

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ХИРУРГИЯ

ДИПЛОМА

ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН

„ДОКТОР“

НА

Д-Р МАРИЕЛА БОРИСОВА ВАСИЛЕВА

НА ТЕМА

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

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ

ПРОФ. Д-Р ГЕОРГИ ТОДОРОВ Д.М.

2016

СОФИЯ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

СЗО – Световна Здравна Организация

AACR - American Association for Cancer Research

NCI – National Cancer Institute

Progress partnership - PROGnosis RESearch Strategy

VEGF- васкуларен ендотелен растежен фактор

TGF- β трансформация растежен фактор бета

PDGF - тромбоцитен растежен фактор

IGF1 - инсулиноподобен растежен фактор

SNP - single nucleotide polymorphism, единични нуклеотидни полиморфизми

TNM – Tumor- Node –Metastasis classification system

LNR – Lymph Node Ratio

FDA - U.S. Food and Drug Administration

QALYs - Quality-Adjusted Life-Years

MPO - Myeloperoxidase

LYZ - Lysozyme

CLCA2 - Calcium-activated chloride channel regulator 2

FBN1 - Fibrillin-1

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

HER2/neo ECD - HER2/neo extracellular domain

IPA - Ingenuity® Pathway Analysis

СЪДЪРЖАНИЕ

Въведение.....	4
Литературен обзор.....	7
Изводи от литературния обзор.....	32
Цел и задачи.....	33
Първа глава.....	34
Втора глава.....	46
Трета глава.....	73
Изследване на евентуалните прогностични фактори на околната среда.....	80
Изследване на прогностичните фактори свързани с човека.....	88
Изследване на прогностичните фактори свързани с тумора.....	102
Заключение.....	126
Изводи.....	131
Приноси.....	132
Приложения.....	133
Библиография.....	141
Публикации.....	165
Участия в конгреси.....	166

ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

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

1. Очаквано е повишаване на броя на новите случаи (както на инвазивен така и на и ин ситу карцином) с 50% до 2030г.
2. В отделните възрастови групи се очаква както следва: понижаване на новите случаи сред жените между 50 и 69 години с 50% и повишаване

броят на новите случаи в групата между 70-84 години, в която възраст карциномът на млечната жлеза е най-разпространен³, от 24% до 35%.

3. Различните тенденции във възрастовите групи се обясняват с нарастването на карциномите позитивни за естрогенен рецептор (които се срещат в по-късна възраст) и намаляване на хормон негативните и тройно негативните карциноми (характерни за по-ранната възраст).
4. Така през следващите няколко декади родените между 1946г. и 1964г. ще имат висок абсолютен риск за развитие на постменопаузален карцином на млечната жлеза, докато тези сега на възраст между 20 и малко над 30 години, ще имат сериозен риск от развитие на пременопаузален.⁴

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

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

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

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

Прогностичните фактори са използвани за определяне прогнозата на пациента в конкретен момент, но във времето тази прогноза може да се промени.

Това се дължи не само на природата на тумора или самото остаряване на пациента, а най-вече на взаимодействието на всички фактори свързани с тумора, пациента, лечението и околната среда, които променят прогнозата по начин, който не винаги може да се предскаже.

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

Настоящия дисертационен труд е съставен от 5 части. Първата част представлява **обзор** на развитието и съвременното разбиране на концепцията за прогностичните фактори. Обзора е последван от три глави, разглеждащи различни аспекти на прогностичните и предиктивни фактори.

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

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

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

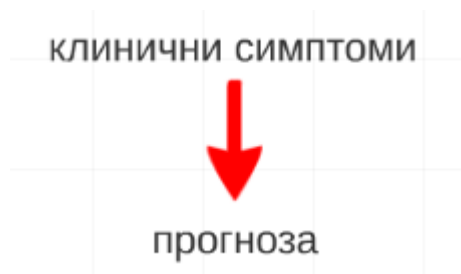
Последната част на настоящия труд е **заключение**, което обобщава получените резултати и представя мястото им в съвременното лечение и разбиране на карцинома на млечната жлеза. Описани са бъдещите насоки за развитие на изследванията и са представени приносите.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Еволюция на прогнозирането

Изкуството на медицината е изградено върху три основни елемента – диагноза, лечение и прогноза.^{6,7} Векове наред предсказването на изхода от едно заболяване, основавайки се на клинично изследване, е било част от медицината. Хипократовата школа е разпознавала комплексите от симптоми и знаци, които определят добрия или лошия изход за пациента. Според нея прогнозата се базира по-скоро върху отделните клиничните симптоми отколкото върху диагностицираното заболяване, просто, защото по това време заболяванията не са били разпознавани като комплекси от симптоми.⁸

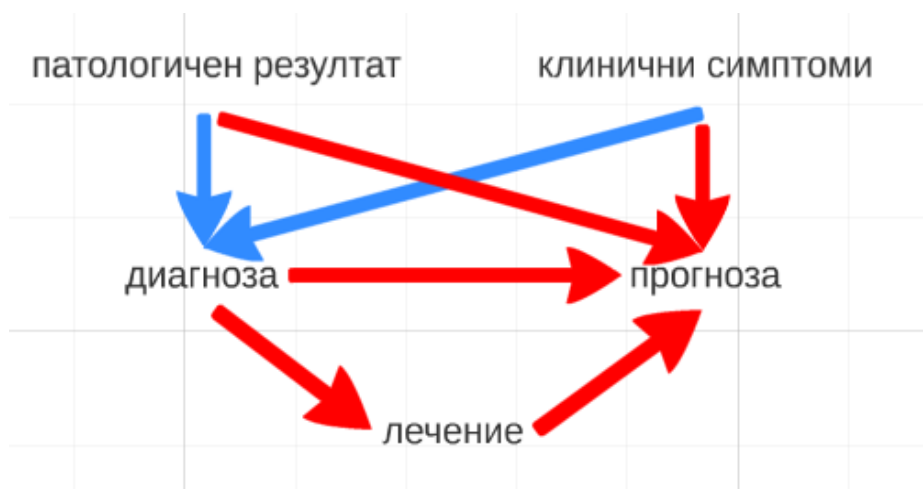
В своята книга „Прогноза при авансирания карцином“ Paul Glare и Nikolas Christakis представят три диаграми (фигура 1а,1б и 1в), които илюстрират как науката за прогнозирането еволюира през вековете.⁹



Фигура 1а. Прогнозата според Хипократовата школа⁴



Фигура1б. Прогнозата на заболяванията през 19 ти век⁴



Фигура 1в. Прогнозата в съвременната медицина⁴

За първи път в съвременната медицина диагнозата и лечението едновременно повлияват на прогнозата.

Една от причините определящи необходимостта от точното предсказване на преживяемостта на пациентите с онкологични заболявания е подобряването на процеса на взимане на решения, относно лечението. В миналото прогнозата е била основополагаща за взимането на решения в терминалните стадии на заболяването, когато се решава какъв вид палиативни грижи да бъдат предложени на пациента.^{2,10} Сега от нея се ръководи също и адювантната терапия в ранните стадии на болестта.¹¹

Съществуват два различни подхода за предсказване на далечните резултати от заболяванията - външен и вътрешен. Според външния подход прогнозата се изгражда върху предходния опит в подобни ситуации (подобни заболявания); според вътрешния подход - върху предходния ход на заболяванията при конкретния пациент.¹²

Прогнозата може да е свързана с конкретно заболяване или конкретен пациент. Обединяването на последните води до създаването на **персонализираната медицина**. Традиционното разбиране за персонализираната медицина се основава на индивидуалните симптоми.¹³ Сегашното разбиране се основава на концепцията за "терапия с правилното лекарство, в правилната доза,

за правилния пациент”.¹⁴ Терминът персонализирана медицина се появява за първи път в самия край на миналия век¹⁵, но вече има много определения. Избрахме като най – подходящо определението дадено от W. Ken Redekop и Deirdre Mladsí през 2013. В техния обзор персонализираната медицина е дефинирана като **използването на комбинирано познание (генетично или друго) за човека, за предсказване на чувствителността на заболяването, прогнозата или отговорът към дадена терапия, и по този начин за подобряване здравето на индивида.**¹⁶

Медицината в наши дни се уповава на ръководства и стандарти, които подобряват преживяемостта.¹⁷ От друга страна всяка индивидуална характеристика на пациента може да бъде от решаващо значение за изхода от заболяването.¹⁸ Предизвикателството в прогнозирането на далечните резултати е свързването на отделният пациент с група пациенти със същото заболяване, като се има в предвид, че познанията, които прилагаме за отделния човек (частния случай), са първоначално изведени от познанията за общата група.¹

Дефиниране на прогнозата

В клиничната медицина термина **прогноза** се отнася до вероятността от бъдещ резултат при пациенти с дадено заболяване или състояние. Изследването на прогнозата представлява **проучване на връзката между бъдещия резултат (крайна точка) сред хора с даден здравен статус (начална точка), имащо за цел да подобри здравето.**¹⁹ Следователно резултатите за пациента могат да бъдат оценени според времето, за което той достига дадена крайна точка. Целта на лечението на онкологичните заболявания може да варира от: отстраняване на локалното проявление, отстраняване на установените далечни метастази, удължаване на преживяемостта, постигане на трайно оздравяване, или просто отлагане появата или отслабване на симптомите.¹ Постигането на тези цели се оценява според различното време за достигане на конкретна крайна точка като: общата преживяемост, заболяемостта свободна от заболяване, времето до прогрес на заболяването, времето свободно от локален или далечен рецидив. В проучване на крайните точки на изследванията върху карцинома на млечната жлеза направено в PubMed®, M. Moosdorff и съавтори откриват 23 различни изследвани крайни точки. Въпреки че много от тях не са добре дефинирани²⁰ това

е пример за разнородността на наличната информация, което е основа за разнородността на прогнозата, която може да бъде направена.

Прогностични фактори

Медицинският изследователски съвет на Великобритания създава Партньорството за Стратегия за Изследване на Прогнозата (PROGnosis RESearch Strategy - PROGRESS Partnership). Този проект е дефиниран като рамка за изследване на прогнозата в четири основни аспекта:

- (1) Фундаментално изследване на прогнозата - Развитието на дадено състояние, свързано със здравето в контекста на естественото му развитие и качеството на предложената грижа.¹⁹
- (2) Изследване на прогностичните фактори - Всяка величина, която сред хора с дадено здравно състояние, е свързана с даден далечен резултат.²¹
- (3) Изследване на прогностичните модели – Прилага прогностичните фактори в комбинация, за да предскаже изхода от заболяването при отделния пациент. Това изследване има три основни фази – разработване на модела, външно валидиране и изследване на неговата клинична значимост.²²
- (4) Стратифицирано изследване на медицината – разглежда пациенти със конкретно заболяване или състояние и разкрива онези от тях, които биха имали най-голяма клинична полза или най-малко вреда от дадено лечение.²³

Вторият от тези аспекти е свързан със специфични фактори (като например биомаркерите), свързани с прогнозата (изследване на прогностичните фактори). Прогностичният фактор се дефинира като **всяка величина, която сред хора с дадено здравно състояние (начална точка) е свързана с определен клиничен резултат (крайна точка)**.¹⁹ По този начин прогностичните фактори се явяват основни инструменти за създаване на прогнозата.

Според наръчника на Европейската Асоциация по Медицинска Онкология „Наръчник за диагностиката на рака и оценката от лечението“ публикуван през 2009²⁴, като прогностичен фактор или тест се определя **всяка величина налична в момента на диагнозата, свързана с времето свободно от заболяване, общата**

преживяемост и с естественото развитие на заболяването, в отсъствие на терапия. Той служи като фактор, който обяснява разнообразието свързано с очаквания курс и изход от заболяването. Прогностичните фактори трябва да се различават от предиктивните фактори, които представляват величини предсказващи отговора към дадена терапия.

Според рамката създадена от PROGRESS Partnership прогностичният фактор може да помогне за откриване на заболяването; може да подобри взимането на информирани клинични и терапевтични решения (директно или като част от прогностични модели за индивидуализирано предсказване на риска); може да подобри дизайна на интервенционалните проучвания; може да помогне за откриването на цели за интервенциите, променящи курса на заболяването. Ограниченията на съвременното изследване на прогностични фактори включват: разнородността в публикуването и докладването на факторите, лошата статистическа обработка на данните, неадекватно интерпретиране на първоначалните данни.²⁵

Съществува голямо разнообразие от възможни прогностични фактори, което ги прави трудни за определяне, доказване или класифициране в групи. Класифицирането им би помогнало за по доброто разбиране на факторите и откриването на нови такива.

Настоящия обзор разглежда съществуващите класификации на прогностичните фактори при карцинома на млечната жлеза.

Класификации на прогностичните фактори

Има няколко опита за класифициране на факторите свързани с преживяемостта при развитието на карцином, които могат да бъдат отнесени и към карцинома на млечната жлеза.

Класификация на прогностичните фактори основаваща се на предмета на действие

През 2003 Mary Gospodarowicz и Brian O'Sullivan⁶ в тяхно проучване разделят прогностичните фактори в три широки категории: свързани с тумора, свързани с пациента и свързани с околната среда. В тяхната класификация факторите на околната среда включват изборът, качеството и достъпа до лечение, здравната политика и достъпа до лекарство или технология, които могат да имат огромно влияние върху изхода от заболяването.

В допълнение към тази класификация, тъй като някои фактори са основни за взимането на решения в лечебния процес, докато други са по-малко свързани с него, те предлагат и групиране на факторите според тяхната връзка с ежедневната грижа за пациента. Основните прогностични фактори са едновременно прогностични и предиктивни, защото те дават информация, както за прогнозата на пациента, така и за отговорът му на дадена терапия (т.е. те биха могли да решат провеждането или не на дадена терапия, имайки в предвид очаквания отговор на пациента). Допълнителните фактори в тази класификация са с доказана прогностична стойност, но те не оказват влияние върху вида на терапията.

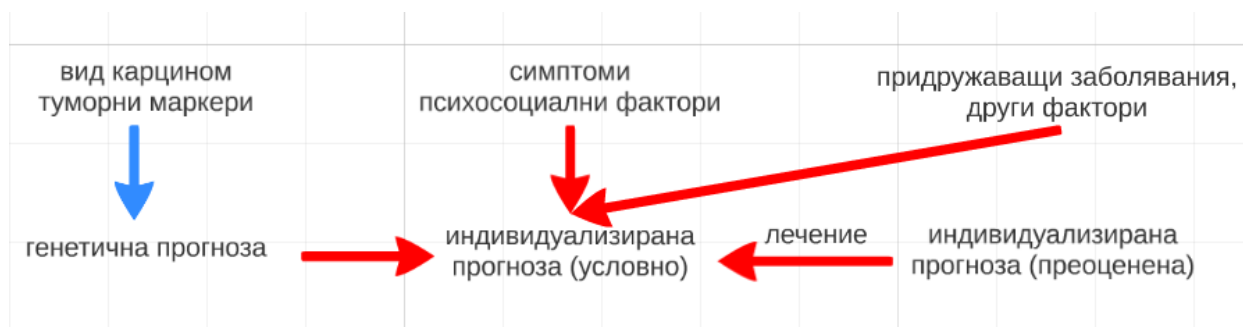
Класификация на прогностичните фактори според тяхната приложимост в ежедневната грижа за пациента.

Тази класификация съдържа „основни“, „допълнителни“ и „нови и обещаващи“ фактори. По времето на създаването на това разделение на факторите Ki 67 попада в категорията на нови и обещаващи фактори. Сега този биомаркер е разпознат като основен за взимането на решения при първичния карцином на млечната жлеза.²⁶

Таблица 1. Класификация на прогностичните фактори

Прогностичен фактор	Тумор	Пациент	Околна среда
Основен			
Допълнителен			
Нов и обещаващ			

Хипотетичен модел, разкриващ концепцията за прогнозирането в онкологията е предложен от Maskillor през 2001. Този модел показва потока на информация, който определя прогнозата в конкретен случай. Фигура 2 илюстрира как диагнозата, заедно с някои характеристики на първичния тумор определя основата на прогнозата на заболяването и така модифицира индивидуалната прогноза на пациента.



Фигура 2. Концептуален модел на прогнозирането при напредналите карциноми²²

В този модел факторите свързани с тумора (например първичната локализация, диференцираността и размера) определят по-общо прогнозата (синя стрелка). Други клинични фактори (например симптоми, придружаващи заболявания, психологически статус) са смятани, като определящи основната индивидуализирана прогноза (червена стрелка). Индивидуалната прогноза може в последствие да се модифицира според отговора към терапията.²⁷ От този модел е видно, че прогнозата може да се промени във времето и според различните терапевтични режими.

Прогностични фактори при ранния карцином и при авансирания и терминален карцином на млечната жлеза.

В своя обзор от 2005г.² Paul Glare още веднъж разделя прогностичните фактори на свързани с тумора, свързани с пациента и свързани с околната среда.

Неговото предложение за разпределението на факторите в групи е представено в таблица 2.

Таблица 2 Paul Glare класификация на прогностичните фактори според обекта

Свързани с тумора	Свързани с пациента	Свързани с околната среда
анатомично разпространение	възраст, пол и раса	социално положение и социален статус
диференцираност	генетични особености	географска локализация
обем на тумора	общо състояние	достъп до лечение
нива на туморните маркери	клинични симптоми	оценка на онколога
биология на тумора	психичен статус	отговор на терапията
време свободно от заболяване	придружаващи заболявания	прогнозата на онколога

В тази таблица като фактор на околната среда е предложена и самата прогноза дадена от онколога. По този начин прогнозата, дадена на пациента, може също да окаже влияние върху бъдещия резултат. Това е в тясна връзка с психичния статус на пациента, който е даден като фактор свързан с пациента. Ако разгледаме по-задълбочено психологическия статус на пациента, той зависи най-вероятно и от преживяемостта свободна от заболяване, което е дадено като фактор свързан с пациента. Това е само един пример за връзките, които съществуват между отделните фактори.

Paul Glare отбелязва някои важни разлики между факторите свързани с авансирания карцином и тези свързани с много авансирания или терминален карцином (таблица 3). Факторите свързани с тумора (например първичната локализация, размера, диференцираността, преживяемостта свободна от заболяване и мястото на метастазите) ясно определят преживяемостта при авансирания карцином. За пациентите с авансирал карцином факторите свързани с тумора се оказват по-малко важни от другите фактори и загубват своята значимост при мултивариантен анализ.

Таблица 3. Клинични прогностични фактори при пациенти с авансирал карцином според силата на доказателствата.

Сигурна корелация с преживяемостта при авансирал карцином	Клинична прогноза за преживяемостта, общ статус Симптоми и признаци на кахексия свързана с рака Други симптоми като делир и диспнея Някои биологични фактори като левкоцитоза, лимфоцитопения, С реактивен протеин
Корелация има но не е уточнена Има корелация в по ранните стадии на заболяването Резултатите са противоречиви	Туморни характеристики локализация на първичния тумор и на метастазите Характеристики на пациента : възраст пол. Социално положение Симптоми: болка, гадене Признаци: тахикардия, треска, протеинурия Други симптоми: анемия, хипоалбуминемия, нива на серумния калций, нива на серумния натрий, лактат дехидрогеназата и др. Придружаващи заболявания
Фактори с противоречиви индикации	Оценка на качеството на живот

Зависими от времето и независими от времето прогностични фактори

Предложение за нова класификация е направено от К. Altundag и съавтори през 2005г. Те предполагат, че размера на тумора, статуса на аксиларните лимфни възли и на HER-2 са фактори, които се променят с времето и трябва да се определят като зависими от времето; докато статуса на естрогенния рецептор и диференцираността на тумора не се променят с времето и следователно трябва да се отнасят към факторите независими от времето. Те предполагат, че тяхната хипотеза трябва да бъде верифицирана от проспективни и ретроспективни клинични проучвания.²⁸

В наши дни е вече доказано, че статусът на естрогенния рецептор може да се промени с прогресията на заболяването²⁹ и не може да бъде приеман като

независим от времето прогностичен фактор. Все пак съществуват фактори, като полът на пациента или расата, които не зависят от времето. Тази класификация показва концепцията за времето като фактор променящ прогнозата на пациента.

Paul Glare също показва динамичните качества на прогнозирането. Според него, въпреки че прогнозата на заболяването е статична, прогнозата на отделния индивид е динамична и зависи от състоянието на различни фактори.²

В определението за прогностичен фактор зависимостта от времето и влиянието му върху изхода за пациента се определя в конкретен момент и се променя с времето.

Фактори описващи състоянието и фактори описващи промяната

През 2008 Paul Glare⁹ предлага друга класификация на прогностичните фактори основаваща се на начина, по който те са свързани с прогнозата. Според неговата теория **ракът е еднопосочен, зависим от времето процес, който причинява заболяемост и смъртност като нарушава нормалната клетъчна и органна функция чрез процесите на инвазия, метастазирание и секреция на токсични продукти.** Във всеки един момент прогнозата зависи от етапа и скоростта, с която напредва заболяването. Прогностичните фактори могат да се групират като такива, които отразяват моментното развитие на карцинома и такива, които отразяват неговата скорост на развитие. Той нарича тези групи – свързани със състоянието и свързани със скоростта на промяна. Той предлага обемът на тумора като фактор, описващ състоянието, а времето, за което туморът удвоява своя размер, като фактор описващ скоростта на промяна. Ефекта на различните видове лечение върху прогнозата може също да се разглежда като част от този модел. Хирургията, например, е фактор променящ състоянието в конкретен момент, докато хормоналните препарати, които намаляват пролиферацията на туморните клетки, са фактори модифициращи състоянието и терапията във времето.

От всички тези класификации става очевидно, че повечето прогностични фактори в различните групи зависят един от друг. Например отговорът към терапията е фактор на околната среда в някои от класификациите, но е тясно

свързан с времето свободно от заболяване, което е фактор свързан с тумора.² В наши дни ние знаем, че позитивността за естрогенен рецептор или преекспресията на HER2, които са туморни характеристики, са също и предиктивни фактори за отговор към терапията. Вероятно други фактори свързани с тумора или с пациента могат да обяснят наличието на отговор към терапията, но те са още неизвестни.

Въпреки че много фактори могат да бъдат смятани за прогностични за преживяемостта от онкологични заболявания, е трудно да се определи тяхното значение при отделния човек. Някои от тези фактори са навлезли в ежедневната практика, докато други са използвани само в дизайна на клинични проучвания.

Прогностичните фактори могат да се използват за да се определи прогнозата на пациента в конкретен момент, но във времето тази прогноза може да се промени. Това не е само заради развитието на раковия процес или остаряването на самия пациент, но и защото всички тези фактори на околната среда, пациента и тумора си взаимодействат по начин, който не винаги можем да предвидим.

Има много проучвания в които факторите свързани с лечението са отделени в отделна група.^{30,31} Обикновено в тези случаи класификацията е създадена базирайки се на фактори на пациента, тумора и лечението.³²

Еволюция на класификацията на факторите свързани с тумора.

В последните години повечето изследвания са фокусирани върху различните подгрупи на тумор свързани прогностични фактори. В тази група се включват патологични, молекулни и генетични фактори, които могат да повлияят преживяемостта. През 1997 W. Donegan публикува доклад, според който прогностични фактори свързани с тумора са хистологичният вид, диференцираността, нулеарният грейдинг, ангиогенезата, анатомичният стадий, метастазите в регионалните лимфни възли, размерът на тумора, рецепторите за стероидните хормони, плоидността, митотичният индекс, Ki-67, PCNA/Cyclin, Cathepsin-D, плазминогеновия активатор на урокиназата (uPA), протоонкогени и онкогени, като ERBB2 (HER-2/NEU, C-ERB B-2), рецептора за епидермален растежен

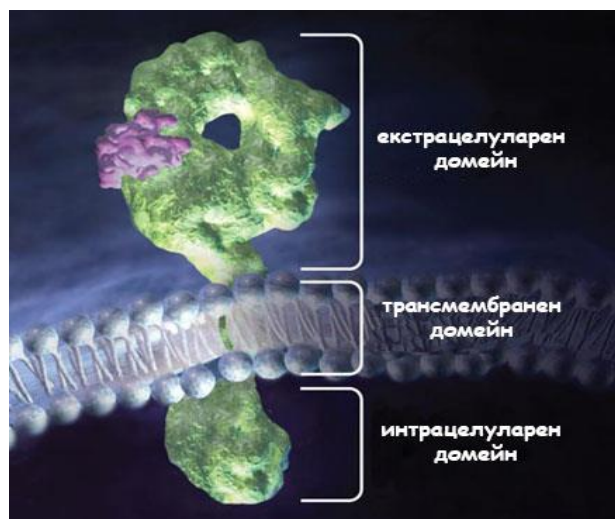
фактор (EGFR) и p53.³³ Само 10 години по-късно след завършването на проекта за човешкия геном³⁴ протеомните и генетични профили са вече изследвани за да се установи експресията на множество гени и да се комбинират стойностите на експресия на тези гени в прогностични индекси, които могат да предскажат клиничният изход от заболяването. Благодарение на възможността за създаване на генетични профили са установени различни молекулни субтипове карцином на гърдата с различно поведение. Всъщност много проучвания показват, че прогнозата и чувствителността към химиотерапия на различните молекулни субгрупи карциноми са различни.³⁵

Много от прогностичните фактори могат да се установят с чрез няколко различни метода. Грешката довела до развитието на раково заболяване може да бъде проследена на различни нива и установена с помощта на различни методи.

Ще дадем пример с ролята на човешкият епидермален растежен фактор 2.

Човешкият епидермален растежен фактор 2 (ERBB2, formerly HER2/neu, c-erbB2), е протеин от фамилия от 4 мембранни тирозин кинази. Неговата амплификация в човешки клетъчни линии на карцином на млечната жлеза е установена през 1985³⁶, а 2 години по-късно тази амплификация е разпозната като важна за патогенезата и прогресията на карцинома на млечната жлеза.³⁷ Сред новодиагностицираните пациенти 15% до 20% имат тумор, който носи генетични алтерации засягащи локуса на *HER2* гена. Тези алтерации водят до амплификация на региона на 17-та хромозома, който съдържа този протоонкоген.³⁸ Механизма на активация на продукта на HER2 и възможните методи за неговото количествено измерване са описани в доклад на W. Hanna и съавтори.³⁹ HER-фамилията на рецептори за растежни фактори е въввлечена в комплексната регулация на клетъчната пролиферация, растеж и оцеляване. Генната амплификация (повишен брой копия на специфичен хромозомен район) е ранно събитие в развитието на HER2 преекспресиращите тумори на млечната жлеза. Като резултат се повишава значимо броя на HER2 рецепторните молекули на мембраната на туморните клетки. Профузната преекспресия HER2 промотира димеризацията на членовете на HER-рецепторната фамилия и активацията на вътреклетъчна сигнална каскада. Последната активира клетъчната пролиферация, ангиоензата и подпомага механизмите за оцеляване, като директно се проявява в по-агресивна биология

на тумора и клинично поведение.⁴⁰ Две диагностични техники са понастоящем одобрени за оценка на статуса на HER2 в клиничната практика: имунохистохимия (IHC) и ин ситу хибридизация (ISH). Първият метод, имунохистохимията, използва антитяло за да оцени експресията на протеина HER2, т.е. изследва продукта на гена, а вторият метод определя броя копия на гена на HER2 изследвайки част от ДНК, т.е. изследвайки самия ген.⁴¹



HER-2/neu извънклетъчният домейн (ECD) се отцепва от металопротиназите, като остава свързана с мембраната вътрешен домейн постоянно активиран.⁴² По този начин екстрацелуларният домейн на HER-2/neu протеина се освобождава в циркулацията. Структурата на рецептора за епидермален растежен фактор 2 е показана на фигура 3.

Фигура 3. Структура на Епидермалния Растежен Фактор тип 2⁴³

Корелацията между нивата на серумния извънклетъчен домейн на HER2 и тъканния HER2 статус е противоречива.^{44,45,46} Все пак има проучвания, които откриват статистически значима корелация между серумното ниво на екстрацелуларния домейн на HER2 и HER2 статуса, установен с имунохистохимични методи върху тъканите. Серумните нива на този домейн са доказани да корелират значително със специфичната преживяемост при рака на гърда.⁴⁷

Следователно серумните нива на HER-2/neu извънклетъчния домейн (ECD) могат да бъдат трета опция за оценка на HER 2 статуса при пациенти с карцином на млечната жлеза. Всички тези три прогностични фактора- амплификацията на гена на HER2, преекспресия на продукта на гена HER2 рецептора и серумното ниво на извънклетъчния домейн HER-2/neu ECD са изследвани по отделно, въпреки че са

част от един и същи сигнален път, те са смятани като три отделни прогностични фактора. Разнородността на докладите се увеличава и от използването на различни методи за оценка на един и същи ефект и разбира се от липсата на стандартизация на методи в различните лаборатории.^{39, 48}

Теории за произхода на рака

Ракът е заболяване познато от древността. Определението за рак се е променяло във времето и най-вече през изминалия век, според нивото на познание, което изследователите са постигнали. Дори днес няма една широко приета теория за произхода на рака, която да може да обясни всички негови аспекти. Обобщение на теориите за произхода на рака е публикувано през 2014 от Roman Paduch, който описва теориите от древността до днес,⁴⁹ а развитието на теориите за рака през последния век и е публикувано през 2012 от S. Kurbel и B. Dmitrovi.⁵⁰

Всяка една от разгледаните хипотези дава различно определение за рака, като разглежда появата му на различно ниво. Така и факторите, които биха били прогностични за развитието на процеса, описват рака на различно ниво. В първия обзор Roman Paduch разглежда две основни направления в разясняването на механизмите на развитието на рака – епигенетични и генетични, и едно допълнително направление – механизмите на соматичните алтерации, наричано още екстрагенетична соматична наследственост.

1. Според генетичните теории всички карциноми са резултат от акумулиране на генетични алтерации в една клетка, което води до модифициране на клетъчния фенотип и морфология. В наши дни са възприети две основни теории в тази връзка- клоналната теория и теорията за стволовите клетки.

Според клоналната теория, развитието на рака произхожда от акумулирането на генетични алтерации (хромозомни и/или молекулни) в случайна клетка. Клоновете на тази клетка се формират заедно с растежа на тумора и развиват някои предимства свързани с този растеж. Според хипотезата за стволовите клетки генетичните алтерации възникват не в случайна клетка, а в ракова стволова клетка.

2. Епигенетичните теории приемат, че ДНК промените се индуцират от дефект в част на клетката различни от генетичния материал.

Епигенетиците смятат, че появата на карцином се дължи на взаимодействието на множество механизми за установяване състоянието на хроматинната структура, хистонни модификации и транскрипционната активност на CpG островните метилации.⁵¹

3. Друг подход към произхода на рака се представя от молекулната теория (теория за соматичните мутации)

Според нея само молекулните взаимодействия могат да обяснят сложността на туморната генеза. Тези взаимодействия са квалифицирани като соматични и наследяеми. Те оказват влияние върху клетъчната сигнална трансдукция, устойчивостта на апоптоза и накрая инхибират растежа.^{50, 49}

Според Теорията на Тъканната Организация, ракът се появява в резултат на разрушаване на взаимодействията между съседни структури, които се медиират от междуклетъчни химични сигнали, механични сили или биоелектрични промени. Според тази теория канцерогенезата представлява проблем на организацията на тъканта, сравним с органогенезата, а пролиферацията е основно състояние при всички клетки. Има три последствия от Теорията за Тъканната Организация:

- 1) Мутациите не са необходими за канцерогенезата
- 2) Карцином може да се появи в тъкан, в която не е имало действие на канцероген.
- 3) Генетичната нестабилност е следствие на канцерогенезата.⁵²

Всяка от тези теории се явява в различно поле и с различни методи на изследване на прогностичните фактори. Например, ако следваме генетичната теория трябва да търсим прогностични фактори сред генетичните мутации свързани с рака. В проучване на 100 солидни тумора на млечната жлеза публикувано в Nature мутации са открити в някои нови гени свързани с : AKT2, ARID1B, CASP8, CDKN1B, MAP3K1, MAP3K13, NCOR1, SMARCD1 и TBX3. Сред 100 тумора в поне 40 гена са открити мутации и 73 комбинации от мутирали гени. Резултатите от това проучване подчертават съществената генетична

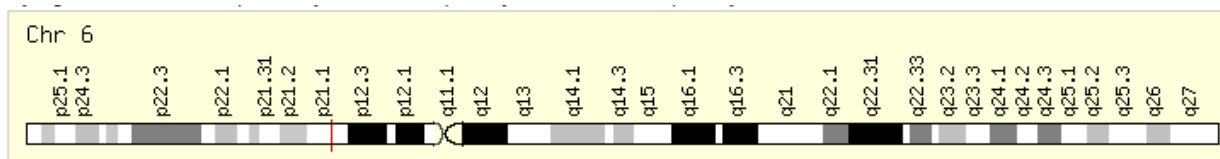
хетерогенност при карцинома на млечната жлеза.⁵³ Това личи още по-ясно от следния пример. Атласът на човешкият геном в създаден през 2005 и цели да установи всички генетични абнормности при 33 основни типове карцином, включително карцинома на млечната жлеза. В резултат на този проект е създадена класификация основана на генетиката и валидирана върху 7500 проби. Резултатите са публикувани през 2014. Класификацията съдържа 10 подгрупи основаващи се молекулни маркери, които са статистически значимо свързани с преживяемостта свободна от заболяване. В проучване на неoadювантната химиотерапия, тази класификация показва различни модели на химиочувствителност.⁵⁴

Ако следваме епигенетичната теория за рака епигеномът е отговорен за контролът на генната експресия, определяйки клетъчната диференциация и тъканната специфичност.⁵⁵ Потенциални прогностични и предиктивни фактори маркери на ДНК метилирането, изследвани в туморни тъкани от пациенти с карцином на млечната жлеза. Сред кохорта от 93 пациенти метилирането на цистатин М (CST6), каликреин 10 (KLK10), и RAS-асоцииран домейн съдържащ протеин 1 (RASSF1A) е значително свързано с преживяемостта свободна от заболяване и общата преживяемост. В друго проучване мултивариантен анализ показва, че метилирането на BRCA1 в серумната ДНК е независимо свързано с лоша прогноза.⁵⁶

Все пак всички тези често прилагани методи за откриване на биомаркери като профилът на генна експресия, не са успели да открият високо чувствителен и специфичен маркер при тройно-негативните карциноми. Няколко публикации докладват за генетични профили свързани с прогнозата при този тип карцином,^{57,58} но те имат ограничена клинична значимост, заради експерименталния им дизайн и недостатъчната чувствителност и специфичност.⁵⁹

Прогностичната стойност на полиморфизмите на васкуларния ендотелен растежен фактор (VEGF)

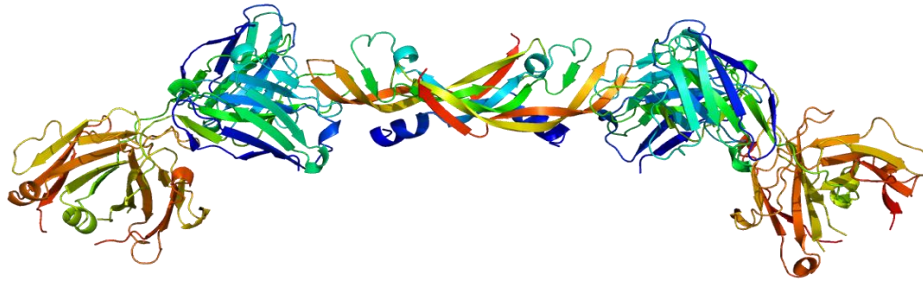
Гена за VEGF се намира в 6-та хромоза. Неговото разрушаване в мишки води до абнормно развитие на ембрионалните им кръвоносни съдове. Този ген е преекспресиран в много тумори, като количеството на неговия продукт корелира със стадия на тумора и неговата прогресия. Повишени нива на протеина са установени при пациенти със синдрома на POEMS (полиневропатия, органомегалия, ендокринопатии, моноклонална гамопатия и кожни промени). Алелни варианти на този ген са асоциирани с микроваскуларните усложнения при инсулинозависим диабет и атеросклероза.⁶⁰



Фигура 4. Структура на гена на васкуларния ендотелен растежен фактор⁶⁰

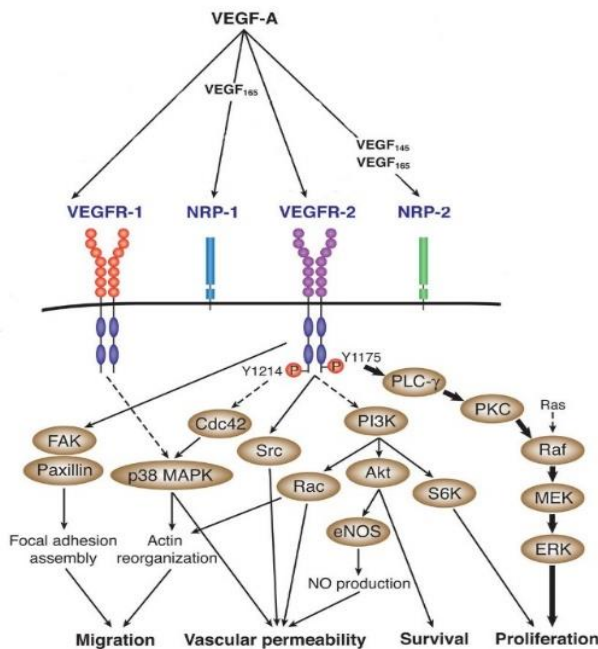
Описани са различни изоформи на кодируания протеин, дължащи се на алтернативен сплайсинг. Във всички изоформи обаче присъстват свързващите домейни за хепарин (кодирани от 6ти и 7ми екзон), VEGFR1 (кодирани от 3-ти екзон) и VEGFR2 (кодирани от 4-ти екзон).⁶¹

Продукта на VEGF гена - васкуларния ендотелен растежен фактор (VEGF, VEGFA) е идентифициран през 1980г. Той принадлежи към суперфамилията на тромбоцитните растежни фактори⁶² и представлява хепарин свързващ протеин. Съществува като хомодимер свързан с дисулфиден мост. Този растежен фактор има роля на медиатор на съдовата пропускливост, инхибитор на апоптозата, индуцира пролиферацията и миграцията на васкуларните ендотелни клетки и е основен едновременно за физиологичната и патологична ангиогенеза. Модел на структурата на VEGF е представен на фигура 5.



Фигура 5. Кристална структура на васкуларния ендотелен растежен фактор ⁶³

Хипоксията е основен стимул на експресията на VEGF, но много други фактори също оказват влияние. Такива са епидермалния растежен фактор (EGF), трансформиращия растежен фактор бета (TGF- β), тромбоцитния растежен фактор (PDGF), инсулиноподобния растежен фактор 1 (IGF-I), ангиотензин II, интерлевкин (IL-1), и интерлевкин 6 (IL-6), простагландините, механичният стрес, хипергликемия, протеин киназа С и свободните радикали, които имат потенциала да повишават експресията на VEGF.⁶⁴



Когато клетката страда от липса на кислород, се повишава образуването на VEGFA. Той медира растежа на нови съдове от съществуващи такива (ангиогенеза), като се свързва с повърхностните рецептори VEGFR1 (**Flt-1**) и VEGFR2 (**KDR/Flk-1**). VEGFR3 (Flt-4), който е от същото семейство, се свързва само с VEGF-C и VEGF-D (фигура 6).

Фигура 6. Рецептор –свързващата специфичност на членовете на фамилията на VEGF и VEGFR-2 сигналния път.⁶⁴

Тези три рецептора са свързани с рецептори за тромбоцитните растежни фактори, за фибробластните растежни фактори, рецепторите за стволови клетки (Kit), с Flt рецепторите (Flt-3), и рецептора за колония стимулиращ фактор (CSF-1R).

Активацията на сигналната трансдукция води до различни клетъчни функции като миграция, повишена пропускливост на съдовете, преживяемост и пролиферация.⁶⁵

Единичните нуклеотидни полиморфизми (single nucleotide polymorphism, SNPs) представляват генетични вариации, които се откриват в генома. Съществуват 10 милиона вариации в човешкия геном, появяващи се с честота 1/300 бази^{66,67}. Подобно на мутациите, полиморфизмите често включват замяна на единична нуклеотидна база. За разлика от мутациите, полиморфизмите в гените не причиняват загуба на функцията на кодиращия белтък⁶⁸. В контекста на карциномната ангиогенеза, полиморфизми са намерени в много различни гени и влияят, както на риска за развитие на карцином, така и на преживяемостта и отговора към терапия^{69,70}. Някои от тези алтерации, включително промени в регулаторните региони на определени гени, променят свързващия афинитет между белтъчния продукт на гена и неговия рецептор или водят до синтез на нов белтък. Всички тези промени, например в свързаните с ангиогенезата гени, водят до растеж на нови кръвоносни съдове.

Полиморфизмите са често изследвани, като предиктори на отговор към терапията или на токсичността (като част от фармакогенетиката) като се има в предвид тяхната честота в човешкия геном⁶⁸. Те могат да променят експресията на даден ген и по този начин влияят на агресивността на неоплазмите, включително при карцинома на млечната жлеза⁷¹.

Това ги прави едновременно прогностични и предиктивни фактори, но също така нови и обещаващи, без да са проучени достатъчно за да навлязат в стандартната клинична практика.

Количество на VEGF в туморните тъкани е пет пъти по-голямо от колкото в нормалните тъкани⁷². Важно е да се изследва ролята и ефекта на различните полиморфизми върху общата преживяемост и отговора към терапията при лекрства, чийто таргет е VEGF, за да се предостави правилното лекарство на

правилния човек, като част от концепцията за „персонализирана медицина“⁷³. Лекарствата, насочени срещу VEGF имат странични ефекти, включително хипертония, бъбречна дисфункция, тромбози или кървене^{74,75}. В допълнение те са ефективни при малка група хора и за това са отлични кандидати за оценка на фармакогенетиката.

Значението на протеомният профил на туморната тъкан като прогностичен фактор при пациенти с карцином на млечната жлеза

Тук е мястото да се разгледа **значението на протеомният профил на туморната тъкан като прогностичен фактор при пациенти с карцином на млечната жлеза.**

По традиция откриването на биомаркери е фокусирано върху откриването и количественото измерване на единични протеини. Сега е вече известно, че предиктивната стойност на самостоятелните протеини е ограничена. От друга страна група от протеини могат да се използват за да се оцени нарушението в дадена биологична система. С бързото развитие на протеомните техники става възможно да се търсят протеинови биомаркери в сложни биологични проби⁷⁶.

Основни понятия

Протеомен (белтъчен) профил на тумора -протеом

Според националния раков институт (NCI) протеомният профил представлява информация за всички протеини, намиращи се в кръвта, други телесни течности или тъкани в определен момент⁷⁷. Терминът е въведен през 1990 като съчетание на термините протеин и геном⁷⁸. Протеомният профил може да се използва за диагностика на заболявания или състояния, или за оценка на отговора на тялото към дадена терапия. Протеомът също се нарича профил на експресия на протеините или протеинов подпис.⁷⁷

Протеомикса представлява процесът на изучаване на всички протеини (протеома) в дадена биологична система (клетка, тъкан, организъм) по време на специфични биологични процеси⁷⁹.

Клиничната протеомика има за цел да подобри предсказването, диагнозата и прогнозирането на заболяванията, като разясни подлежащите им молекулни механизми⁸⁰.

Протеините като биомаркери

Протеините, като крайни продукти на генната експресия, могат да предоставят подробна информация за молекулните процеси; те дирижират сигналните

механизми (чрез посттранслационните модификации) и по този начин повлияват туморогеназата. Изучаването на протеома е по-сложно от изучаването на генома, поради огромното разнообразие на протеините, различната им експресия в отделни моменти, невъзможността им да се амплифицират и посттранслационните промени, които могат да променят активността им⁸¹.

През 2015 Bashar A. Zeidan и съавтори в свое проучване разглеждат методите и постиженията на протеомните изследвания при карцинома на млечната жлеза. Те очертават две насоки на протеомния анализ в изследването на туморите: да се открият нови молекулни маркери (като прогностични и предиктивни фактори) и да се разчетат сигналните пътища водещи до инициация и прогрес на туморите⁸¹.

Според тях подобна информация може да предостави основата за откриването на нови терапевтични мишени и да подобри резултатите от лечението. Авторите разглеждат няколко проучвания прилагачи анализа на протеини чрез метода на мас спектрометрията⁸¹. Така като прогностични маркери са доказани Cluster of Differentiation (CD14)⁸²; Quiescin sulfhydryl oxidase 1(QSOX1)⁸³; Decorin (DCN)⁸⁴; Endoplasmin (HSP90B19)⁸³ и Ferritin light chain (FTL)⁸⁵. Те забелязват и няколко маркера, които се откриват повторно в различни проучвания. През 2008 Brozkova K. и съавтори потвърждават класификацията на карцинома на млечната жлеза базирана на гена експресия⁸⁶, като изследват протеома на туморите и откриват същите субгрупи⁸⁷.

Развитието на даден биомаркер преминава през 5 стъпки, включващи:

1. предклинично проучване
2. клиничен анализ
3. продължителни ретроспективни валидиращи проучвания
4. проспективни скринингови проучвания
5. рандомизирани контролирани проучвания

Повечето от известните протеомни маркери при карцинома на млечната жлеза в момента се намират на първите три стъпки⁸⁰.

Протеомният профил може да бъде използван за целите на диагностиката за да отличи пациентите с карцином от здравите на базата на различната концентрация на някои серумни протеини^{88,89}. Нова насока в изследването на протеома е изследването на прогностичната стойност на профила на туморната тъкан, като неговото значение при някои видове карцином е вече доказано.⁹⁰ Установени са тъканни протеини предиктивни за статуса на аксиларните лимфни възли⁹¹ и далечната преживяемост.⁹²

Опит да се оценят няколко прогностични фактора наведнъж и по този начин да се получи по – прецизна информация за прогнозата е създаването на прогностичните индекси. Само някои от тях са разгледани тук.

Прогностични индекси

Един от най –старите прогностични индекси е Nottingham прогностичният индекс. Той е докладван за първи път през 1982г.⁹³ Създаден е на базата на ретроспективен анализ на 9 фактора при 387 пациентки с първичен операбилен карцином на млечната жлеза. Само 3 от изследваните фактори - размера на тумора , ангажираността на лимфните възли, 1-3ниво) и диференцираността на тумора остават значими в мултивариантен анализ. Този индекс е използван за да се определят три групи пациенти, които носят различен риск от смърт от карцином на млечната жлеза:

- 1) добра прогноза, с 80% 15-годишна преживяемост;
- 2) умерена прогноза, с 42% 15-годишна преживяемост;
- 3) лоша прогноза, с 13% 15-годишна преживяемост.⁹⁴

Този индекс е валидиран много пъти през годините.^{95,96} През миналата (2014) година е докладван Nottingham + прогностичният индекс. Той се определя от шест клиникопатологични прогностични фактора, важни сред популацията, който предсказват специфичната преживяемост от карцином на млечната жлеза: броят засегнати лимфни възли (N), стадия на заболяването (St), размерът на тумора (Sz), броят митози (M), лимфно-васкуларната инвазия (LVI) и статуса на прогестеронния рецептор (PgR). Този индекс е приложен към 7 субгрупи пациенти с рак на гърдата, като всяка от тези групи е дефинирана с помощта на 10 биомаркера. Биомаркерите използвани за класифициране на пациентите са ER, PgR, цитокератин (CK) 5/6, CK7/8, рецептор за епидермален растежен фактор (EGFR; HER1), c-erbB2 (HER2), c-erbB3 (HER3), c-erbB4 (HER4), p53 и Mucin 1. Седемте субгрупи, дефинирани с помощта на тези биомаркери са:

1. Три луминални субгрупи: луминален-А, луминален-Н и луминален-В;
2. Два базални класа: базален p53 променен и базален p53 нормален;
3. Два HER2-позитивни класа HER2 + /ER + и HER2 + /ER-;

Шестте клиничко-патологични прогностични фактора са комбинирани за да се създаде формула, която варира сред различните групи и води до така наречената NPI-подобна формула за всеки от седемте биологични класа – прогностичен

индекс базиран на биомаркери (NPI+). Този индекс е използван за да се прогнозира специфичната преживяемост от рак на гърдата и резултатите са сравнени с тези от традиционният индекс за всеки от биологичните класове.⁹⁷ Оригиналният NPI е съставен от само 3 прогностични фактора, докато NPI+ е съставен от 10 биомаркера и 6 клинично-патологични фактора или общо 15 променливи (статуса на прогестероният рецептор се повтаря).

В наши дни прогностичните индекси могат да бъдат представени и изчислени като уеб базирани инструменти. Например един от най-известните инструменти за предсказване на специфичната преживяемост при пациенти с карцином на млечната жлеза е „Adjuvant! Online“. Целта му е да подпомогне дискусията между здравните професионалисти и пациентите с ранен карцином на гърдата относно рисковете и ползите от адювантната терапия. Adjuvant! Online представя оценка на риска от смъртност или рецидив. Параметрите използвани за тази оценка са възраст, размер, диференцираност, статусът на естрогенния рецептор и придружаващите заболявания.⁹⁸ Прилагането Adjuvant! Online е много противоречиво.^{99,100,101,102} Все още това е един от най-сложните и амбициозни прогностични инструменти.

„PREDICT“ е също инструмент за създаване на прогноза и оценка на ползата от терапията, създаден за да помага на клиницистите и пациентите да взимат информирано решение относно лечението, което следва оперативната интервенция при пациенти с карцином на млечната жлеза. Оценката на преживяемостта представена с и без провеждането на адювантна терапия е дадена 5 и 10 години след операцията. Включените прогностични фактори са възрастта на диагноза, начина на откриване на заболяването, размерът на тумора в мм, броят позитивни лимфни възли, статуса на естрогенния рецептор, HER2, Ki 67 и приложеният химиотерапевтичен режим.¹⁰³

Прогностичните индекси описват прогнозата на пациента по-надеждно отколкото самостоятелните прогностичните фактори. Тези индекси обаче трябва да бъдат валидирани в големи проучвания. Всички те са използвани за определяне на риска при конкретна група пациенти. Повечето оценяват риска при ранен и първичен карцином на млечната жлеза и не могат да бъдат прилагани в случаите на метастатичен карцином, или неинвазивен карцином за които са

разработени други индекси.^{104,105} Все още няма прогностичен индекс, който да може да бъде приложен на всеки стадий от развитието на заболяването или във всеки момент от процесът на лечение на пациента.

ИЗВОДИ ОТ ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

1. Съществува голямо разнообразие от прогностични и предиктивни фактори при пациентите с онкологични заболявания;
2. Това разнообразие се допълва от разнообразието на приложимите методи на изследване;
3. Предмет на настоящи и бъдещи изследвания са най-вече генетичните и протеомните прогностични фактори и индекси;
4. Класифицирането на прогностични фактори ще подпомогне тяхното изучаване и приложимост;
5. Прогнозата на пациента не е статичен показател, а променлива зависима от времето;
6. Все още няма прогностичен фактор или индекс, който да може да бъде приложен на всеки стадий от развитието на заболяването или във всеки момент от процесът на лечение на пациента.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

Задачи:

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

ПЪРВА ГЛАВА

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

Взимайки в предвид всички вече изброени класификации на прогностичните фактори предлагаме нова обобщена класификация, която по-добре показва конкретното място на всеки един фактор. Първо определихме всеки един фактор като свързан с пациента, свързан с тумора или свързан с околната среда. След това определихме, основните фактори (тези, които биха променили терапията за пациента, тъй като имат едновременно прогностична и предиктивна стойност) и допълнителните фактори (тези, с доказано прогностично значение, които на базата на сегашните познания, не променят лечението на пациента) сред споменатите групи. Както основните така и допълнителните фактори могат да бъдат постоянни във времето или да се променят с времето. С други думи факторите, които зависят от времето могат да описват състояние (описание на тумора в конкретен момент) или промяна (описание на промяната в пациента, тумора или околната среда).

Таблица 4. Предложение за класификация на прогностичните и предиктивни фактори

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

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

Прогностични фактори свързани с пациента

Възраст при диагноза

Възрастта при диагноза е фактор с доказана прогностична стойност в много проучвания.^{106,107,108} Освен това е установено, че тя е важна в процеса на взимане на решение относно адювантната терапия, независимо от аксиларния статус.¹⁰⁹ В проучване на T. Sio и съавтори се разглежда възрастта на диагноза във връзка с взимането на решения за избора на лечение. Авторите намират значима разлика в препоръките за хирургично лечение и химиотерапия за всяка възрастова група.¹¹⁰ Последното издание на препоръките на NCCN също предлага различно лечение на пациентите над 70 годишна възраст.¹¹¹ Това прави възрастта на диагноза доказан, основен и независим от времето прогностичен фактор при карцинома на млечната жлеза.

Раса

В наши дни е вече доказано, че субтиповете карцином на млечната жлеза се срещат с различна честота сред жените от различна раса.¹¹² Доказано е също, че черната раса сама по себе си е прогностичен фактор.^{113, 114} Проучване върху 1928 пациенти, в което са изследвани предикторите на прогресия на тумора по време на неoadювантната терапия, намира расата като независим фактор за предсказване на прогресията на заболяването в мултивариантни проучвания.¹¹⁵ Това показва, че расата е също и предиктивен фактор за отговор към терапията. Това прави расата основен, независим от времето, свързан с пациента прогностичен фактор.

Менопаузален статус

Менопаузалният статус е доказан прогностичен фактор за общата преживяемост и преживяемостта свободна от рецидив.¹¹⁶ Той е важен също за процеса на взимане на решение за терапията. В препоръките на Европейската Асоциация по Медицинска Онкология за диагноза, лечение и проследяване на пациенти с

първичен карцином избора на лечение първично се определя от менопаузалния статус на пациента.¹¹⁷ Менопаузалния статус е основен, свързан с пациента и независим от времето прогностичен фактор.

Придружаващи заболявания

Много проучвания намират, че пациентите с карцином на млечната жлеза, които имат придружаващи заболявания, имат по бедна прогноза от тези, които нямат.^{118,119} В проучване на значението на придружаващите заболявания се докладва, че пациентите с придружаващи заболявания по-често не получават стандартно лечение като вид хирургична интервенция, химиотерапия или лъчетерапия, в сравнение с пациентите без заболявания и съответно техния шанс за завършване на курса на лечение е по-малък.¹²⁰

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

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

Преживяемост след диагноза

Времето след поставяне на диагнозата е друг фактор свързан с пациента. В своя преглед на прогностичните фактори за дългогодишна преживяемост при карцинома на млечната жлеза от 2008 година I. Soerjomataram и съавтори докладват проучвания доказващи, че колкото по-дълго живее една болна с карцином на млечната жлеза, толкова повече се подобрява нейната прогноза.¹²¹ Преживяемост свободна от заболяване по-малко от 2 години показва значително по-висока вероятност от рецидив или смърт. Резултатите са съвместими с други доклади, особено при наличие на костни метастази.¹²²

Пример за това е проучване от 2015 изследващо преживяемостта при пациентки с карцином на млечната жлеза и костни метастази. Авторите намират, че взимайки в предвид интервала свободен от костни метастази, преживяемостта се подобрява с всяка изминала година след първата.¹²³ Това показва, че преживяемостта свободна от събития е прогностичен фактор за общата преживяемост, а също и свързан с пациента, зависим от времето и описващ промяната фактор, който променя приложената терапия.

Индекса на телесна маса (BMI)

Мета-анализ от 2014г. изследва връзката между индекса на телесната маса и преживяемостта при жени с карцином на гърдата. Той включва 79 публикации 82 проучвания, проследяващи 213 075 пациентки. Авторите изследват индекса на телесна маса преди диагнозата, по-малко от 12 месеца след диагнозата и повече от 12 месеца след диагнозата. Техните резултати ясно подкрепят факта, че при пациентки с карцином на млечната жлеза, по-високия индекс на телесна маса е свързан с по-ниска обща и специфична преживяемост, независимо от това кога е отчетен.¹²⁴

Депресията

Проучване на A. Vodermaier и съавтори доказва депресията като прогностичен фактор. Тя е изследвана като биноминална променлива- пациентите са разделени на такива с и без депресия. Авторите анализират наличието на депресия в зависимост от стадия на болния. Те установяват, че депресията има значение за специфичната и общата преживяемост при пациенти I^{ви} и II^{ри} стадий.¹²⁵

N. Zainal и съавтори изследват наблюдателни проучвания сред пациенти с карцином на млечната жлеза. В тяхното проучване депресията също е разгледана като биноминална характеристика, определена на базата на дискусия или клинична оценка.¹²⁶ Ние приемаме депресията като зависима от времето променлива описваща състоянието в конкретен момент, тъй като тя може да се прояви във всеки един момент от лечението на пациента или след неговото приключване. Друго проучване изследва намаляването на симптомите на депресия в асоциация с по-дълга преживяемост при пациенти с метастатичен

карцином и намира подобряване на преживяемостта.¹²⁷ Намалването на симптомите на депресия е отделен прогностичен фактор описващ промяната

Съотношението на неутрофилите към лимфоцитите

Мета-анализ от 2015г. изследва публикуваните проучвания върху това съотношение и включва 4 293 пациенти. Авторите изследват връзката между съотношението на неутрофилите и лимфоцитите и общата, специфичната и преживяемостта свободна от заболяване. Резултатите показват, че повишената стойност на това съотношение е свързана с влошена обща и преживяемост свободна от заболяване.¹²⁸ Предиктивна стойност на съотношението на неутрофилите към лимфоцитите се нуждае от доказване.¹²⁹ Следователно единичната оценка на съотношението преди лечението е допълнителен, зависим от времето и описващ състоянието прогностичен фактор. Намерихме и едно проучване, което изследва промяната на съотношението на неутрофилите и лимфоцитите като прогностичен фактор при болни в IV^{ти} стадий на карцином на млечната. То показва, че това съотношение може да бъде и фактор описващ промяната.¹³⁰

Промяна в теглото след диагноза

Качване на килограми

Проучване на X. Chen и съавтори изследва промяната в теглото след диагноза във връзка с преживяемостта. Сред 5042 пациентки авторите установяват, че жените, които са качили повече от 5 килограма или са свалили повече от 1 килограм имат по-голяма смъртност от тези, които са запазили теглото си.¹³¹

Загуба на тегло

Едно малко проучване върху 109 пациенти изследва загубата на тегло като индикатор за рецидив. Резултатите предполагат, че необяснимата загуба на килограми е ценен ранен индикатор за рецидив на заболяването.¹³²

Прогностични фактори, свързани с тумора

Хистологичен тип

Хистологичния тип е доказан прогностичен фактор при карцинома на млечната жлеза.¹³³ В проучване на разликите в хистологичните видове на този карцином на и отговора на неoadювантна терапия, се установява, че общата и преживяемостта свободна от заболяване е значително по-кратка за болните с метапластичен или инвазивен лобуларен карцином. Въпреки слабия отговор, пациентите с муцинозен и апокринен карцином, имат добра прогноза. Следователно дори хистологичния тип да не се взима в предвид в препоръките за лечение има доказателства, че той може да промени лечението.¹³⁴ Следователно хистологичния тип е свързан с тумора, основен и независим от времето прогностичен фактор.

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

Рецептора за естроген, прогестерон и епидермалния растежен фактор 2 са сред най-често изследваните прогностични фактори свързани с тумора. Те имат доказана прогностична^{135, 136} и предиктивна стойност.^{137,138} Освен това през 2011г. R. Nishimura и съавтори публикуват проучване изследващо промяната на ER, PgR, HER2, p53 и Ki-67 при появата на рецидивен карцином на млечната жлеза. Промяна е наблюдавана при всички изследвани фактори. Следователно ние можем да ги класифицираме като свързани с тумора, основни, зависими от времето, описващи състоянието в конкретен момент прогностични фактори.¹³⁹

Патологичния отговор или съотношението между тумора и отговора към терапия

През 2011 г мета-анализ проверява хипотезата, дали патологичния отговор към неoadювантната терапия е прогностичен за далечните резултати. Анализата включва 16 проучвания и 3776 пациенти. Резултатите потвърждават патологичния отговор като прогностичен индикатор за преживяемостта и предполагат, че пациентите постигнали пълен отговор след терапията имат по-добра прогноза.¹⁴⁰ В случай на частичен отговор, пациента може да има полза от по-продължително лечение за да постигне пълен отговор. В случай на липса на отговор или дори

прогресия на заболяването, хирургичната интервенция може да се преосмисли в по-ранни етапи на лечението. Така пациентите могат поне да бъдат предпазени от получаването на токсични лекарства, от които нямат полза.¹⁴¹

Друг начин да се оцени отговора на тумора, е чрез съотношението между тумора и отговора. То отразява частта от тумора останала след като пациента премине неoadювантната терапия и преди всякаква хирургична интервенция. Доказано е, че това съотношение е предиктивно за преживяемостта при пациенти с I-III^{ти} стадий карцином на гърдата, при които е проведена неoadювантна терапия.¹⁴² Това прави съотношението между тумора и отговора, основен, свързан с тумора и описващ промяната фактор.

Загубата на E- кадхерин

E-кадхеринът представлява адхезионна молекула на туморната клетка. Неговата ниска експресия или загуба на експресия се свързва с туморна дедиференциация и повишен метастатичен потенциал. Доказан е като независим фактор за преживяемостта свободна от заболяване¹⁴³ и общата преживяемост¹⁴⁴ при пациенти с карцином на млечната жлеза. В проучване на Yoshida R. и съавтори се установява, че експресията на E-кадхерин е намалена или липсва в метастатичните лимфни възли, независимо от експресията в първичния тумор. Авторите предполагат, че промяната в експресията на E-кадхерин е свързана не само с далечните метастази, но и с метастазите в лимфните възли.¹⁴⁵ Също загубата на E-кадхерин се свързва с по-напреднал стадий, подкрепяйки идеята, че това е маркер за агресивност.¹⁴⁶ Не можахме да открием проучване, което да изследва промяната в експресията на E-кадхерин в случай на рецидив, затова не можем да бъдем сигурни, че този фактор е независим от времето. В настоящата класификация той е допълнителен и свързан с тумора прогностичен фактор.

Времето за удвояване на тумора

В своята книга „Естествена история и прогностични маркери“ R. Margolese и съавтори оценяват времето за удвояване размера на тумора при първичен карцином на млечната жлеза. Те сравняват скоростта на растеж на тумора в няколко проучвания и намират, че средното време за удвояване на размера е между 215 и 325 дни. Авторите заключават, че ако карциномът се развива от

единична клетка и расте с постоянна скорост на удвояване на размера, ще са му необходими около 20 години за да достигне размер 1-2 см в диаметър. Тумор с по-голяма скорост на нарастване, като например 100 дни, ще се нуждае от 10 години за да стане клинично доловим. Значително по бързо растящ тумор (време за удвояване на размера 20 дни), ще се прояви само 2 години по-рано. Тумор с размер 2 мм, нарастващ със средното установено време за удвояване на размера, ще се нуждае от 4 години за да достигне размер 1 см. Трябва да се вземе в предвид и, че скоростта на нарастване, не е постоянна за тумора. Тези наблюдения могат да обяснят сравнително по-бедната прогноза показана в много проучвания за по-младите жени (<35 години). Авторите предполагат, че тези жени имат в по-голямата си част бързо растящи, по-агресивни тумори, тъй като бавно растящите не биха имали време да станат клинично доловими до тази възраст. Следователно времето за удвояване размера на тумора е допълнителен фактор описващ промяната.¹⁴⁷

Прогностични фактори свързани с околната среда:

Социален статус

Проучване от 2006г. оценява и обяснява социалните неравенства в преживяемостта от карцином на млечната жлеза в швейцарския кантон на Женева, където цената на здравеопазването и очакваната продължителност на живот са едни от най-високите в света. Това проучване включва 3 920 жени, жителки на Женева, които са диагностицирани с инвазивен карцином преди да достигнат 70 годишна възраст, за 20 годишен период от време между 1980г. и 2000г. Пациентките са разделени в 4 социално-икономически групи, според последната им месторабота. Когато се сравняват пациентките сред различните групи, тези, от нисък социален клас, имат повишен риск от смърт от карцином. Авторите установяват също, че тези жени по-често са чужденки, по-рядко са диагностицирани по време на скрининг и по-често са в напреднал стадий. Установява се и разлика в приложеното лечение. Те по-рядко претърпяват органосъхраняващи операции и по-рядко получават хормоно- и химиотерапия, най-вече при наличие на позитивни лимфни възли. Когато всички тези фактори се вземат в предвид, пациентките от по-ниска социална група имат значително по-висок риск от смърт.¹⁴⁸ Не можахме да намерим проучване, което да изследва

значението на промяната в социалния статус при пациентки с карцином на млечната жлеза. И за това приемаме, че това е допълнителен и независим от времето прогностичен фактор свързан с околната среда.

Вид операция

Това е зависим от времето, описващ състоянието, основен фактор на околната среда. Той е оценен и доказан като прогностичен.¹⁴⁹ Обема на оперативната интервенция определя и прилагането на лъчетерапия в процеса на лечение.^{150,46} Вида на операцията е фактор, който може да се промени с времето, тъй като обемът на интервенцията може да се увеличи.

Достъп до лечение

Достъпът до лечение е също изследван като фактор на околната среда в проучването на I. Soerjomataram и съавтори,¹²¹ описано по-горе. Те установяват, че достъпа до лечение се е подобрил във времето в повечето индустриализирани страни и по-добра преживяемост се наблюдава във всички възрастови групи. Това показва, че достъпа до лечение е основен фактор на околната среда, който зависи от времето. То описва състоянието на пациента в конкретен момент.

Година на диагноза

Потърсихме проучвания, които да сравняват преживяемостта в зависимост от годината на диагноза, за да докажем подобряването на лечението на карцинома на млечната жлеза през годините. Анализ на раковите регистри на Австралия, Канада, Дания, Норвегия, Швеция и Великобритания между 1995 и 2007 намира, че преживяемостта се подобрява за всички 4 типа карцином включени в проучването. За карцинома на млечната жлеза 5-годишната преживяемост е 85%, за пациенти диагностицирани между 1995-1999; 87% за пациенти диагностицирани между 2000г. и 2002г. и 88,1% за пациенти диагностицирани между 2005г. и 2007г.¹⁵¹ Други проучвания също докладват подобни резултати¹⁵² Това подобрене, може да се дължи на подобрене във всички етапи на лечението, като например въвеждането на мултидисциплинарната грижа в клиничната практика.¹⁵³

Лъчетерапия

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

Качество на живот

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

Тютюнопушене

Много проучвания изследват връзката между тютюнопушенето и смъртността от карцином на млечната жлеза. Едно от тях сравнява настоящите и бивши пушачи с никога непушилите. Първоначално авторите не откриват значима зависимост. Когато взимат в предвид възрастта на диагноза те установяват, че сред настоящите пушачи специфичната смъртност се повишава в зависимост от експозицията, интензитета и продължителността на тютюнопушенето. Авторите извършват и мета-анализ, който показва статистически значимо повишаване на специфичната смъртност при пушачите в момента на диагноза в сравнение с

никога непушилите.¹⁵⁴ Друго скорошно проучване също намира повишен риск от рецидив и смъртност в зависимост от дозата.¹⁵⁵ Класифицирахме тютюнопушенето като допълнителен фактор на околната среда, променящ се с времето по смисъл на продължителност на тютюнопушенето и пакетогодини.

Заключение

В крайна сметка ни беше трудно да определим онези прогностични фактори, които не се променят с времето.

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

Има проучвания, доказващи че значението на прогностичните фактори намалява с времето в зависимост от продължителността на проследяване¹⁵⁶ и с напредване на карциномния процес.² Те докладват, че кривите на преживяемостта, в зависимост от туморните прогностични фактори, показват голям спад на преживяемостта през първите 5 години след диагнозата, след което се стабилизират.⁵⁰ От тук нататък по-важни остават факторите свързани с пациента.

ВТОРА ГЛАВА

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

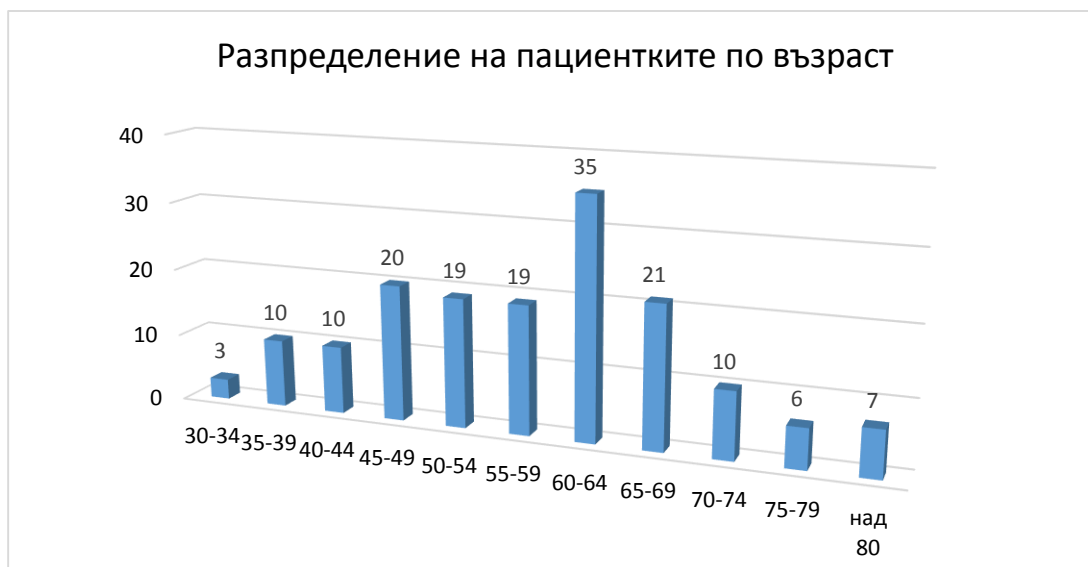
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Характеристики на пациентките

В изследването са включени 160 пациентки с хистологично доказан първичен инвазивен карцином на млечната жлеза.

1. Възраст

Пациентките са на възраст от 30 до 86 години (средно 57,7). Карциномът на млечната жлеза е диагностициран най-често в групата от 60 до 64 години.



Фигура 7. Разпределение на новите случаи по възраст

От включените в проучването пациентки, 8 са с данни за билатерален карцином. При 4 от тях от момента на диагностициране на първият карцином са минали повече от 5 години. По тази причина за дата на диагноза се приема датата на

диагноза в клиниката (след 2010г.). При останалите 4 първият карцином е диагностициран след 2010г и времето до появата на втория контралатерален карцином е по-малко от 5 години и за дата на диагноза е взета датата на установяване на първия карцином. По така изброените причини, нито една от пациентките с билатерален карцином не е изключена от изследването.

2. Стадий

В настоящия труд стадия се разглежда като характеристика на пациента, тъй като стадия обединява пациенти с една и съща прогноза (а прогнозата е характеристика на пациента). Той е пряко свързан с характеристиките на тумора и се определя от тях. Пациентите са стадираны по 7-мата ревизия на TNM (Tumor-Node-Metastases classification system)¹⁵⁷. Най-много са пациентките във втори стадий на заболяването. Това са пациенти с размер на тумора до 5см и до 3 метастатични лимфни възела.

3. Туморни маркери

Карциноембрионалният антиген е изследван при 76 пациентки. От тях със стойност в референтни граници е при 66. Специфичният туморен маркер за карцином на млечната жлеза Ca15-3 е изследван при 125 от болните, като при 103 от тях е в норма.

4. **Съотношението на неутрофилите към лимфоцитите** - известно при 50 пациентки (виж таблица 5).
5. **Съотношението на тромбоцитите към лимфоцитите** - известно при 49 пациентки (виж таблица 5).
6. **Фибриноген** – изследван при 110 пациентки, в норма при 90 от тях. (виж таблица 5).

Стойността на прогностичните фактори сред пациентите лекувани в Клиника по хирургия „Александър Станишев“ е оценена при 94 пациенти от описаните по-горе 160. В анализа на преживяемостта са включени само пациенти, за които са минали поне две години от датата на диагнозата. Подробно разпределението на всички фактори в двете групи пациенти е показано на таблица 5.

Таблица 5. Характеристики на пациентите

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

2. Характеристики на тумора

1. Размер

Размерът на тумора е оценен, както по абсолютна стойност в мм при 148 болни, така и според Т категорията на TNM класификационната система при 159 от всички 160 болни. За една от болните, няма никакви хистологични данни.

2. Множественост

С данни за повече от един фокус на тумора са 18 болни. Сред тях най-често се срещат тези с по 2 фокуса, но има и една болна с 5 огнища на карцином. За множествен карцином в настоящия труд се счита, такъв с поне две огнища на **инвазивен** карцином.

От 18-те множествени карцинома :

За 2 болни данните са от направените образни методи, тъй като хистологичният резултат е единствено от инцизионна биопсия, с цел последваща неoadювантна терапия. Информация за хистологията и рецепторния статус има съответно само за 1 от формациите.

За 2 болни резултатите са след неoadювантна терапия и при тях хистологията и рецепторния статус на отделните фокуси съвпада.

При 2 болни туморите се различават по хистология – едната има съчетания от инвазивен папиларен и инвазивен дуктален карцином, а при другата едната формация е инвазивен дуктален карцином, а втората е смес от муцинозен, тубуларен, папиларен и солиден дуктален тумор. Последните са и с различен рецепторен статус.

Също общо 2 болни имат различен рецепторен статус на туморите.

3. Диференцираност - най-разпространени са нискодиференцираните карциноми

4. Хистологичен вид

Сред хистологичните видове преобладава инвазивния дуктален карцином -127 пациентки. С инвазивен лобуларен карцином са 16, а само с папиларен -6 пациентки.

5. Инфилтрация на околната тъкан

В анализа са включени само пациентки, в чийто хистологичен резултат изрично е упоменато наличието или липсата на инфилтрация в околната околната мастна тъкан. Това са 137 пациентки, от тях при 126 има инфилтрация, а при 11 липсва.

6. Брой метастатични лимфни възли

Метастатичните лимфни възли са оценени в настоящия труд по няколко начина:

- 1) по наличие или отсъствие на метастатични лимфни възли- информация има за 133 пациентки, от тях 63 имат поне един метастатичен лимфен възел;
- 2) по абсолютният брой метастатични лимфни възли – броят метастатични лимфни възли варира от 0 до 19;
- 3) групирани в N-категории според TNM класификационната система;
- 4) според стойността на съотношението на лимфните възли се дефинира като съотношението на броя метастатични лимфни възли към броя на изследваните лимфни възли. Съотношението на лимфните възли е фактор по-често изследван при болните с позитивни лимфни възли.^{158,159} Най-често избраните разделни стойности за съотношението на лимфните възли са 0,2 и 0,25¹⁶⁰;

7. **ER, PR, HER-2** - пълни данни за рецепторния статус има при 153 пациентки. Изследвани са и различни комбинации от стойности на рецепторния статус, като тройно негативни, тройно позитивни тумори и HER2 преекспресиращи;

8. Луминален тип

Консенсуса от St. Gallen, както и наръчниците на Европейската Асоциация по Медицинска Онкология през 2015 препоръчват класифицирането на туморите на млечната жлеза на молекулни типове да става на базата на експресията на рецептора за естроген, прогестерон, HER2 и Ki 67^{161, 26}. От пациентите включени в изследването Ki 67 е известен само при 32 болни, което направи невъзможно определянето на молекулния субтип при по-голямата част от тях. По тази причина разпределението на туморите по луминален тип е извършено на базата на класификация приложена от Carol Parise и Vincent Caggiano през 2014г. Според нея луминалният тип може да се определи само с помощта на хормоналният и HER2 статус и диференцираността на тумора.¹⁶² Разпределението на туморите според молекулния субтип е представено на таблица 6.

Таблица 6. Класификация на туморите по молекулния тип в зависимост от рецепторния статус

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

На базата на дадената класификация, пациентите от изследването се класифицират както следва на таблица 7.

Таблица 7. Разпределение на туморите по луминален тип

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

9. Изследвано е наличието на **туморни емболи в лимфни съдове (131); туморни емболи във венозни съдове (132)** и общо **лимфноваскуларна инвазия (131)**.

10. Наличие на неинвазивна компонента – има данни за 150 болни. В анализа на прогностичната стойност са включени само пациентките с инвазивен дуктален карцином, тъй като тези с инвазивен лобуларен карцином с данни за неинвазивна компонента са само 5.

Подробно разпределението на всички фактори е представено на таблица 8.

Таблица 8. Разпределение на туморните характеристики

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

N1	44	27,5	27	28,7
N2	16	10,0	14	14,9
N3	9	5,6	6	6,4
LNR	133	83,1	82	87,2
LNR>0,2	30	18,8	22	23,4
ER	156	97,5	90	95,7
позитивен	128	80,0	70	74,5
PR	156	97,5	90	95,7
позитивен	111	69,4	62	66,0
HER2	153	95,6	88	93,6
позитивен	27	16,9	18	19,1
тройно негативен	18	11,3	14	14,9
тройно позитивен	8	5,0	7	7,4
лимфо- васуларна инвазия	132	82,5	78	83,0
позитивна	71	44,4	45	47,9
наличие на	150	93,8	89	94,7
неинвазивна компонента				
позитивно	54	33,8	31	33,0
наличие на	159	99,4	93	98,9
метастази				
M1	9	5,6	6	6,4

Фактори свързани с околната среда и лечението

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

1. Хирургично лечение

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

Таблица 9. Разпределение на пациентите според обема на оперативната интервенция и стадия на заболяването.

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

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

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

3. Неоадювантна терапия:

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

Протокол на изследването

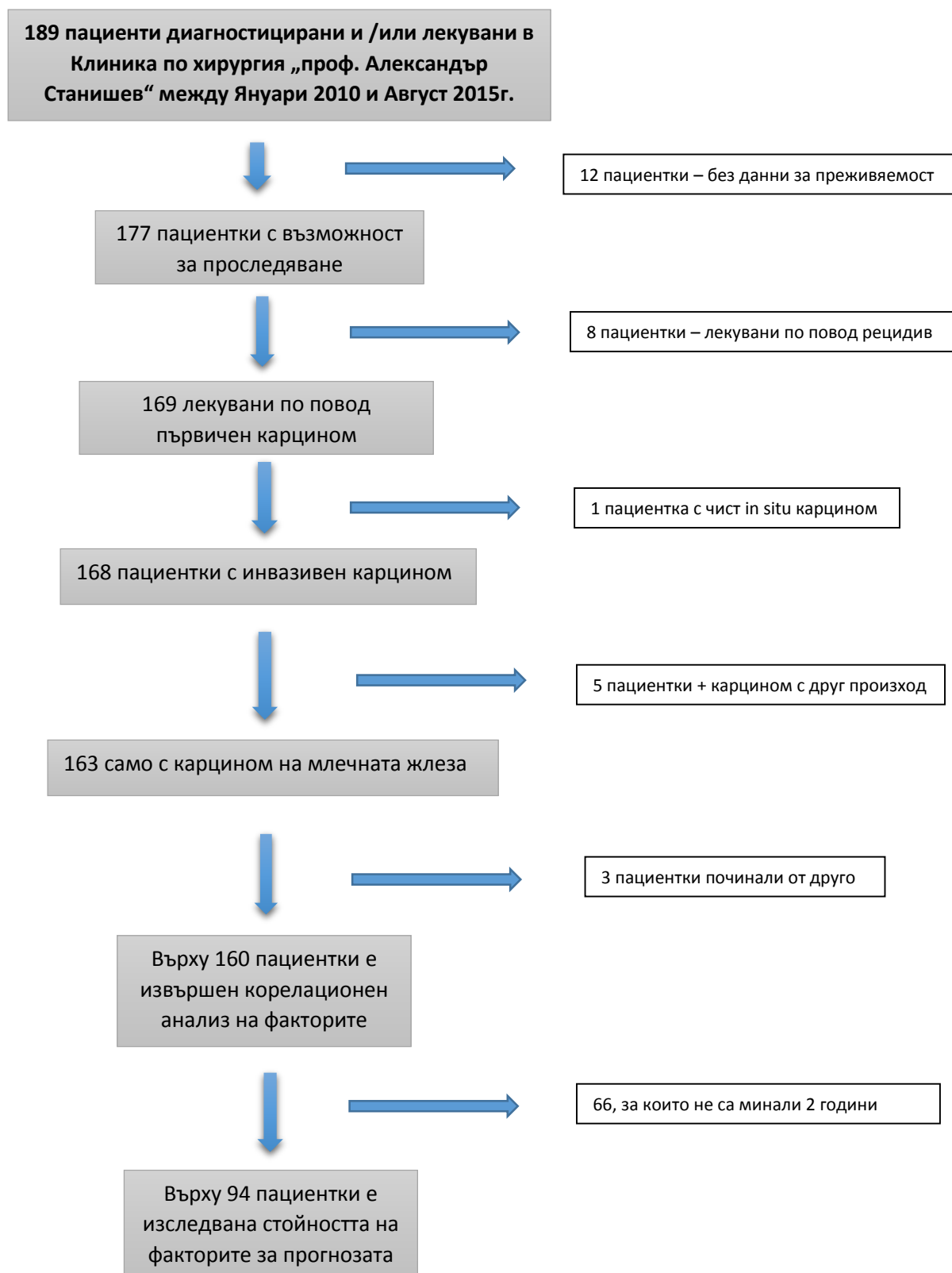
За описания период в Клиниката по хирургия „Проф. Александър Станишев“ са лекувани 189 болни с хистологично доказан карцином на млечната жлеза. От тях без данни за далечната преживяемост и/или преживяемостта свободна от рецидив са 12 болни. От останалите 177, 7 болни са лекувани по повод на рецидив,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

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

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

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

Протоколът за включване на пациенти в изследването на прогностичните фактори е представен на фигура 8.



Фигура 8. Протокол за включване на пациентите в изследването на прогностичните фактори.

Приложени методи на диагностика и лечение:

Диагностичният алгоритъм включва:

1. Анамнеза
2. Клиничен преглед
3. Лабораторни изследвания – ПКК с диференциално броене, туморни маркери, АСАТ, АЛАТ, креатинин, кръвна захар, INR, фибриноген
4. Образни методи – ехография и мамография
5. Хистологични методи – оцветяване с Н&Е, имунохистохимия, CISH

Приложените оперативни методи на лечение:

1. Ексцизионна биопсия
2. Инцизионна биопсия- дебелоиглена или отворена
3. Квадрантектомия
4. Проста мастектомия
5. Радикална мастектомия
6. Сентинелна биопсия
7. Аксиларна лимфна дисекция

Използваните статистически методи включват:

Карпан Меиер крива на преживяемостта

Карпан-Меиер кривата на преживяемост се дефинира, като вероятността от оцеляване при дадено време на проследяване. При този анализ се допускат три твърдения.

1. Приема се, че във всеки един момент отпадналите от проучването пациенти имат същия шанс за преживяване, като пациентите, които продължават да се проследяват в проучването;
2. Приема се, че шанса за преживяване е еднакъв при пациентите отпаднали рано или по-късно в проучването;
3. Приема се, че всяко събитие възниква в различен индивидуален момент;

Метода на Карпан Меиер включва вероятността от поява на събитие в конкретен момент от време. За всеки период от време вероятността за преживяване се изчислява като броя на пациентите, които са преживели, се разделя на броя пациенти в риск. Пациентите, които са починали, отпаднали или излезли по някаква причина от проучването, не принадлежат към групата пациенти в риск. Това означава, че тези пациенти са изгубени и се смятат за „цензурирани“ и не се броят в знаменателя.

Общата вероятност за преживяване в този момент се смята като се умножат всички вероятности за преживяване по всички времеви периоди преди дадения конкретен момент.¹⁶³

Log rank теста се използва за да се провери нулевата хипотеза, а именно, че при наличие на две кохорти няма разлика между популациите във вероятността за дадено събитие, в който и да е момент. За всеки период от време се изчислява наблюдавания брой събития във всяка група и очаквания брой събития, ако наистина няма разлика между групите. Нарича се още **Mantel–Cox тест**.¹⁶⁴

Използваното от нас критично ниво на значимост е $\alpha = 0.05$. Нулевата хипотеза се отхвърля, когато Р стойността (P-value) е по-малка α .

Cox regression hazard model

Кокс регресията е метод за изследване на ефекта на няколко променливи върху времето, което е необходимо да се случи конкретно събитие. В контекста на резултат, какъвто е смъртта, това се нарича Кокс регресия за анализ на преживяемостта. Този метод приема, че ефекта на изследваните фактори е константа във времето и се измерва в една и съща скала. Този метод дава по добра оценка на вероятността за преживяемост от метода на Kaplan Meier.¹⁶⁵

В един конкретен момент t вероятността за преживяване е равна на риска от смърт (между 0 и 1), а функцията на преживяемостта в момент t е вероятността за преживяване до този момент.

Коефициентите в Кокс регресията са свързани с вероятностите. Позитивен коефициент показва по-лоша прогноза, а негативен коефициент показва протективен ефект върху променливите, с които е свързан.¹⁶⁶

Chi-square тест

Това е често използван тест за номинални (категорийни) променливи. Основно му приложение е тестването за независимост. Нулевата хипотеза гласи, че разпределението на стойностите на едната променлива е независимо от другата, или с други думи, че разпределението на стойностите на единия фактор е еднакво за всяка стойност на втория фактор.

Тест на Фишер

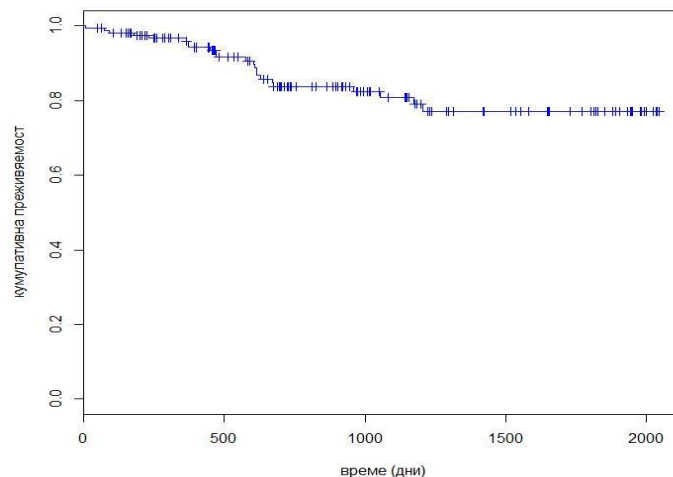
Прилага се също както Chi-square тест при бинарни променливи, когато се търси отговор на въпроса дали дадена променлива е равномерно разпредена сред вариантите на втората променлива. Разликата с Chi-square тест е, че може да се прилага при малко случаи (<5) или ненормално разпределение на променливите.¹⁶⁷

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

РЕЗУЛТАТИ

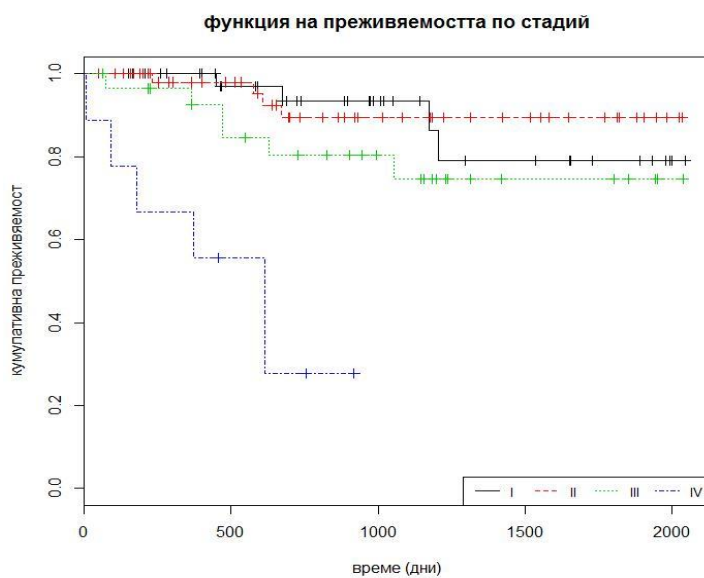
Всички изследвани показатели са тествани за връзка с преживяемостта с log rank метод. Намерени са 8 значими резултата. Някои от по – важните резултати са представени във вид на графика.

1. Обща преживяемост



Фигура 9. Обща преживяемост на пациентите

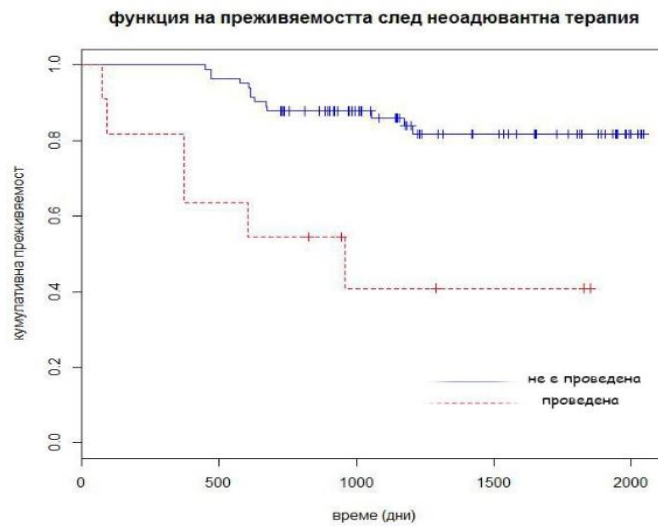
2. Преживяемост според стадия в момента на диагноза



Log rank $p < 0.001$

Фигура 10. Преживяемостта според стадия на пациентите

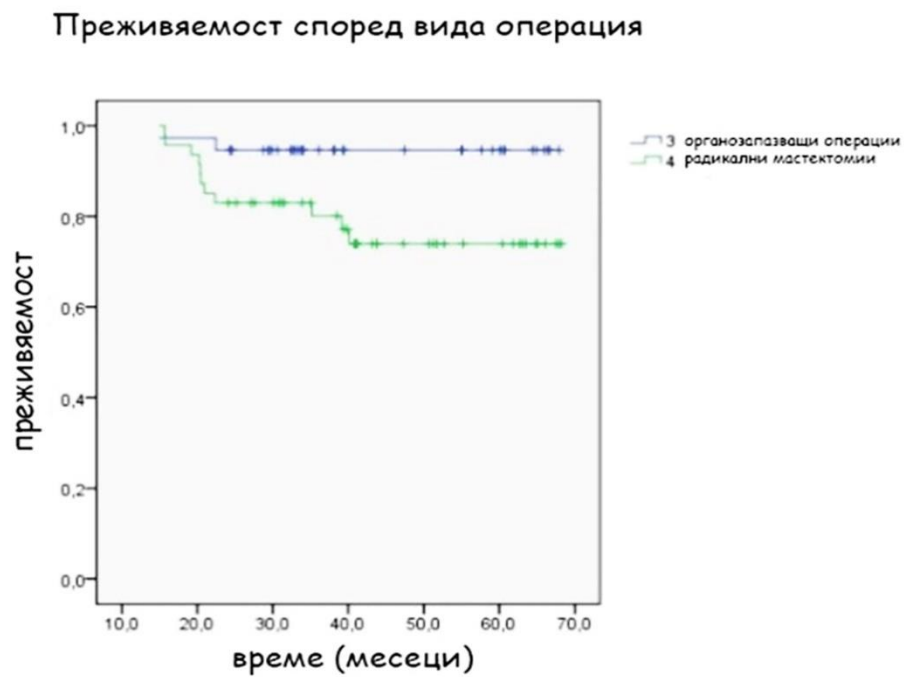
3. Преживяемост на пациентите с и без проведена неoadювантна терапия



Log rank $p < 0.001$

Фигура 11. Преживяемост според провеждането на неoadювантна терапия

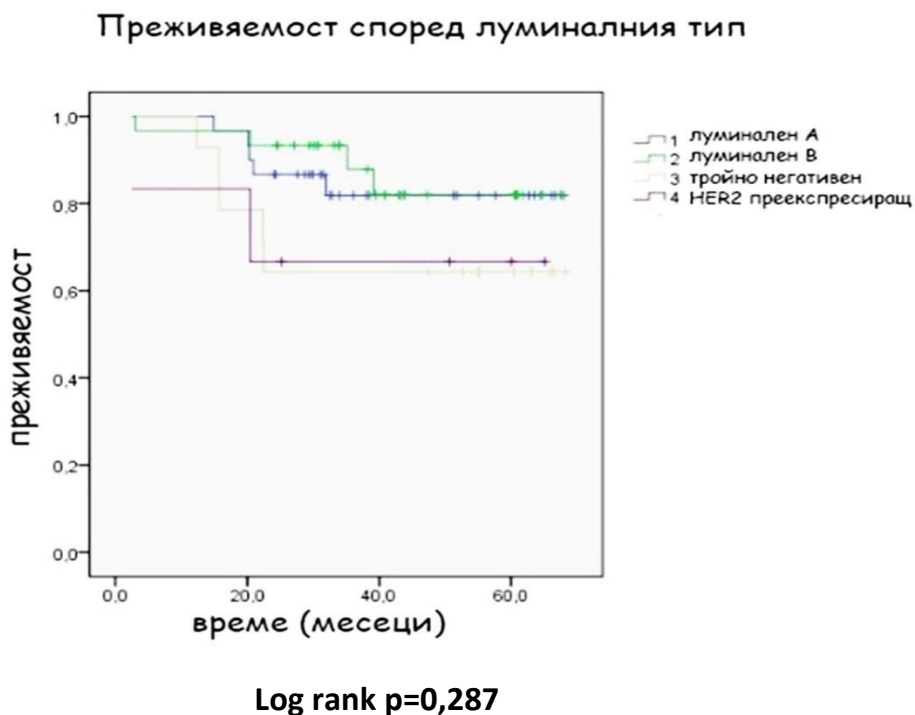
4. Преживяемост на пациентите в зависимост от вида на операцията



Log rank $p = 0,039$

Фигура 12. Преживяемост според вида на оперативната интервенция

5. Преживяемост на пациентите според луминалния тип



Фигура 13. Преживяемост на пациентите според луминалния тип

Сравнителна таблица на значимостта на прогностичните фактори за 2 годишната преживяемост (94 болни) . Значимостта е оценена с Cox regression models.

Таблица 10. Значимост за преживяемостта на факторите свързани с пациента

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

Таблица 11. Значимост за преживяемостта на факторите свързани с тумора

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

Таблица 12. Значимост за преживяемостта на факторите свързани с лечението

Изследвани прогностични фактори	2 годишна преживяемост (p)
неoadювантна терапия	0,001
Вид операция (радикална)	0,058
Брой премахнати лимфни възли	0,928

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

ОБСЪЖДАНЕ

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

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

Характеристики на пациента

1. Възраст

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

2. Стадий

Стадият е основен индикатор за прогнозата на болните. Нашите резултати показват една особена тенденция, а именно, че пациентите във втори стадий изместват тези в първи по преживяемост. Въпреки това статистически значима разлика между преживяемостта в различните стадий съществува. Според нас тези резултати, се дължат на краткия период на проследяване на пациентите – средно 40,2 месеца.

3. Туморни маркери

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

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

Тези два сравнително нови прогностични маркера са доказали своето диагностично и прогностично значение. Малкият брой пациенти и събития, не ни позволи да намерим подходяща разделна стойност за тези две съотношения. В настоящия анализ приложихме най-често използваните разделни стойности, приложими за нашите резултати.^{168,169}

5. Фибриноген

Фибриногенът не е разглеждан досега в този дисертационен труд. Включихме го в анализа на преживяемостта на базата на не малко проучвания върху неговата прогностична стойност за преживяемостта, голяма част, от които публикувани съвсем наскоро.^{170,171} Той доказва своята значимост за преживяемостта, макар и да загуби прогностична стойност, когато в модела се включи стадия на болните.

2. Характеристики на тумора

1. Размер

Размерът на тумора доказва своето значение, както като количествена характеристика (в мм), така и в Т категорията на TNM. Самостоятелното значение на размера на тумора за преживяемостта е доказано многократно. В проучване от 2005 сред повече от 21 000 пациентки е установена зависимост между размера на тумора и преживяемостта, както при пациентките с налични метастази в лимфните възли, така и при тези без.¹⁷²

2. Множественост

Значението на множествеността на раковия процес е много противоречиво, а оценката на значението на множествените карциноми е трудна. Това се дължи на няколко фактора. Първият, от които, е липсата на единна терминология дефинираща множествените карциноми. Разграничаването между мултифокалния и мултицентричния карцином на гърдата се прави топографски, въз основа на допускането, че мултифокалният карцином произхожда от събирателната система на едно каналче (туморите са в един и същи квадрант или на по –малко от 5 см един от друг), докато мултицентричният карцином се появява в събирателните системи на различни канали (туморите са в различни квадранти или на повече от 5 см един от друг)¹⁷³. Използването на квадрантите на гърдата за класификация сега е прието като неподходящо, тъй като се базира на определение, което не е свързано с анатомията на й.¹⁷⁴.

Много проучвания отдават значение и доказват, че наличието на повече от един фокус при карциномите на млечната жлеза, е фактор, оказващ влияние на далечната преживяемост и преживяемостта свободна от заболяване^{175,176}. Някой проучвания дори предполагат различната биология на мултицентричните и мултифокалните карциноми на гърдата в сравнение с единичните карциноми.¹⁷¹

В настоящото проучване е възприето понятието множествен карцином по примера на 7-мата ревизия на TNM. То обхваща множествени синхронни ипсилатерални първични карциноми. В тази класификация е определено и минимално отстояние от 0,5 см между два макроскопски фокуса на даден карцином, за да може да се нарече той множествен.¹⁷⁷

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

3. Диференцираност

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

4. Хистологичен вид

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

5. Инфилтрация на околната тъкан; туморни емболи в лимфни съдове; туморни емболи във венозни съдове; лимфноваскуларна инвазия

Тези показатели не винаги са отбелязвани в патологичния доклад. Лимфноваскуларната инвазия е свързана с наличието на позитивни аксиларни лимфни възли и е независим фактор за прогнозата в много проучвания.^{178,179} Тя е част от индексите за оценка на нодалния статус след позитивна сентинелна биопсия на Memorial Sloan Kettering Cancer Center¹⁸⁰ и Stanford Online Calculator¹⁸¹ В проучване от 2011 Emad A. Rakha и съавтори дори предлагат да бъде добавена към TNM класификацията.¹⁸²

Изследване на Junzo Yamaguchi и съавтори от 2008г. анализира значението за прогнозата на инвазията в околната мастна тъкан, наличието на туморни емболи в лимфни и венозни съдове, както и общата стойност на двата фактора. Изследването обхваща 310 болни с инвазивен дуктален карцином, при които както факторите по отделно така и заедно имат значение за преживяемостта. Наличието на туморни емболи в лимфни и кръвоносни съдове е разглеждано като един фактор.¹⁸³ В нашето проучване също се открива асоциация между инфилтрацията на околната мастна тъкан и нодалния статус (теста на Фишер показва $p=0.042$) и лимфноваскуларната инвазия и нодалния статус ($p=0,001$, χ^2 тест). Въпреки това и двата фактора, както и по отделно наличието

на туморни емболи в лимфни или кръвоносни съдове не показва значимост за преживяемостта.

6. Брой метастатични лимфни възли

Настоящето проучване не успя да намери връзка между метастатичните лимфни възли и преживяемостта. Това най-вероятно е в резултат на краткото време за проследяване на пациентите, тъй като статуса на лимфните възли е един от основните, вече доказани, фактори за прогнозата и все още е основен за препоръчаната лечебна стратегия²⁶.

Съотношението на лимфните възли (Lymph node ratio, LNR) е величина, дефинирана като броят метастатични към общия брой премахнати лимфни възли. Според някои автори тя описва по-добре статуса на лимфните възли в аксилата от N-категорията на TNM-класификацията^{184,185}, тъй като съдържа в себе си и броя премахнати лимфни възли. В проучванията изследващи прогностичната стойност на LNR броят на анализирани лимфни възли е често различен, което се определя и от индивидуалните анатомични особености на пациента. Премахването на необходимостта от минимум 6 изследвани лимфни възела има за недостатък, разнородност на получените резултати, но позволява да се извърши стадиране и при пациенти, при които не е достигнат този минимум. Друга разлика между съотношението на лимфните възли и N-категорията се проявява при наличието на повече от 7 метастатични лимфни възли. N-категорията би поставила такъв болен в група N2, или N3 (ако са повече от 10), докато при използването на съотношението на лимфните възли този болен може да е в почти всяка рискова група в зависимост от общия брой изследвани лимфни възли. Няколко проучвания доказват LNR като по-чувствително в този случай и по-добре корелиращо с общата преживяемост^{186,187}. Ние не можахме да потвърдим значимостта на метастатичните лимфни възли чрез нито един от описаните методи - нито като абсолютна стойност, в N категорията или чрез определянето на съотношението на лимфните възли.

7. ER, PR, HER-2

Рецепторният статус е безкомпромисен прогностичен фактор при карциномите на млечната жлеза. Всеки един от рецепторите е доказал своето прогностично и

предиктивно значение индивидуално и в комбинация между тях, което е довело до създаването на класификация на базата на рецепторния статус.¹⁸⁸ Развитието на изследването на биомаркерите води от своя страна до много възможности за класифициране в зависимост от прогнозата. Откриването и доказването на Ki 67 като прогностичен и предиктивен фактор¹⁸⁹ допълва молекулната класификация на карциномите и води до въвеждането на луминалния тип на туморите. Днес луминалният тип е водещ в определянето на адювантната терапия на пациента.²⁶

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

8. Наличие на in situ компонента

Проучване от 2014г. на М. Dietericha и съавтори изследва наличието на неинвазивна компонента като част от инвазивния дуктален карцином като прогностичен фактор за появата на рецидив. Авторите установяват, че пациентите, при които е налична in situ компонента, са значително по-млади, с по-малки тумори, по-малко засегнати лимфни възли. Нивото на рецидивите сред чистите инвазивни карциноми е по-високо, а времето свободно от далечни метастази по-кратко. Така наличието на неинвазивна компонента се определя като протективен фактор.¹⁹⁰ Ние не откриваме подобни зависимости, а само тенденция за връзка с далечната преживяемост ($p=0,092$, log rank test).

Фактори свързани с околната среда и лечението

1. Хирургично лечение

В анализа на връзката с преживяемостта са включени само пациентите, на които е извършена радикална оперативна интервенция – квадрантектomia или мастектомия. Интересно е да се отбележи, че връзката между преживяемостта и обема на оперативната интервенция достига гранична значимост, когато е приложена Кокс регресия ($p=0,058$), и значима ($p=0,038$), ако се приложи log rank теста и то за сметка на по – лоша преживяемост на болните, при които е извършена мастектомия. Това се обяснява с разпределението на болните според обема на операцията и стадия (таблица 9), където е видно, че мастектомии са извършвани при пациентки с по-напред стадий. Ето защо, когато към

регресионния модел се прибави стадия на пациента, връзката губи своята статистическа значимост и потвърждава световните резултати, че няма статистически значима разлика за преживяемостта в зависимост от обема на оперативната интервенция.¹⁹¹

2. Брой премахнати лимфни възли

Сентинелната биопсия, при която се премахват до 3 лимфни възела при пациенти с клинично негативна аксила, е стандартна практика.²⁶

През 2011г. Armando E. Giuliano и съавтори поставят въпроса за необходимостта от аксиларна дисекция, дори при позитивни (1 или 2) сентинелни лимфни възли. Пациентите са проследявани минимум 5 години, тъй като проучването приключва през 2004г. Основен извод от това изследване е, че сред пациентите с 1 или 2 метастатични сентинелни лимфни възли, самостоятелното приложение на сентинелна биопсия не дава по-лоши далечни резултати (обща и преживяемост свободна от заболяване) в сравнение с аксиларната дисекция.¹⁹² През 2015г. в Европейския Журнал по Хирургична Онкология е публикуван мета-анализ, обхващащ 12 проучвания и 130 757 пациенти от 5 рандомизирани контролирани проучвания и 7 наблюдателни проучвания, които подкрепят тези резултати.¹⁹³

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

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

3. Неоадювантна терапия

Приложението на неоадювантна терапия в лечението на карцинома на млечната жлеза е намерило своето място и доказало своята значимост.¹⁹⁴

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

ТРЕТА ГЛАВА

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

Въведение:

За да обясним същността на биобанкирането ще използваме следните две определения:

1. Биобанките са центрове за събиране, съхранение и разпращане на всички видове човешки биологични материали (като кръв, тъкан, клетки или ДНК) и/или свързаната с тях клинична или изследователска информация, както и биомолекулярните източници (модели и микроорганизми), които могат да помогнат за разбирането на физиологията и заболяванията на хората.
2. Биобанката представлява организирана колекция от човешки биологичен материал и свързаната с него информация, съхранявана за една или повече изследователски цели¹⁹⁵

Към Април 2015 в създадената Световна Дирекция на Биобанките, Тъканните банки и Биологичните хранилища (GLOBAL DIRECTORY OF BIOBANKS, TISSUE BANKS AND BIOREPOSITORIES) от Европа се обединяват 85 тъканни банки, като броят им непрекъснато нараства. Единствената включена биобанка от Балканите е регистрирана в София. Това е Fidelis Research Ltd- частна българско-американска компания за предоставяне на човешки тъкани и обслужване на клинични проучвания.¹⁹⁶

Развитието на знанието за много заболявания зависи от създаването и разработването на човешки тъканни биобанки. През 2006г. в Англия е проведено проучване, което търси областите на изследване на рака на млечната жлеза, които при целенасочено развитие, биха имали най-голямо значение за пациентите. Според това проучване биобанкирането и събирането на свързана информация е основно за развитието, тестването и въвеждането на нови методи за откриване на маркери, определящи поведението на рака. По този начин биха се подобрили методите за предсказване и прогнозиране на естествената история на

заболяването.¹⁹⁷ За следващите 5 години в Националната Биобанка на Обединеното Кралство са регистрирани 500 000 участника от 22 центъра от цялата страна.¹⁹⁸

Според доклада на Европейската комисия за биобанките в Европа от 2012г. биобанките най-често:

1. Събират и съхраняват не само медицинска информация, но също така и епидемиологична информация (за околната среда и начина на живот);
2. Те не представляват статични проекти , тъй като биологичните материали обикновено се събират продължително време;
3. Свързани са с провеждането на настоящи и бъдещи проучвания;
4. Създадени са по начин, който запазва анонимността на участниците, но и при определени условия участниците могат да се разкрият с цел да им се предостави клинично значима информация;
5. Включват етични комисии и процедури, които предпазват правата и интересите на донорите;¹⁹⁹

Методология на създаването на биобанка за карциноми на млечната жлеза

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

Заложени за изследване са фактори от повечето класификационни групи, за които стана дума по-рано в настоящия научен труд. Пациентите, включени в тъканната банка са диагностицирани и лекувани в Клиника по хирургия „Проф. Александър Станишев“ на УМБАЛ „Александровска“ и Клиника по хирургия на УМБАЛ „ Царица Йоанна –ИСУЛ“. При постъпването на пациент, с доказан карцином на млечната жлеза или съмнение за такъв, лекуващият лекар запознава пациента с диагностичния и терапевтичен план и възможностите за участие в тъканната банка. На всички пациенти се предоставя разработена специално за

биобанката информация за болния (Приложение 1), в която са разяснени ползите, целите и методите за създаването на тъканни банки. Предоставени са информирани съгласия за взимане на част от туморна тъкан и кръв от пациента, както и за изследване на генетичен материал (Приложение 2 и 3).

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

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

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

Взетите проби се поставят в крио-епруветки с РНК- стабилизиращ реагент и се съхраняват в хладилник на 4 градуса до два дни след взимане на пробите. Кръвните проби се взимат преди операцията, в случаите на доказан карцином или в ранния следоперативен период, ако диагнозата е поставена интраоперативно, и се съхраняват в хладилник в рамките на същия ден. След събиране на всички проби и информирани съгласия те се доставят в Центъра по Молекулна Медицина (ЦММ) към Катедра по химия и биохимия на Медицински Университет София, където се изолира ДНК от кръвните проби. **Изолиране на ДНК:** Изолирането на ДНК от венозна кръв се осъществява при използване на полуавтоматизирана апаратура за изолиране с магнитни частици (Chemagic Magnetic Separation Module) и с използване на китове за изолиране на ДНК от кръв (лимфоцити) (Chemagic DNA Blood kits), на фирмата производител, следвайки установените лабораторни протоколи и препоръките на производителя (Chemagen AG). По този начин се създава ДНК и плазмена биобанка от периферна кръв.

Тъканните проби се съхраняват чрез дълбоко замразяване на -80°C .

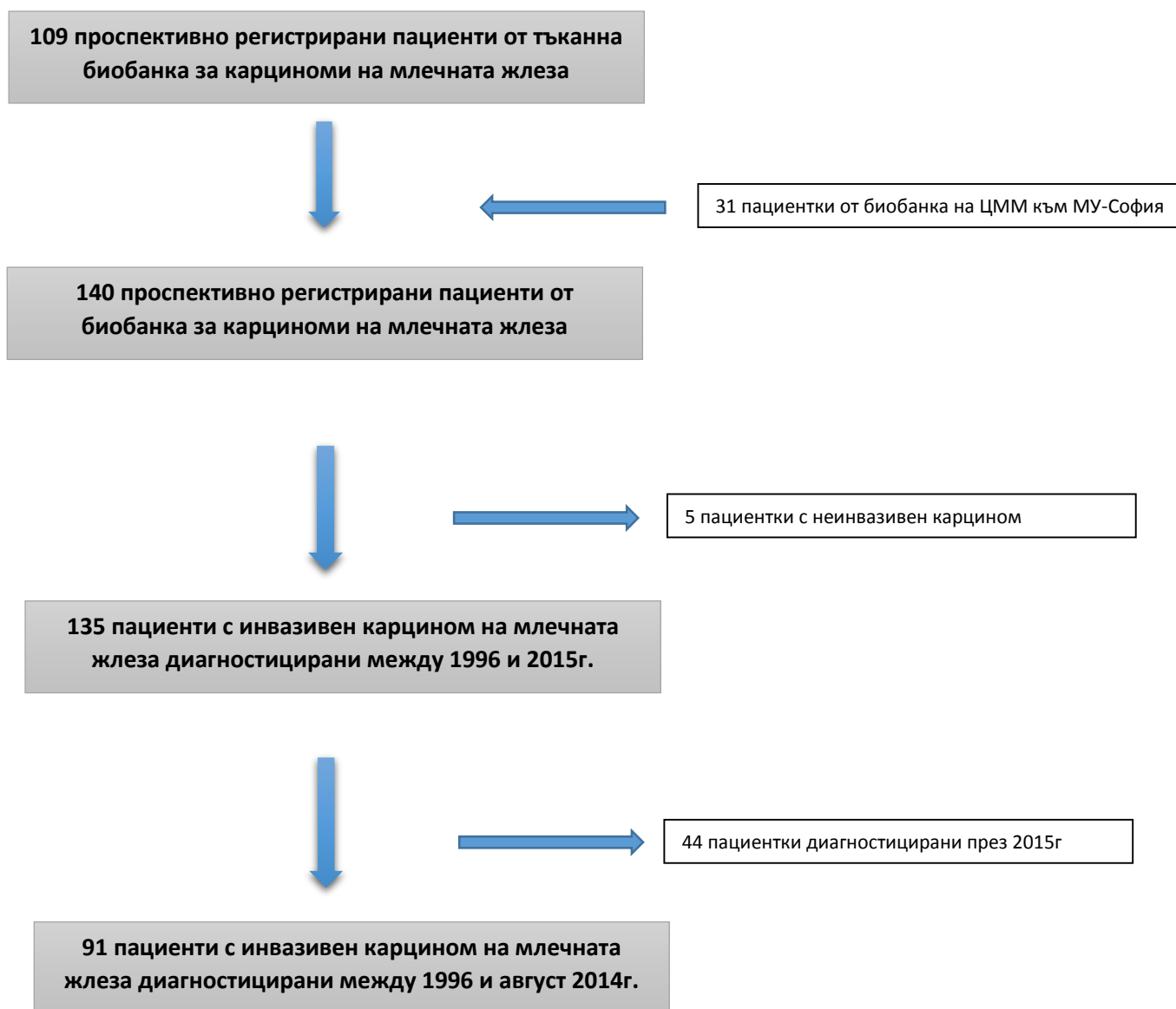
Допълнително на всеки пациент се предоставя създадена по проекта анкетна карта (разработена от ЦММ на МУ-София, не е показана) съдържаща въпроси, относно рисковите фактори за развитие на карцином на млечната жлеза, наследствената му предразположеност и диетичният му режим. Анкетната карта, заедно с епикризата,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

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

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

Протокол на изследванията

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



Фигура 14. Протокол на включване и изключване на пациенти в изследването на прогностичните фактори.

Характеристика на пациентите

На таблица 13 е представено разпределението на пациентите според техните клинични и патологични характеристики. Разгледани са както всички пациенти включени в създадената биобанка (заедно с още 31 пациенти на ЦММ), така и характеристиките на 91 пациенти, при които е извършен анализ на прогностичните фактори (пациентки с инвазивен карцином, за които е минала поне 1 година от датата на диагноза). В таблица 13 са описани характеристиките на пациента и тумора при първото поставяне на диагнозата (отнася се за билатералните и рецидивните карциноми).

Таблица 13 .Характеристики на пациентите

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

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

В създадената биобанка се извършват изследвания в няколко направления.

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

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОГНОСТИЧНИТЕ ФАКТОРИ СВЪРЗАНИ С ОКОЛНАТА СРЕДА

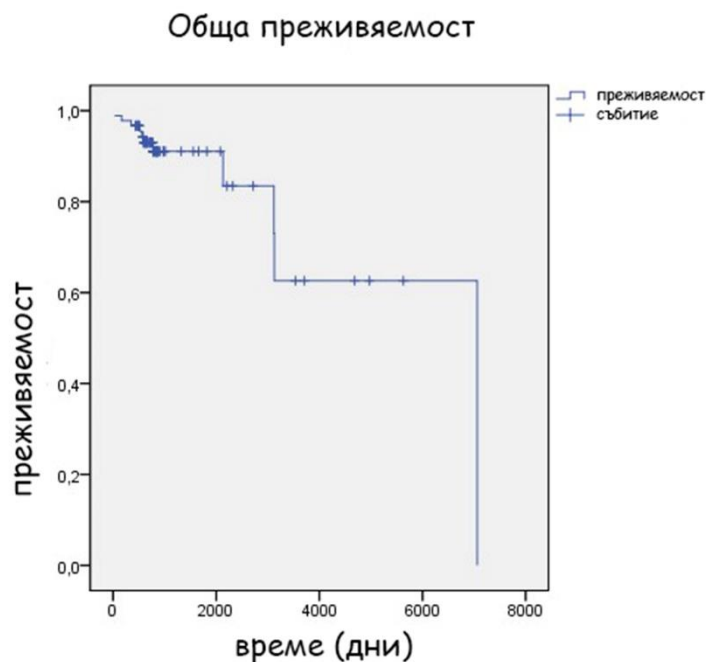
За анализ на факторите свързани с околната среда информация е взета от попълнените от болните анкетни карти. В анализа за оценка на прогностичната стойност са включени 91 пациента (от 140), за които е минала поне 1 година от датата на диагноза.

Статистически методи

Използвани са статистически методи за оценка на връзката на даден фактор с преживяемостта като Kaplan Meier, log rank, Cox regression hazard model, които са вече описани. За оценка на връзката между отделните фактори е използван теста на Фишер.

РЕЗУЛТАТИ

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



Фигура 15. Обща преживяемост на пациентите от биобанката

За оценка на прогностичната стойност на даден фактор използвахме влиянието му върху общата преживяемост (за събитие се приема смъртта на пациента) или върху преживяемостта свободна от заболяване (за събитие се приема смъртта, появата на рецидив или метастаза). С Fisher exact test изследвахме и връзката между даден фактор и появата на далечни метастази и рецидиви (91). За оценка на връзката на даден фактор с други характеристики на тумора използвахме данни за всички 140 пациентки от биобанката.

1. Брой раждания

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

2. Продължителност на кърменето

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

3. Прием на хормони

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

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

4. Следващите изследвани фактори, могат да се обединят като фактори свързани с диетата. Това са приемът на месо, плодове и хляб и тестени изделия.

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

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

5. Прием на алкохол

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

6. Тютюнопушене

Тютюнопушенето е представено като категорийна характеристика, определена както следва: болни, които никога не са пушили и болни, които са пушили или пушат в момента на диагнозата. Не се установява статистически значима връзка между тютюнопушенето и далечната преживяемост. Установява се статистически значима връзка само между тютюнопушенето и тройно негативния субтип ($p=0,025$).

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

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

ОБСЪЖДАНЕ

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

Продължителност на кърменето:

До колкото кърменето е въпрос на избор, а не на биологична възможност, можем да го разглеждаме като външен фактор за човека. Едва през последните години е изследвана връзката между кърменето и далечните резултати при болните. М. L. Kwan и съавтори намират връзка между продължителността на кърменето и прогнозата на болните. Те установяват, че кърменето като бинална променлива е свързано с намален риск от рецидив²⁰⁰. В Швеция проспективно проучване обхващащо 634 пациентки, изследва как продължителността на кърменето влияе върху туморните характеристики и риска от ранен рецидив. Резултатите от това проучване показват, че: продължителност на кърменето по-малко от 12 месеца при първото дете се свързва с по-голяма честота на хормон позитивните тумори $p=0.02$; по-висок риск от ранни рецидиви се наблюдава при продължителност на кърменето над 12 месеца при първо дете ($p=0.001$), обща продължителност на кърменето над 12 месеца ($p=0.008$), както и наличие на много кърма ($p=0.001$); при пациентките с много малко или без кърма не се наблюдават ранни рецидиви.²⁰¹ Настоящото проучване не успява да докаже връзка единствено между наличието на туморни емболи в лимфни възли и кърменето изобщо, но тази асоциация също трябва да се постави под съмнение, заради малкия брой жени, които не са кърмили никога- само 7.

Диетичен режим.

Установено е, че диетичното хранене, включително по-големият прием на плодове и зеленчуци, зърнени храни, птиче месо и риба е свързано с намален риск от смърт. Връзката на предоперативната диета с рецидивите обаче не

достига статистическа значимост^{202,203} Други проспективни проучвания докладват, че консумацията на плодове и зеленчуци и най-вече някои техни съставки, като каротени и фибри, подобряват прогнозата, но резултатите също не са значими.²⁰⁴ За разлика от настоящето проучване в много други изследвания диетичният режим е изследван след поставяне на диагнозата²⁰⁵, и е с доказано влияние върху появата на рецидиви.²⁰⁶

Интересни тенденции се откриват при анализа на приема на алкохол.

Ще разгледаме две проучвания от 2013г., които изследват връзката между приемът на алкохол преди диагнозата и рецидивите и далечната преживяемост при болни с карцином на млечната жлеза. И двете проучвания са проспективни и обхващат голям брой пациенти.

Първото, проведено в Америка включва 22,890 болни диагностицирани с инвазивен карцином. Изследвана е връзката между консумацията на алкохол преди и след поставянето на диагнозата и появата на рецидиви и далечната преживяемост. Това проучване подобно на нашето не открива линейна връзка между употребата на алкохол преди диагнозата и преживяемостта. Не само това. Сравнявайки неупотребяващите с умерено употребяващите алкохол се установява подобрена преживяемост при пациентите с умерена консумация (3-6 питиета на седмица) и никаква асоциация с преживяемостта за приемащите повече от 10 питиета на седмица²⁰⁷.

Второто проучване е проведено в Дания и обхваща само 1052 жени от проспективна кохорта от 29,875. Авторите откриват повишен риск, макар и незначително свързан със специфичната преживяемост. Не се установява връзка между алкохолът и специфичните хистологични видове, но употребата на алкохол преди диагнозата се свърза с по-висок риск от рецидив при провеждане на Кокс регресионен анализ, когато приемът на алкохол се разглежда като бинарна променлива (сравняват се приемът на по-малко от една алкохолна единица на ден с приемът на повече от 2 единици).²⁰⁸

Тютюнопушене

Връзката между тютюнопушенето и прогнозата е разгледана в първа глава на настоящия труд, затова приемаме неговото значение като негативен

прогностичен фактор. Връзката между тютюнопушенето и хистологичния вид на карцинома е многократно изследвана. Повечето проучвания не успяват да намерят статистически значима връзка дори и при целенасочено изследване на тройно негативните карциноми,²⁰⁹ но има и такива, които намират връзка и то най-вече при настоящите пушачи.²¹⁰

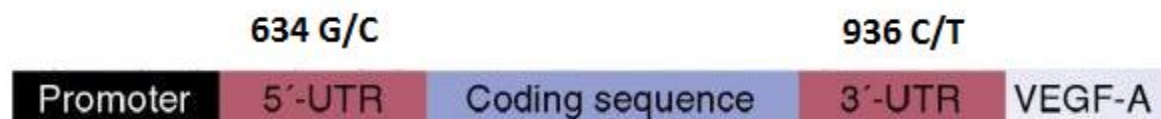
Извод от настоящето проучване е, че факторите на околната среда имат много противоречив ефект върху прогнозата на пациентите. Причина за това е комплексното действие на много показателни, голяма част от които са трудни за оценка или дори неизвестни. Например в попълваната анкетна карта няма въпрос, оценяващ психичното състояние на пациента, а това е фактор с доказано значение. Друга причина е разнородността на публикуваните изследвания по отношение изследваните категории, разделянето във времето и периода на проследяване (крайните точки на проучванията). Непрекъснато нараства броят проучвания изследващи значението на факторите на околната среда за далечните резултати, но заключенията от тях не остават, окончателни. Това отваря бъдещо поле за изследване в тази област на големи описателни проучвания и добре организирани рандомизирани контролирани проучвания.²¹¹

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОГНОСТИЧНИТЕ ФАКТОРИ СВЪРЗАНИ С ЧОВЕКА

ПОЛИМОРФИЗМИ НА ВАСКУЛАРНИЯ ЕНДОТЕЛЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР

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

Локализацията им в гена на VEGF е показана на фигура 16.



Фигура 16. Локализация на изследваните полиморфизми на васкуларния ендотелен растежен фактор

Полиморфизмът -634G > C е разположен в 5'-края на гена на VEGF, а полиморфизмът +936C > T в 3'- края. И двата полиморфизма повлияват експресията на гена. За първият (-634G > C) е известно, че повлиява транслацията. В резултат на това -634GC генотипа се свързва с по-висока експресия на VEGF, а -634GG със значително по-ниска.²¹²

При вторият полиморфизъм, при който цитозин е заменен с тимин на 936 то място от 5' края (+936C > T), се загубва потенциалното място за връзка с AP-4. AP-4 е транскрипционен фактор, който по принцип усилва експресията на гените.²¹³ Така при наличие +936C > T серумната концентрация²¹⁴ и експресията в тумора на VEGF намаляват.⁷⁰ Не открихме данни тези полиморфизми да повлияват по друг начин върху VEGF.²¹⁵

Можем да заключим, че наличието на единият от изследваните полиморфизми - 634G>C повишава експресията на VEGF, а при наличието на другият – 936 C>T тя намалява.

Има проучвания, доказващи ролята на rs3025039 (+936C>T) като протективен фактор за развитие на карцином на млечната жлеза²¹⁶. Мета-анализ от 2014г. включващ 13 проучвания, 6,879 пациента и 7,219 контроли също подкрепя протективната му роля.²¹³ Други проучвания не откриват асоциация с риска за развитие на карцином, но откриват статистически значима връзка с по-кратка преживяемост свободна от заболяване в уни и мултивариантни анализи.²¹⁷

Накрая мета-анализ от 2015г. базиран на 10,340 пациенти с карцином на гърдата и 10,388 контроли доказва, че и двата изследвани полиморфизма повлияват предразположението към карцинома на млечната жлеза и растежа на тумора, но по противоположен начин. Според този мета-анализ замяната на гуанозин с цитозин при -634G>C няма връзка с развитието на карцином на млечната жлеза. Все пак, когато се вземе в предвид расовата принадлежност на пациентите се установява, че -634G алела е свързан с намалена предразположеност към карцином при азиатци, а пациенти с генотип -634GG имат по-малък размер на тумора при диагноза (по-ниска серумна концентрация на VEGF).

Пациенти с генотип +936CC (хомозиготи по честия алел) имат значително по-голяма предразположеност към развитие на карцином на млечната жлеза и , при диагноза, значително по-голям размер на тумора, от колкото пациенти с други генотипове.²¹⁸

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

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Характеристики на пациентите

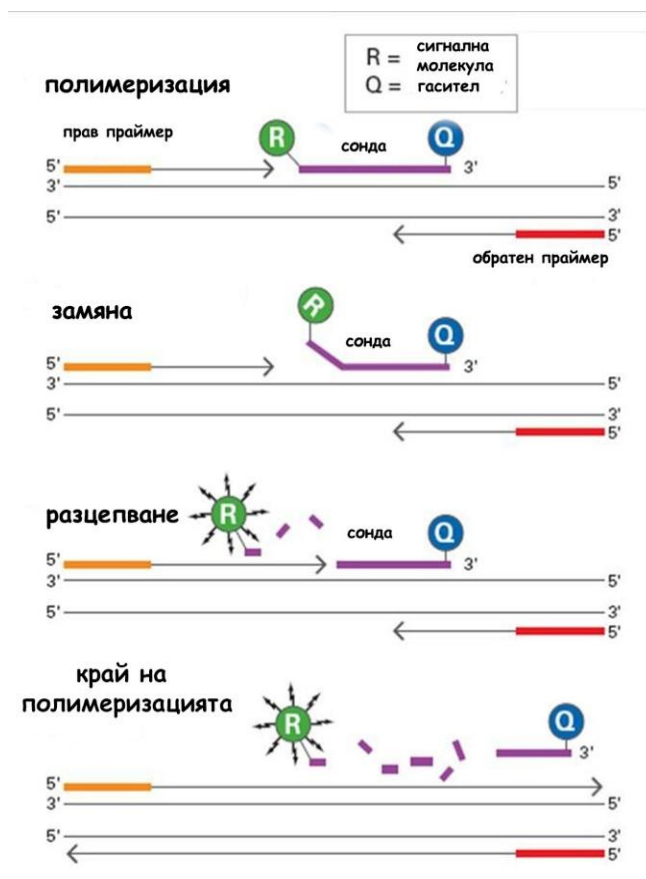
За оценка на прогностичната стойност на двата полиморфизма са използвани данни за 91 пациенти от тъканната биобанка за карцином на млечната жлеза, вече описана в настоящия труд. Това са пациенти, за които са минали поне две години от датата на диагноза. Връзката на полиморфизмите с други фактори на тумора е оценена при всички 140 пациенти от биобанката. Характеристиките и на двете групи пациенти са разгледани в таблица 13.

Обработка на пробите

Пробите на пациентите и контролите са извлечени, обработени и съхранени, съобразно вече установените правила за изграждане на биобанка и съпровождащата я клинична база данни, след получаване на информирано съгласие от участниците в изследването.

Откриването на еднонуклеотидни полиморфизми (SNP) в гена за VEGF (634 G>C; +936 C>T) е извършен на апарат за PCR в реално време с помощта на TaqMan™ (Life Technologies) технология. Апарата за PCR в реално време има две функции: увеличава и намалява температурата, което води до денатурация и ренатурация на пробите и отчита флуоресценцията. В епруветка се поставя изолираната ДНК, реакционен буфер, дестилирана вода, праймерите, сонда, свободни нуклеотиди и Taq полимераза.

TaqMan® Real Time PCR представлява метод за количествена протеазна верижна реакция, който позволява мониториране на процеса в момента на извършването му. Тази реакция се базира на отчитане на флуоресценцията, получена от дадена сигнална молекула. Тази флуоресценция нараства с прогресирането на реакцията. Флуоресцентната сигнална молекула съдържа багрило свързано със специфична олигонуклеотидна последователност (сонда). Освен сигналната молекула сондата е свързана и с гасител.



Фигура 17. Схема на TaqMan® PCR в реално време

Флуоресцентната проба, комплиментарна на целевата последователност (изследвания сноп), се добавя към разтвора за PCR. Сигналната молекула е свързана с 5' края, а гасителя е свързан за 3' края. Докато сондата не е хидролизирана, гасителя и флуоресцентната част са близо една до друга, на отстояние равно само на дължината на пробата. Това не може напълно да маскира флуоресценцията и се наблюдава определено фоново ниво. По време на PCR, сондата се свързва специфично между двата праймера за вътрешна област на продукта PCR. След това Taq полимеразата разцепва сондата и освобождава сигналната молекула от гасителя (фигура 17).

Това води до увеличаване на флуоресценцията над фонвата и може да бъде отчетено. Този процес се повтаря във всеки цикъл и не пречи на натрупването на PCR продукт. Процесът следва следната последователност:

- 1) Конструиране на необходимите праймери и алел-специфични проби
- 2) Намножаване на изследвания фрагмент от ДНК, при стриктно спазване на протокола на производителя за състав на реакционната смес и условия на реакцията за съответните комбинации от праймери и алел-специфични проби
- 3) Анализ на резултатите от реакцията със специализиран софтуер за отчитане на генотипирането. Подробно целият този процес е вече описан.²¹⁹

Статистически методи

Освен вече описаните статистически методи Cox regression hazard models, Kaplan Meier, Log rank, Fisher exact test в настоящата част използвахме ANOVA и T-test.

Анализ на вариабилността или ANOVA е статистически метод използван за изследване на разликите между две или повече средни стойности. ANOVA изпитва неспецифичната нулева хипотеза, че всички средни стойности на даден показател в различни популации са равни. ANOVA теста не показва, кои средни стойности се различават статистически от други, а само дали съществува статистически значима разлика между поне две средни стойности за даден показател.²²⁰

T-test- отговаря на същите въпроси като ANOVA теста, но може да се прилага само за сравняване на 2 групи. Приема се като подвид на ANOVA.²²¹

РЕЗУЛТАТИ

Разпределението на генотиповете е представено на таблица 14

Таблица 14. Разпределение на пациентите според техния генотип

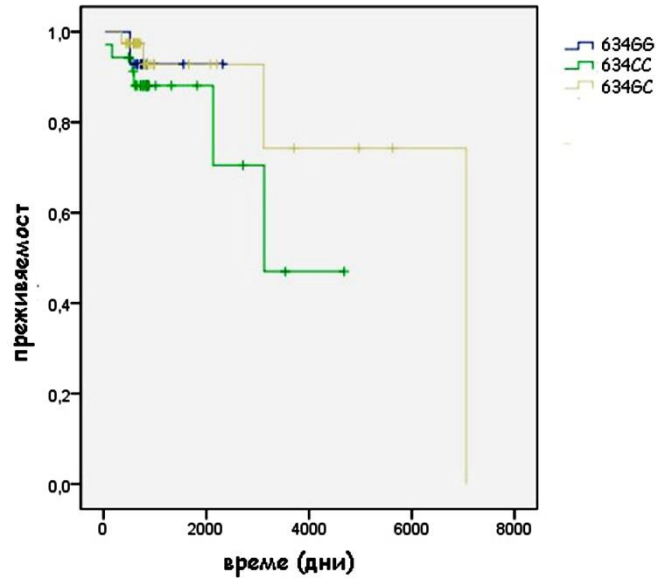
полиморфизъм	брой (140)	%	брой (91)	%
rs2010963/ -634G>C	136	97,1	88	96,7
634CC	26	18,6	14	15,4
634GC	61	43,6	35	38,5
634GG	49	35,0	39	42,9
rs3025039/ 936C>T	137	97,9	90	98,9
936TT	3	2,1	1	1,1
936CT	32	22,9	19	20,9
936CC	102	72,9	70	76,9

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

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

В настоящия анализ не успяхме да докажем значение за преживяемостта на нито един от полиморфизмите. Все пак ограниченията на настоящето проучване на прогностичните фактори важат и тук – малък брой пациенти и кратък период на проследяване. Зависимостта на преживяемостта от генотипа на пациентите са представени на фигура 18 и фигура 19.

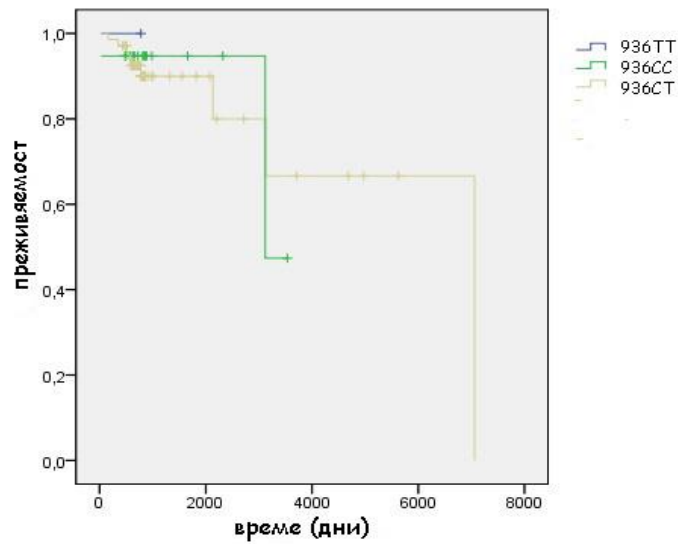
Функция на преживяемостта в зависимост от генотипа
rs2010963



Log rank p=0,430

Фигура 18. Функция на преживяемостта в зависимост от генотипа при - 634G>C

Функция на преживяемостта в зависимост от генотипа
rs3025039



Log rank p=0, 953

Фигура 19. Функция на преживяемостта в зависимост от генотипа при +936 C>T

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

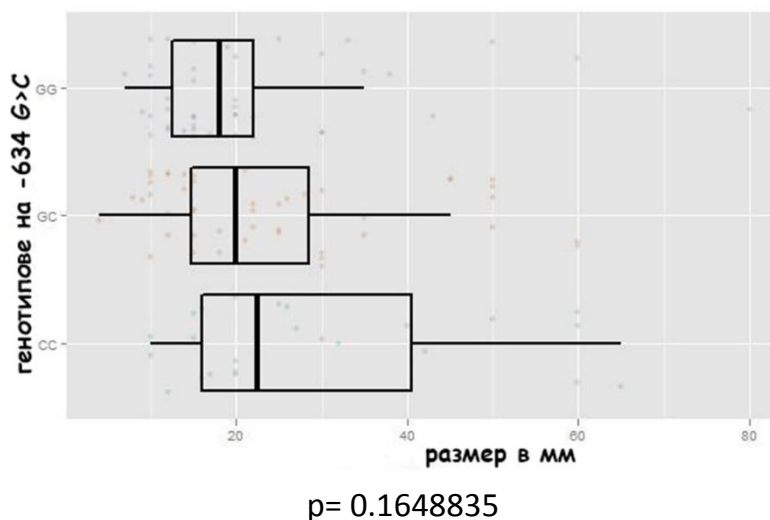
rs 2010963 / -634 G>C

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

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

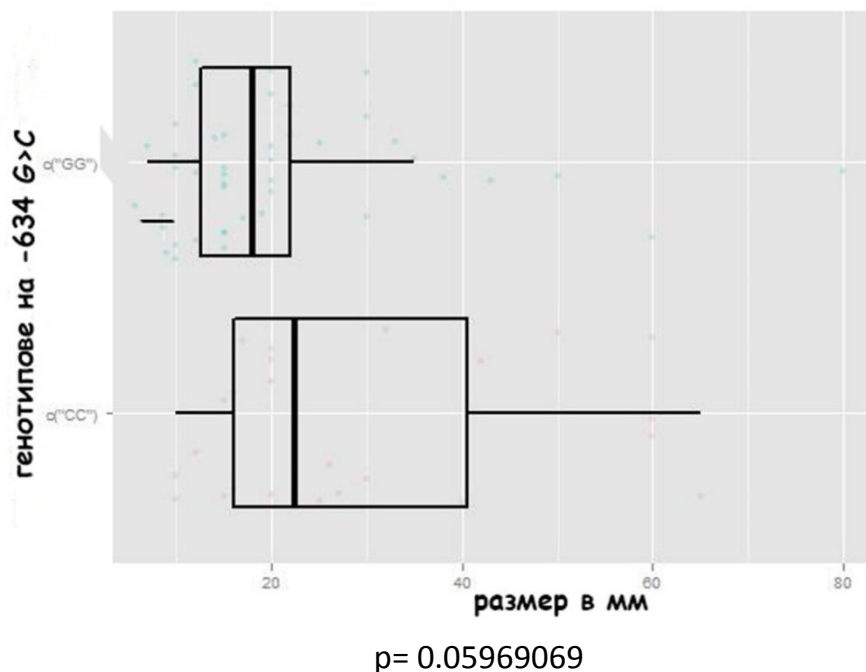
За да представим нагледно тази връзка използвахме ANOVA test, която ни позволи да включим в модела количествена променлива, каквато е размера на тумора в мм, и да разгледаме размерите на тумора в трите генотипни групи.

Резултатите са показани на фигура 20. Когато се сравнят трите генотипа, не се установява статистически значима разлика в средните стойности на размерите.



Фигура 20. Зависимост между размера на тумора и генотипа, ANOVA

Когато се сравнят само двата хомозиготни генотипа, резултатите са по-близко до значими (фигура 21).



Фигура 21. Зависимост между размера на тумора и генотипа, t-test

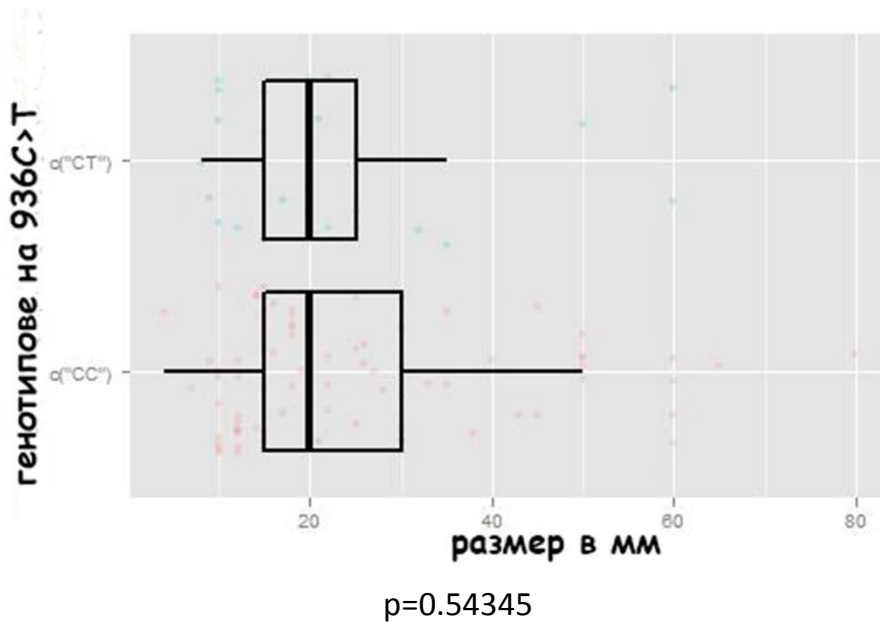
Може да се заключи, че пациентите, при които е открит -634 G>C полиморфизъм, имат по-голям размер при диагноза, което може да се свърже с повишена експресия на VEGF и се потвърждава от литература.

rs3025039 / +936C>T

Макар да не успява да докаже своята значимост при анализа на преживяемостта, когато се разглежда наличието на събития по групи се установява, че има връзка между наличието на събитие и генотипа на пациента (p=0,048). Тази връзка обаче се дължи на факта, че при 2 от 3^{-те} пациентки с генотип 936ТТ вече има регистрирани метастази. 13 от останалите 16 болни с метастази или рецидив са с генотип 963 СС. Откритата значимост на връзката на генотипа с появата на рецидиви и далечни метастази в този случай се дължи най-вероятно на малкият брой пациенти и вероятно **няма реална стойност.**

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

Генотипът 963 CC преобладава и сред множествените карциноми, макар тази връзка да не достига статистическа значимост ($P=0,087$). Не се установява никаква зависимост между този полиморфизъм и размера на тумора (Фигура 22).



Фигура 22. Зависимост между размера на тумора и генотипа , t -test

ОБСЪЖДАНЕ

Ползата от изследването на тези полиморфизми се крие в хипотезата, че растежа на тумора зависи от ангиогенезата. Основоположник на тази теория е Folkman, който през 1971 публикува в “New England Journal of Medicine” хипотезата, че ако туморния растеж зависи от ангиогенезата, то инхибирането на ангиогенезата може да е терапевтично.²²² Теорията предсказва, че туморите не биха били способни да нарастват над 1-2мм, без непрекъснато да си изграждат нови кръвоносни съдове. Тази концепция е сега широко приета и подкрепена от експериментални проучвания и клинични наблюдения. Една година по-късно в лабораторията на Folkman се докладва първият количествен метод на измерване на ангиогенезата. Той свързва неовакуларизацията при човешки мозъчни тумори с диференцираността на тумора.²²³

Проучване от 2011г. сред 120 пациенти установява, че повишените средни серумни нива на VEGF са значително по-високи при пациенти с карцином на млечната жлеза, отколкото при пациенти с доброкачествени заболявания (т.е. той е диагностичен маркер). Също така авторите докладват позитивна корелация между серумното и тъканното ниво на VEGF. Повишените стойности на този растежен фактор се асоциират с нискодиференцирани тумори с по-големи размери, метастази в аксиларните лимфни възли, отрицателен хормонален статус, позитивна експресия на HER2 и по-лоша прогноза.²²⁴ Това е само едно от проучванията доказващи значението на VEGF като прогностичен фактор.²²⁵ Други изследвания предполагат неговата роля в таргетната терапия²²⁶

Бевацизумаб (Bevacizumab, BEV) е моноклонално антитяло, което се свързва с VEGF и го неутрализира.²²⁷ През Февруари 2008г. е одобрен за лечение от U.S. Food and Drug Administration (FDA) в комбинация Паклитаксел за лечение на пациенти с метастатичен HER2-негативен карцином на млечната жлеза, които още не са получили химиотерапия за метастазите. През Ноември 2011 U.S. Food and Drug Administration съобщава, че премахва карцинома на гърдата от индикациите за лечение с Бевацизумаб, защото не е доказал своята ефективност и безопасност. Самото лекарство не е премахнато от пазара и лекарите могат да изберат да го приложат, независимо дали е одобрено за употреба при метастатичния карцином на гърдата или не.²²⁸

В Българските “Национални медицински стандарти за системно лекарствено лечение, оценка на лечебен ефект и проследяване на злокачествени солидни тумори при възрастни” от 2015г. Бевацизумаб не е изключен от лечението на карцинома на млечната жлеза. Той може да се приложи при I^{Ba} линия химиотерапия при пациенти, получавали адювантни антрациклини в комбинация с Паклитаксел; химиотерапия при резистентност на антрациклини и таксани.²²⁹

През 2014 г. на конгреса на Европейската Асоциация по Медицинска Онкология се докладва обзор на значението на VEGF, като биомаркер. Включени са 1713 пациенти с налични данни за серумната стойност на VEGF от три различни проучвания. Едно от проучванията добавя Бевацизумаб към адювантната терапия, а две проучвания го прилагат като първа линия химиотерапия. Бевацизумаб подобрява преживяемостта свободна от събития при пациенти с над средното серумно ниво на VEGF, но не и при тези с под средното ниво. Това изследване отново поставя въпроса за ролята на Бевацизумаб при карцинома на млечната жлеза, особено при **селектирани пациенти**. Авторите предлагат да се преоцени значението му за терапията, като прилагането на Бевацизумаб да се основава на измерването на VEGF.²³⁰

Проучване от 2014г. също открива приложение на Бевацизумаб, но в неоадювантната терапия. Това изследване доказва, че в стадий II и III на тройно негативни карциноми, добавянето на Бевацизумаб към неоадювантната терапия повишава патологичния отговор²³¹. През следващата година резултатите от NSABP B-40 показват, че добавянето на Бевацизумаб в неоадювантното лечение на HER2 негативни карциноми подобрява и общата преживяемост.²³²

През 2015г. P.R. Blank и съавтори публикуват анализ на съотношението цена – полза при изследването на **VEGF–A** като предиктивен фактор за отговор към Бевацизумаб (като част от неоадювантната терапия при ранен HER-2 негативен карцином на млечната жлеза). Ползата от лечението се оценява в **години живот според качеството (quality-adjusted life-years, QALYs)**. Те установяват, че цената на лечение на един пациент варира от 37'042 евро без Бевацизумаб, до 78'367евро, ако Бевацизумаб се приложи в лечението на всички пациенти. Лечението без Бевацизумаб добавя 14.031 **години живот според качеството за пациент**. Ако прилагането на Бевацизумаб се ръководи от нивото на VEGF-A се

достигат между 14.220 (при използването на гранична концентрация от 450 pg/mL) и 14.235 (при използването на гранична концентрация от 339 pg/mL) **години живот според качеството**. Когато се сравни с терапията без Бевацизумаб, най-предпочитаната стратегия (при гранична стойност 450 pg/mL) оскъпява лечението с 11'191 евро и дава допълнително 0.189 (14.220-14.031) **години живот според качеството** за пациент. В заключение на своя анализ авторите предполагат, че тестването на VEGF-A може да бъде чувствителен метод, който да ръководи прилагането на Бевацизумаб в лечението на хормон позитивен и HER2-негативен карцином на млечната жлеза.²³³

Проучване от 2011 година изследва полиморфизмите на VEGF във връзка с терапията с Бевацизумаб. То не установява връзка на полиморфизмите с преживяемостта, но авторите обясняват това с малкия брой събития. Полиморфизмът - 634 G > C е значително свързан с токсичността, която е най-голяма при пациентите с -634CC генотип. Анализ на +936C > T полиморфизма показва, че хомозиготите по честия алел +936CC имат тенденция за по-кратко време до прогресия на заболяването, в сравнение с носителите на другия алел.²³⁴ В нашето проучване метастази и рецидиви са наблюдавани при 18 пациенти, от които са 13 хомозиготи по честия алел +936C, 3 са хетерозиготи и 2 са хомозиготи по T алела.

През 2015 г Alexander Hein и съавтори публикуват проучване върху ролята на генетичните варианти на VEGF за неoadювантната терапия при пациенти с карцином на млечната жлеза получаващи Бевацизумаб. Те изследват 125 полиморфизма за способността им да предвидят патологичния отговор при пациенти получаващи стандартна химиотерапия и такива, при които към терапията е добавен Бевацизумаб. Те установяват 5 полиморфизма свързани с подобър отговор към Бевацизумаб, но когато взимат под внимание множественото тестване на променливите, тази връзка се загубва. Тогава авторите разделят туморите по групи в зависимост от рецепторния статус. Те предполагат, че лечебната ефективност може да зависи от рецепторния статус при 5 от 10^{-te} полиморфизма с най-малка стойност на p, като този ефект е най-голям при тройно негативните карциноми. Пациенти хомозиготи по честия алел с тройно негативни

тумори имат полза от лечението с Бевацизумаб, докато при другите пациенти такава полза не се отчита. Първи в този списък е rs3025039.²³⁵

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

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

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

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

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОГНОСТИЧНИТЕ ФАКТОРИ СВЪРЗАНИ С ТУМОРА

ПРОТЕОМЕН ПРОФИЛ НА ТУМОРНАТА ТЪКАН

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

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Характеристики на пациентите:

Туморни тъканни проби от 49 пациентки от създадената и описана по-горе биобанка, съхранявани в RNA-later стабилизиращ разтвор, бяха предоставени за протеомен анализ в лаборатория към Катедра по биологични науки на Университета в Есекс, Обединеното кралство. Всички туморни проби са идентифицирани и свързани с хистологични и клинични данни.

Тъканните проби са от 49 болни (една пациентка е с билатерален карцином) на възраст от 31 до 84 години (средно 58,5), подбрани на случаен принцип от биобанката.

Характеристиките на болните са представени в таблица 15 (49 пациенти и 50 тъканни проби):

Таблица 15. Характеристики на пациентите, включени в анализа на протеомния профил

Фактор	Брой	%
възраст	50	100
до 39	5	10
39-69	36	72
над 70	9	18
стадий	44	88
0 (ин ситу)	2	4
I ^{ви} стадий	14	28
II ^{ри} стадий	14	28

III ^{ти} стадий	10	20
IV ^{ти} стадий	4	8
луминален тип	44	88
луминал А	19	38
луминал В	14	28
тройно негативни	6	12
HER2 преекспресиращ	5	10
диференцираност	42	84
G1	3	6
G2	24	48
G3	15	30
статус на аксиларните лимфни възли	43	86
позитивен	22	44
негативен	21	42
билатерални	4	8

Болните са проследявани до 19.08.2015 – крайна дата на проучването. До тогава починали са 5 от тях.

Обработка на протеиновите проби.

Целият процес на подготовка и обработка на пробите е описан от L. Alldridge, G. Metodieva и съавтори.²³⁶

Отделяне на протеините

Протеините са екстрахирани с механично хомогенизиране на пробите в буфер съдържащ 2% натриев диетилсулфат, 50 mmol хидрокси-метил-аминометанов буфер, рН 6.8 протеаза и фосфатазни инхибитори с цел да се лизират клетките, разградят клетъчните мембрани и протеините.

Тъканните хомогенати са центрофугирани на 16 000 оборота за 15 мин и течността на повърхността (супернатанта) е отделена и съхранява на -80°C докато стане необходима за изследването. Преди електрофорезата протеините са преципитирани с метанол или хлороформ и поставени обратно в същия буфер.

Обогатяване на мембранните протеини.

Мембранните протеини са обогатени от туморните тъкани с помощта на Mem-PER кит за екстракция на мембранни протеини на еукариоти от Pierce Biotechnology.

Гел електрофореза преди мас спектрометрията. – SDS-PAGE

Използван е протоколът на Laemmli²³⁷ за гел-електрофореза.

Изрязване и обезцветяване

След разделянето с електрофореза пробите се изрязват, като се работи само с фракцията протеини над 100 kDa, с цел да се обхванат мембранните рецептори и да се избегне албумина на 67kDa ²³⁸.

Подготовка на пробите за мас спектрометрия

Извършва се редуциране на дисулфидните връзки и алкилиране на свободните цистеини.

Ензимно разграждане на белтъците

Използва се трипсин, който разрязва полипептидите след аминокиселините лизин и аргини и по този начин произвежда точно определени известни пептиди. Получените пептиди се сравняват с база данни от предварително известни номерирани пептиди, с определени стойности на съотношението маса/заряд.

Promega trypsin of MS е използван при всички експерименти. След 18 часа инкубация на 37 °C, пептидите са екстрахирани и изсушени. Така те се съхраняват на -80 °C докато са необходими за анализ.

Качественият и количествен анализ на пептидите се извършва с мас спектрометрия.

Принципи на мас-спектрометрията

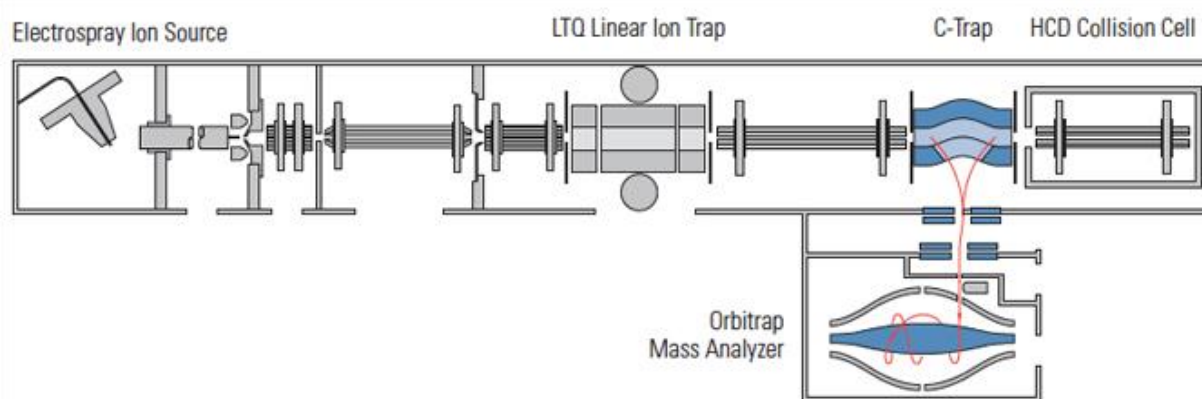
Предизвикателствата в изучаването на протеомния профил се преодоляват с помощта на **мас-спектрометрията**. Това е чувствителна техника използвана за откриване, идентифициране и измерване на молекулите на базата на съотношението между тяхната маса и заряд²³⁹.

В основата на мас-спектрометрията стои принципът, че частиците, които имат електрически заряд, се отклоняват под влиянието на магнитно поле, за разлика от частиците без заряд.

По определение, мас-спектрометъра съдържа следните части:

- 1) източник на йони;
- 2) анализатор, който измерва съотношението между масата и заряда;
- 3) детектор, който отчита броя йони за всяка стойност на съотношението маса/заряд;

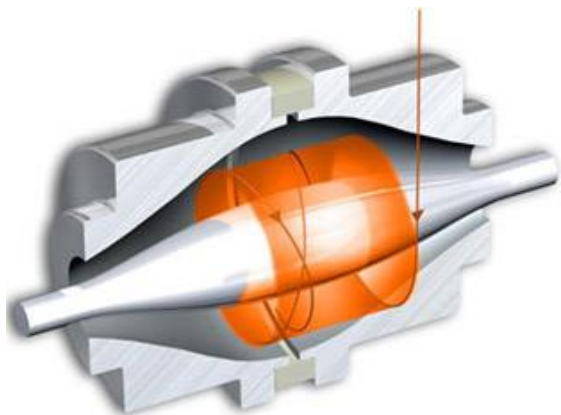
Анализаторът на мас-спектрометъра е основна част на технологията. От него се определят основни параметри на процеса като чувствителност, резолюция, точност и възможност да се генерира богат на информация спектър от пептидните фрагменти. Голям пробив в изучаването на протеома е въвеждането на хибриден мас спектрометър LTQ-Orbitrap съставен от линейарен йонен филтър и анализатор, използван за настоящето проучване. Схематично LTQ-Orbitrap е представен на фигура 23.



Фигура 23. Схематично представяне на LTQ-Orbitrap

Инструмента съдържа три части.

Различните компоненти се инжектират по ред в източник на електрон спрей йони²⁴⁰. Получените йони се събират в линеарен четириполусен йонен филтър, който дава възможност за контролиране и манипулиране (събира и активира) на йоните във времева скала. Засичането на йоните може да се постигне по два начина. В линейния йонен филтър йоните се инжектират радиално през отвори в **четирите полюса** и се засичат от два електрон умножителни детектора. При втория начин йоните се инжектират аксиларно от йонния филтър в друг йонен филтър С, където те се изстудяват и фокусират преди да се инжектират в третия компонент на инструмента **Orbitrap анализатор на масата**, който работи във вакуум. В него йоните на пробата се инжектират в йонни филтри, между два електрода създаващи електрично поле (фиг 24). Тези йони се придвиждат по кръгова орбита около вътрешния електрод. Веднъж щом тяхното привличане към вътрешния електрод се балансира от центробежните сили, йоните се задържат в техните орбити. Тези пръстени от йони се движат наляво и надясно от централния електрод с хармонични трептения. Снимка на тези трептения може да се направи от външния електрод.



Комплексният сигнал от електродите се намножава и трансформира в честотен спектър, който накрая се превръща в спектър на масата, където честотата на трептенията за всеки йон се използва за да се изчисли съотношението маса / заряд – обратно пропорционално на корен квадратен от масата/заряда.

Фигура 24. Orbitrap анализатор на масата

Orbitrap анализатора на масата е подходящ за качествен и количествен анализ на сложни пептидни разтвори, защото има висока чувствителност, точност и скорост. Това позволява секвенирането на хиляди пептиди с помощта на тандем мас спектрометрия с висока резолюция за по малко от 1 час.²⁴¹

Анализ на данните

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

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

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

Статистически методи:

Cox survival models

Тези модели представляват статистическа техника за изследване на връзката между преживяемостта на пациента и няколко различни променливи. Те предоставят оценка на лечебните ефекти върху преживяемостта след като се вземат в предвид други ко-фактори. В допълнение те позволяват да се оцени вероятността или риска от смърт на индивида на базата на дадени прогностични променливи.

РЕЗУЛТАТИ

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

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

След извършване на статистическа обработка на данните и корекция за множествени тестове, получихме статистически значими следните протеини (таблица 16):

Таблица 16. Протеини със статистически по-голям интензитет на експресията при пациенти със събитие (метастаза, рецидив или смърт)

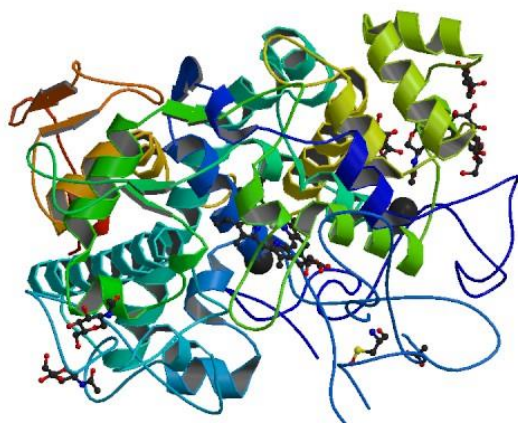
Протеин	Ген	Swiss prot идентификационен номер	р- стойност
Isoform H14 of Myeloperoxidase (Isoform2_HUMAN)	MPO	P05164-2	0,000795
Lysozyme	LYZ	F8VV32	0,000837
Calcium-activated chloride channel regulator 2	CLCA2	Q9UQC9	0,001093
Fibrillin-1	FBN1	P35555	0,004651
Fibronectin type III domain-containing protein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

ОБСЪЖДАНЕ

1. Миелопероксидаза (изоформа 2)

1) Определение

Миелопероксидазата МПО е хем протеин, синтезиращ се по време на миелоидната диференциация. Той представлява лизозомен протеин основен компонент на неутрофилните азурофилни гранули, който се освобождава в екстрацелуларното пространство при дегранулация, и по този начин подпомага микробиологичната активност на неутрофилите. Той съдържа хем пигмент, на който се дължи зеления цвят при секреция, богата на неутрофили, като гнойта и някои форми на мукус.²⁴²



Фигура 25. Кристална структура на миелопероксидазата

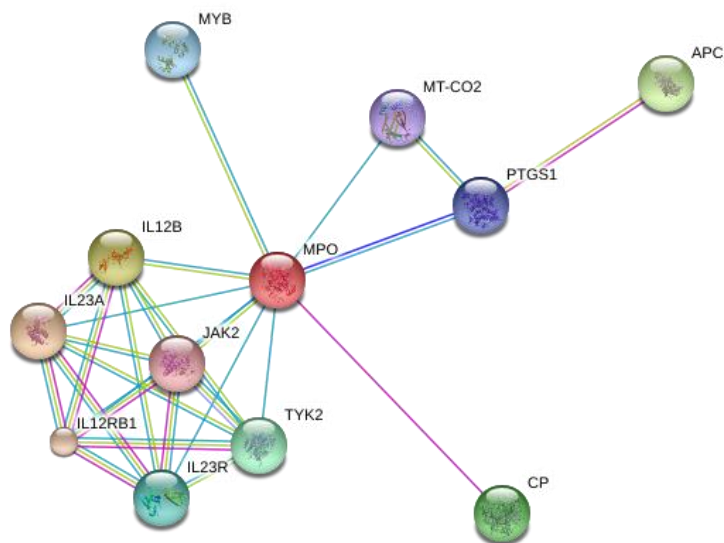
2) Кристална структура

Кристална структура на миелопероксидаза от човешки левкоцити е представен на фигура 25.²⁴³

3) Функция

Миелопероксидазата има значение за нормалната физиология на гърдата и като антибактериален ензим, предпазващ кърмата. Тя също активира някои лекарства и проканцерогени и продуцира високо токсичната хипохлорна киселина, което има за резултат оксидативен стрес и медира апоптозата. МПО се освобождава от неутрофилите и макрофагите, които инфилтрират в туморите и могат да влияят на раковите клетки по време на последващата химиотерапия. Миелопероксидазата взаимодейства със стероидните хормони. Някои автори предполагат, че тя може да има значение за отговора към терапията при пациенти с карцином на млечната жлеза.²⁴⁴

4) Най- честите взаимодействия на МПО са представени на фигура 26



Фигура 26. Най-чести взаимодействия на миелопероксидазата²⁴⁴

5) Стойност като прогностичен фактор

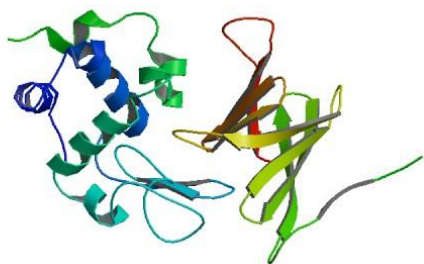
Най-често е изследвано значението на различните полиморфизми на гена за миелопероксидаза за далечните резултати при пациенти с карцином на гърдата. Установено е, че генотиповете с по-голяма активност на миелопероксидазата са свързани с по-добра преживяемост при пациенти на циклофосфамид съдържаща терапия, особено ако са лекувани в последствие и с тамоксифен²⁴⁵.Тя също е маркер за кардиотоксичността на химиотерапията.²⁴⁶ **Това прави МПО едновременно прогностичен и предиктивен фактор.** Проучване от 2013 година на 1225 пациенти с колоректален карцином показва, че пациентите, чиито тумори са инфилтрирани от клетки богати на МПО имат по- добра прогноза.²⁴⁷ Тези резултати се потвърждават и от друго проучване от 2015. ²⁴⁸ Все пак има и противоречиви резултати. Резултатите от настоящето проучване подкрепят тезата, че инфилтрацията на клетки на имунната система в туморите (като израз на доказаня по-голям интензитет на МПО) е негативен фактор за прогноза. Освен изследванията при колоректалния карцином гранулоцитната инфилтрация е свързана с влошена прогноза при карцинома на белия дроб²⁴⁹ и хепатоцелуларния карцином²⁵⁰. Това прави инфилтрацията на гранулоцити

противоречив фактор за прогнозата при различните тумори. Проучванията за значението на експресията на ензима върху карциномите на гърдата до сега само на експериментално ниво²⁵¹, като доказателства за прогностичната стойност има само за някои полиморфизми.

2. Лизозим

1) Определение

Лизозимът представлява гликозидна хидролаза- ензим, който уврежда клетъчната стена като катализира хидролизата в пептидогликаните. Лизозима се отделя от различни секрети като сълзите, слюнката, млякото и мукуса. Той също присъства в цитоплазмените гранули на макрофагите и полиморфонуклеарните неутрофили.



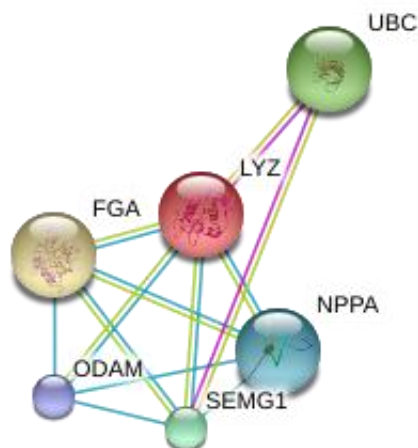
Фигура 27. Кристална структура на лизозима

2) **Кристална структура на лизозима е представена на фигура 27.**²⁵²

3) Функция

Този ензим атакува пептидогликаните, намиращи се в клетъчната стена най-вече на грам положителните бактерии. Отделят се от азурофилните гранули на неутрофилите.

4) **Най- честите взаимодействия на лизозима са представени на фигура 28.**



Фигура 28. Най-чести взаимодействия на лизозима

5) Стойност на лизозима като прогностичен фактор

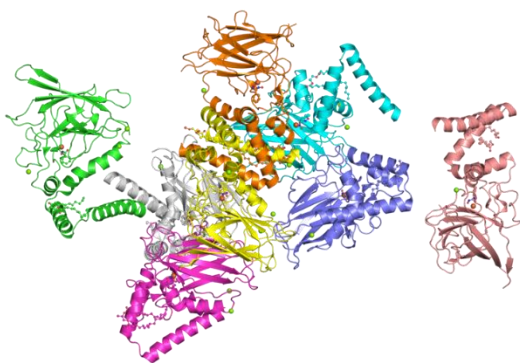
В проучване на Francisco Vizoso и съавтори от 2001 година се изследва експресията на лизозим от клетки на карцинома на млечната жлеза, с помощта на имунохистохимични методи. От общо изследвани 177 карцинома при 126 се установява експресия на лизозим, но с различна интензивност. Нивото на експресия е по-голямо при високодиференцираните и умеренодиференцираните тумори. Също нивата на лизозим са по-високи в малките тумори и при пациенти с негативни лимфни възли. Резултатите показват, че ниско съдържание на лизозим предсказва по-кратко време свободно от заболяване и влошена обща преживяемост, което противоречи с нашите резултати. Лизозимната експресия е независим прогностичен фактор за преживяемостта свободна от заболяване и общата преживяемост при пациенти с негативна аксила²⁵³.

През 2002г. Carlos Serra и съавтори разглеждат значението на лизозима като прогностичен фактор при карцинома на млечната жлеза при мъже. Противно на предходното изследване уни- и мултивариантни анализи показват, че експресията на лизозим от тумора е значителен и независим индикатор за лоша прогноза.²⁵⁴

3. CLCA2

1) Определение

Калций активиран регулатор на хлоридния канал 2, принадлежи към семейство от 4 подобни протеина, срещани при човека (CLCA1, CLCA2, CLCA3, CLCA4).²⁵⁵



Фигура 29. Кристална структура на CLCA2

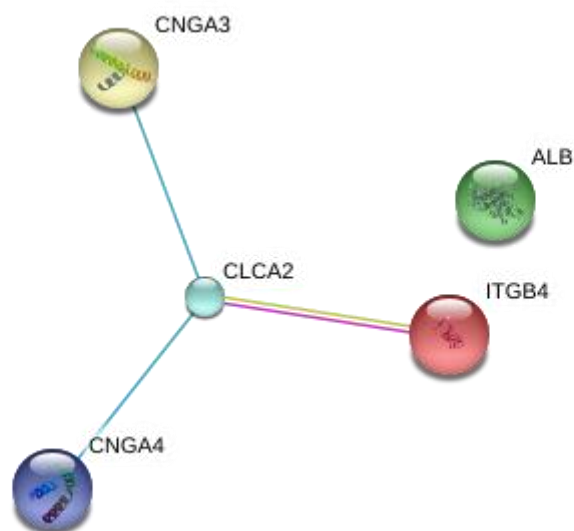
2) Кристалната структура на CLCA2 е представена на фигура 29.²⁵⁶

3) Функция

Играе роля за регулация на хлоридните йони през плазмената мембрана и за клетъчната адхезия. Експресиран е в нормалната тъкан на млечната жлеза и се губи при карциномите. Може да има функция като тумор-супресор при

карцинома на млечната жлеза и колоректалния карцином.²⁵⁷ Играе роля за клетъчната адхезия в началните етапи на белодробните метастази.²⁵⁸

4) Най-честите взаимодействия на CLCA2 са представени на фигура 30



Фигура 30. Най-чести взаимодействия на CLCA 2

5) Стойност като прогностичен фактор

Проучване на Vijay Walia и съавтори от 2012 година установява, че експресията е по-висока от средната, на човешкия калций-активиран регулатор на хлоридния канал 2 (CLCA2) е асоциирана с една трета по-голям риск от метастази при 18-годишно проследяване. Маркерът е необходим за епителната диференциация, загубва се по време на туморната експресия и е свързан с метастазирането²⁵⁹

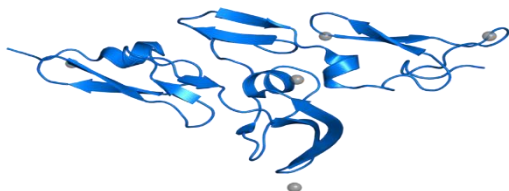
Интересна е връзката на човешкия CLCA2 с p53. Протеините от фамилията на p53 активират промотора на CLCA2 като се свързват директно с него. Ектопичната експресия на CLCA2 инхибира миграцията на карциномните клетки²⁶⁰. Това определя неговото едновременно прогностично и терапевтично приложение.²⁶¹

4. Фибрилин 1

1) Определение

Фибрилините са структурни компоненти на екстрацелуларните калций-свързващи микрофибрили. Микрофибрилите богати на фибрилин 1 имат голяма сила за поддържане на извънклетъчния матрикс на съединителния тъкан.²⁶²

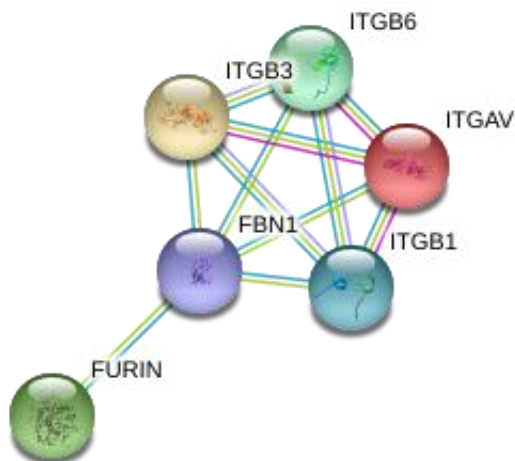
2) Кристалната структура на фибрилин 1 представена на фигура 31.



Фигура 31. Кристална структура на фибрина

3) **Функцията** на фибрилин 1, все още не е напълно изяснена. Основна концепция за неговото значение е, че фибрина контролира сигналните пътища на растежните фактори в екстрацелуларния матрикс.²⁶³

4) Най- честите взаимодействия на фибрилин 1 са показани на фигура 32.



Фигура 32. Най-чести взаимодействия на фибрилин 1

5) Стойност като прогностичен фактор

Връзка между фибрина и някои други карциноми е вече установена. Проучване от 2013г. дори предлага хиперметилацията на промотора на гена за фибрилин като високо специфичен и чувствителен маркер за колоректален карцином.²⁶⁴ Проучванията за ролята на фибрина при овариалния карцином са все още на експериментално ниво.²⁶⁵

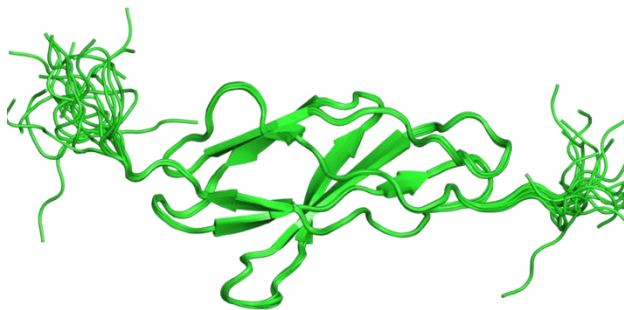
Едно изследване от 2015г. разглежда взаимодействията между тумора и екстрацелуларния матрикс. Резултатите от него подкрепят тезата, че развитието и прогресията на рака, не е изцяло автономен процес, а може да се повлияе от взаимодействието между раковите клетки и заобикалящата ги микро среда, в която освен имунните клетки, клетките на стромата и екстрацелуларния матрикс също имат основно значение. Няколко проучвания изследват профила на екстрацелуларния матрикс в асоциация с клиничната прогресия при пациенти от I^{ви} до III^{ти} стадий карцином на млечната жлеза /или валидират своите резултати в независими свободни бази данни . Установява се връзка между гена за фибрилин 1 (FBN1) и далечните метастази и смърт в уни и мултивариантни проучвания, с по-добра прогноза при пациентите, при които този ген е преекспресиран.²⁶⁶

5. Фибронектин тип 3

1) Определение

Фибронектина формира мрежата от нишки, която свързва клетките с екстрацелуларния матрикс. Човешкия фибрилин е мултимодуларен протеин, който съществува и като разтворим димер и като неразтворим компонент на екстрацелуларния матрикс.

2) Кристалната структура на фибронектин тип 3 домейна е представена на фигура 33.



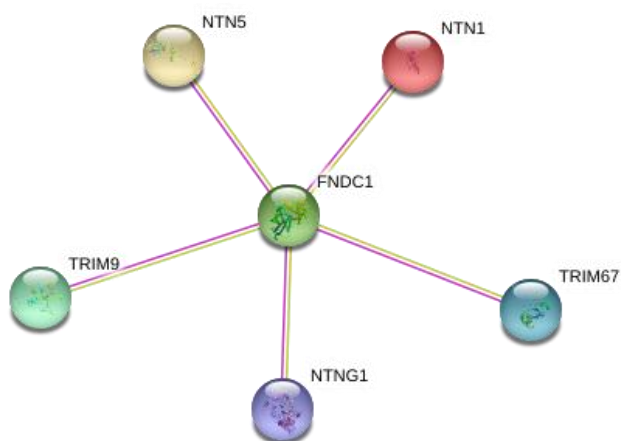
Фигура 34. Кристална структура на фибронектин тип 3

3) Функция

Той има функция като регулаторен протеин в процеси като клетъчната адхезия, придвижване, диференциране и пролиферация. Оксидативният стрес, индуциран от туморните епителиални клетки, води до

повишаване нивото на фибронектин на повърхността на застаряващите, свързани с тумора фибробласти. Повишената продукция на фибронектин е основна характеристика на застаряващата клетка.²⁶⁷

4) Най-честите взаимодействия на фибронектина са представени на фигура 34.



Фигура 34. Най-чести взаимодействия на фибронектина²⁶⁷

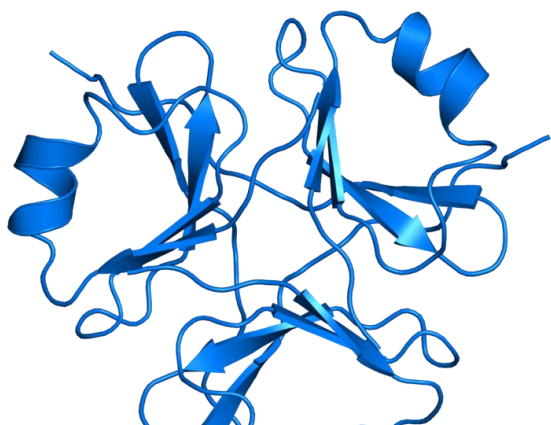
5) Стойност като прогностичен фактор

Фибронектина е преекспресиран при тройно-негативните тумори в сравнение с HER2 позитивните.²⁶⁸ В проучване от 2002г. анализиращо експресията на протеините на екстрацелуларния матрикс при 134 операбилни болни с карцином на млечната жлеза се установява, че експресията на фибронектин е позитивно свързана със засягането на лимфните възли и KI 67, но не успява да докаже значението си за преживяемостта.²⁶⁹

6. Колаген алфа 1(XVIII) верига

1) Определение

Този колаген е също един от протеините на екстрацелуларния матрикс. Протеолитични процеси в няколко участъка на С домейна водят до произвеждането на ендостатин – силен антиангиогенен протеин, който е способен да инхибира ангиогенезата и туморния растеж.²⁷⁰



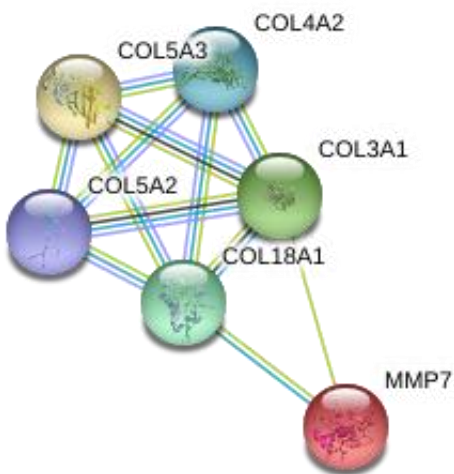
Фигура 35. Кристална структура на колаген алфа 1

2) **Кристалната структура** на Колаген алфа 1 е представена на фигура 35.²⁷¹

3) **Функция**

Ендостатина може да влияе на проангиогенното действие на фибробласт растежния фактор и васкуларния ендотелен растежен фактор²⁷², инхибира ендотелната пролиферация и туморния растеж и индуцира апоптозата.²⁷³

4) **Най-честите взаимодействия на колаген алфа 1 са представени на фигура 36.**



Фигура 36. Най-чести взаимодействия на колаген алфа 1

5) Значение за преживяемостта

Проучване на Gaëlle Brideau и съавтори от 2007г. докладва инхибиране на туморната ангиогенеза от ендостатина в ранните стадии на кожен карцином. Авторите установяват също, че ендостатина инхибира адхезията и миграцията на някои клетки върху фибронектина ин витро. Те предполагат, че ендостатина може да инхибира туморната лимфангиогенеза като понижава нивата на VEGF-C в тумора, инхибира миграцията на мастоцитите и регулира тумор асоциираното възпаление.²⁷⁴

През септември 2005г. ендостатина (Ендостар) е одобрен за лечение на недребноклетъчен карцином на белия дроб. От ендогенните инхибитори на ангиогенезата, ендостатина има най-широкия антиканцерогенен спектър. Той инхибира регулаторните гени за ангиогенезата на повече от 12 % от човешкия геном, и все още е най-малко токсичното антираково средство при мишки . При хората ендостатина не е токсичен и към него не се развива резистентност.²⁷³

Ендостатина е свързан с рецепторите на повърхността на клетката включително интегрини и VEGFR2. Той потиска няколко ключови компонента на сигналната каскада на VEGF и в същото време стимулира сигналната каскада на тромбоспондин, друг мощен ангиостатичен протеин. Ендостатина е изучаван във фаза 1 и 2 на клинични проучвания при пациенти с метастатични карциноми и е показал ниска ефективност. Сега нова по-стабилна версия на ендостатина се въвежда в клиничната практика в лечението на карцинома на белия дроб и стомаха.²⁷⁵

7. Протеин S100-A9

- 1) **Определение** S100A9 е калций и цинк свързващ протеин, играещ основна роля в регулацията на възпалителните процеси и имунния отговор.

2) Кристалната структура на S100A9 е представена на фигура 37.



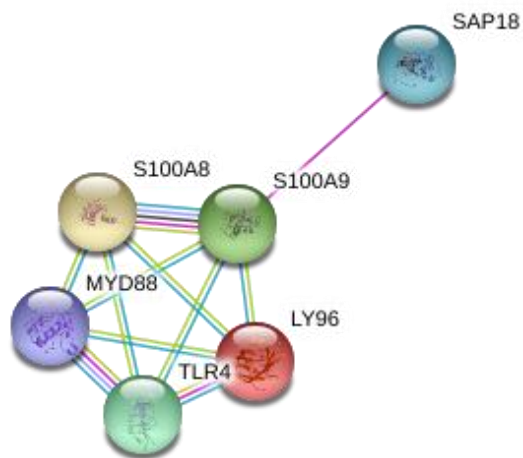
Фигура 37. Кристална структура на S100A9

3) Функция

S100A9 може да индуцира химиотаксиса, адхезията, повишава бактериалната активност на неутрофилите като промотира фагоцитозата. Може да индуцира дегранулацията на неутрофилите с помощта на MAPK-зависим механизъм. Може да индуцира клетъчната смърт чрез автофагия и апоптоза, може да регулира

броя на неутрофилите. Той е също силен ускорител на възпалението и автоимунитета, развитието и разпространението на карциноми. S100A9 е силно преекспресиран в много тумори на стомаха, хранопровода, дебелото черво, панкреаса, пикочния мехур, яйчниците, щитовидната жлеза, гърдата и кожните карциноми.²⁷⁶

4) Най-честите взаимодействия на S100A9 са представени на фигура 38.



Фигура 38. Най-чести взаимодействия на S100A9

5) Прогностична стойност

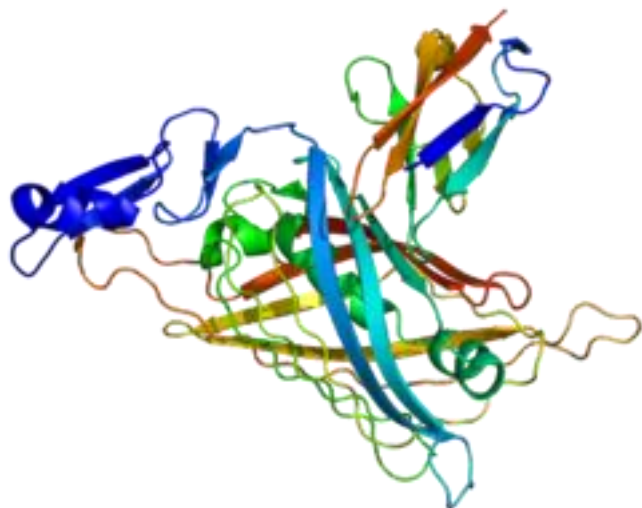
Проучване от 2015г., изследващо 144 туморни проби и ин витро анализ на клетъчни линии от карцином на млечната жлеза, установява връзка на експресията на S100A9 с хормон негативните тумори и Ki 67. Установява също, че този протеин се експресира в малигнените клетки и в тумор инфилтриращите.²⁷⁷

Едно по-старо изследване от 2010г. върху тъкан от 182 инвазивни карцинома и 45 контроли установява, че туморната експресия на S100A9 е свързана с по-лоша прогноза и напреднал стадий на заболяването. Авторите откриват връзка с размера на тумора, негативния рецепторен статус и диференцираността и го предлагат като прогностичен биомаркер.²⁷⁸ Настоящи проучвания изследват tasquinimod, известен със способността си да се свързва с S100A9, в лечението на солидни тумори, като простатния карцином.²⁷⁹

8. Специфичен за базалната мембрана хепаран сулфат протеогликан 2

1) Определение

Перлеканът е също познат като мембранно специфичен хепаран сулфат протеогликан или хепаран сулфат протеогликан 2 (HSPG2). Синтезира се от васкуларния ендотел и гладката мускулатура. Представлява интегрален компонент на базалните мембрани. Компонент на гломеруларната базална мембрана. Служи като свързващ субстрат на клетките. Играе основна роля във **васкуларизацията**. Основен за васкуларния отговор при нараняване. Също необходим за аваскуларното развитие на сухожилията.



Фигура 39. Кристална структура на HSPG2

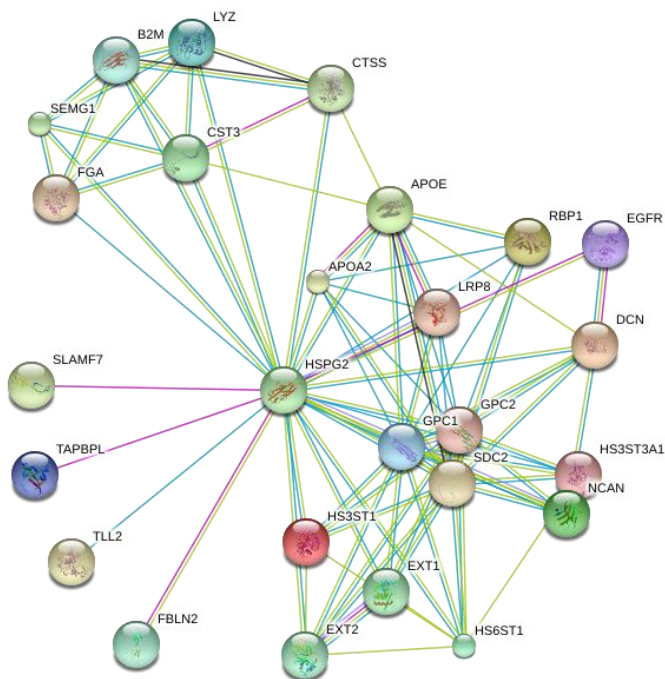
2) Кристалната структура на перлекана е представена на фигура 39.²⁸⁰

3) Функция

Перлеканът има про-ангиогенна функция. При отделянето на протеази по време на растежа и инвазията на тумора перлеканът се разцепва на две вериги ендорепелин и LG3 пептид.

Ендорепелина е анти-ангеогенен и анти-туморен пептид, който инхибира ендотелната клетъчна миграция, колаген индуцираната ендотелиална морфогенеза и растежа на кръвоносни съдове в хориоалантоиновата мембрана. Той е мощен инхибитор на ангиогенезата като едновременно се свързва с VEGFR2 и $\alpha 2\beta 1$ интегрин. Активирането на $\alpha 2\beta 1$ интегрин води до разграждане на актина и блокиране на ендотелиалната клетъчна миграция и свързването с **фибронектин и колаген тип 1**. Активирането на VEGFR2 индуцира дефосфорилация на рецептора чрез активиране на SHP-1 и супресира проангиогенната верига, най-вече като отслабва експресията на VEGFA.²⁸¹ LG3 пептида също има анти-ангеогенни характеристики, които обаче изискват свързване с калциеви йони.

4) Най-честите взаимодействия на перлекана са представени на фигура 40



Фигура 40. Най-чести взаимодействия на перлекана

На дадената фигура е видно взаимодействието му с лизозим (LYZ) и рецептора за епидермален растежен фактор (EGFR).

5) Значение за преживяемостта

На базата на изследването на протеините в клетъчни линии на карцином и на нормална тъкан LG3 пептида на перлекана е предложен като диагностичен маркер за карцином на млечната жлеза.²⁸² Доказано е, че системното доставяне на рекомбинантен ендорепелин към мишки, носещи туморен ксенографт, причинява значителна супресия на туморния растеж и скоростта на обмяна.²⁸³

Ефектите на ендорепелина са демонстрирани във вече доста ин vivo и ин vitro изследвания, поставяйки го в категорията на молекулите с истински терапевтичен потенциал. Екзогенния ендорепелин се свързва специфично с кръвоносните съдове в тумора, намалява растежа и метаболизма на карциномите. Още повече той се свързва с $\alpha 2\beta 1$ интегрин, мощен про-ангиогенен рецептор, който е преекспресиран в активно пролифериращите ендотелни клетки. Той има голямо значение за туморната ангиогенеза, тъй като в нормалните кръвоносни съдове е

слабо експресиран. Използването на ендорепелин в клиничната практика би имало нисък риск за пациента и ниска токсичност, тъй като той не се свързва с нормалните кръвоносни съдове.⁵¹

Автофагията е биологичен механизъм за чистене на увредени протеини и продукти на оксидативния стрес, отделени в околната среда на тумора. Този процес може да помогне за решаването на тумора чрез спасяването на клетки, претърпели различни модификации или индуцирайки автофагия - клетъчна смърт на туморните кръвоносни съдове. Разцепени фрагменти от екстрацелуларния матрикс - протеоглици имат основна роля за регулация на ангиогенезата и клетъчната ендотелиална автофагия. Основна характеристика на прогресията на рака е ремоделирането на базалната мембрана и отделяне на разградени части от нейните компоненти. Ендостатина, получен от колаген XVIII и ендоперелина, С терминален сегмент на перлекана, имат двойна активност като едновременно модифицират ангиогенезата и ендотелиалната клетъчна автофагия. Манипулирането на тези ендогенни форми, може да представлява терапевтичен подход за ерадикация на рака.²⁸⁴

Опитахме се да намерим връзка между изследваните протеини, както и между тези протеини и експресията и функцията на VEGF. За целта използвахме първо Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®). IPA е уеб базиран софтуер за анализ, интеграция и интерпретация на информацията получена от експерименти с генома, протеома и метаболома. Това е могъщ инструмент за търсене и анализиране разкриващ значението на информацията и идентифициращ нови мишени или кандидати за биомаркери в контекста на биологичните системи.²⁸⁵

Заложихме 8-те протеина, оказали се със статистически значима разлика в експресията при пациентките със събитие (метастаза, рецидив или смърт) в сравнение с тези без събитие. Мястото на всеки един от тези протеини, без миелопероксидазата, който не фигурира в базата данни, в клетката е представено в приложение 4. Някои от протеините са намират в цитоплазмата, докато други са част от екстрацелуларното пространство. Вижда се още, че дори да нямат директно взаимодействие 7 от 8-те протеина имат общи пътища за действие. Това се подкрепя и от анализа на функциите протеините. Всички 7 протеина участват в

клетъчната смърт и оцеляване, откриват се при гастроинтестиналните и малигнените процеси и като цяло при карциномите, при нараняване, или други абнормности. 6 от тях (без лизозима) имат функция при апоптозата. 4 са с доказана функция при карцинома на млечната жлеза. Това са COL18A1, FBN1, HSPG2 и S100A9. Подробно общите процеси, в които участват протеините, са дадени в приложение 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Във втората глава на настоящия труд потърсихме факторите с най-голямо значение за преживяемостта сред пациентите лекувани в Клиниката по хирургия „Проф. Александър Станишев“ на УМБАЛ „Александровска“. Установихме, че размера на тумора, статуса на рецепторите за естроген и прогестерон, хистологичния тип, специфичния туморен маркер за гърда и стойността на фибриногена са от значение за преживяемостта на болния. Единствено хистологичният тип запазва своята прогностична значимост, ако в модела се включи и стадия на пациента. Резултатите в тази част имат само потвърдителен характер. Изброените прогностични фактори са вече доказани и са част от стандартния процес на взимане на решения. Други проучвания от България доказват размера на тумора, възрастта на диагноза и лимфно-васкуларната инвазия като прогностични за преживяемостта свободна от заболяване.²⁸⁶ От заложените за изследване фактори в настоящото проучване, само малка част доказват своето значение. Един по-дълъг период на проследяване би дал възможност за изява и на други показатели, което е предмет на последващо изследване и интерпретация.

Третата глава довежда новите подходи в изучаването на биомаркерите при леглото на болния и дава ясни насоки за приложението на научно-изследователската работа в клиничната практика. Съвременния подход в

изследването на биомаркерите включва събирането и съхранението на уникална информация за човека, както свързана с заобикалящата го среда и навици, така и заложена в неговото ДНК или намерена в неговите тъканите. В тази част разглеждаме приносите на биобанкирането за развитие на науката и значението им за ежедневната клинична практика.

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

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

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

Сред българската популация вече е изследвана честотата на мутациите в p53²⁸⁷ и BRCA1/2²⁸⁸ при пациентки с инвазивен карцином на млечната жлеза, а като прогностични фактори са изследвани алтерации в няколко гени като p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, и преекспресията на HER2. Установена е връзка между алтерациите в тези гени и други доказани прогностични фактори, но значима независима връзка между тях и преживяемостта не е потвърдена.²⁸⁹

Сред евентуалните генетични прогностични и предиктивни фактори избрахме да изследваме два от полиморфизмите на васкуларния ендотелен растежен фактор, които досега не са изследвани сред български пациенти. Единият от тях - 634G>C повишава експресията на VEGF, а другият – 936 C>T я намалява. Не намерихме връзка между тези полиморфизми и преживяемостта. Установихме, че пациентите, при които е открит -634 G>C полиморфизъм, имат по-голям размер на тумора при диагноза, което може да се свърже с повишената експресия на VEGF, а наличието на +936C>T е свързано с билатералните карциноми, хистологичния вид и има гранична стойност за множествеността на тумора. По-голямо значение и приложение има самото установяване на наличието на даден полиморфизъм. Проучвания от последната година (2015г.) доказват, че пациенти хомозиготи по честия алел на +936C>T с тройно негативни тумори имат полза от лечението с Бевацизумаб, докато при другите пациенти такава полза не се отчита. Това ни позволява да селектираме група пациенти, при които лечението с Бевацизумаб би било от съществена полза. В нашата биобанка такива пациенти са шест. Това превръща един от основните недостатъци на проучването – краткия период на проследяване, в негово основно предимство за лечението на тези пациенти. Ранните рецидиви и далечните метастази при тези пациентки предстои да се наблюдават в следващите години и знанието за техния генотип би помогнало за персонализиране на терапията им и подобряване на преживяемостта.

Последната част на настоящия труд потърси протеини от протеомния профил на туморната тъкан, които биха имали значение за преживяемостта. Сред изследваните 50 проби от туморна тъкан се установяват 8 протеина, които се различават статистически по своя интензитет при починалите болни или тези с метастази или рецидив от пациентите, при които не е наблюдавано събитие.

Подробно е разгледана функцията на тези протеини и техните взаимодействия. Успяхме да установим връзка между всички открити протеини. Така миелопероксидазата и лизозима се намират в азурофилните гранули на неутрофилните гранулоцити и играят основна роля във възпалението. Доказана е също връзката между перлекана, фибронектина и колагена. Макар тези протеини да не са част от един и същи път на канцерогенезата, те могат взаимно да повлияят функцията си.

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

Интересно е значението на съотношението между ендостатина, който потиска ангиогенезата, и васкуларния ендотелен растежен фактор, който я промотира. Едно проучване от 2014 на Y. Ни и съавтори изследва предоперативните нива на серумния VEGF и ендостатина при 98 болни с недребноклетъчен карцином на белия дроб и 51 здрави контроли. Авторите установяват, че съотношението между VEGF и ендостатина е значително по-високо при пациенти с операбилен карцином в сравнение със здравите контроли. Съотношението при пациенти, които са все още живи 60 месеца след диагнозата е 8.3, докато съотношението при починалите е 12.9. Субгруповият анализ на пациентите с N0 установява значимо повишаване на преживяемостта при по-ниски стойности на това съотношение.²⁹⁰

Едно друго проучване изследва серумните нива на VEGF и ендостатина при 59 болни с карцином на млечната жлеза предоперативно и 3 седмици след операцията. При част от пациентите следоперативно нивото на VEGF намалява значително, докато нивото на ендостатина се запазва. Този резултат показва по-нисък риск от рецидив в сравнение с пациентите, при които се запазва високото ниво на VEGF.²⁹¹

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

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

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

ИЗВОДИ

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

ПРИНОСИ

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

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Информация за болния

Катедра по хирургия

Център по Молекулна Медицина

Медицински Университет София,

Клиника по хирургия “Професор

Александър Станишев” на Университетска Болница Александровска

Университетска Болница „ Царица Йоанна - ИСУЛ”



ЦЕНТЪР ПО
МОЛЕКУЛНА
МЕДИЦИНА



София 1431 бул. „Георги Софийски” №1, Ръководител Катедра по хирургия: Проф. Д-р Георги Тодоров, д.м.
Ръководител на проекта - д-р Мариела Василева, за контакти email: sscvasileva@gmail.com

Информация за пациента

Относно участие в научноизследователски проект

“Асоциативно проучване на полиморфизми във *VEGF* гена като прогностични фактори при карцином на млечната жлеза”

Ракът на гърдата би могъл да се дължи на мутации в определени гени и да се предава по наследство. Тези мутации се откриват чрез ДНК анализ, който се извършва върху проби от различни биологични материали. Откритата при даден болен мутация се търси след това при неговите родственици, за да се прецени за кои от тях е необходима профилактика с цел ранна диагностика на същото заболяване.

Със заболяването са асоциирани и множество полиморфни варианти в различни гени. Установено е, че те оказват влияние както върху риска за развитие на рак, така и върху преживяемостта и отговора към лечението. Някои от тези генетични промени са разположени в регулаторни области на гените и могат да доведат до промяна в тяхната експресия и синтез на белтъци с променена функция. Това, от своя страна, би могло да повлияе процеса на туморогенеза и агресивността на неоплазмите. Значението на полиморфизмите за развитието на рака на гърдата се оценява чрез асоциативни проучвания от типа пациенти-здрави контроли.

Открити са полиморфни варианти в множество гени, свързани с образуването на кръвоносните съдове на тумора. Те могат да доведат до увеличаване броя и растежа на нови кръвоносни съдове, които подпомагат дисеминацията на първичния тумор и образуването на метастази. Един от най-изследваните гени от тази група е генът, кодиращ васкуларния ендотелен растежен фактор (*VEGF*). Установено е, че количеството на този сигнален белтък е пет пъти по-голямо в туморните отколкото в нормалните тъкани. Изследвани са различни полиморфни варианти във *VEGF* гена във връзка с прогнозата и лечението при рак на гърдата. Някои от тях оказват ефект върху общата преживяемост, а други имат значение за отговора към терапията с лекарства, насочени срещу *VEGF*, като част от концепцията за „персонализирана медицина”.

В тази връзка целта на настоящото проучване е да се определи честотата на полиморфните варианти -634 G/C и +936 C/T във *VEGF* гена в група от 100 български пациентки с рак на гърдата и 200 здрави контроли и да се установи тяхната асоциация

с риска за развитие на карцином на млечната жлеза.

Проектът се извършва с участието на клинични специалисти от Клиниките по Хирургия „Проф. Александър Станишев“ и Обща и клинична патология, УМБАЛ „Александровска“, гр. София, Клиниката по Хирургия, УМБАЛ „Царица Йоана- ИСУЛ“, както и на специалисти по молекулярна генетика от Центъра по молекулярна медицина на МУ-София.

На приелите да участват в това изследване ще бъде взето малко количество кръв (до 10 мл) по начина, по който това се прави при всички медицински изследвания на кръвта в Р. България - с игли за еднократна употреба и с риск за изследваното лице, не по-висок от среднестатистическия за медицинските заведения в страната.

В някои случаи материалът за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава се налага повторно вземане на кръв. **Ако това се случи, участниците запазват правото си си да откажат като приемат, че в този случай техният генетичният анализ може би няма да бъде проведен до край.**

Кръвта ще се използва за извличане на ДНК, която ще бъде обект на генетично изследване. ДНК пробите ще бъдат обозначени с код, което ще осигури анонимност на участниците. След приключване на изследванията, част от ДНК пробите ще се съхранява в ДНК банката на Центъра по молекулярна медицина, при пълно спазване на условията за конфиденциалност на придружаващата ги лична информация, единствено за целите на бъдещи научни изследвания и проекти, свързани с рака на гърдата. Резултатите от това проучване могат да бъдат публикувани или обсъждани по други начини, но използването на специфичен код ще гарантира анонимност на участниците. Анонимно биологичните проби и клинични данни могат да бъдат транспортирани до други научни институции в страната и чужбина за участие в други изследвания, и публикувани в научни списания и бази данни. Центърът би могъл да повтори анализите в бъдеще чрез нови, разширени или подобрени методи с остатъчния ДНК материал, ако това е необходимо и възможно.

Участниците в проекта имат право да прекратят участието си в него по всяко време, като това няма да доведе до неприятни последици или загуба на блага и здравни услуги.

В качеството си на научна разработка, настоящото изследване може да доведе до резултати, които да имат пряко значение за диагностиката и лечението на рака на гърдата. Получените данни също биха били от изключително важно значение за разбиране на механизмите за развитие на карцинома на гърдата, и оттам за разработване на нови и още по-ефективни методи за терапия и лечение на това социално-значимо заболяване, което би променило живота на милиони хора в бъдеще.

В случай, че получените резултати имат диагностична стойност за участниците, те ще им бъдат съобщени лично от изследователския екип. Тези резултати са поверителни и могат да бъдат съобщавани на други лица само след моето писмено съгласие или където законът позволява.

След запознаването с целите на настоящия проект, моля подпишете формата за **ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ**, където заявявате, че разбирате и сте съгласни да участвате в изследването. Не забравяйте да искате копие от информираното съгласие.

Предварително Ви благодарим за участието в проекта!

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Информирано съгласие за предоставяне на тъкан

Катедра по хирургия
Център по Молекулна Медицина
Медицински Университет София,
Клиника по хирургия “Професор
Александър Станишев” на Университетска Болница Александровска
Университетска Болница „ Царица Йоанна - ИСУЛ”



ЦЕНТЪР ПО
МОЛЕКУЛНА
МЕДИЦИНА



София 1431 бул. „Георги Софийски” №1, Ръководител Катедра по хирургия: Проф. Д-р Георги Тодоров, д.м.
Ръководител на проекта - д-р Мариела Василева, за контакти email: sscvasileva@gmail.com

Информирано съгласие
за предоставяне на биологичен материал от туморна формация и прилежащата ѝ нормална
тъкан за създаване на тъканна банка от карциноми на гърдата

Уважаема госпожо/ господине,

Моля, прочетете внимателно и подпишете това информирано съгласие.

Ракът на гърда е изключително хетерогенно заболяване и обхваща разнообразна група от тумори, които могат да бъдат подразделени на базата на техните хистопатологични характеристики и генно-експресионни профили. Молекулярно биологичните особености на отделните подтипове карциноми на гърдата определят тяхната клинична изява и са много важни за прецизиране на диагнозата, предсказване на изхода от заболяването и избора на терапия.

Събирането на настоящата биобанка от биологични материали, включващи карциноми на гърдата и прилежащите им нормални тъкани, има за цел да послужи като основа за бъдещи изследвания и определяне молекулярно биологичните характеристики на различните подтипове рак на гърдата. Изследванията ще бъдат насочени към откриване на промените в рамките на целия геном на туморите; епигенетичните промени, изразяващи се в промоторното хиперметиране на гените и повлияване на тяхната експресия от специфични микро РНК; промените на протеомно и метаболомно ниво, свързани със синтезираното на специфични белтъчни фактори и метаболити и др. Тези знания, съпоставени с хистопатологичните характеристики на туморите ще позволят откриването на нови диагностични и прогностични биомаркери за рак на гърдата, персонализирано лечение и откриване на нови молекули-мишени за насочена терапия. Това, от своя страна, би довело до по-добра диагностика и профилактика на рака на гърдата в България, както и до повишаване на продължителността и качеството на живот на пациентите, страдащи от това социално значимо заболяване.

Аз, долуподписан(ият)ата.....,

- съм съглас(ен)на да участвам в проучвания на рака на гърдата чрез молекулярно биологични анализи на туморни, сравнени с прилежащите им нормални тъкани.
- Информиран(а) съм, относно процедурите, които ще ми бъдат извършени, при участие в проекта - вземане на част от туморната формация след нейната ексцизия и, по възможност,

прилежащата ѝ нормална тъкан.

● Разрешавам да се вземе част от туморната формация след нейната ексцизия и, по възможност, част от здрава тъкан за създаването на тъканна банка, с цел последващи научни (генетични/ геномни, епигенетични/ епигеномни, протеомни, метаболомни и др. изследвания) свързани с карциногенезата и туморната биология на карцинома на млечната жлеза.

● Обяснена ми е целта на взимането на тези проби.

● Съобщени ми бяха евентуалните рискове и усложнения от процедурата.

● Участието ми в настоящето изследване е напълно доброволно.

● Разбирам, че съгласието или отказа за участие в този научно-изследователски проект по никакъв начин няма да повлияе на лечението ми.

● Имам право да прекратя участието си по всяко време, като това няма да има неприятни последици или загуба на блага и здравни услуги, и ще бъда информиран(а) за хода на изследването и резултатите от него.

● Запозната съм с целите, методите и институционалната принадлежност на изследователите.

● Запознат(а) съм с процедурата за събиране на лична информация на участниците в изследването и с гаранциите за конфиденциалност на тази информация.

● Съглас(ен)на съм да участвам в проекта.

Моите биологични материали ще бъдат обозначени със специфичен код и съхранявани в биобанката на Центъра по молекулярна медицина, при пълно спазване на условията за конфиденциалност на личната ми информация. Резултатите от това проучване могат да бъдат публикувани или обсъждани по други начини, но използването на специфичен код ще гарантира моята анонимност. Анонимно моите проби и клинични данни могат да бъдат транспортирани до други научни институции в страната и чужбина за участие в други изследвания и публикувани в научни списания и бази данни.

Поставеният от мен подпис по-долу потвърждава моето доброволно участие в това изследване, но в никакъв случай не освобождава членовете на изследователския екип от тяхната професионална и етична отговорност.

В случай, че получените резултати от бъдещи изследвания имат диагностична стойност за мен, желая те да ми бъдат съобщени лично от изследователския екип. Резултатите ми са поверителни и могат да бъдат съобщавани на други лица само след моето писмено съгласие или когато законът позволява.

Съглас(ен)на съм доброволно да участвам в изследването:

Да

Не

Получих копие от това съгласие.

Дата:.....

Подпис:.....

Обясних същността на ДНК изследването на пациента. Отговорих на всички въпроси.

Име:.....

Дата:.....

Подпис:.....

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Информирано съгласие за предоставяне на кръв

Катедра по хирургия

Център по Молекулна Медицина

Медицински Университет София,

Клиника по хирургия “Професор

Александър Станишев” на Университетска Болница Александровска
Университетска Болница „ Царица Йоанна - ИСУЛ”



ЦЕНТЪР ПО
МОЛЕКУЛНА
МЕДИЦИНА



София 1431 бул. „Георги Софийски” №1, Ръководител Катедра по хирургия: Проф. Д-р Георги Тодоров, д.м.
Ръководител на проекта - д-р Мариела Василева, за контакти email: sscvasileva@gmail.com

Информирано съгласие

за анализ на ДНК в изследователски проект

“Асоциативно проучване на полиморфизми във VEGF гена като прогностични фактори
при карцином на млечната жлеза”

Уважаеми госпожо/ господине,

Моля, прочетете внимателно и подпишете това информирано съгласие.

Аз, долуподписан(ия)тата.....
съм съглас(ен)на да участвам в изследване, свързано с проучване на рака на гърдата чрез ДНК анализ.

Информиран(а) съм, че:

■ Ракът на гърдата би могъл да се дължи на мутации в определени гени и да се предава по наследство. Тези мутации се откриват чрез ДНК анализ, който се извършва върху проби от различни биологични материали. Откритата при даден болен мутация се търси след това при неговите родственици, за да се прецени за кои от тях е необходима профилактика с цел ранна диагностика на същото заболяване.

■ Със заболяването са асоциирани и множество полиморфни варианти в различни гени. За да се оцени тяхното значение за развитието на рака на гърдата в Българската популация, е необходимо провеждането на асоциативно проучване от типа пациенти-здрави контроли.

Разбрах че:

■ На приелите да участват в това изследване ще бъде взето малко количество кръв (до 10 мл) по начина, по който това се прави при всички медицински изследвания на кръвта в Р. България - с игли за еднократна употреба и с риск за изследваното лице, не по-висок от средностатистическия за медицинските заведения в страната.

■ В някои случаи материалът за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава се налага повторно вземане на кръв. **Ако това се случи, запазвам правото си да откажа и приемам, че в резултат на отказа ми, генетичният анализ в моя случай може би няма да бъде проведен до край.**

■ Кръвта ще се използва за извличане на ДНК, която ще бъде обект на генетично изследване.

ДНК пробата ще бъде обозначена с код, което ще осигури моята анонимност.

■ **С настоящото давам съгласието си за участие в научно-изследователски проект.** В качеството си на научна разработка, настоящото изследване може да доведе до резултати, които да имат пряко значение за диагностиката и лечението на рака на гърдата. Получените данни също биха били от изключително важно значение за разбиране на механизмите за развитие на карцинома на гърдата, и оттам за разработване на нови и още по-ефективни методи за терапия и лечение на това социално-значимо заболяване, което би променило живота на милиони хора в бъдеще.

■ След приключване на изследванията, част от моята ДНК ще се съхранява в ДНК банката на Центъра по молекулярна медицина, при пълно спазване на условията за конфиденциалност на личната ми информация, единствено за целите на бъдещи научни изследвания и проекти, свързани с рака на гърдата. Резултатите от това проучване могат да бъдат публикувани или обсъждани по други начини, но използването на специфичен код ще гарантира моята анонимност. Анонимно моите проби и клинични данни могат да бъдат транспортирани до други научни институции в страната и чужбина за участие в други изследвания, и публикувани в научни списания и бази данни. Центърът би могъл да повтори анализите в бъдеще чрез нови, разширени или подобрени методи с остатъка от моята ДНК, ако това е необходимо и възможно.

Поставеният от мен подпис по-долу потвърждава моето доброволно участие в това изследване, но в никакъв случай не освобождава изследователите от тяхната професионална и етична отговорност.

В случай, че получените резултати имат диагностична стойност за мен, желая те да ми бъдат съобщени от изследователския екип. Резултатите ми са поверителни и могат да бъдат съобщавани на други лица само след моето писмено съгласие или където законът позволява.

Съгласна/съгласен съм доброволно да участвам в изследването:

Да

Не

Получих копие от това съгласие.

Дата:.....

Подпис:.....

Обясних същността на ДНК изследването на пациента. Отговорих на всички въпроси.

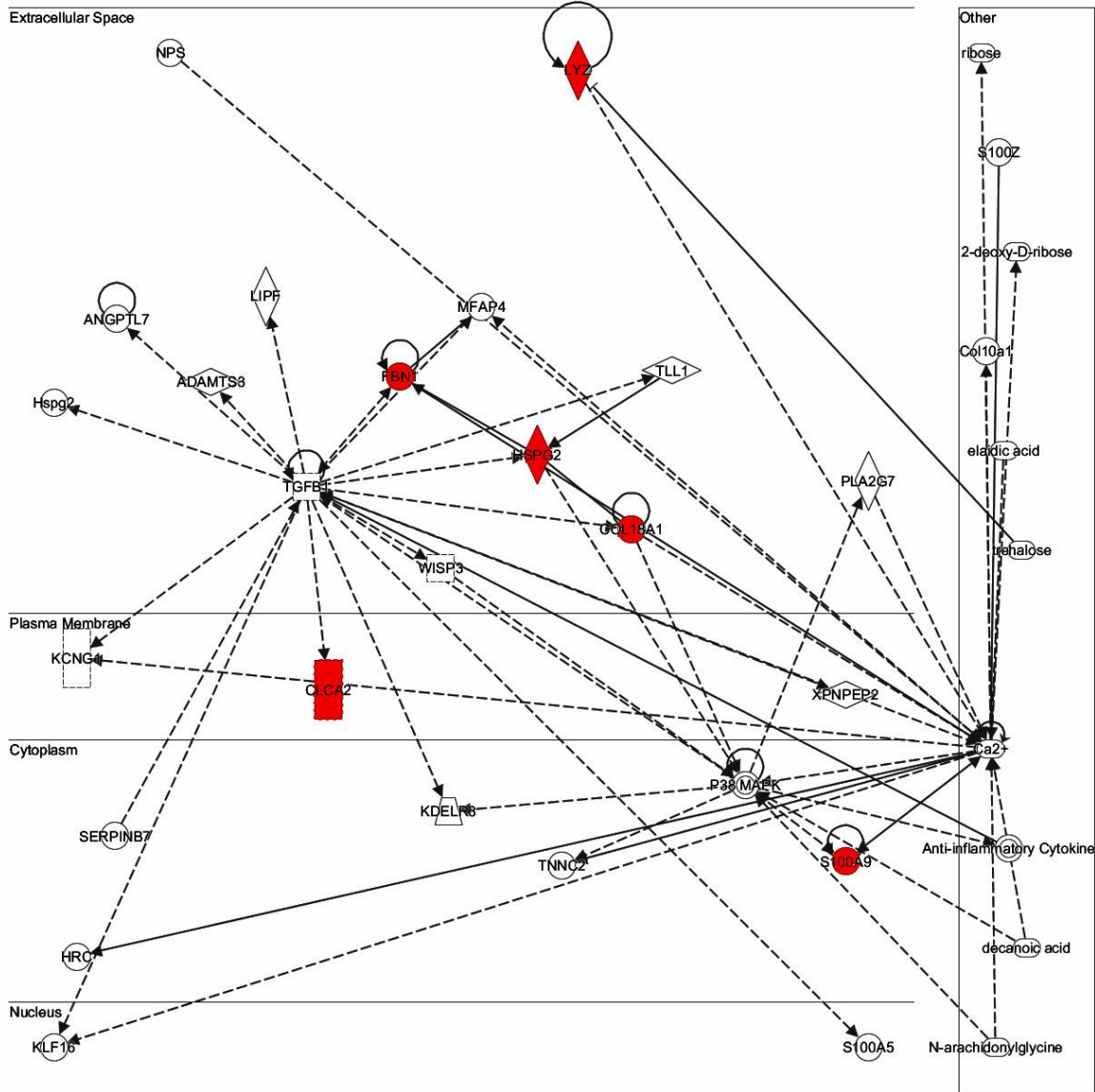
Име:.....

Дата:.....

Подпис:.....

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Разпределение на протеините в цитоплазмата и екстрацелуларния матрикс

Network 1 : Breast Ca - 2015-11-18 03:18 AM : Breast Ca : Breast Ca - 2015-11-18 03:18 AM



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Общи пътища на значимите за преживяемостта протеини

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

БИБЛИОГРАФИЯ

- ¹ International Agency for Research in Cancer. GLUBUCAN 2012 GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Breast Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=breast
- ² Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology* Volume 13, No. 8, p790–801, August 2012
- ³ Alteri R, Bandi P, Brinton L, Casares C, Cokkinides V, Gansler T, et al. Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012. Publication of the American Cancer Society, Atlanta, Georgia
- ⁴ Rosenberg P, Barker K, Anderson W. National Cancer Institute, Bethesda, Estrogen receptor status and the future burden of invasive and in-situ breast cancers in the United States
- ⁵ De Angelis R, Sant M, Coleman M, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, and the EURO CARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO CARE-5—a population-based study *Lancet Oncol* 2014; 15: 23–34
- ⁶ Gospodarowicz M, O’Sullivan B. Prognostic Factors in Cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 2003; 21:13–18
- ⁷ Glare P. Clinical Predictors of Survival in Advanced Cancer. *J Support Oncol* 2005;3:331–339
- ⁸ Tenkin O. Temkin CL. Antient medicine: selected papers of Ludwig Edelstein. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London 1967
- ⁹ Glare P, Christakis N. Prognosis in Advanced Cancer. Oxford University press 2008
- ¹⁰ MacKillop WJ, Quirt CF. Measuring the accuracy of prognostic judgments in oncology. *Journal of Clinical Oncology* 1997; 50:21–29
- ¹¹ Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: Today and tomorrow *Cancer Treatment Reviews* Volume 40, Issue 3, April 2014; Pages 434–444
- ¹² Mackillop, W. J. The Importance of Prognosis in Cancer Medicine. 2006; TNM Online.
- ¹³ Jiang R. The Promise of Pharmacogenomics in Personalized Medicine. *Trends in bio/pharmaceutical industry*. 4-2007
- ¹⁴ Paveliu M, Bengea S, Paveliu F. Individualized drug response related to genetic variations of cytochrome p450 isoforms and other enzymes. *Farmacia*, 2010, Vol.58, 3

- ¹⁵ Pucheril D. The History and Future of Personalized Medicine. Managed care August 2011; MediMedia USA
- ¹⁶ Redekop W, Mladi D. The Faces of Personalized Medicine: A Framework for Understanding Its Meaning and Scope Value in Health. 2013; Volume 16, Issue 6, Supplement
- ¹⁷ Scheingraber S, Justinger Ch, Stremovskaia T. The standardized surgical approach improves outcome of gallbladder cancer World Journal of Surgical Oncology. 2007; 5:55
- ¹⁸ Perez E. Breast Cancer Management: Opportunities and Barriers to an Individualized Approach. The Oncologist. 2011; vol. 16Supplement 1 20-22
- ¹⁹ Hemingway H, Croft P, Perel P, Hayden J, Abrams K, Timmis A, et al. for the PROGRESS Group Prognosis research strategy (PROGRESS) 1: A framework for researching clinical outcomes BMJ 2013; 346
- ²⁰ Moosdorff M, Roozendaal L, Schipper R.-J, Strobbe L, Voogd A, VTjan-Heijnen V, et al. Inconsistent selection and definition of local and regional endpoints in breast cancer research BJS Volume 101, Issue 13 December 2014 Pages 1657–1665
- ²¹ Riley RD, Hayden JA, Steyerberg EW, Moons KGM, Abrams K, Kyzas PA, et al. Prognosis research strategy (PROGRESS) 2: Prognostic factor research. PLoS Med2013
- ²² Steyerberg EW, Moons KGM, van der Windt DA, Hayden JA, Perel P, Schroter S, et al. Prognosis research strategy (PROGRESS) 3: Prognostic model research. PLoS Med2013,
- ²³ Hingorani AD, van der Windt DA, Riely RD, Abrams K, Moons KGM, Steyerberg EW, et al. Prognosis research strategy (PROGRESS) 4: stratified medicine research. BMJ2013;346:e5793
- ²⁴ H.-J. Schmoll, Veer L, Vermorken J, Schijvers D. European Society for Medical Oncology Handbook of Cancer Diagnosis and Treatment Evaluation. 2009; Informa Healthcare USA
- ²⁵ Riley R, Hayden J, Steyerberg E, Moons K, Abrams K, Kyzas P, Malats N. Prognosis Research Strategy (PROGRESS) 2: Prognostic Factor Research Plos Medicine February 2013, Volume 10, Issue 2, e1001380
- ²⁶ Cardoso F, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Senkus E, Thompson A, Zackrisson S. Primary Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol 2013; 24 (Suppl 6): vi7-vi23.
- ²⁷ Mackillop WJ. The importance of prognostication in cancer medicine. In: Gospodarowicz MJ, ed. Prognostic Factors in Advanced Cancer. 2nd ed. New York, NY: Wiley-Liss; 2001:3–14
- ²⁸ Altundag K, Altundag O, Boruban C, Altundag M, Gunduz M. Are all prognostic factors changing with time in breast cancer? – New proposal for classification of prognostic factors as

time-dependent and time-independent. *Medical Hypotheses*; 2005, Volume 65, Issue 2 Pages 413–414

²⁹ Lindström LS, Karlsson E, Wilking UM, Johansson U, Hartman J, Lidbrink EK, et al. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 20; 30(21):2601-8.

³⁰ van der Hage J, Mieog J, van de Velde C, Putter H, Bartelink H, van de Vijver M. Impact of established prognostic factors and molecular subtype in very young breast cancer patients: pooled analysis of four EORTC randomized controlled trials *Breast Cancer Research* 2011, 13:R68

³¹ Carvalho S, Stiepcich M, Fregnani J; Nonogaki S; Rocha R; Soares F. Evaluation of prognostic factors in stage IIA breast tumors and their correlation with mortality risk *Clinics* vol.66 no.4 São Paulo 2011

³² Brenner B, Siris N, Rakowsky E, Fenig E, Sulkes A, Lurie H. Prediction of outcome in locally advanced breast cancer by post-chemotherapy nodal status and baseline serum tumour markers *Br J Cancer*. 2002 Dec 2; 87(12): 1404–1410.

³³ Donegan W. Tumor-Related Prognostic Factors for Breast Cancer *CA Cancer J Clin* 1997; 47:28-51

³⁴ FACT SHEET - Human Genome Project National Institutes of Health October 2010

³⁵ Tonini G, Fratto M, Schiavon G. Molecular prognostic factors: clinical implications in patients with breast cancer *Cancer Therapy* Vol 6, 773-782, 2008

³⁶ King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985;229(4717):974–976

³⁷ Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987; 235(4785):177–182.

³⁸ Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The HER-2 receptor and breast cancer: Ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*. 2009; 14:320–368.

³⁹ Hanna W, Rüschoff J, Bilous M, Coudry R, Dowsett M, Osamura R, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity *Modern Pathology*. 2014; 27, 4–18;

- ⁴⁰ Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319:1–11
- ⁴¹ Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC, Kandalaf PL, Wiley JC, Kussick SJ, Gown AM. Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-HER2 targeted therapy. *J Clin Oncol.* 2011 Nov 1;29(31):4168-74
- ⁴² Zhou BB, Peyton M, He B, Liu C, Girard L, Caudler E et al. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in nonsmall cell lung cancer. *Cancer Cell.* 2006; 10: 1–2
- ⁴³ Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson K, Garrett T, Leahy D et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 2003; 12:541-542.
- ⁴⁴ Fornier M, Seidman A, Schwartz M, Ghani F, Thiel R, Norton L, Hudis C. Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate *Ann Oncol.* 2005; 16 (2):234-239.
- ⁴⁵ Finn R, Gagnon R, Di Leo A, Press M, Arbushites M, Koehler M. Prognostic and Predictive Value of HER2 Extracellular Domain in Metastatic Breast Cancer Treated With Lapatinib and Paclitaxel in a Randomized Phase III Study *JCO.* 2009; vol. 27 no. 33 5552-5558
- ⁴⁶ Leyland-Jones B, Smith B. Serum HER2 testing in patients with HER2-positive breast cancer: the death knell tolls. *The Lancet Oncology.* 2011; Vol. 12, No. 3, p286–295
- ⁴⁷ Lee S, Lee J, Yu J, Ko B, Kim H, Son B et al. Preoperative serum HER2 extracellular domain levels in primary invasive breast cancer. *BMC Cancer* 2014, 14:929
- ⁴⁸ Downward J. The ins and outs of signaling *Nature.* 2001; 411, 759-762
- ⁴⁹ Paduch R. Theories of cancer origin *European Journal of Cancer Prevention* 2015, 24:57–67
- ⁵⁰ Kurbel S, Dmitrovi B. Shifting paradigms in cancerogenesis: from genetics to epigenetics & back *periodicum biologicum* vol. 114, No 4, 445–451, 2012
- ⁵¹ Sąsiadek M, Karpiński P. Genetic theory of cancer. Short review *POLSKI PRZEGLĄD CHIRURGICZNY* 2009, 81, 10, 478–485
- ⁵² Baker S. A Cancer Theory Kerfuffle Can Lead to New Lines of Research. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2015; 107(2): dju405
- ⁵³ Stephens P, Tarpey P, Davies H, Van Loo P, Greenman Ch. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer *Nature.* 2012; 486, 400–404

- ⁵⁴ Ali H, Rueda O, Chin S, Curtis Ch, Dunning M, C. Caldas. Genome-driven integrated classification of breast cancer validated in over 7,500 samples. *Genome Biology*. 2014; 15:431
- ⁵⁵ Parrella P. Epigenetic Signatures in Breast Cancer: Clinical Perspective. *Breast Care (Basel)*. 2010; 5(2): 66–73.
- ⁵⁶ Jing F, Jun L, Yong Z, Wang Y, Fei X, Zhang J, Hu L. Multigene methylation in serum of sporadic Chinese female breast cancer patients as a prognostic biomarker. *Oncology*. 2008;75:60–66
- ⁵⁷ Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(5):R97.
- ⁵⁸ Hallett RM, Dvorkin-Gheva A, Bane A, Hassell JA. A gene signature for predicting outcome in patients with basal-like breast cancer. *Sci Rep*. 2012; 2:227.
- ⁵⁹ Liu N, Stingl Ch, Look M, Smid M, Braakman R, De Marchi T, et al. Comparative Proteome Analysis Revealing an 11-Protein Signature for Aggressive Triple-Negative Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2014) 106(2): djt376
- ⁶⁰ <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VEGFA&keywords=VEGF>
- ⁶¹ The NCBI handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2002 Oct. Chapter 18. The Reference Sequence (RefSeq) Project. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- ⁶² Shibuya M. Structure and Function of VEGF/VEGF-receptor System Involved in Angiogenesis *Cell Structure and Function* 2001; Vol. 26 No. 1 P 25-35
- ⁶³ Structure of the VEGFA protein. Based on PyMOL rendering of PDB 1bj1. <https://en.wikipedia.org>
- ⁶⁴ SCHRIJVERS B, FLYVBERG A, DE VRIESE A. THE ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) IN RENAL PATHOPHYSIOLOGY *Kidney International* (2004) 65, 2003–2017;
- ⁶⁵ Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(3):227-41.
- ⁶⁶ International HapMap Consortium; Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449(7164), 851–861 (2007).
- ⁶⁷ Hochberg EP, Miklos DB, Neuberg D, Eichner DA, McLaughlin SF, Mattes-Ritz A, et al. A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 101(1), 363–369.

- ⁶⁸ Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.* 2005; 107(2), 155–176.
- ⁶⁹ Eng L, Azad AK, Habbous S, Pang V, Xu W, Maitland-van der Zee AH et al. Vascular endothelial growth factor pathway polymorphisms as prognostic and pharmacogenetic factors in cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* 18(17), 4526–4537 (2012).
- ⁷⁰ Jain L, Vargo CA, Danesi R et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol. Cancer Ther.* 8(9), 2496–2508 (2009).
- ⁷¹ Sa-nguanraksa D, O-charoenrat P. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor A Polymorphisms in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* ISSN 1422-0067 www.mdpi.com/journal/ijms
- ⁷² Coate L, Cuffe S, Horgan A, Hung RJ, Christiani D, Liu G. Germline genetic variation, cancer outcome, and pharmacogenetics. *J. Clin. Oncol.* 28(26), 4029–4037 (2010).
- ⁷³ Coate L, Cuffe S, Horgan A, Hung RJ, Christiani D, Liu G. Germline genetic variation, cancer outcome, and pharmacogenetics. *J. Clin. Oncol.* 28(26), 4029–4037 (2010).
- ⁷⁴ Hayman SR, Leung N, Grande JP, Garovic VD. VEGF inhibition, hypertension, and renal toxicity. *Curr. Oncol. Rep.* 14(4), 285–294 (2012)
- ⁷⁵ Gressett SM, Shah SR. Intricacies of bevacizumab-induced toxicities and their management. *Ann. Pharmacother.* 2009;43(3), 490–501
- ⁷⁶ Amelina, Hanna, 1983-. - Proteomics in biomarker research [Elektronisk resurs]: Insights into the effects of aging and environment on biological systems. - 2011. - ISBN: 978-91-7447-209-7
- ⁷⁷ NCI Dictionary of Cancer Terms <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=367447>
- ⁷⁸ Wilkins MR, Sanchez J, Gooley A, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1996; 13:19.
- ⁷⁹ Mallick P, Kuster B. Proteomics: A pragmatic perspective. *Nat Biotechnol.* 2010; 28, 695-709.
- ⁸⁰ Mischak H, Apweiler R, Banks R, Conaway M, Coon J, Dominiczak A. Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *PROTEOMICS - Clinical Applications* Volume 1, Issue 2, pages 148–156, No. 2 February 2007
- ⁸¹ Zeidan B, Townsend P, Garbis S, Copson E, Cutress R. Clinical proteomics and breast cancer, *The Surgeon.* 2015; Volume 13, Issue 5, Pages 271–278

- ⁸² He W, Tong Y, Wang Y, Liu J, Luo G, Wu J, et al. Serum soluble CD14 is a potential prognostic indicator of recurrence of human breast invasive ductal carcinoma with Her2-enriched subtype. *PLoS One* 2013; 8:e75366.
- ⁸³ Katchman BA, Ocal IT, Cunliffe HE, Chang YH, Hostetter G, Watanabe A, et al. Expression of quiescin sulfhydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. *Breast Cancer Res BCR* 2013; 15:R28.
- ⁸⁴ Cawthorn TR, Moreno JC, Dharsee M, Tran-Thanh D, Ackloo S, Zhu PH, et al. Proteomic analyses reveal high expression of decorin and endoplasmin (HSP90B1) are associated with breast cancer metastasis and decreased survival. *PLoS One* 2012; 7:e30992.
- ⁸⁵ Descotes F, Jezequel P, Spyrtos F, Campion L, Grenot C, Lerebours F, et al. Identification of potential prognostic biomarkers for node-negative breast tumours by proteomic analysis: a multicentric 2004 national PHRC study. *Int J Oncol* 2012; 41:92e104.
- ⁸⁶ Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10869e74.
- ⁸⁷ Brozkova K, Budinska E, Bouchal P, Hernychova L, Knoflickova D, Valik D et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight proteomic profiling of breast carcinomas identifies clinicopathologically relevant groups of patients similar to previously defined clusters from cDNA expression. *Breast Cancer Res BCR* 2008; 10:R48.
- ⁸⁸ Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang Y, Chan W. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin. Chem.* 2002; 48, 1296– 1304
- ⁸⁹ Hu Y, Zhang Z, Yu K, Liu J, Zheng S, Hu X. Diagnostic application of serum protein pattern and artificial neural network software in breast cancer. *Ai Zheng* 2005; 24, 67– 71
- ⁹⁰ Chen G, Gharib T, Wang H, Huang C, Kuick R, Thomas G et al. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100, 13537– 13542
- ⁹¹ Nakagawa T, Huang Sh, Martinez S, Tran A, Elashoff D, Ye X et al. Proteomic Profiling of Primary Breast Cancer Predicts Axillary Lymph Node Metastasis *Cancer Res* December 15, 2006 66;11825
- ⁹² Tamar Geiger¹, Stephen F. Madden², William M. Gallagher³, Juergen Cox¹, and Matthias Mann¹ Proteomic Portrait of Human Breast Cancer Progression Identifies Novel Prognostic Markers *Cancer Res* May 1, 2012 72; 2428
- ⁹³ Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, et al. (1982). A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 45: pp. 361-366

- ⁹⁴ Galea M, Blamey R, Elston Ch, Ellis I. The Nottingham prognostic index in primary breast cancer Breast Cancer Research and Treatment 1992; Volume 22, Issue 3, pp 207-219
- ⁹⁵ Balslev I, Axelsson Ch, Zedeler K, Rasmussen B, Carstensen B, Mouridsen H. The Nottingham Prognostic Index applied to 9,149 patients from the studies of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG). Breast Cancer Research and Treatment 1994; Volume 32, Issue 3, pp 281-290
- ⁹⁶ Blameya R, Ellisa I, Pindera S, Leea A, Macmillana R, Morgana D, et al. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990–1999; European Journal of Cancer Volume 43, Issue 10, July 2007, Pages 1548–1555
- ⁹⁷ Rakha E, Soria D, Green A, Lemetre C, Powe D, Nolan C, et al. Nottingham Prognostic Index Plus (NPI p): a modern clinical decision making tool in breast cancer British Journal of Cancer, . 2014; 110, 1688–1697
- ⁹⁸ Gribbin J, Dewis R. Adjuvant! Online: review of evidence concerning its validity, and other considerations relating to its use in the NHS Early and Locally Advanced Breast Cancer: Diagnosis and Treatment NICE Clinical Guidelines, No. 80. National Collaborating Centre for Cancer (UK). Cardiff (UK): National Collaborating Centre for Cancer (UK); 2009 Feb.
- ⁹⁹ de Glas N, van de Water W, Engelhardt E, Bastiaannet E, de Craen A, Kroep J, et al. Validity of Adjuvant! Online program in older patients with breast cancer: a population-based study. The Lancet Oncology Volume 15, No. 7, p722–729, June 2014
- ¹⁰⁰ Bhoo-Pathya N, Yipc C, Hartmand M, Saxenad N, Taibc N, Hof G, et al. Adjuvant! Online is overoptimistic in predicting survival of Asian breast cancer patients European Journal of Cancer Volume 48, Issue 7, May 2012; Pages 982–989
- ¹⁰¹ Olivotto I, Bajdik Ch, Ravdin P, Speers C, Coldman A, Norris B, et al. Population-Based Validation of the Prognostic Model ADJUVANT! for Early Breast Cancer JCO April 20, 2005 vol. 23 no. 12 2716-2725
- ¹⁰² Campbell HE, Taylor MA, Harris AL, Gray AM. An investigation into the performance of the Adjuvant! Online prognostic programme in early breast cancer for a cohort of patients in the United Kingdom. Br J Cancer 2009; 101:1074-1084.
- ¹⁰³ Wishart G, Azzato E, Greenberg D, Rashbass J, Kearins O, Lawrence G, et al. PREDICT: a new UK prognostic model that predicts survival following surgery for invasive breast cancer Breast Cancer Research. 2010; 12:R1

- ¹⁰⁴ Ahluwalia M, Du L, Venur V. New graded prognostic index for breast cancer patients (pts) with brain metastases (BCBM). J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr 637)
- ¹⁰⁵ Седлоев Т. Оценка на прогностичните индекси (Дисертационен труд), Медицински Университет – София; 2014
- ¹⁰⁶ van de Water W, Markopoulos Ch, van de Velde C, Seynaeve C, Hasenburg A, Rea D, et al. Association Between Age at Diagnosis and Disease-Specific Mortality Among Postmenopausal Women With Hormone Receptor–Positive Breast Cancer JAMA. 2012;307(6):590-597
- ¹⁰⁷ Yu JI, Park W, Choi DH, Huh SJ, Nam SJ, Kim SW et al. Clinical Outcomes and Prognostic Factors of Pathologic N3 Breast Cancer Treated With Modern Standard Treatments. Clin Breast Cancer. 2015 Jun 18. pii: S1526-8209(15)00120-2.
- ¹⁰⁸ Brandt J, Garne JP, Tengrup I, Manjer J. Age at diagnosis in relation to survival following breast cancer: a cohort study. World J Surg Oncol. 2015 Feb 7;13:33
- ¹⁰⁹ Jayasinghe UW, Taylor R, Boyages J. Is age at diagnosis an independent prognostic factor for survival following breast cancer? ANZ J Surg. 2005 Sep; 75(9):762-7.
- ¹¹⁰ Sio T, Chang K, Jayakrishnan R, Wu D, Politi M, Malacarne D, et al. Patient age is related to decision-making, treatment selection, and perceived quality of life in breast cancer survivors World Journal of Surgical Oncology 2014; 12:230
- ¹¹¹ NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Breast Cancer. Version 3.2015.
- ¹¹² Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations Ann Oncol (2012) 23 (suppl 6):vi7-vi12.
- ¹¹³ Perez CA, Zumsteg ZS, Gupta G, Morrow M, Arnold B, Patil SM, et al. Black race as a prognostic factor in triple-negative breast cancer patients treated with breast-conserving therapy: a large, single-institution retrospective analysis. Breast Cancer Res Treat. 2013 Jun; 139(2):497-506.
- ¹¹⁴ Copson E, Maishman T, Gerty S, Eccles B, Stanton L, Cutress R, et al. POSH study steering group and Diana Eccles Ethnicity and outcome of young breast cancer patients in the United Kingdom: the POSH study British Journal of Cancer (2014) 110, 230–241.
- ¹¹⁵ Caudle A, Gonzalez-Angulo A, Hunt K, Liu P, Pusztai L, Symmans W, et al. Predictors of Tumor Progression During Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer JCO, 2010; vol. 28 no. 11 1821-1828

- ¹¹⁶ Demicheli R, Bonadonna G, Hrushesky W, Retsky M, Valagussa P. Menopausal status dependence of the timing of breast cancer recurrence after surgical removal of the primary tumour *Breast Cancer Res.* 2004; 6:R689-R696
- ¹¹⁷ Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, Cardoso F, on behalf of the ESMO Guidelines Working Group Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up *Ann Oncol* (2013)
- ¹¹⁸ Land L, Dalton S, Jensen M, Ewertz M. Influence of comorbidity on the effect of adjuvant treatment and age in patients with early-stage breast cancer. *British Journal of Cancer.* 2012; 107, 1901–1907.
- ¹¹⁹ Cappellani A, Vita M, Zanghì A, Cavallaro A, Piccolo G, Majorana M, et al. Prognostic factors in elderly patients with breast cancer. *BMC Surgery* 2013, 13(Suppl 2):S2
- ¹²⁰ Sjøgaard M, Thomsen R, Bossen K, Sørensen H, and Mette Nørgaard The impact of comorbidity on cancer survival: a review *Clin Epidemiol.* 2013; 5(Suppl 1): 3–29
- ¹²¹ Soerjomataram I, Louwman M, Ribot J, Roukema J, Coebergh J. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Feb; 107(3): 309–330.
- ¹²² Zhao X, Xu X, Zhang Q, Jia Z, Sun Si, Zhang J, et al.: Prognostic and predictive value of clinical and biochemical factors in breast cancer patients with bone metastases receiving "metronomic" zoledronic acid *BMC Cancer.* 2011; 11: 403.
- ¹²³ Cetin K, Christiansen Ch, Sværke Cl, Jacobsen J, Sørensen H. Survival in patients with breast cancer with bone metastasis: a Danish population-based cohort study on the prognostic impact of initial stage of disease at breast cancer diagnosis and length of the bone metastasis-free interval. *BMJ Open* 2015;5:e007702
- ¹²⁴ Chan D, Vieira A, Aune D, Bandera E, Greenwood D, McTiernan A et al. Body mass index and survival in women with breast cancer—systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies *Ann Oncol.* 2014; Volume 25, Issue 10
- ¹²⁵ Vodermaier A, Linden W, Rnic K, Young S, Ng A, Ditsch N, et al. Prospective associations of depression with survival: a population-based cohort study in patients with newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 143:373–384
- ¹²⁶ Zainal N, Nik-Jaafar N, Baharudin A, Sabki Z, Ng Ch. Prevalence of Depression in Breast Cancer Survivors: a Systematic Review of Observational Studies *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* Volume 14, Issue 4, 2013; pp.2649-2656

- ¹²⁷ Davi J, Collie K, Rancourt K, Neri E, Kraemer H, Spiegel D. Decrease in Depression Symptoms Is Associated With Longer Survival in Patients With Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis. *JCO* February 1, 2011 vol. 29no. 4 413-420
- ¹²⁸ Chena J, Dengb Q, Panb Y, Heb B, Yingc H, Suna H, et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer. *FEBS Open Bio* Volume 5, 2015, Pages 502–507
- ¹²⁹ Koh C, Bhoo-Pathy N, Ng K, Jabir R, Tan G, See M, et al. Utility of pre-treatment neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio as prognostic factors in breast cancer *British Journal of Cancer*. 2015; 113, 150–158. doi:10.1038/bjc.2015.183
- ¹³⁰ Shin H, Kim J, Son B, Lee J, Kim H, Ko B, et al. Neutrophil Lymphocyte Ratio Change After Systemic Therapy is Predictive of Cancer Specific Survival in Stage IV Breast Cancer *Global Breast Cancer Conference 2015 & 4th International Breast Cancer Symposium*
- ¹³¹ Chen X, Lu W, Zheng W, Gu K, Chen Z, Zheng Y, et al. Obesity and weight change in relation to breast cancer survival *Breast Cancer Research and Treatment* August 2010; Volume 122, Issue 3, pp 823-833
- ¹³² Marinho LA, Rettori O, Vieira-Matos AN. Body weight loss as an indicator of breast cancer recurrence. *Acta Oncol*. 2001;40(7):832-7.
- ¹³³ Huober J, Gelber S, Goldhirsch A, Coates A, G. Viale, Öhlschlegel C et al. Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. *Ann Oncol*. 2012; 23 (11): 2843-2851.
- ¹³⁴ Nagaoa T, Kinoshitaa T, Hojoa T, Tsudab H, Tamuraa K, Fujiwaraa Y. The differences in the histological types of breast cancer and the response to neoadjuvant chemotherapy: The relationship between the outcome and the clinicopathological characteristics *The Breast*. Volume 21, Issue 3. June 2012; Pages 289–295
- ¹³⁵ Kyndi M, Sørensen F, Knudsen H, Overgaard M, Nielsen H, Overgaard J. Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and Response to Postmastectomy Radiotherapy in High-Risk Breast Cancer: The Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 26:1419-1426.
- ¹³⁶ Jacquemier J, Boher J, Roche H, Esterni B, Serin D, Kerbrat P et al. Protein expression, survival and docetaxel benefit in node-positive breast cancer treated with adjuvant chemotherapy in the FNCLCC - PACS 01 randomized trial *Breast Cancer Res*. 2011; 13(6): R109.
- ¹³⁷ Liedtke C, Mazouni C, Hess K, André F, Tordai A, Mejia J, et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer *JCO* March 10, 2008; vol. 26 no. 8 1275-1281

- ¹³⁸ Yerushalmi R, Woods R, Sca M, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential *The Lancet Oncology* Volume 11, Issue 2, February 2010; Pages 174–18
- ¹³⁹ Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Tashima R, Toyozumi Y, Arima N. Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis. *World Journal of Surgical Oncology* 2011; 9:13
- ¹⁴⁰ Konga X, Moranb M, Zhanga N, Hafftyc B, Yang Q. Meta-analysis confirms achieving pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy predicts favourable prognosis for breast cancer patients *European Journal of Cancer* Volume 47, Issue 14, September 2011; Pages 2084–2090
- ¹⁴¹ Lobbes M, Prevos R, Smidt M. Response monitoring of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy using breast MRI – a review of current knowledge. *Journal of Cancer Therapeutics and Research* 2012, 1:34
- ¹⁴² Miller M, Ottesen RA, Niland JC, Kruper L, Chen SL, Vito C. Tumor response ratio predicts overall survival in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2014 Oct; 21(10):3317-23.
- ¹⁴³ Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology.* 1996; 105(4):394-402
- ¹⁴⁴ Brzozowska A, Sodolski T, Duma D, Mazurkiewicz T, Mazurkiewicz M. Evaluation of prognostic parameters of E-cadherin status in breast cancer treatment *Ann Agric Environ Med.* 2012; 19(3): 541-546.
- ¹⁴⁵ Yoshida R, Kimura N, Harada Y, Ohuchi N. The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol.* 2001 Mar; 18(3):513-20.
- ¹⁴⁶ Younis L, Sakka H, Haque I. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer *Int J Health Sci (Qassim).* 2007 Jan; 1(1): 43–51.
- ¹⁴⁷ Margolese R, Hortobagyi G, Buchholz T. *Natural History and Prognostic Markers* Holland-Frei *Cancer Medicine.* 6th edition.
- ¹⁴⁸ Bouchardy Ch, Verkooijen H, Fioretta G. Social class is an important and independent prognostic factor of breast cancer mortality *Int. J. Cancer:* 119, 1145–1151. 2006; Wiley-Liss, Inc.

¹⁴⁹ Héry M, Bonnetterre J, Roché H, Luporsi E, Kerbrat P, Namer M et al. Epirubicin-based chemotherapy as adjuvant treatment for poor prognosis, node-negative breast cancer: 10-year follow-up results of the French Adjuvant Study Group 03 trial *Bulletin du Cancer*. 2006; Volume 93, issue 10

¹⁵⁰ Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *The Lancet*, Volume 378, Issue 9804, 12–18 November 2011, Pages 1707-1716

¹⁵¹ Coleman M, Forman D, Bryant H, Butler J, Maringe R, Nur U et al. the ICBP Module 1 Working Group. Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995–2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): an analysis of population-based cancer registry data *Volume 377, Issue 9760, 8–14 January 2011; Pages 127–138*

¹⁵² Dawood Sh, Broglio K, Gonzalez-Angulo A, Buzdar A, Hortobagyi G, Giordano S. Trends in Survival Over the Past Two Decades Among White and Black Patients With Newly Diagnosed Stage IV Breast Cancer *J CO*. 2008; vol. 26no. 30 4891-4898

¹⁵³ Kesson E, Allardice G, George W, Burns H, Morrison D. Effects of multidisciplinary team working on breast cancer survival: retrospective, comparative, interventional cohort study of 13 722 women. *BMJ* 2012;344:e2718

¹⁵⁴ Bérubé S, Lemieux J, Moore L, Maunsell E, Brisson J. Smoking at time of diagnosis and breast cancer-specific survival: new findings and systematic review with meta-analysis Bérubé et al. *Breast Cancer Research*. 2014; 16:R42

¹⁵⁵ Pierce JP, Patterson RE, Senger CM, Flatt SW, Caan BJ, Natarajan L et al. Lifetime cigarette smoking and breast cancer prognosis in the After Breast Cancer Pooling Project. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Jan;106(1):djt359

¹⁵⁶ Takeuchi H, Baba H, Kano T, Maehara Y. The time-related changes of the importance of prognostic factors in breast cancer. A sequential multivariate analysis of 1423 Japanese patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 94(3):273-8.

¹⁵⁷ Rabban J. The New Edition (7th) AJCC Staging System for Breast Cancer: A Summary of Key Changes. 2010; Pathology Department, University of California, San Francisco. OpenURL

¹⁵⁸ Dings PJ, Elferink MA, Strobbe LJ, de Wilt JH. The prognostic value of lymph node ratio in node-positive breast cancer: a Dutch nationwide population-based study. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20(8):2607-14

- ¹⁵⁹ Solak M, Turkoz FP, Keskin O, Aksoy S, Babacan T, Sarici F, Kertmen N, Sever AR, Altundag K. The lymph node ratio as an independent prognostic factor for non-metastatic node-positive breast cancer recurrence and mortality. *J BUON*. 2015 May-Jun; 20(3):737-45.
- ¹⁶⁰ Liu D, Chen Y, Deng M, Xie G, Wang J, Zhang L et al. Lymph node ratio and breast cancer prognosis: a meta-analysis *Breast Cancer* January 2014, Volume 21, Issue 1, pp 1-9
- ¹⁶¹ Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015; 26: 1533–1546.
- ¹⁶² Parise C, Caggiano V. Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *Journal of Cancer Epidemiology*. Volume 2014; Article ID 469251, 11 pages
- ¹⁶³ Goel M, Khanna P, Kishore J. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate *Int J Ayurveda Res*. 2010 Oct-Dec; 1(4): 274–278.
- ¹⁶⁴ Bland J, Altman D. The logrank test *BMJ*. 2004 May 1; 328(7447): 1073.
- ¹⁶⁵ Cox D, Oakes D. *Analysis of Survival Data*. 1972
- ¹⁶⁶ Cox D. Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society* 1972; B34:187-220.
- ¹⁶⁷ McDonald J.H. *Handbook of Biological Statistics*. 2014, 3rd ed. pages 77-85 version.
- ¹⁶⁸ Chen J, Deng Q, Pan Y, He B, Ying H, Sun H et al. , Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer *FEBS Open Bio*. 2015; 5: 502–507.
- ¹⁶⁹ Zhou X, Du Y, Huang Z, Xu J, Qiu T, Wang J et al. Prognostic Value of PLR in Various Cancers: A Meta-Analysis *PLoS One*. 2014; 9(6): e101119.
- ¹⁷⁰ Krenn-Pilko S, Langsenlehner U, Stojakovic T, Pichler M, Gerger A, Kapp KS, Langsenlehner T. An elevated preoperative plasma fibrinogen level is associated with poor disease-specific and overall survival in breast cancer patients. *Breast*. 2015 Oct; 24(5):667-72.
- ¹⁷¹ Wen J, Yang Y, Ye F, Huang X, Li S, Wang Q, Xie X. The Preoperative Plasma Fibrinogen Level Is an Independent Prognostic Factor for Overall Survival of Breast Cancer Patients Who Underwent Surgical Treatment. *Breast* 2015 Oct 16; 24(6):745-50.
- ¹⁷² Elkin EB, Hudis C, Begg CB, Schrag D. The effect of changes in tumor size on breast carcinoma survival in the U.S.: 1975-1999. *Cancer*. 104(6):1149-57, 2005 -
- ¹⁷³ Rezo A, Dahlstroma J, Shadbolta B, Rodinsd K, Zhangb Y, Davisa A in collaboration with ACT & SENSW BCTG Tumor size and survival in multicentric and multifocal breast cancer. *Breast*. 2011 Jun;20(3):259-63

- ¹⁷⁴ Jesinger A. Breast anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interv Radiol* 2014; 17(1):3:9
- ¹⁷⁵ Weissenbacher TM, Zschage M, Janni W, Jeschke U, Dimpfl T, Mayr D et al. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified? *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jul; 122(1):27-34
- ¹⁷⁶ Ustaalioglu BO, Bilici A, Kefeli U, Şeker M, Oncel M, Gezen C, et al. The importance of multifocal/multicentric tumor on the disease-free survival of breast cancer patients: single center experience. *Am J Clin Oncol.* 2012 35(6):580-6
- ¹⁷⁷ Rabban J. The New Edition (7th) AJCC Staging System for Breast Cancer A Summary of Key Changes
- ¹⁷⁸ Song Y, Shin S, Cho J, Park M, The Role of Lymphovascular Invasion as a Prognostic Factor in Patients with Lymph Node-Positive Operable Invasive Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2011 Sep; 14(3): 198–203.
- ¹⁷⁹ Woo CS, Silberman H, Nakamura SK, Ye W, Sposto R, Colburn W et al. Lymph node status combined with lymphovascular invasion creates a more powerful tool for predicting outcome in patients with invasive breast cancer. *Am J Surg.* 2002 Oct; 184(4):337-40.
- ¹⁸⁰ Van Zee KJ, Manasseh DM, Bevilacqua JL, Boolbol SK, Fey JV, Tan LK et al. A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol.* 2003 Dec; 10(10):1140-51.
- ¹⁸¹ Scow JS, Degenim AC, Hoskin TL, Reynolds C, Boughey JC. Assessment of the performance of the Stanford Online Calculator for the prediction of nonsentinel lymph node metastasis in sentinel lymph node-positive breast cancer patients. *Cancer.* 2009 Sep 15; 115(18):4064-70.
- ¹⁸² Rakha E, Martin S, Lee A, Morgan D, Pharoah P, Hodi Z, et al. The Prognostic Significance of Lymphovascular Invasion in Invasive Breast Carcinoma. *Cancer.* 2011; Volume 118, Issue 15
- ¹⁸³ Yamaguchi J, Ohtani H, Nakamura K, Shimokawa I, Kanematsu T. Prognostic Impact of Marginal Adipose Tissue Invasion in Ductal Carcinoma of the Breast. *Am J Clin Pathol* 2008;130:382-388
- ¹⁸⁴ Wu S, He Zh, Li Q, Sun J, Li F, Lin H et al. Prognostic Value of Metastatic Axillary Lymph Node Ratio for Chinese Breast Cancer Patients *PLoS One.* 2013; 8(4): e61410

- ¹⁸⁵ Xiao XS, Tang HL, Xie XH, Li LS, Kong YN, Wu MQ, et al. Metastatic axillary lymph node ratio (LNR) is prognostically superior to pN staging in patients with breast cancer--results for 804 Chinese patients from a single institution. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(9):5219-23.
- ¹⁸⁶ Zhu C, Wu XZ. Proposal of new classification for stage III breast cancer on the number and ratio of metastatic lymph nodes *J Surg Oncol.* 2012 Nov; 106(6):696-702.
- ¹⁸⁷ Lee H, Ko S, Yoon C, Kang S, Hur M, Kim E et al. Prognostic significance of metastatic axillary lymph node ratio in stage IIIC (pN3) breast cancer. *The Breast.* 2007; Volume 16, Supplement 1, Pages S26
- ¹⁸⁸ Onitilo A, Engel J, Greenlee R, Mukesh B. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clinical Medicine & Research.* 2009; vol. 7 no. 1-2 4-13
- ¹⁸⁹ Jonat W, Arnold N. Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Ann Oncol.* 2011; 22 (3): 500-502.
- ¹⁹⁰ Dieterich M, Hartwig F, Stuberta J, Klöcking S, Kundt G, Stengeld B et al. Accompanying DCIS in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma is predictive of improved local recurrence-free survival. *The Breast.* 2014; Volume 23, Issue 4, Pages 346–351
- ¹⁹¹ Litière S, Werutsky G, Fentiman I, Rutgers E, Christiaens M, Van Limbergen E, et al. Breast conserving therapy versus mastectomy for stage I–II breast cancer: 20 year follow-up of the EORTC 10801 phase 3 randomised trial. *The Lancet.* 2012 Volume 13, No. 4, p412–419
- ¹⁹² Giuliano A, Hunt K, Ballman K, Beitsch P, Whitworth P, Blumencranz P, et al. Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis. *JAMA.* 2011; Vol 305, No. 6
- ¹⁹³ Lia C, Zhang P, Lia R, Wua C, Zhanga X, Zhua H. Axillary lymph node dissection versus sentinel lymph node biopsy alone for early breast cancer with sentinel node metastasis: A meta-analysis *European Journal of Surgical Oncology (EJSO).* 2015; Volume 41, Issue 8, Pages 958–966
- ¹⁹⁴ Fisher C, Ma C, Gillanders W, Aft R, Eberlein T, Gao F, et al. Margenthaler Neoadjuvant Chemotherapy Is Associated with Improved Survival Compared with Adjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer Only after Complete Pathologic Response *Annals of Surgical Oncology.* 2012; Volume 19, Issue 1, pp 253-258
- ¹⁹⁵ Fransson M, Rial-Sebbag E, Brochhausen M, Litton J. Toward a common language for biobanking. *Eur J Hum Genet.* 2014; 23, 22–28;

- ¹⁹⁶ GLOBAL DIRECTORY OF BIOBANKS, TISSUE BANKS AND BIOREPOSITORIES. <http://specimencentral.com>
- ¹⁹⁷ Thompson A, Brennan K, Cox A, Gee J, Harcourt D, Harris A, and Breast Cancer Campaign Gap Analysis Meeting. Evaluation of the current knowledge limitations in breast cancer research: a gap analysis. *Breast Cancer Research*. 2008; 10:R26
- ¹⁹⁸ Sudlow C, Gallacher J, Allen N, Beral V, Burton P, Danesh J, et al. UK Biobank: An Open Access Resource for Identifying the Causes of a Wide Range of Complex Diseases of Middle and Old Age. (2015) *PLoS Med* 12(3): e1001779
- ¹⁹⁹ Report of the Expert Group on Dealing with Ethical and Regulatory Challenges of International Biobank Research. *Biobanks for Europe- A challenge for Governance*. 2012
- ²⁰⁰ Kwan M, Bernard P, Kroenke C, Factor R, Habel L, Weltzien E et al. Breastfeeding, PAM50 Tumor Subtype, and Breast Cancer Prognosis and Survival *JNCI J Natl Cancer Inst* (2015) 107(7): djv087
- ²⁰¹ Gustbée E, Anesten C, Markkul A, Simonsson M, Rose C, Ingvar C Jernström H. Excessive milk production during breast-feeding prior to breast cancer diagnosis is associated with increased risk for early events. *SpringerPlus* 2013, 2:298
- ²⁰² Kroenke CH, Fung TT, Hu FB, Holmes MD. Dietary patterns and survival after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol*. 2005; 23:9295–9303
- ²⁰³ Kwan ML, Weltzien E, Kushi LH, Castillo A, Slattery ML, Caan BJ. Dietary patterns and breast cancer recurrence and survival among women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27:919–926.
- ²⁰⁴ Belle F, Kampman E, McTiernan A, Bernstein L, Baumgartner K, Baumgartner R et al. Dietary Fiber, Carbohydrates, Glycemic Index and Glycemic Load in Relation to Breast Cancer Prognosis in the HEAL Cohort *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 May; 20(5): 890–899.
- ²⁰⁵ Beasley J, Newcomb P, Trentham-Dietz A, Hampton J, Bersch A, Passarelli M et al. Post-diagnosis dietary factors and survival after invasive breast cancer *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jul; 128(1): 229–236.
- ²⁰⁶ Chi F, Wu R, Zeng YC, Xing R, Liu Y, Xu ZG. Post-diagnosis soy food intake and breast cancer survival: a meta-analysis of cohort studies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(4):2407-12.
- ²⁰⁷ Newcomb P, Kampman E, Trentham-Dietz A, Egan K, Titus L, Baron J et al. Alcohol Consumption Before and After Breast Cancer Diagnosis: Associations With Survival From Breast Cancer, Cardiovascular Disease, and Other Causes. *J Clin Oncol*. 2013; 31(16):1939-46.

- ²⁰⁸ Holm M, Olsen A, Christensen J, Kroman N, Bidstrup P, Johansen Ch et al. Pre-diagnostic alcohol consumption and breast cancer recurrence and mortality: Results from a prospective cohort with a wide range of variation in alcohol intake. *International Journal of Cancer*. 2013; Volume 132, Issue 3, pages 686–694
- ²⁰⁹ Kabat GC, Kim M, Phipps AI, Li CI, Messina CR, Wactawski-Wende J et al. Smoking and alcohol consumption in relation to risk of triple-negative breast cancer in a cohort of postmenopausal women. *Cancer Causes Control*. 2011; 22(5):775-83
- ²¹⁰ Prabhakar D, Harris L, Cheryl L. Effect of current smoking on risk of triple negative breast cancer. *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr 1592)
- ²¹¹ Cho J, Jung S, Lee J, Shim E, Kim N, Kim Z et al. A Review of Breast Cancer Survivorship Issues from Survivors' Perspectives *J Breast Cancer*. 2014; 17(3): 189–199.
- ²¹² Koukourakisa M, Papazogloub D, Giatromanolakic A, Bougioukasd G, Maltezosb E, Siviridisc E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004;Volume 46, Issue 3, Pages 293–298
- ²¹³ Yan Y, Liang H, Li T, Guo Sh, Li M, Li Sh, Qin X. Vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis of 13 case–control studies *Tumor Biol*. 2014; 35:2687–2692
- ²¹⁴ Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000; 37(6):443-8.
- ²¹⁵ Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger EA. Common 936 C/T Mutation in the Gene for Vascular Endothelial Growth Factor Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Plasma Levels *J Vasc Res* 2000; 37:443–448
- ²¹⁶ Rodrigues P, Furriol J, Tormo E, Ballester S, Lluch A, Eroles P. The single-nucleotide polymorphisms +936 C/T VEGF and -710 C/T VEGFR1 are associated with breast cancer protection in a Spanish population. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 133(2):769-78.
- ²¹⁷ Absenger G, Szkandera J, Stotz M, Pichler M, Winder T, Langsenlehner T. A common and functional gene variant in the vascular endothelial growth factor predicts clinical outcome in early-stage breast cancer. *Mol Carcinog*. 2013; 52 Suppl 1:E96-102.
- ²¹⁸ Ma J, Hu W, Zhang P, Sun Y, Wang N, Teng X, Qiao Q. The Association Between VEGF +936C/T and -634G/C Polymorphisms and Breast Cancer Susceptibility, Tumor Growth, and Metastases: Evidence From 20,728 Subjects. *Cancer Invest*. 2015; 33(7):312-7

- ²¹⁹ Додова Р. Влияние на генетични и геномни промени върху развитието на рака на гърдата в българската популация (Дисертационен труд) Медицински Университет София 2015
- ²²⁰ Online Statistics Education: A Multimedia Course of Study (<http://onlinestatbook.com/>). Project Leader: David M. Lane, Rice University.
- ²²¹ Mankiewicz P. The Story of Mathematics (Paperback ed.). Princeton, NJ: Princeton University Press. 2004; p. 158. ISBN 9780691120461.
- ²²² Folkman J. Tumor angiogenesis. Therapeutic implications. N Engl J Med. 1971; 285:1182–1186
- ²²³ Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. J Natl Cancer Inst. 1972; 48:347–356
- ²²⁴ Alia E, Shetab M, Mohsenc M. Elevated serum and tissue VEGF associated with poor outcome in breast cancer patients. Alexandria Journal of Medicine 2011; Vol.47, Issue 3, , Pages 217–224
- ²²⁵ Zhang C, Hu Y, Qian H, Jiao Sh, Liu Zh, Tao H, Han L. Expression and Significance of ER, PR, VEGF, CA15-3, CA125 and CEA in Judging the Prognosis of Breast Cancer. Asian Pacific J Cancer Prev 2013; 14 (6), 3937-3940
- ²²⁶ Gasparini G. Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer The Oncologist. 2000; vol. 5 Supplement 1 37-44
- ²²⁷ Ferrara N, Hillan K, Gerber H, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer Nature Reviews Drug Discovery 3,2004; 391–400
- ²²⁸ "Press Announcements - FDA Commissioner announces Avastin decision". U.S. Food and Drug Administration. 18 Nov 2011. Retrieved 31 Oct 2014.
- ²²⁹ Власковска М, Дудов А, Куртева Г, Христова Св, Хаджиева Т, Калев Д. и съавтори. Национални медицински стандарти за системно лекарствено лечение, оценка на лечебен ефект и проследяване на слокачествени солидни тумори при възрастни. 2015; Списние на Българското Онкологично Дружество
- ²³⁰ Lima J, Rodrigues D, Carcano F, Cruz M, Dos Santos L. Anti-Cancer Agents & Biologic Therapy Breast Cancer, Metastatic Translational Research. Annals of Oncology. 2014; 25 (suppl_4): iv116-iv136.
- ²³¹ Sikov W, Berry D, Perou C, Singh B, Cirrincione C, Tolaney S et al. Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-

Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (Alliance). JCO. 2015; vol. 33 no. 1 13-21

²³² Bear H, Tang G, Rastogi P, Geyer Sh, Liu Q, Robidoux A et al. Neoadjuvant plus adjuvant bevacizumab in early breast cancer (NSABP B-40 [NRG Oncology]): secondary outcomes of a phase 3, randomised controlled trial. The Lancet Oncology 2015; Volume 16, Issue 9, Pages 1037–1048

²³³ Blank P, Loibl S, Linderholm B, Caramuta S, Nekljudova V, Szucs T et al. Cost-effectiveness analysis of VEGF-A testing to predict response to bevacizumab (BEV) as a component of neoadjuvant therapy of early HER's-2 negative breast cancer. Ann Oncol. 2015; 26 (suppl 3):iii16-iii17.

²³⁴ Etienne-Grimaldi M, Formento P, Degeorges A, Pierga J, Delva R, Pivot X et al. Prospective analysis of the impact of VEGF-A gene polymorphisms on the pharmacodynamics of bevacizumab-based therapy in metastatic breast cancer patients Br J Clin Pharmacol. 2011; 71(6): 921–928.

²³⁵ Hein AI, Lambrechts D, Minckwitz G, Haberle L, Eidtmann H, Tesch H et al. Genetic variants in VEGF pathway genes in neoadjuvant breast cancer patients receiving bevacizumab: Results from the randomized phase III GeparQuinto study. Int. J. Cancer. 2015; 137, 2981–2988

²³⁶ Alldridge L, Metodieva G, Greenwood Ch, Al-Janabi K, Thwaites L, Sauven P, Metodiev M. Proteome Profiling of Breast Tumors by Gel Electrophoresis and Nanoscale Electrospray Ionization Mass Spectrometry J. Proteome Res. 2008; 7 (4), pp 1458–1469

²³⁷ Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(5259): 680-685.

²³⁸ Metodiev M, Timanova A, Stone D. Differential phosphoproteome profiling by affinity capture and tandem matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Proteomic.s 2004; 4, 1433–1438.

²³⁹ Willard H. H. (1988) Instrumental methods of analysis. Belmont, Calif.: Wadsworth Pub. Co. xxi, 895pp.

²⁴⁰ Orbitrap - High Resolution, High Mass Accuracy - LC/MS. THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM. <http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/orbitrap.html>

²⁴¹ Barchelo D, Garcia-Canas V, Cifuentes AI, Simo C. Applications of Advanced Omics Technologies: From Genes to Metabolites. Comprehensive Analytical Chemistry 1st Edition 2014; Volum 64

²⁴² GeneCards® Human Gene Database. MPO Gene (Proten Coding)
http://pathcards.genecards.org/card/transcriptional_misregulation_in_cancer

²⁴³ Carpena X., Vidossich P., Schroettner K., Calisto B.M., Banerjee S., Stampl J et al. Essential role of proximal histidine-asparagine interaction in Mammalian peroxidases. *J.Biol.Chem.* 2009; 284: 25929-25937 doi: 10.2210/pdb3f9p/pdb

²⁴⁴ GeneCards® Human Gene Database. MPO Gene (Proten Coding)
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MPO>

²⁴⁵ Ambrosone Ch, Barlow W, Reynolds W, Livingston R, Yeh I, Choi J et al. Myeloperoxidase Genotypes and Enhanced Efficacy of Chemotherapy for Early-Stage Breast Cancer in SWOG-8897 *J Clin Oncol.* 2009; 27(30): 4973–4979.

²⁴⁶ Ky B, Putt M, Sawaya H, French B, Januzzi JL Jr, Sebag IA et al. Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes, and trastuzumab. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63(8):809-16.

²⁴⁷ Drosner R, Hirt Ch, Eppenberger-Castori S, Zlobec I, Viehl C, Frey D et al. High Myeloperoxidase Positive Cell Infiltration in Colorectal Cancer Is an Independent Favorable Prognostic Factor *PLoS One.* 2013; 8(5): e64814.

²⁴⁸ Däster S, Eppenberger-Castori S, Hirt Ch, Soysal S, Delko T, Nebiker Ch et al. Absence of myeloperoxidase and CD8 positive cells in colorectal cancer infiltrates identifies patients with severe prognosis *Oncolmunology.* 2015; Volume 4, Issue 12

²⁴⁹ Ilie M, Hofman V, Ortholan C, Bonnetaud C, Coëlle C, Mouroux J, Hofman P. Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011; 118: 1726–1737

²⁵⁰ Li YW, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Gao Q, Xiao YS et al. Intratumoral neutrophils: a poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma following resection. *J Hepatol* 2011; 54: 497–505

²⁵¹ Mueller B. Myeloperoxidase in the Progression of Breast Cancer Descriptive Note : Final rept. 28 Aug 2009-27 Aug 2012
<http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA575227>

²⁵² Chiba-Kamoshida, K., Matsui, T., Chatake, T., Ohhara, T., Ostermann, A., Tanaka, I., Site-specific softening of peptide bonds by localized deuterium observed by neutron crystallography of human lysozyme hydrogen
<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3FE0>

- ²⁵³ Vizoso F , Plaza E, Vázquez J, Serra C, Lamelas M, González L, et al. Lysozyme Expression by Breast Carcinomas, Correlation With Clinicopathologic Parameters, and Prognostic Significance. *Annals of Surgical Oncology*. 2001; Volume 8, Issue 8, pp 667-674
- ²⁵⁴ Serra C, Vizoso F, Alonso L, Rodríguez J, González L, Fernández M et al. Expression and prognostic significance of lysozyme in male breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002; 4(6): R16.
- ²⁵⁵ Pauli BU, Abdel-Ghany M, Cheng HC, Gruber AD, Archibald HA, Elble RC. Molecular characteristics and functional diversity of CLCA family members. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27(11):901-5.
- ²⁵⁶ Ferraroni M, Solyanikova IP, Kolomytseva MP, Scozzafava A, Golovleva LA, Briganti FJ. CRYSTAL STRUCTURE OF 3-CHLOROCATECHOL 1,2-DIOXYGENASE FROM RHODOCOCCLUS OPACUS 1CP. Protein Data Bank in Europe. Bringing Structure to Biology *Mol. Biol.* (2006)
- ²⁵⁷ UniProtKB - Q9UQC9 (CLCA2_HUMAN). <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UQC9>
- ²⁵⁸ Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *J Biol Chem*. 2001; 276(27):25438-46
- ²⁵⁹ Walia V, Yu Y, Cao D, Sun M, McLean JR, Hollier BG et al. Loss of breast epithelial marker hCLCA2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and indicates higher risk of metastasis. *Oncogene*. 2012; 31(17):2237-46.
- ²⁶⁰ Sasaki Y, Koyama R, Maruyama R, Hirano T, Tamura M et al. CLCA2, a target of the p53 family, negatively regulates cancer cell migration and invasion. *Cancer Biol Ther*. 2012; 13(14):1512-21
- ²⁶¹ Walia V, Ding M, Kumar S, Nie D, Premkumar LS, Elble RC. hCLCA2 Is a p53-Inducible Inhibitor of Breast Cancer Cell Proliferation. *Cancer Res*. 2009; 69(16):6624-32
- ²⁶² Handford P. Fibrillin-1, a calcium binding protein of extracellular matrix *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2000; Volume 1498, Issues 2–3, Pages 84–90
- ²⁶³ Sengle G, Tsutsui K, Keene D, Tufa S, Carlson E, Charbonneau N et al. Microenvironmental Regulation by Fibrillin-1 *PLoS Genet*. 2012; 8(1):e1002425
- ²⁶⁴ Guo Q, Song Y, Zhang H, Wu X, Xia P, Dang C. Detection of hypermethylated fibrillin-1 in the stool samples of colorectal cancer patients. *Med Oncol*. 2013; 30(4):695
- ²⁶⁵ Wang Z, Liu Y, Lu L, Yang L, Yin Sh, Wang Y et al. Fibrillin-1, induced by Aurora-A but inhibited by BRCA2, promotes ovarian cancer metastasis. *Oncotarget*. 2015; 6(9):6670-83.

- ²⁶⁶ Giussani M, Merlino G, Cappelletti V, Tagliabue E, Daidone M. Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression *Seminars in Cancer Biology*. 2015; vol 35 Pages 3–10
- ²⁶⁷ GeneCards® Human Gene Database. FNDC1 Gene (Protein Coding) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FNDC1>
- ²⁶⁸ Schulz D, Böllner C, Thomas G, Atkinson M, Esposito I, Höfler H et al. Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE and mass spectrometry *J. Proteome Res.* 8.2009; pp. 3430–3438
- ²⁶⁹ Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL et al. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer*. 2002; 38(18):2362-70.
- ²⁷⁰ Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, Thibaud-Nissen F, Astashyn A, Ermolaeva O et al. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res.* 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80781>
- ²⁷¹ Boudko SP, Sasaki T, Engel J, Lerch TF, Nix J, Chapman MS et al. Crystal structure of human collagen XVIII trimerization domain: A novel collagen trimerization *Fold. J. Mol. Biol.* **392** 787-802 (2009) PMID: 19631658
- ²⁷² Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell. Res.* 2006; 312 (5, part 2): 594–607.
- ²⁷³ Nemoto T, Hori H, Yoshimoto M, Seyama Y, Kubota Sh. Overexpression of ornithine decarboxylase enhances endothelial proliferation by suppressing endostatin expression *Blood journal* 2002; Volume: 99 Issue: 4 Pages: 1478 - 1481
- ²⁷⁴ Brideau G, Mäkinen MJ, Elamaa H, Tu H, Nilsson G, Alitalo K et al. Endostatin overexpression inhibits lymphangiogenesis and lymph node metastasis in mice. *Cancer Res.* 2007; 67(24):11528-35.
- ²⁷⁵ Sund M, Kalluri R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28(0): 177–183.
- ²⁷⁶ UniProtKB - P06702 (S10A9_HUMAN) <http://www.uniprot.org/uniprot/P06702>
- ²⁷⁷ Bergenfelz C, Gaber A, Allaoui R, Mehmeti M, Jirström K, Leanderson T et al. S100A9 expressed in ER(-)PgR(-) breast cancers induces inflammatory cytokines and is associated with an impaired overall survival. *Br J Cancer.* 2015; 113(8):1234-43

- ²⁷⁸ Noetzel E, Schütz A, Bernhagen J, Hartmann A, Dahl E, Knüchel-Clarke R. Abstract LB-218: S100A9 is a novel biomarker for poor survival of breast cancer patients *Cancer Res* April 15, 2010 70; LB-218
- ²⁷⁹ Williamson S, Hartley A, Heer R. A review of tasquinimod in the treatment of advanced prostate cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2013; 7: 167–174.
- ²⁸⁰ File:Protein HSPG2 PDB 1gl4.png. <https://en.wikipedia.org/wiki/Perlecan>
- ²⁸¹ Douglassa S, Goyala A, Iozzo R. The role of perlecan and endorepellin in the control of tumor angiogenesis and endothelial cell autophagy *Connective Tissue Research* 2015; Vol. 56, Issue 5
- ²⁸² Chang JW, Kang UB, Kim DH, Yi JK, Lee JW, Noh DY et al. Identification of circulating endorepellin LG3 fragment: Potential use as a serological biomarker for breast cancer. *Proteomics Clin Appl.* 2008; 2(1):23-32
- ²⁸³ Bix G, Castello R, Burrows M, Zoeller JJ, Weech M, Iozzo RA, et al. Endorepellin in vivo: targeting the tumor vasculature and retarding cancer growth and metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98, 1634–1646.
- ²⁸⁴ Poluzzia C, Iozzo R, Schaefer L. Endostatin and endorepellin: A common route of action for similar angiostatic cancer avengers. *Advanced Drug Delivery Reviews* Volume 97, 1 February 2016, Pages 156–173
- ²⁸⁵ Ingenuity IPA - Integrate and understand complex 'omics data <http://www.ingenuity.com/products/ipa>
- ²⁸⁶ Baitchev G, Gortchev G, Velkova A, Deliisky T. Predictors of recurrence in stage I invasive breast carcinoma. *Radiol Oncol* 2001; 35(2): 133-7
- ²⁸⁷ Krasteva ME, Garanina Z, Georgieva EI. Optimized polymerase chain reaction-based single-strand conformation polymorphism analysis of p53 gene applied to Bulgarian patients with invasive breast cancer. *Clin Exp Med.* 2003 Nov; 3(3):173-80.
- ²⁸⁸ Dodova RI, Mitkova AV, Dacheva DR, Hadjo LB, Vlahova AI, Hadjieva MS et al. Spectrum and frequencies of BRCA1/2 mutations in Bulgarian high risk breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2015 Jul 17; 15:523.
- ²⁸⁹ Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrillov IG, Georgieva EI. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010 Nov;136(11):1657-69

²⁹⁰ Hu Y, Hu M, Shi G, Han Y, Li B. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin correlates with the prognosis of operable non-small cell lung cancer. *EJSO* 40.2014; 1136e1142

²⁹¹ Zhao J, Yan F, Ju H, Tang J, Qin J. Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 2004; 204(1):87-95.

ПУБЛИКАЦИИ:

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

УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ

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