting. *Cancer Reports*. 2024;7(2):e1966.
130. Vo TN, Mekata E, Umeda T, Abe H, Kawai Y, Mori T, et al. Prognostic impact of CD10 expression in clinical outcome of invasive breast carcinoma. *Breast cancer*. 2015 Mar;22(2):117-28. PubMed PMID: 23575921.
131. Subitha Kandamuthan RT. Role of CD10 as a Prognostic Marker in Invasive Breast Carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2022 September 6 2023;16(3):EC01-EC4. Epub March 1,2022. English.
132. Nogi H, Kobayashi T, Suzuki M, Tabei I, Kawase K, Toriumi Y, et al. EGFR as paradoxical predictor of chemosensitivity and outcome among triple-negative breast cancer. *Oncology reports*. 2009 Feb;21(2):413-7. PubMed PMID: 19148516. Epub 2009/01/17. eng.
133. Burness ML, Grushko TA, Olopade OI. Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2010 Jan-Feb;16(1):23-32. PubMed PMID: 20164687. Epub 2010/02/19. eng.
134. Wang Z, Liu L, Li Y, Song Za, Jing Y, Fan Z, et al. Analysis of CK5/6 and EGFR and Its Effect on Prognosis of Triple Negative Breast Cancer. *Frontiers in oncology*. 2021 2021-January-20;10. English.

135. Boustan A, Mosaffa F, Jahangiri R, Heidarian-Miri H, Dahmardeh-Ghalehno A, Jamialahmadi K. Role of SALL4 and Nodal in the prognosis and tamoxifen resistance of estrogen receptor-positive breast cancer. *Molecular biology research communications*. 2021 Sep;10(3):109-19. PubMed PMID: 34476264. Pubmed Central PMCID: PMC8340312. Epub 2021/09/04. eng.
136. Liu C, Yao F, Mao X, Li W, Chen H. Effect of SALL4 on the Proliferation, Invasion and Apoptosis of Breast Cancer Cells. *Technology in cancer research & treatment*. 2020 Jan-Dec;19:1533033820980074. PubMed PMID: 33308020. Pubmed Central PMCID: PMC7739211. Epub 2020/12/15. eng.
137. Masood S. Breast Cancer Subtypes: Morphologic and Biologic Characterization. *Women's Health*. 2016;12(1):103-19.
138. Schulmeyer CE, Fasching PA, Häberle L, Meyer J, Schneider M, Wachter D, et al. Expression of the Immunohistochemical Markers CK5, CD117, and EGFR in Molecular Subtypes of Breast Cancer Correlated with Prognosis. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2023 Jan 19;13(3). PubMed PMID: 36766486. Pubmed Central PMCID: PMC9914743. Epub 2023/02/12. eng.
139. Kabos P, Haughian JM, Wang X, Dye WW, Finlayson C, Elias A, et al. Cytokeratin 5 positive cells represent a steroid receptor negative and therapy resistant subpopulation in luminal breast cancers. *Breast cancer research and treatment*. 2011 Jul;128(1):45-55. PubMed PMID: 20665103. Pubmed Central PMCID: PMC3851293. Epub 2010/07/29. eng.
140. Dodova RI, Mitkova AV, Dacheva DR, Hadjo LB, Vlahova AI, Hadjieva MST, et al. Spectrum and frequencies of BRCA1/2 mutations in Bulgarian high risk breast cancer patients. *BMC cancer*. 2015 Jul 17;15:523. PubMed PMID: 26183948. Pubmed Central PMCID: PMC4504066. Epub 2015/07/18. eng.
141. Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Bégin LR, et al. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer research*. 2004 Feb 1;64(3):830-5. PubMed PMID: 14871808. Epub 2004/02/12. eng.
142. Shanmugalingam A, Hitos K, Hegde S, Al-Mashat A, Pathmanathan N, Edirimmane S, et al. Concordance between core needle biopsy and surgical excision for breast cancer tumor grade and biomarkers. *Breast cancer research and treatment*. 2022 2022/05/01;193(1):151-9.

143. Ding Y, Ding K, Yang H, He X, Mo W, Ding X. Does dose-dense neoadjuvant chemotherapy have clinically significant prognostic value in breast cancer?: A meta-analysis of 3,724 patients. *PloS one*. 2020;15(5):e0234058. PubMed PMID: 32470093. Pubmed Central PMCID: PMC7259732. Epub 2020/05/30. eng.
144. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials. *Lancet*. 2019 Apr 6;393(10179):1440-52. PubMed PMID: 30739743. Pubmed Central PMCID: 6451189.
145. Jung J-J, Kim S-Y, Koh J, Cheun J-H, Kim MK, Ryu JM, et al. Omission of breast surgery for predicted pCR patients with MRI and vacuum-assisted biopsy in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy: A multicenter, single-arm, non-inferiority trial (OPTIMIST trial). *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(16_suppl):TPS627-TPS.
146. Boughey JC, Alvarado MD, Lancaster RB, Fraser Symmans W, Mukhtar R, Wong JM, et al. Surgical Standards for Management of the Axilla in Breast Cancer Clinical Trials with Pathological Complete Response Endpoint. *NPJ breast cancer*. 2018;4:26. PubMed PMID: 30131975. Pubmed Central PMCID: 6098077.
147. Yap YS. Outcomes in breast cancer-does ethnicity matter? *ESMO open*. 2023 Jun;8(3):101564. PubMed PMID: 37290358. Pubmed Central PMCID: PMC10265619. Epub 2023/06/09. eng.

11 ПРИЛОЖЕНИЯ

Patient	Age	Grade	Necrosis (core)	Elastosis (core)	DCIS (core)	ER (>1% of cells)	PR (>1% of cells)	HER2	CK5	CD10	EGFR	p53	Stage	Response	Core Blospy No	Type
2	64	3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	IIa	SD	cs13-878	IDC
3	36	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	SD	cs13-79	IDC
9	63	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	IIa	SD	CS12-8785	IDC
18	64	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	IIb	SD	cs12-4774	IDC
21	46	2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	IIb	SD	cs12-3698	IDC
26	67	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	SD	cs12-13291	IDC
34	40	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	SD	CS11-8591	IDC
36	49	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	SD	CS11-6276	IDC
41	65	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	SD	cs11-4082	IDC
49	47	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	SD	cs11-1265	IDC
58	66	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IIa	SD	CS10-923	IDC
60	65	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IIb	SD	CS10-8232	IDC
64	28	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	SD	CS10-4587	IDC
65	27	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	SD	CS10-4177	IDC
70	44	3	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	IIb	SD	CS10-1632	IDC
71	70	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	SD	CS10-13584	IDC
75	81	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	SD	cs09-9403	IDC
93	73	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	SD	CS08-15095	IDC
28	53	2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	IIb	SD	cs12-12857	IDC
33	58	2	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	IIa	SD	cs11-9830	IDC
46	52	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	IIa	SD	cs11-2438	IDC
69	45	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	SD	CS10-23694	IDC
90	48	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	SD	CS08-23944	IDC
1	57	3	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	IIb	CR	CS13-385	IDC
4	39	3	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	IIa	CR	CS13-479	IDC
6	51	3	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	IIb	CR	CS12-9140	IDC
7	33	2	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	IIa	CR	CS12-9051	IDC
8	51	3	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	IIb	CR	CS12-8877	IDC
15	52	3	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	IIa	CR	CS12-5742	IDC
17	67	2	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	IIb	CR	cs12-5373	IDC
20	44	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	IIa	CR	CS12-3974	IDC
24	69	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	IIb	CR	cs12-23580	IDC
25	55	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	IIb	CR	CS12-1577	IDC
30	66	2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	IIa	CR	CS12-1140	IDC
32	64	3	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	IIb	CR	CS12-10101	IDC
37	61	3	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	IIa	CR	CS11-6202	IDC
39	52	3	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	IIb	CR	CS11-438	IDC
47	46	2	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	IIa	CR	CS11-23994	IDC
48	70	3	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	IIb	CR	CS11-22478	IDC
51	48	2	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	IIa	CR	CS11-12121	IDC
66	45	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	IIb	CR	CS10-3674	IDC
72	40	3	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	IIb	CR	CS10-11602	IDC
74	41	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	IIb	CR	CS09-9532	IDC
77	42	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	IIb	CR	CS09-7932	IDC
78	31	2	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	IIb	CR	CS09-6041	IDC
80	61	3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	IIb	CR	cs09-51690	IDC
84	55	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	IIa	CR	CS09-1767	IDC
87	54	3	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	IIb	CR	CS09-11345	IDC
91	68	3	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	IIb	CR	cs08-22860	IDC
92	47	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	IIb	CR	CS08-23934	IDC
94	60	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	IIb	CR	cs05-5645	IDC
98	72	3	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	IIa	CR	CS05-18408	IDC
5	32	3	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	IIb	PR	CS12-9643	IDC
10	58	3	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	IIa	PR	CS12-7830	IDC
11	38	3	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	IIb	PR	CS12-7562	IDC
12	73	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	PR	cs12-7055	IDC
13	51	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	PR	CS12-6763	IDC
14	50	3	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	IIa	PR	CS12-6642	IDC
16	64	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	PR	cs12-5683	IDC
19	62	3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	IIa	PR	CS12-4326	IDC
22	47	3	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	IIa	PR	CS12-2692	IDC
23	53	3	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	IIa	PR	CS12-2627	IDC
27	38	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	IIa	PR	CS12-1291	IDC
29	40	3	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	IIb	PR	cs12-1196	IDC
31	51	3	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	IIb	PR	CS12-10560	IDC
38	42	3	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	PR	CS11-5731	IDC
42	56	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	IIa	PR	cs11-393	IDC
43	67	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	IIa	PR	CS11-3781	IDC
45	57	3	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	IIa	PR	cs11-2552	IDC
50	54	2	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	IIb	PR	CS11-12531	IDC
52	37	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	IIa	PR	CS11-1189	IDC
53	37	3	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	IIb	PR	cs11-11696	IDC
54	38	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	IIa	PR	CS11-11189	IDC
57	47	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	PR	CS10-9790	IDC
59	46	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	PR	CS10-920	IDC
62	35	3	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	IIb	PR	cs10-6968	IDC
63	34	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	IIa	PR	cs10-6796	IDC
67	61	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	IIb	PR	cs10-3296	IDC
68	26	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	PR	CS10-2899	IDC
73	60	3	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	IIa	PR	CS10-10804	IDC
79	50	2	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	IIb	PR	CS09-55145	IDC
81	47	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	PR	CS09-26196	IDC
82	24	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	PR	CS09-2089	IDC
83	63	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	PR	CS09-19575	IDC
85	55	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	IIb	PR	cs09-12778	IDC
86	60	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	PR	cs09-11568	IDC
88	58	3	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	IIa	PR	CS09-10209	IDC
89	60	3	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	IIb	PR	cs08-5222	IDC
95	48	2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	IIb	PR	CS06-4045	IDC
96	56	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	IIa	PR	cs06-11887	IDC
99	48	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	IIa	PR	CS05-15196	IDC
100	65	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIb	PR	CS05-11875	IDC
101	62	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	IIa	PR	cs05-10510	IDC
35	58	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	IIb	PD	cs11-7414	IDC
40	60	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	IIa	PD	cs11-4366	IDC
44	60	3	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	IIb	PD	CS11-2895	IDC
55	35	3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	IIa	PD	CS11-1118	IDC
56	37	3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	IIb	PD	CS11-11017	IDC
61	55	3	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	IIa	PD	CS10-7964	IDC
97	57	3	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	IIb	PD	CS05-9000	IDC

Приложение 1. Част от суровите данни за 100-те случая от Англия и свързаните с тях молекулярни и хистопатологични характеристики, използвани в статистическия анализ. Всичките 100 основни тъканни блока на пациента бяха избрани от архива на болницата Черинг Крос, Лондон. Значимостта на експресията на ER и PR беше оценена с помощта на резултата на Allred. Експресията на HER2 беше оценена полуколичествено; -/+ и ++ се считат за отрицателни, а +++ за положителни. По отношение на хистологичния параметър (некроза, еластоза и/или наличие на DCIS в основната биопсия), присъствието е представено като 1, а отсъствието като 0. IXX откриването (ER, PR, HER2, CK5, CD10, EGFR и p53) е представено както следва; 1 положителен за маркера, 0 отрицателен за маркера. ППО, пълен патологичен отговор.

pin	sex	mkb	ime_mkb	diag_date	ime_dokazva ne	histol	ime_histol	histol_date	ime_grade	stadii	ime_her2	ime_estroge n	ime_progester on
09120171492	ж	C501	ЦЕНТРАЛНА ЧАСТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	07.03.2017	Хистология на пръвичен тумор	81403	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	07.03.2017	Слабо диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120172966	ж	C508	ЛЕВЯ, ИЗВНАША ИВЪН ГРАНИЦИТЕ НА ОТДЕЛНИТЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	01.05.2020	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	01.05.2020	Умерено диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120180087	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	23.11.2016	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	23.11.2016	Умерено диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120161273	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	01.12.2015	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	01.12.2015	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120161710	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	26.04.2016	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	26.04.2016	Умерено диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120180956	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	18.10.2017	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	18.10.2017	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120121259	ж	C509	МЛЕЧНА ЖЕЛЕЗА, НЕУТОЧНЕНА ЧАСТ	01.09.2020	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	01.09.2020	Няма, не е е приложим	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120121296	ж	C509	МЛЕЧНА ЖЕЛЕЗА, НЕУТОЧНЕНА ЧАСТ	01.11.2020	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	01.11.2020	Слабо диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120179931	ж	C508	ЛЕВЯ, ИЗВНАША ИВЪН ГРАНИЦИТЕ НА ОТДЕЛНИТЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	18.09.2017	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	18.09.2017	Слабо диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
10120190024	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	02.04.2018	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	02.04.2018	Умерено диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
0911980425	ж	C509	МЛЕЧНА ЖЕЛЕЗА, НЕУТОЧНЕНА ЧАСТ	02.09.2019	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	21.05.2020	Слабо диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120156215	ж	C501	ЦЕНТРАЛНА ЧАСТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	15.10.2015	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	15.10.2015	Умерено диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120171266	ж	C508	ЛЕВЯ, ИЗВНАША ИВЪН ГРАНИЦИТЕ НА ОТДЕЛНИТЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	15.02.2017	Хистология на пръвичен тумор	85223	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	15.02.2017	Умерено диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120171259	ж	C508	ЛЕВЯ, ИЗВНАША ИВЪН ГРАНИЦИТЕ НА ОТДЕЛНИТЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	17.02.2017	Хистология на пръвичен тумор	85223	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	17.02.2017	Умерено диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
10320170013	ж	C501	ЦЕНТРАЛНА ЧАСТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	01.06.2016	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	01.06.2016	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120153509	ж	C509	МЛЕЧНА ЖЕЛЕЗА, НЕУТОЧНЕНА ЧАСТ	09.06.2015	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	09.06.2015	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120162172	ж	C509	МЛЕЧНА ЖЕЛЕЗА, НЕУТОЧНЕНА ЧАСТ	01.04.2016	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	01.04.2016	Умерено диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120163040	ж	C501	ЦЕНТРАЛНА ЧАСТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	06.06.2016	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	06.06.2016	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120211143	ж	C509	МЛЕЧНА ЖЕЛЕЗА, НЕУТОЧНЕНА ЧАСТ	02.04.2018	Хистология на пръвичен тумор	85223	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	02.04.2018	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
091201211247	ж	C509	МЛЕЧНА ЖЕЛЕЗА, НЕУТОЧНЕНА ЧАСТ	01.01.2019	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	01.01.2019	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120211207	ж	C503	ДОЛЕН ВЪТРЕШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	14.07.2020	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	14.07.2020	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120202026	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	20.09.2020	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	20.09.2020	Умерено диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120152112	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	13.02.2015	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	13.02.2015	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120171176	ж	C508	ЛЕВЯ, ИЗВНАША ИВЪН ГРАНИЦИТЕ НА ОТДЕЛНИТЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	09.03.2017	Хистология на пръвичен тумор	80703	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	09.03.2017	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120203040	ж	C509	МЛЕЧНА ЖЕЛЕЗА, НЕУТОЧНЕНА ЧАСТ	10.06.2020	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	10.06.2020	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120200049	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	19.08.2019	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	19.08.2019	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
09120200077	ж	C508	ЛЕВЯ, ИЗВНАША ИВЪН ГРАНИЦИТЕ НА ОТДЕЛНИТЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	18.05.2019	Хистология на пръвичен тумор	84013	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	18.05.2019	Умерено диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
02120210004	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	20.05.2020	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	20.05.2020	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
0911900352	ж	C509	МЛЕЧНА ЖЕЛЕЗА, НЕУТОЧНЕНА ЧАСТ	06.04.2017	Хистология на пръвичен тумор	80103	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	06.04.2017	Слабо диференциран	3b	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен
07320200001	ж	C504	ГОРЕН ВЪНШЕН КВАДРАНТ НА МЛЕЧНАТА ЖЕЛЕЗА	23.02.2021	Хистология на пръвичен тумор	85003	Имфитративен дуктален карцином (C50.)	23.02.2021	Слабо диференциран	3a	Отрицателен	Отрицателен	Отрицателен

Приложение 2. Суровите данни за 30-те случая от VG и свързаните с тях молекулярни и хистопатологични характеристики, използвани в статистическия анализ. Всичките 30 основни тъканни блока на пациента бяха избрани от архива на УМБАЛ „Царица Йоанна“, София.

БИОМАРКЕР	-ОТР	+ПОЛ	СЛУЧАИ С ПРОМЯНА	БЕЗ ПРОМЯНА	ОБЩО	ПРОЦЕНТ	P
ER	2	0	2	66	68	3%	NS
PR	8	0	8	60	68	12%	NS
HER2	1	2	3	65	68	4%	NS
CK5	4	7	11	57	68	16%	NS
CD10	4	6	10	58	68	15%	NS
EGFR	4	5	9	59	68	13%	NS
p53	3	2	5	63	68	7%	NS

Приложение 3. Промени в експресията, наблюдавани между сърцевината и ексцизионните биопсии, открити от ИХХ на Английската кохорта пациентки. В случай на ER, PR, HER2 CK5, CD10, EGFR и p53 бяха открити само минимални, статистически незначими (NS) промени както по отношение на отсъствието към присъствието на молекулата, така и обратното. Това показва, че молекулярните промени на тези маркери след НАХТ нямат статистически значима връзка с прогнозирането на ППО. Промяната към -отр показва, че след НАХТ експресията на молекулата е изчерпана. Промяната към +пол показва, че след НАХТ, молекулата е започнала да се експресира.

БИОМАРКЕРИ	ППО	ЛИПСА НА ППО	ОБЩО
CK5-,CD10-	10 (20%)	39 (80%)	49
CK5-,CD10-ER+	4 (10%)	34 (90%)	38
CK5-,CD10-HER2+	7 (39%)	11 (61%)	18
CK5-,CD10-ER+HER2+	4 (31%)	9 (69%)	13
CD10-,EGFR-	11 (23%)	37 (77%)	48
CD10-,EGFR-ER+	3 (8%)	34 (92%)	37
CD10-,EGFR-HER2+	7 (47%)	8 (53%)	15
CD10-,EGFR-ER+HER2+	3 (27%)	8 (72%)	11
CK5-EGFR-	10 (23%)	34 (77%)	44
CK5-EGFR-ER+	3 (9%)	32 (91%)	35
CK5-EGFR-HER2+	6 (46%)	7 (54%)	13
CK5-EGFR-ER+HER2+	3 (30%)	7 (70%)	10
EGFR-p53-	7 (17%)	34 (83%)	41
EGFR-p53-ER+	3 (9%)	32 (91%)	35
EGFR-p53-HER2+	6 (46%)	7 (54%)	13
EGFR-p53-ER+HER2+	3 (30%)	7 (70%)	10
CK5-, p53-	9 (21%)	34 (79%)	43
CK5-, p53-ER+	4 (11%)	31 (89%)	35
CK5-, p53-HER2+	6 (46%)	7 (54%)	13
CK5-, p53-ER+HER2+	4 (36%)	7 (64%)	11
CD10-, p53-	9 (17%)	38 (83%)	47
CD10-, p53-ER+	4 (11%)	31 (89%)	35
CD10-, p53-HER2+	7 (46%)	8 (54%)	15
CD10-, p53-ER+HER2+	4 (80%)	1 (20%)	5
CK5-EGFR-p53-	9 (22%)	32 (78%)	41
CK5-EGFR-p53-ER+	2 (6%)	30 (94%)	32
CK5-EGFR-p53-HER2+	5 (45%)	6 (55%)	11
CK5-EGFR-p53-ER+HER2+	2 (25%)	6 (75%)	8

Приложение 4. Комбинации и вариации на експресия на биомаркери в туморни проби и тяхната връзка с ППО.

12 БЛАГОДАРНОСТИ

Изготвянето на докторска дисертация е предизвикателство, което изисква усъвършенстване и овладяване на множество мултидисциплинарни умения както в рамките на медицината, така и извън нея. Щастливи са тези, които са придобили тези умения под вещото ръководство на ментори, учители, колеги лекари, учени и приятели. Аз съм сред тези късметлии и искам да посветя този труд на всички, които по какъвто и да е начин ми помогнаха да стигна до неговото успешно завършване и публикуване. Вашата подкрепа и насоки бяха безценни.

Изказвам сърдечни благодарности на:

- Проф. д-р Петранка Троянова, дм
- Доц. д-р Весела Иванова, дм
- Проф. д-р Сами Шушаџ, дм
- Проф. д-р Галина Куртева, дм
- Проф. д-р Радка Аргирова, дмн
- Проф. д-р Николай Цонев, дм
- Доц. д-р Желязко Арабаджиев, дм
- Доц. Д-р Трифон Вълков, дм
- Д-р Мариана Атанасова
- Д-р Радослав Мангалджиев
- Г-н Ивайло Гогов

Бих искал да изразя своята специална благодарност към моите скъпи родители, семейство и приятели. Без тяхната неизчерпаема подкрепа и вяра в мен през годините, тези успехи нямаше да бъдат възможни. Вашата любов и отдаденост бяха двигателят на всяка моя стъпка по този път.



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ

КАТЕДРА ПО НУКЛЕАРНА МЕДИЦИНА, ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ И МЕДИЦИНСКА
ОНКОЛОГИЯ

София, 2024г.