

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ- ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ „ЗДРАВНИ ГРИЖИ“
КАТЕДРА „СЕСТРИНСКИ ХИРУРГИЧНИ ГРИЖИ“

Д-р Васил Димитров Нанев

**Проучване честотата и ролята на морфологичния и биологичен туморен
хетерогенитет при карцином на млечната жлеза**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„доктор“

7.1. Медицина, Докторска програма „Обща хирургия“

Научни ръководители:

Доц. Д-р Страхил Асенов Страшилов д.м.

Доц. Д-р Иван Недков Иванов д.м.

Рецензенти:

Проф. д-р Илия Атанасов Баташки д.м.

Проф д-р Юлиан Руменов Ананиев д.м.

Плевен 2026

Дисертационният труд е разработен върху 145 страници, съдържа 2 диаграми, 16 фигури, 36 таблици и 4 приложения. Библиографията включва 358 източника, в по-голямата си част от последните 10 години, а 87 от последните 5 години.

Представените данни са резултат от разработването на проект, финансиран от МУ – Плевен: Проект №6/2022 година. Разрешение за проведеното изследване е получено от Етична комисия към Медицински Университет гр. Плевен с номер 707-КЕНИД/03.06.2022г.

Авторът е докторант в самостоятелна форма на обучение в 7.1. Медицина, докторска програма „Обща хирургия“ към катедра „Сестрински хирургични грижи“, Факултет „Здравни грижи“, Медицински университет – Плевен.

Дисертационният труд е обсъден и определен за защита на разширен Катедрен съвет на катедра „Сестрински хирургични грижи“, Факултет „Здравни грижи“, Медицински университет – Плевен, състоял се на 07.02.2025 година.

Материалите по защитата са на разположение на сайта на университета – www.mu-pleven.bg

Състав на Научното жури:

Председател

Проф. д-р Пламен Стоянов Божинов д.м.н.

Членове:

Проф. д-р Илия Атанасов Баташки д.м.

Проф д-р Юлиан Руменов Ананиев д.м.

Доц. д-р Атанас Илиев Баташки д.м.

Доц. д-р Весела Иванова Тодорова д.м.

Резервни членове:

Доц. д-р Ангел Данчев Йорданов д.м.

Проф. д-р Георги Тодоров Байчев д.м.

Защитата ще се състои на 04.11.2026г. от 13:00 ч. в зала „Амброаз Парев“ на МУ - Плевен

СЪДЪРЖАНИЕ

I Увод	4
II. ЦЕЛ	5
III. ЗАДАЧИ	5
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	6
1. Материали използвани при работа по поставените задачи	6
2. Методи използвани при работа по поставените задачи	8
3. Хирургични методи	8
4. Патологоанатомични методи	8
5. Документален метод	9
6. Статистически методи	9
V. Резултати и обсъждане	11
1. Задача 1.....	11
2. Задача 2	28
3. Задача 3	31
4. Задача 4	42
5. Задача 5	48
VI. Изводи	55
VII. Приноси с научен и оригинален характер	56
VIII. Приноси с приложен характер	57
Публикации и участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд	58
Приложения	59

Използвани съкращения

На кирилица

РМЖ- Рак на млечната жлеза
НАХТ- неoadювантна химиотерапия
АТФ- аденозин три фосфат
ИХХ- имуно хистохимия
РНК- Рибонуклеинова киселина
ДНК- Дезоксирибонуклеиновата киселина
ДИБ- дебелоиглена биопсия

На латиница

pCR- пълен патологичен отговор
ER- естроген рецептор
PgR- прогестерон рецептор
HER2- рецептор за човешкия епидермален растежен фактор 2
Ki 67- индекс на пролиферация
G- степен на диференциация
TNBC- тройнонегативен карцином на гърда
WHO- (C3O)- световната здравна организация
NOS- not otherwise specified
NST- no special type
SERMs- селективни ER модулатори
DFS- свободна от болест преживяемост
OS- обща преживяемост
RT-PCR- обратна транскриптазна полимеразна верижна реакция
CNB- щанцова (дебелоиглена) биопсия
MRI- ядрено магнитен резонанс
BIRADS- Breast Imaging Reporting and Data System
EC- Епирубицин + Ендоксан
TNM- tumor, node, metastases
cT- клинично установен първичен тумор
cN- клинично установени лимфни възли
ypT- патоанатомична оценка на туморен обем след проведена НАХТ
ypN- патоанатомична оценка на лимфни възли след проведена НАХТ
DCIS- дуктален карцином ин ситу
ISH – ин ситу хибридизация
FISH- Fluorescence in situ hybridization

Увод:

Ракът на млечната жлеза (РМЖ) е най-честото онкологично заболяване при жените и е на първо място по смъртност в България. През последните години е събран значителен материал доказващ, че карциномът на гърда е изключително хетерогенно заболяване на клинично, морфологично, геномно ниво, проявяващ се клинично с различно поведение и различен отговор към терапия. Това налага, в допълнение към стандартното за онкологичните заболявания морфологично типизиране, при ракът на гърда да се включат лесно достъпни биомаркери – като естроген рецептор (ER), прогестерон рецептор (PgR), рецептор за човешкия епидермален растежен фактор 2 (HER2), както и други, с независимо прогностично значение - като индекс на пролиферация Ki 67, степен на диференциация G или такива с по-скоро научна тежест като профилиране на генна експресия. Caspase-3 се изследва през последните години, най-вече в комбинация с индекс на пролиферация Ki 67, имащ допълнителна отрицателна прогностна стойност върху общата преживяемост. Туморния хетерогенитет - морфологичен или на база биомаркерна експресия се свързва с по-лоша прогноза и преживяемост и се приема за основна причина при терапевтична резистентност. Способността на дадена терапия да ерадикира туморната маса и нейните метастази зависи от способността и да надмогне хетерогенният отговор на отделните клетъчни линии, което е мултифакторен процес и отразява всички форми на туморен хетерогенитет. Интер и интратуморният хетерогенитет, времевите и пространствени различия във фенотипен и генотипен аспект проявяващи се в хода на туморната еволюция, налагат необходимостта от развитие на индивидуализиран подход при пациентите с рак на гърда за постигане на оптимални терапевтични резултати в хода на онкологичното заболяване.

II. ЦЕЛ

- Да се установи ролята на морфологичния и биологичен туморен хетерогенитет при диагностика на пациенти с карцином на млечната жлеза подходящи за неoadювантна химиотерапия
- Да се определи ролята му върху последващият терапевтичен подход

III. ЗАДАЧИ

1. Да се определи честотата на туморен хетерогенитет при РМЖ
2. Да се определи зависимост на честотата на туморен хетерогенитет от използвания метод за хистологична верификация
3. Да се определи повлияването на туморен хетерогенитет от неoadювантна химиотерапия
4. Да се определят рецидиви и преживяемост при пациенти с доказан туморен хетерогенитет и неoadювантна химиотерапия
5. Да се определи ролята на пролиферативна и апоптотична активност преди и след неoadювантна химиотерапия при популация от тумори, съдържащи случаи и с туморен хетерогенитет

IV. Материали и Методи

1. Материали използвани при работа по поставените задачи:

За изпълнение на поставените цели проведехме ретроспективно проучване със случаен подбор на участниците спрямо заболяване и проведена терапия. Проучването обхваща период от 5 години /2016г.-2021г./. При селектирането се установиха два случая (пълнолетни пациенти) с туморен хетерогенитет, чиито характеристики затрудняват стандартизираната оценка и поведение. Последните са подробно описани и документирани в настоящата разработка, без допълнителни изследвания с цел пълното и обективно представяне на цялостния хетерогенитет в изследваната обща популация.

Изследвани са 110 пълнолетни пациенти с клинични и образни данни (категоризирани с BIRADS 4-5) за формация в млечните жлези подлежащи на хистологична верификация, след която отговарят на критериите за неoadювантна химиотерапия (НАХТ) - пациенти с авансирало заболяване, подходящи за предоперативна системна терапия. Всички пациенти включени в изследването са диагностицирани и оперирани след НАХТ в УМБАЛ- Плевен и са подбрани на случаен принцип от архива на отделението по клинична патология при УМБАЛ - Плевен.

Като изключващи критерии са приети :

- Пациенти при които хистологичната диагностика или операция след неoadювантна химиотерапия не е извършена в УМБАЛ – Плевен, поради разлика в патологоанатомичните отговори от различните звена.

- Пациенти с изчерпани или липсващи хистологични материали
- Непълнолетни пациенти
- Лишени от свобода

Оценени са фактори като пол, възраст, фокалност, туморен хетерогенитет, хистологичен вариант/-и/, степен на злокачественост от диагностична биопсия и резектат след неoadювантна химиотерапия. Взеят е под внимание и терапевтичният подход.

Проведената НАХТ е според съвременните препоръки и гайдлайни.

- При HER2 позитивен статус – Пертузумаб + Трастузумаб + Доцетаксел
- При HER2 негативен статус – по схема ЕС /Епирубицин + Ендоксан/
- При тройно негативен карцином на гърда - Паклитаксел + Карбоплатина

Терапията на всички хетерогенни тумори е насочена срещу по-агресивната компонента. Установени са пациентите с туморен хетерогенитет - след иглена биопсия или ексцизионна биопсия преди проведена НАХТ и са оценени на резектат след проведена НАХТ.

Анализирани са клинични и основни прогностични параметри включени в патоанатомичната хистологична оценка на пациентите при първичната диагностика на онкологичното заболяване и последващото радикално оперативно лечение след проведена неoadювантна химиотерапия.

За целите на проучването, при изпълнение на задачи 3 и 4, пациентите с установен туморен хетерогенитет - след иглена биопсия или на резектат са приети като основна група. Оформена беше контролна група, съставена от подбрани на случаен принцип от групата на изследваните пациенти без хетерогенитет, съпоставими по възраст, пол и морфологичен вариант на една от туморните компоненти (NST или лобуларен карцином), максимално доближаващи се до по-агресивната компонента в основната група.

В получените от нас резултати се проследява повлияване на стандартни променливи от TNM класификация на туморите, Grade и молекулярни маркери в двете групи /със и без наличен хетерогенитет/. Обем и инфилтрация на първичният тумор / cT / е определен на база образни и клинични данни. Поради неясните граници на част от туморите, той има относително ориентировъчен характер. За нуждите на проучването, пациентите бяха разделени в две групи:

- тумори с размери до 2 см и
- тумори по-големи от 2 см, включително тумори засягащи кожа и гръдна стена, както и кожа тип портокалова кора.

При мултифокалните тумори, стадирането е според най-голямата туморна маса, а двустранните карциноми са стадирани поотделно, като за нуждите на анализа е приет по-големият от двата туморни размера.

Подбраните пациентски групи са съпоставени статистически.

При работа по задача 5, нива на Ki-67 и caspase-3 експресирани на диагностична биопсия, бяха съпоставени със степен на диференциация, сурогатен молекулярен субтип, променливи T, N, както и урT, урN, оценени по Саталоф на резектат.

Представените данни са резултат от разработването на проект, финансиран от МУ Плевен -Проект № 6/2022г.

Разрешение за проведеното изследване е получено от Етична комисия към Медицински Университет гр. Плевен с номер 707-КЕНИД/ 03.06.2022г.

(Приложение № 3)

2. Методи използвани при работа по поставените задачи

2.1 Хирургични методи

2.1.1 Дебелоиглена биопсия /ДИБ/ - Проведена под ехографски контрол с 14-gauge полуавтоматична и автоматична щанцова игла. Вземите цилиндри са между 3 и 6 от различни части на лезията. Всеки цилиндър се номерира според поредност на вземане и се фиксира във формалин според унифицирани препоръки.

2.1.2 Ексцизионна биопсия - диагностична ексцизия, при невъзможност за провеждане на ДИБ, при диагностика на заболяването преди НАХТ, отговарящо на последни стандарти за диагностика при пациенти с рак на гърда.

2.1.3 Радикално оперативно лечение – Съхраняваща гърдата операция /СГО/ или Модифицирана радикална мастектомия /МРМ/ след НАХТ според приетите индикации/ контраиндикации за органосъхраняващи операции при пациенти с рак на гърда.

2.2. Патологоанатомични методи

Следвани са основни протоколи за работа с тъканни проби – за дебелоиглени биопсии и съответно – резектати.

Морфологично типизиране, стадиране и грейдинг, както и определяне на смесени (морфологично хетерогенни) тумори са извършени съгласно СЗО върху оцветени по рутинен протокол срези с Хематоксилин Еозин и при нужда имунохистохимична верификация или оцветяване с друг хистохимичен метод (PAS).

При определяне на рецепторният статус на туморите са използвани антитела от съответни клонове ER (клон EP1) Dako, PgR (PgR 636) Dako, E-cadherin (NCH-38) Dako, EMA clone E29, Ki-67 (MIB-1, Dako), Ki-67 (Ki-67 rabbit monoclonal antibody clone SP6/Biocrine USA), HER2 (4B5) Dako, caspase-3 /rabbit polyclonal antibody/Biocrine USA/; използвайки визуализацията envision или HercepTest™, Dako (кит).

Оцветяванията са извършени на автостейнер Dako link 48.

Ин ситу хибридизационно изследване (ISH) за HER2 е извършвано във външни лаборатории. Резултатът е вписан в клиничната документация, от където е интерпретиран бинарно (позитивен/негативен статус) на база клиничните препоръки.

Отчитането на резултатите за стероидни рецептори и HER2 е извършено съгласно утвърдените за периода препоръки.

Експресията на Ki-67 е отчетена според съвременните препоръки с изброяване на минимум от 500 клетки за всеки от компонентите, отчетени като позитивни при налично оцветяване, независимо от интензитета.

Експресията на caspase-3 се оценява според препоръки от Engels et al, 2013 като нива > 0.5% се приемат за повишени.

Сурогатните молекулярни субтипове са определени на база препоръките, публикувани от СЗО.

2.3. Документален метод беше използван при изпълнение на задача 4:

Оценени са прогресия и рецидив на онкологичното заболяване на база данни от болничната електронна система. Информация за обща преживяемост е получена на база данни от национален регистър.

2.4. Статистически методи - използвани са редица параметрични и непараметрични тестове, съобразно с анализирания променливи.

2.4.1 При работа по задача 1: Съпоставката по възраст се извърши посредством Signed rank test, като $P < 0.05$ се приема за сигнификантна. За оценка на статистически значима разлика във възрастта при пациенти със и без туморен хетерогенитет са използвани статистически методи (ANOVA), след оценка на нормалност на разпределението. Връзката между непараметричните променливи (фокалност и хетерогенитет) се изследва посредством χ^2 тест. Стойности на $p < 0,05$ се приема за статистически значими. Статистическият анализ използва SPSS софтуер.

2.4.2 При изпълнение на задача 2: Чувствителност и специфичност на щанцова биопсия за откриване на туморен хетерогенитет при карцином на гърда, се определиха съгласно подхода разгледан от Monaghan TF et al, 2021 като се изчисли Cohen's Kappa. Групирането на хетерогенните пациенти, базирано на диагностичен подход, беше анализирано според непараметричният метод на Kruskal - Wallis поради липса на нормално разпределение. Стойности на $p < 0,05$ се приеха за статистически значими. Данните бяха обработена и анализирана от SPSS компютърен софтуер.

2.4.3 При работа по задача 3: Сравняването на промяната на степента на злокачественост в групата на хетерогенните тумори и съответно на нехетерогенните тумори преди и след неoadювантна терапия се извърши посредством Marginal Homogeneity test/ Stuart-Maxwell χ^2 тест, като $P < 0.05$ се приема за сигнификантна. Изчисленията са извършени с помощта на софтуер. (John Uebersax Ph.D email: jsuebersax@yahoo.com, web: <http://ourworld.compuserve.com/homepages/jsuebersax>)

Сравняване степен на злокачественост преди неoadювантна химиотерапия между групата на хетерогенните и нехетерогенни тумори, наличието на промяна в молекулярния субтип в контекста на проведена неoadювантна химиотерапия между групата на хетерогенните и нехетерогенни тумори, сравняване на размера на тумора и нодалният статус след неoadювантна химиотерапия между групата на хетерогенните и нехетерогенни тумори, както и терапевтичният ефект върху тумора и нодалният статус между групата на хетерогенните и нехетерогенни тумори (отчетени по Саталоф) е извършено посредством χ^2 тест, като $P < 0.05$ се прие за статистически сигнификантна (изчислени с програмата SPSS). Определяне на терапевтичният ефект е извършено по Саталоф за пациентите от двете групи, като в контекста на променящите се тенденции, туморното повлияване е отчетено и бинарно - като пълен/почти пълен патологичен отговор (с остатъчни единични туморни клетки и групи от клетки) и непълен терапевтичен отговор за всички останали случаи.

2.4.4 При изпълнение на задача 4: Параметрите за преживяемост бяха анализирани с помощта на метода на Каплан- Майер и обобщени с медиана и 95% доверителни интервали. Кривите за преживяемост бяха сравнени с помощта на log-rank тестове. Периодът на преживяемост беше измерван от момента на поставяне на диагнозата до края на отчетният период при събиране на данните. Основна крайна цел беше определяне на свободната от болест преживяемост и общата преживяемост, ограничена от смърт, независимо от

причината. Използван е статистически софтуер. (<https://www.statskingdom.com/kaplan-meier.html>; <https://www.bmj.com/about-bmj/resources-readers/publications/statistics-square-one/12-survival-analysis>) Отпадналите пациенти са цензурирани.

2.4.5 При изпълнение на задача 5: За установяване на зависимостта на Ki-67 от изследваните променливи е използван дисперсионен анализ ANOVA F или еднопосочен непараметричен Kruskal-Wallis тест с доверителен интервал от 95%. Стойности от $p < 0.05$ са приети за статистически сигнификантни.

При установяване на зависимостта на Caspase 3 от изследваните променливи е използван χ^2 тест със стойности от $p < 0.05$ приети за статистически сигнификантни, подкрепен от The Fisher's Exact test.

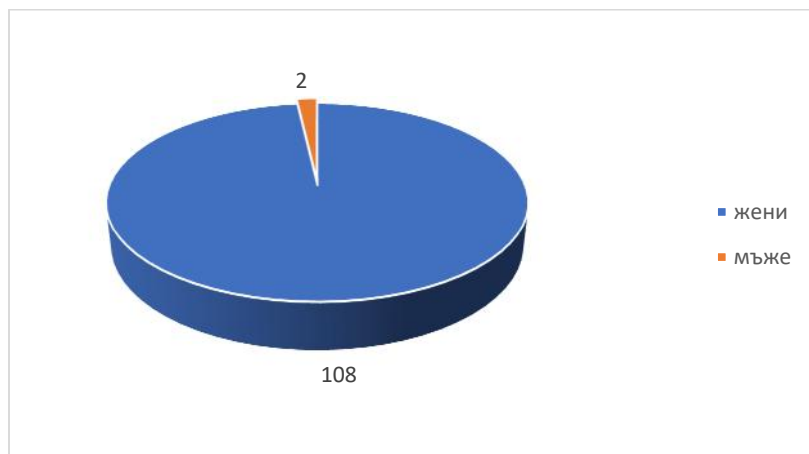
Статистическата информация от изследваните маркери и в двата случая е обработена и анализирана от SPSS компютърен софтуер.

V. Резултати и обсъждане:

1 Задача- Да се определи честотата на туморен хетерогенитет при РМЖ

1.1 Обща характеристика на изследваните пациенти по възраст и пол, с определяне честота на туморен хетерогенитет и мултифокалност

От включените пациенти - 108 са жени (98,18%) и двама са мъже (1,82%).

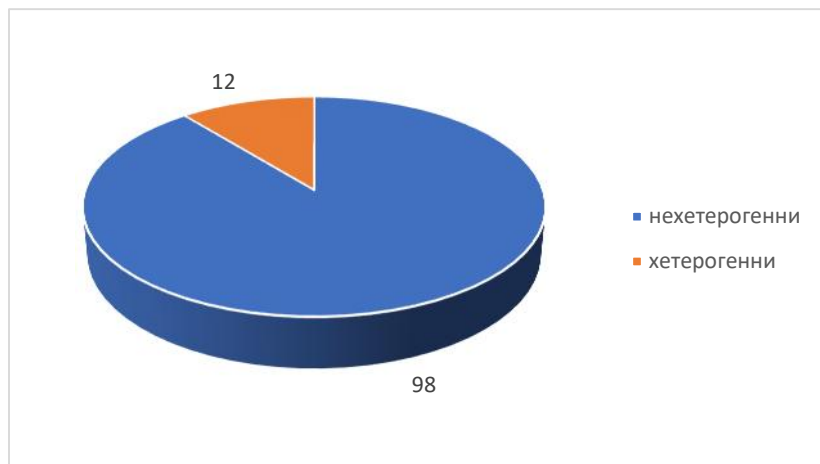


Диаграма 1 Графично представяне съотношение по пол

Възрастта в представените от нас резултати варира между 30 и 82 години със средна възраст 59.22 години, съответстваща до голяма степен с публикуваните до момента в литературата

данни за диагностициране на ракът на гърда в над 80% от случаите във възрастта ≥ 50 години, със средната възраст от 62 години. (Giaquinto AN et al, 2022)

От изследваните 110 пациента, с доказан хетерогенитет (*наличие на две и повече отграничени туморни огнища в едната или двете гърди*) върху диагностична биопсия и резектат са – 12 случая или 10.91% .



Диаграма 2 Графично представяне разпределението по брой хетерогенни към нехетерогенни тумори

Получената от нас честота се включва в интервала между 9% и 15% , описван в литературата за случаи, при които видът на туморите не може да бъде отнесен към стандартните диагностични групи. Вариациите в морфологичната и/или молекулярна експресия на тумора са в основата на интартуморният хетерогенитет и причина за диагностични трудности.

По отношение на възрастовото разпределение, пациентите с туморен хетерогенитет са на средна възраст 50,58 години (SD +/- 17,1383) , а в групата без хетерогенитет средната възраст е 60.26 години (SD +/- 12.5938)

При сравняване на възрастта на пациентите с туморен хетерогенитет (установен върху ДИБ и резектат) и пациентите при които хетерогенитет не е наблюдаван се установи, че пациентите с хетерогенни тумори са сигнификантно по млади $F=5.8020$, $p=0.0177$

На таблица 1 е представена съпоставка на пациентите със и без туморен хетерогенитет по възраст

Таблица 1 съпоставка на пациентите със и без туморен хетерогенитет по възраст

	п	средна възраст	SD	min /max
пациенти без туморен хетерогенитет	98	60.2551	12.5938	30-82
пациенти с туморен хетерогенитет	12	50.5833	17.1383	31-73

Получените от нас резултати подкрепят данните описани в литературата за особеностите при ракът на гърда в млада възраст. За него е характерна по-високата степен на хетерогенност в младата възрастова група, чиято честота нараства с годините и достига най-високи нива на описван хетерогенитет в диапазона 40 – 49 години.

1.2 Характеристика на хетерогенната група пациенти:

Според получените от нас резултати, засегнатите от туморен хетерогенитет пациенти с рак на гърда са само жени, като не може да бъде изключена вероятността това да се дължи на малкият брой мъже включени в извадката, но туморен хетерогенитет при тях не е наблюдаван.

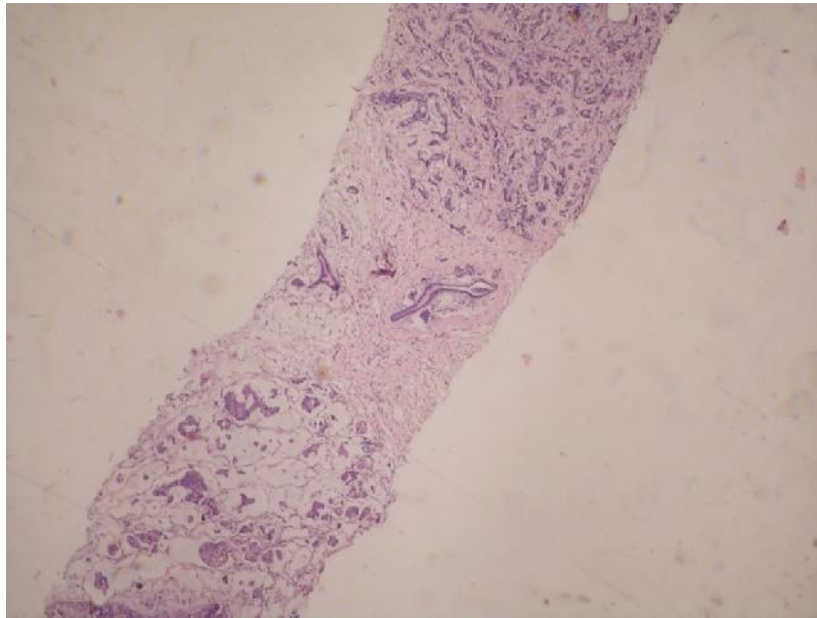
В два от случаите с хетерогенитет се касае за синхронен карцином, засягащ двете гърди. В останалите десет случая се касае за оформени туморни фокуси в едната гърда, като в три от случаите туморът е мултифокален и оформя два туморни фокуса.

При десет от случаите с хетерогенитет се касае за морфологичен със или без допълнително разпознаваем молекулярен хетерогенитет при хистологично изследване върху препарати, оцветени с хематоксилин еозин.

Най-честата комбинация включва два морфологично отличими компонента

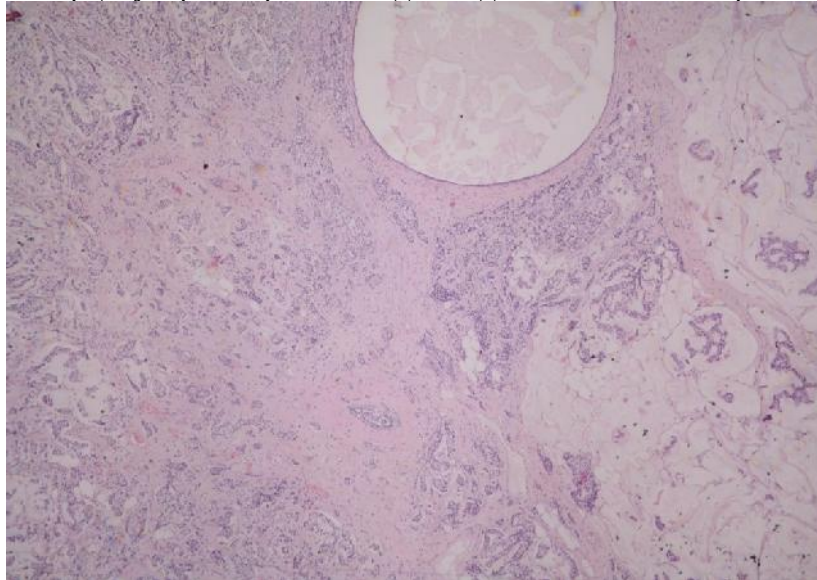
- NST комбиниран с муцинозен в три от случаите, като само при единият имаме разлики и в молекулярната експресия - комбинация от луминален А при муцинозния и луминален Б (HER 2 вариант) за NST компонента.

На фигура 1 е представен HER 2 луминален Б тип в смесен муцинозен и NST (дуктален) карцином G2 на ДИБ преди НАХТ

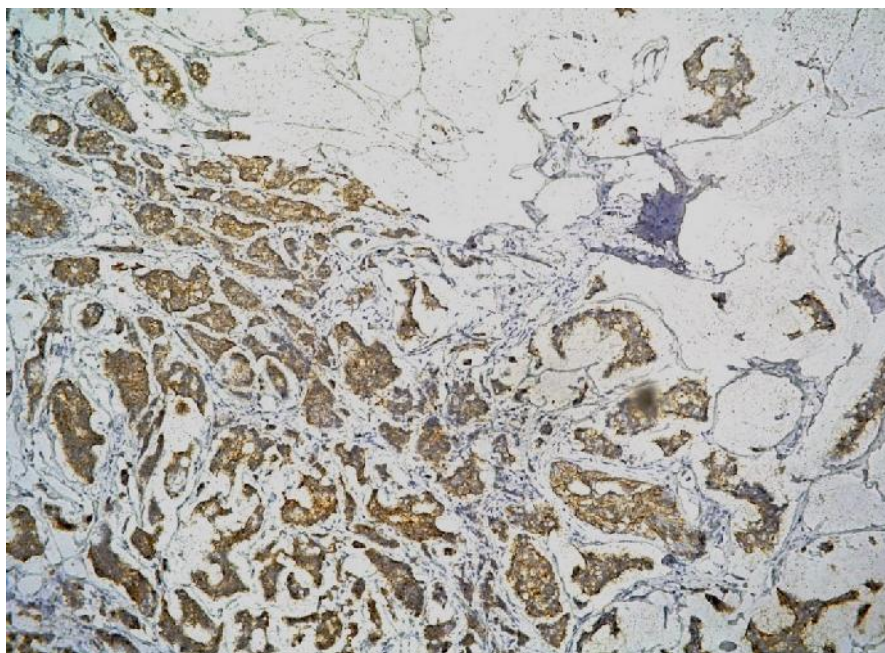


Фиг 1. Материал от дебелоиглена биопсия представена от два компонента - муцинозна и NST (дуктален) карцином G2 (ХЕ 10х)

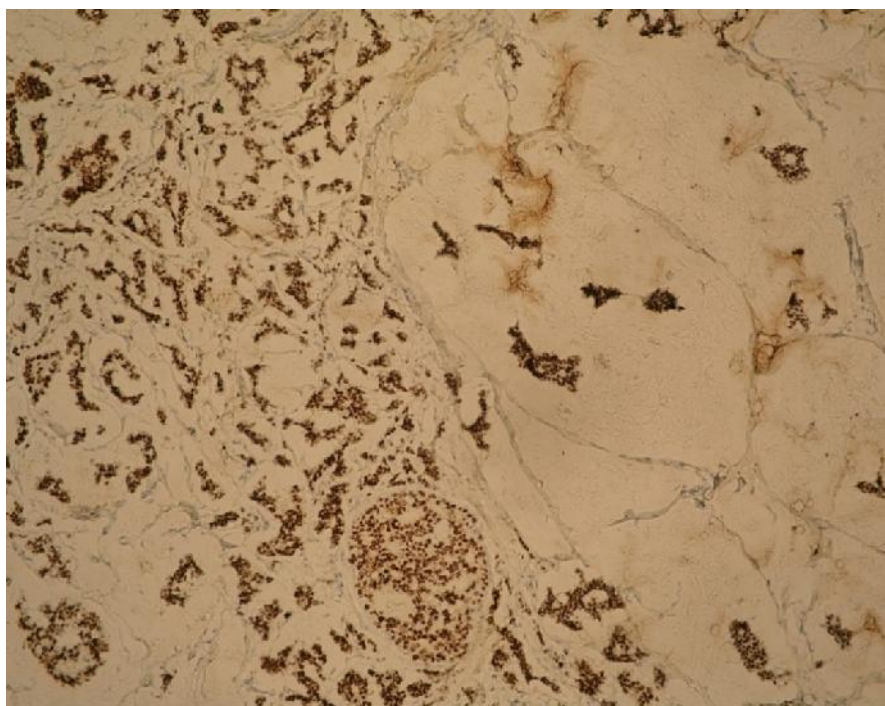
На фигура 2 е представен двукомпонентният тумор - NST G2 и муцинозен карцином хиперцелуларен вариант след неoadювантна химиотерапия



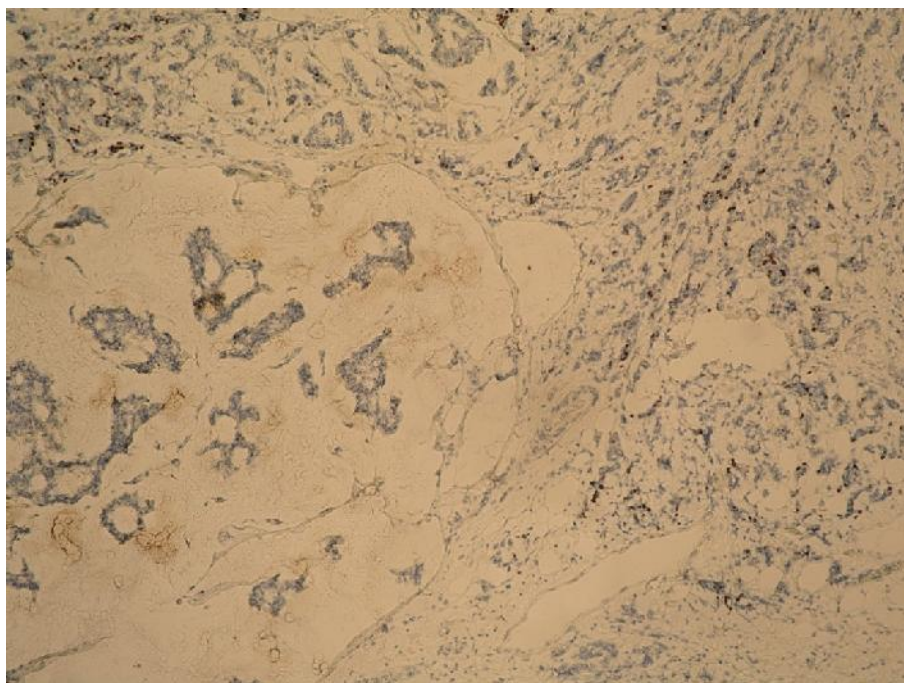
Фиг 2.1 материал от резектат – персистиращ и двете туморни компоненти с превалиране на муцинозната на фона на неизразена фиброза и целуларна строма, с наличие на цитопатичен ефект. (ХЕ 10х)



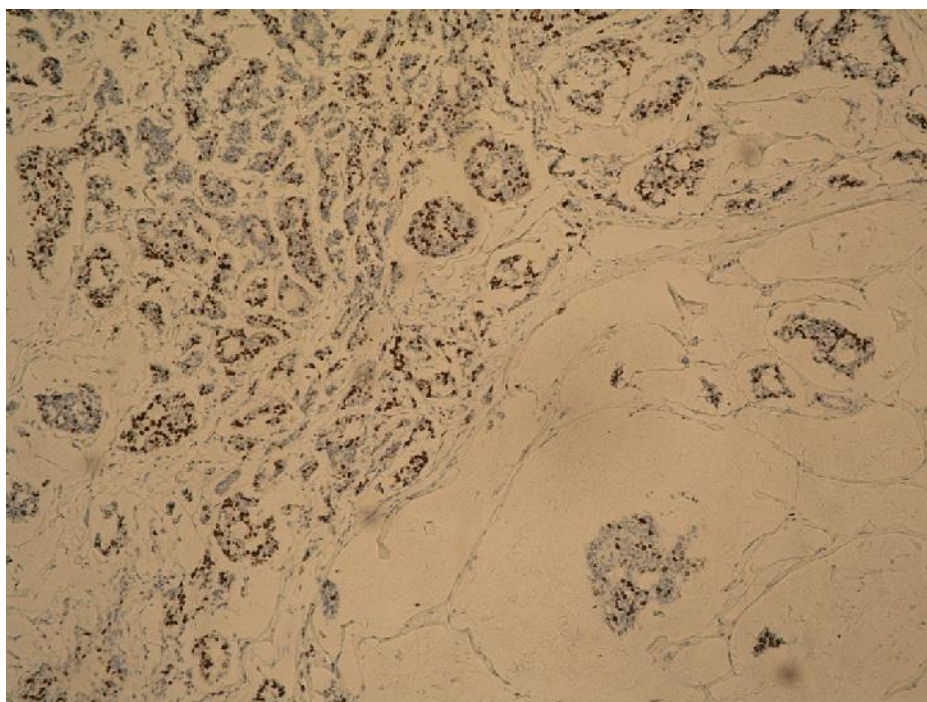
Фиг 2.2 HER2 -3+ Силно пълно мембранно оцветяване в повече от 10 % от туморните клетки (HER 2, 40x)



Фиг 2.3 ER - ядрена позитивност в около 80 % от туморните клетки (ER 100x)



Фиг 2.4 PgR - умерена ядрена позитивност в около 15 % от туморните клетки (PgR100x)



Фиг 2.5 Ki 67- позитивност в над 30 % от туморните клетки (Ki 67, 40x)

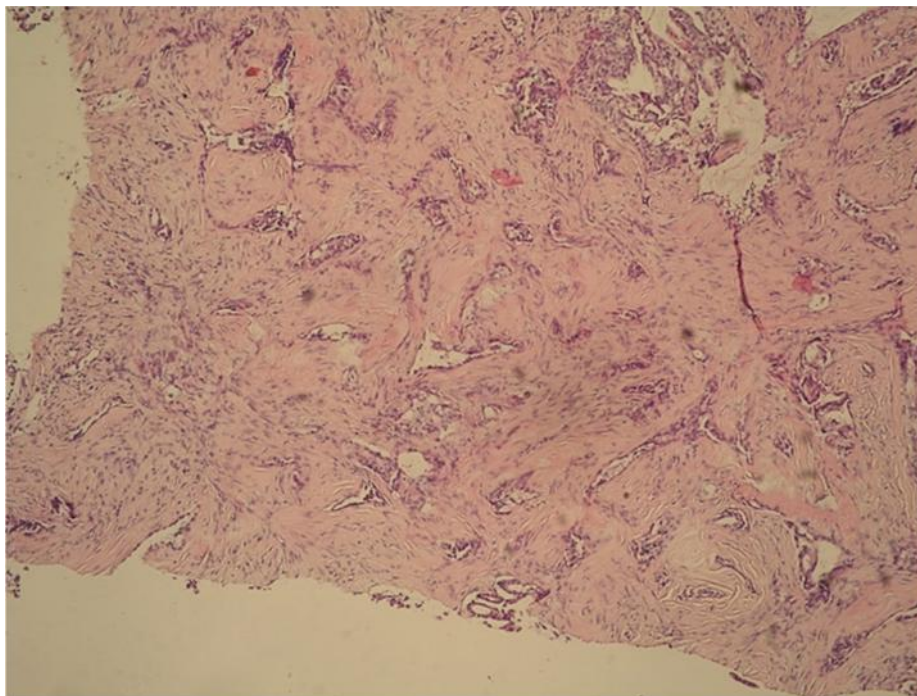
Муцинозните карциноми рядко са HER 2 позитивни. Както и в описаният случай HER 2 експресията се носи от NST компонентата. Морфологичният вариант не определя различен път на стимулиране на туморен растеж, респективно не е определящ за терапевтичният избор. В конкретният случай той се влияе от рецептурния статус на тумора като цяло, а не от неговите различни морфологични компоненти.

- Инвазивен NST дуктален, комбиниран с лобуларен в три от случаите, като само при единият имаме разлики и в молекулярната експресия - тройнонегативен за NST и луминален А при лобуларната компонента.

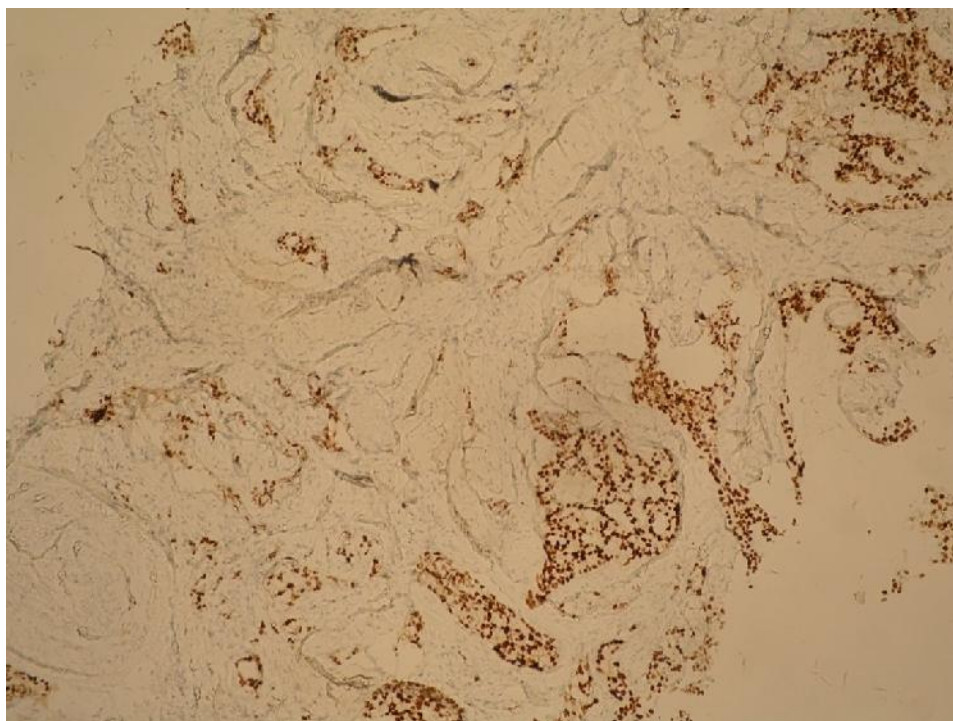
- NST карцином в комбинация с метапластичен карцином в два от случаите, като и в двата случая се наблюдават разлики и в молекулярната експресия - луминален Б тип експресия за NST участъкът и тройно негативна за метапластичната компонента

- NST карцином в комбинация с микропапиларен карцином в един случай, като микропапиларният е луминален Б (HER 2 вариант) а остатъчният NST е луминален Б тип

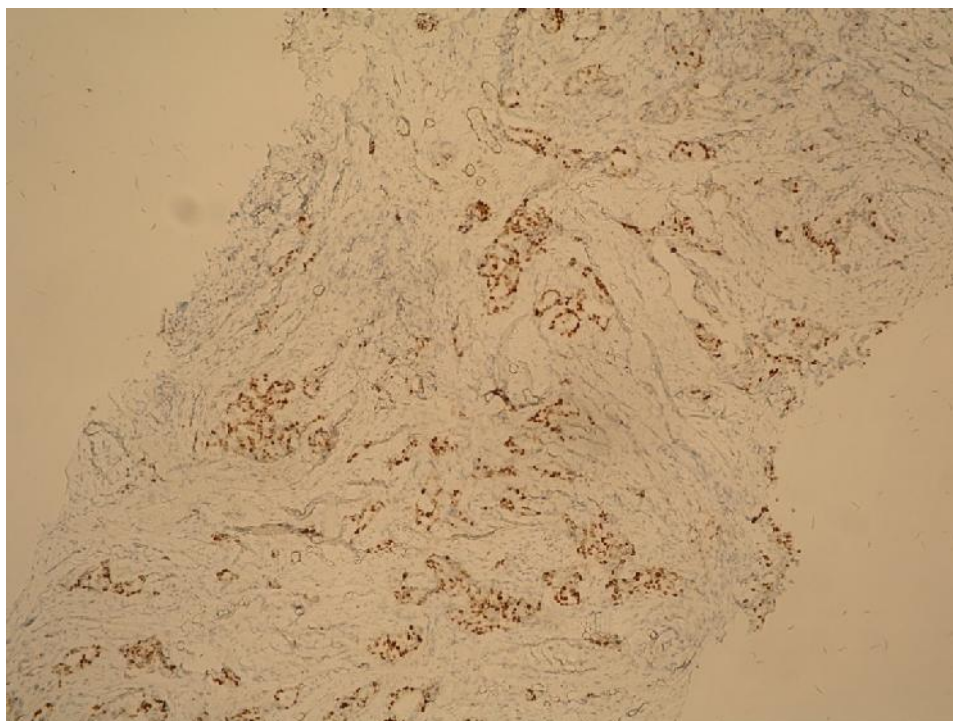
На фигура 3 е представен материал от дебелоиглена биопсия представящ компонента с микропапиларен и дуктален NST G2



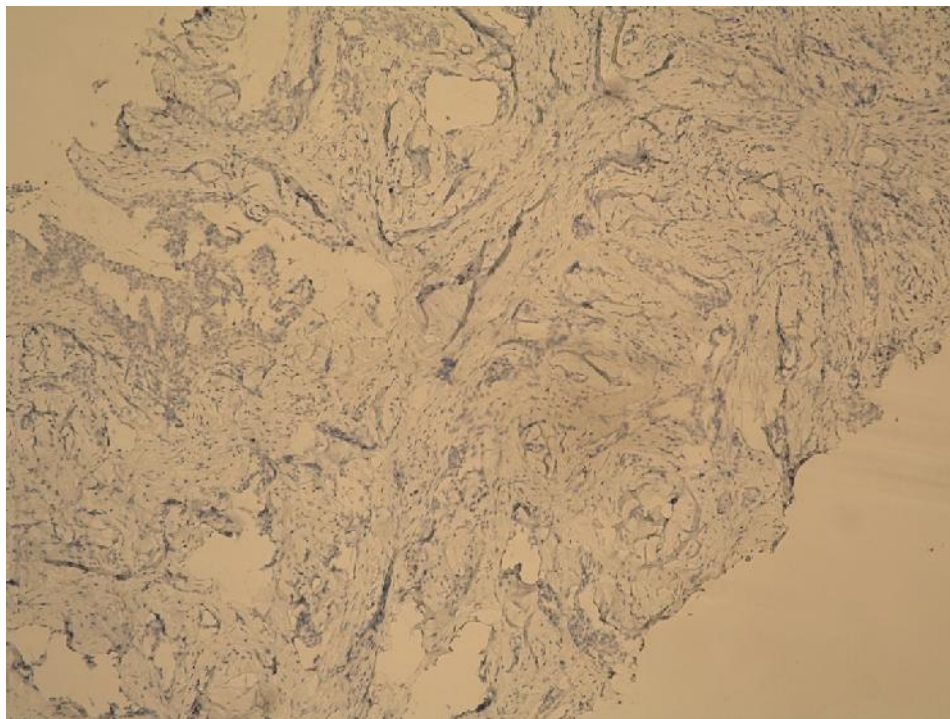
Фиг 3.1 Материал от дебелоиглена биопсия представящ компонента с микропапиларен и гнезден строеж определена като дуктален NST G2 и DCIS – G2 карцином (ХЕ 10х, 400х)



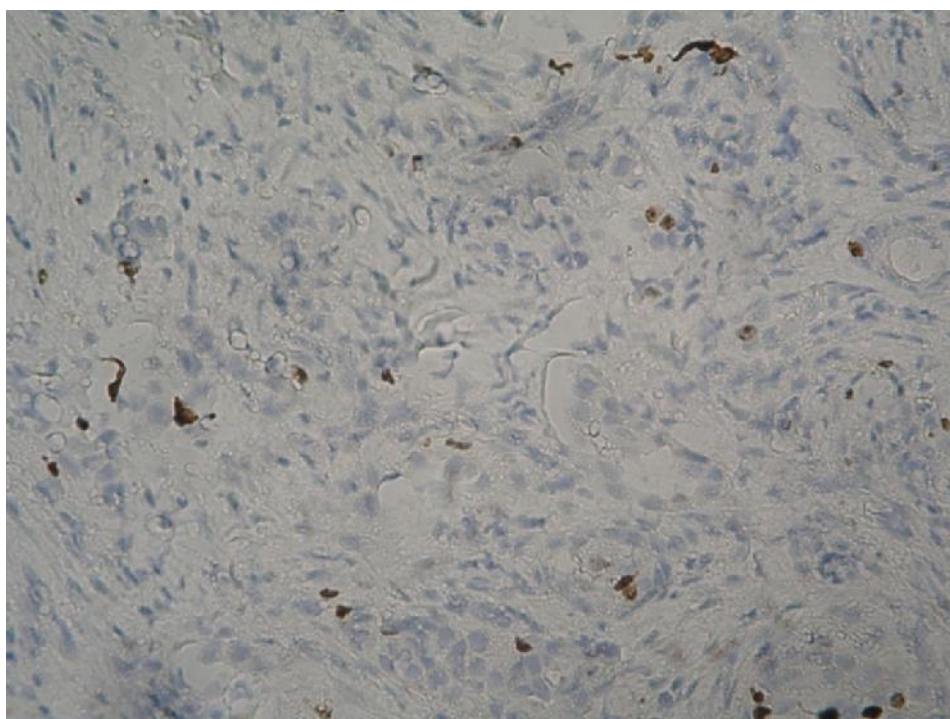
Фиг 3.2 ER - ядрена позитивност в около 80% от туморните клетки (ER 100x)



Фиг 3.3 PgR - умерена ядрена позитивност в около 60% от туморните клетки (PgR, 100x)



Фиг 3.4 HER 2 – негативен (HER2, 100х)



Фиг 3.5 Ki 67 позитивност в около 10 % от туморните клетки (Ki 67, 100х)

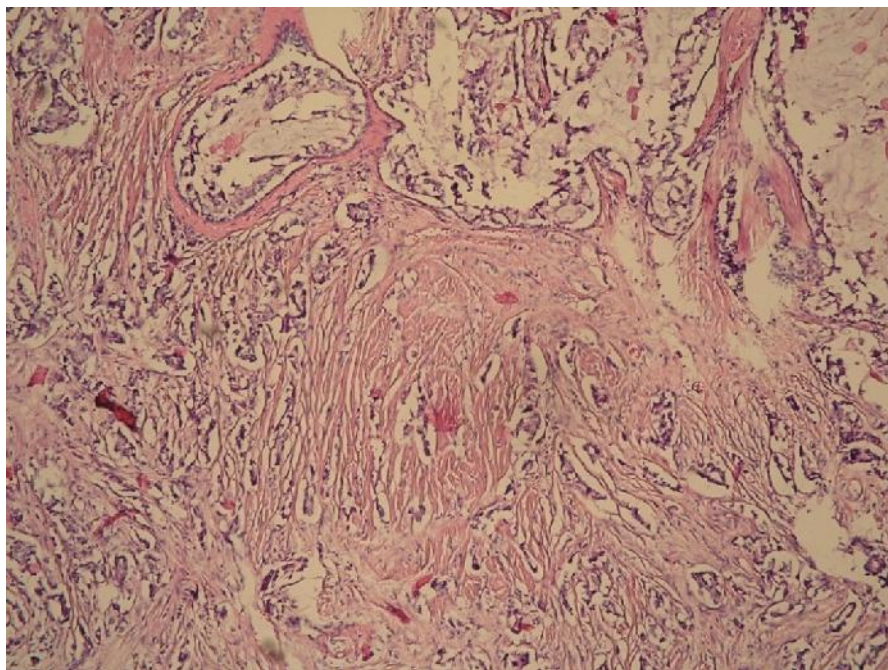
Случаят е силно дискутабилен поради наличието на набелязана микропапиларна компонента, но без изразени морфологични критерии за поставяне на диагнозата микропапиларен карцином. Нагледно се демонстрира как малкият обем тъкан може да изкриви представата за цялостният облик на тумора. Настоящият случай се приема за хетерогенен тумор след цялостното изследване на материала. Туморните компоненти остават в рамките на луминален тип. Микропапиларният карцином се възприема като по-агресивен тумор, с по-лоша прогноза и наличието му в достатъчен обем на резектата е свързано с наличие на по-висока пролиферативна активност и съответно луминален Б тип на цялостният тумор.

В нашата извадка честотата на тумори с два компонента под формата на лобуларен и дуктален карцином, която е и най-често спряганата комбинация в литературата, е почти два пъти по-ниска от описаната в научните публикации, за сметка на други по-рядко срещани варианти.

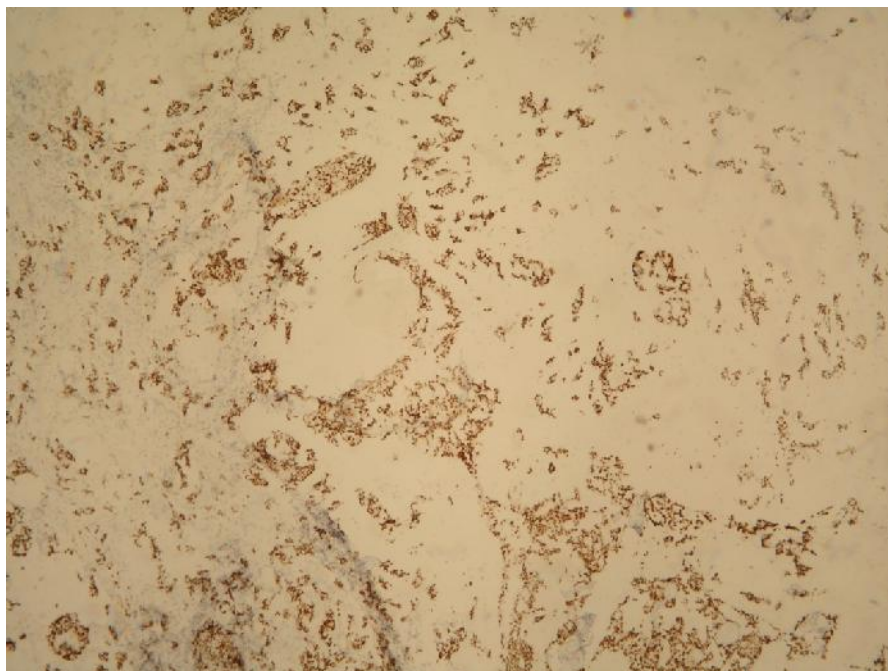
Комбинация от три морфологично отличими компоненти се наблюдава при един случай

- NST дуктален карцином, муцинозен и микропапиларен карцином, които съдържат отчетливи компоненти на луминален А при муцинозната компонента и луминален Б тип при NST и микропапиларната компонента.

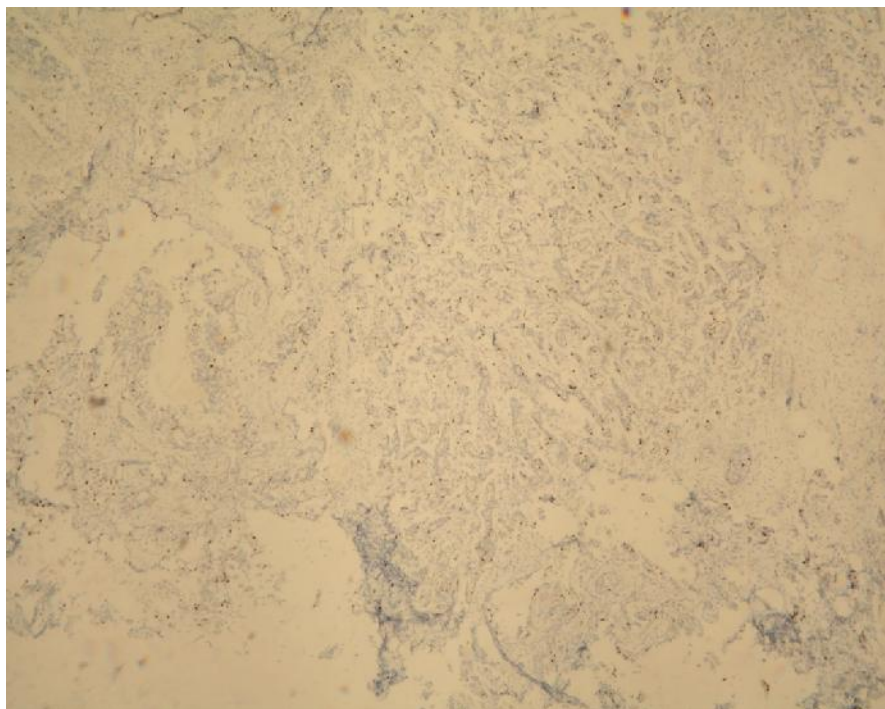
На фигура 4 е представен NST G2, муцинозен и микропапиларен карцином преди и след неoadювантна химиотерапия



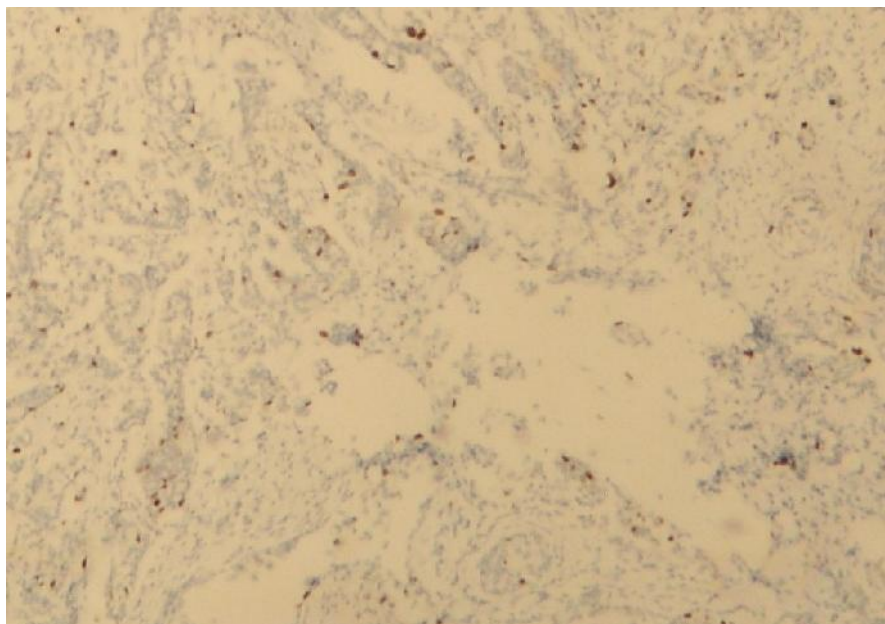
Фиг 4.1 Персистират три туморни компонента на фона на слабо изразена фиброза и целуларна строма с наличие на цитопатичен ефект. (ХЕ 100х)



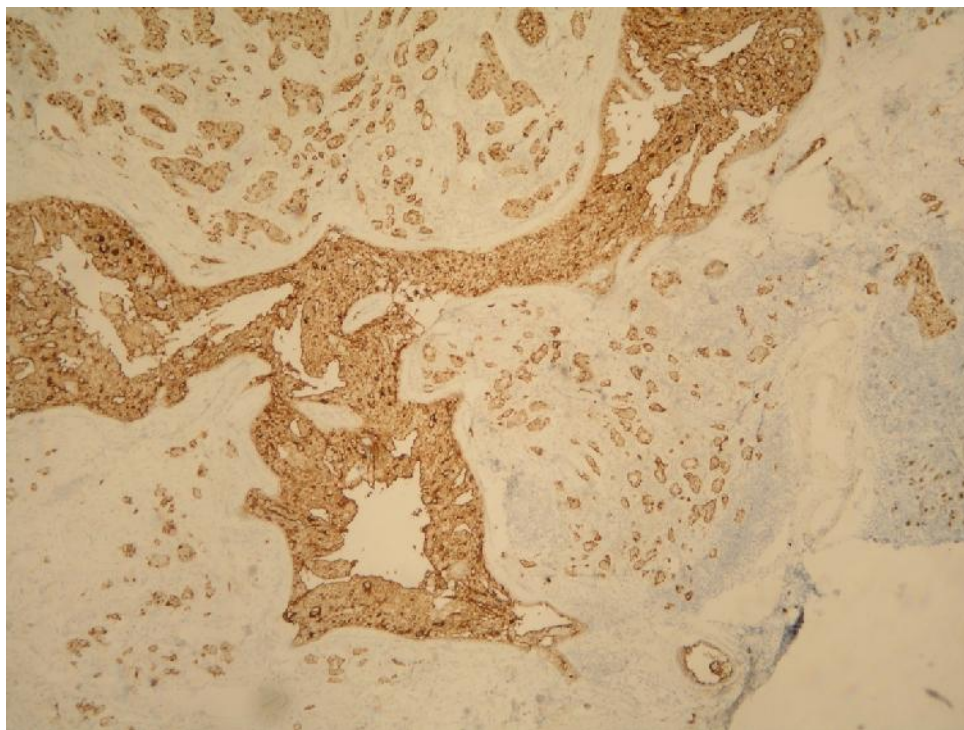
Фиг 4.2 ER - ядрена позитивност в около 80% от туморните клетки (ER 100х)



Фиг 4.3 PgR - умерена ядрена позитивност в около 10% от туморните клетки (PgR100x)



Фиг 4.4 Ki 67- позитивност в около 15 % от туморните клетки (Ki 67, 40x)



Фиг. 4.5 ЕМА окантова микропапиларни структури отвън (ЕМА, 100х)

При два от случаите с хетерогенитет е установен само молекулярен след имунохистохимично изследване.

- NST карцином с два ясно отграничени имунопрофили луминален А тип и зони на луминален Б тип,
 - В рамките на метапластичен карцином се попада на отчетлива ER позитивна компонента.
- На таблица 2 е показано разпределение на случаите с хетерогенитет според морфологичен вариант, фокалност, степен на диференциация и молекулярен субтип преди и след проведена НАХТ.

Таблица 2 Разпределение на случаите с хетерогенитет

Легенда: G grade: 1- високодиференциран, 2- умеренодиференциран,
3 -нискодиференциран

Молекулярен субтип: 1- луминален А, 2- луминален Б, 2(HER2)- луминален HER2,
3- HER2 обогатен, 4- ТНKG *персистира муцинозна компонента с носеща HER 2 1+

№	възраст	Морфологичен вариант на база цялостна оценка на тумора (Щанц, Резектат и метастази)	Фокалност на тумора	G преди НАХТ	G след НАХТ	Молекулярен субтип преди неoadювантна терапия	Молекулярен субтип след неoadювантна терапия
1	68	Морфологичен (дуктален /лобуларен) Дуктален - щанц; дуктален /лобуларен- резектат	унифокален (двустранен)	3	3/2	2	2/2
2	68	Молекулярен и Морфологичен (NST с отличима вариация в морфологията	мултифокален	2/3	2/3	1/1	1/2
3	37	Морфологичен (NST и муцинозен) NST - биоптат; NST и муцинозен- резектат	мултифокален	2	3/ -	2(HER2)	2(HER2)/1
4	73	Морфологичен и молекулярен (NST и микропапиларен) микропапиларен- щанц; NST- резектат	унифокален	2	2/-	2(HER2)	2/2(HER2)
5	67	Морфологичен (NST и метапластичен) NST и метапластичен – щанц; NST - резектат	унифокален	2	3	2(HER2)	2
6	72	Морфологичен (NST и лобуларен) NST - щанц лобуларен - резектат	унифокален	3	2	4	1
7	41	Морфологичен (NST и муцинозен) Едновременно на биопсия и резектат	унифокален	2/-	2/-	2(HER2)	2(HER2)*
8	37	Морфологичен (NST с отличима вариация в морфологията)	мултифокален	2	2	2(HER2)	1
9	40	Морфологичен (NST и лобуларен) NST – биопсия; Лобуларен - биопсия от другата гърда	мултифокален - засягащ двете гърди	1/лобуларен не е установен	1/2	1	1/1
10	32	Морфологичен (NST и метапластичен) NST- биопсия; метапластичен - резектат	унифокален	3	3	2	4
11	31	Морфологичен (муцинозен и NST) (две ту компоненти в лимфен възел) муцинозен - биопсия Муцинозен и NST - резектат, NST само метастаза в лимфен възел	унифокален	-/липсва NST, който е G2	-/2	1	1/1
12	41	Морфологичен NST, муцинозен и микропапиларен) NST – биопсия; NST, муцинозен и микропапиларен- резектат	унифокален	1/-/2	2	1	2

Зависимостта на мултифокалност и хетерогенитет е отчетлива : $\chi^2=13.1108$; $df= 1$, $p<0,0001$ (Табл.3).

При рак на гърда без прояви на хетерогенитет мултифокалност или мултицентричност се доказва едва в 10% от случаите, докато в хетерогенната популация тази честота е приблизително 50% от случаите.

Таблица 3 Зависимост на мултифокалност от хетерогенитет

	Без хетерогенитет	хетерогенни
унифокални	91 (82,73%)	7 (6,36%)
мултифокални	7 (6,36%)	5 (4.55 %)

За периода на селекция са диагностицирани и описани два случая на туморен хетерогенитет представляващи казуси за клиничната практика при които НАХТ не е приложима по различни причини.

Първият случай описва 64 годишна жена с асимптоматична, непалпируема лезия, оценена на скринираща мамография като BIRADS 4с, с групирани микрокалцификати в горен латерален квадрант на лява млечна жлеза. Графията на бял дроб и ултразвуковото изследване на гърда не показват отклонения. Резекцията е извършена чрез маркиране с метална нишка, под мамографски контрол. Хистологичното изследване отчита мултифокален инвазивен карцином NST (дуктален) G2 на фона на обширен дуктален карцином ин ситу (DCIS) G2 pT1aNxMx (ER-0, PR – 0, HER 2 – 2+ Ki 67– 40%). След решение на онкологична комисия е проведено радикално оперативно лечение. Последващото хистологично верифициране от резектат представя единични терминални каналчета с лобуларен карцином инситу (LCIS). Отчитането на туморен хетерогенитет в този случай – наличен инвазивен дуктален и лобуларен карцином ин ситу, е станал възможен след изследване на резектат.

Вторият случай описва 49 годишна жена с палпируема формация на дясна гърда. Мамографски е оценена като BIRADS 4- силно лобулирана сянка в долен външен квадрант на дясна гърда с размери 43/27 mm. Проведената диагностична тънкоиглена биопсия под ехографски контрол е неинформативна - отчетени са фиброзни повлекла, единични

нормални дуктални клетки, еритроцити и левкоцити. Хистологичното изследване от проведената ексцизионна биопсия представя туморни клетки организирани в групи и повлекла сред изразена лимфоцитна стромна реакция. От тях Т-лимфоцитите са около 30% от клетъчният състав. ER, PgR и HER2 рецептори са отрицателни, Ki-67 е позитивен в около 50% от туморните клетки. E-cadherin с умерено интензивно оцветяване на клетъчните мембрани в 70% от туморните клетки и p63 позитивен в около 20% . CK 7 силно позитивен в около 40% от туморните клетки , CK 5/6 слабо маркиран в около 2% , vimentin силно позитивен. CD 117 слабо оцветяване на цитоплазмин в 5% от туморните клетки, CD20 и CD3 позитивни съответно в В и Т лимфоцитната клетъчна популация. Pd-L1 не е изследван. Описаните морфологични и имунохистохимични данни съответстват на висок грейд, слабо диференциран карцином с изразена лимфоцитна инфилтрация, какъвто е лимфоепителиома лайк карцином, оценен като pT2 cN0 cM0 G3. След решение на онкологична комисия е проведено радикално оперативно лечение. Въпреки липсата на резидуален тумор, е отчетена нова лезия, в друг квадрант на гърдата, разпозната като дуктален карцином ин ситу DCIS G2, както и фокус на инвазивен дуктален карцином (NOS) G3, с изразена лимфоцитна инфилтрация. Имунохистохимичното изследване на инвазивния дуктален карцином представи слабо ER и PgR позитивни в около 10% от туморните клетки, HER2 негативен, Ki-67 - 30% , E-cadherin демонстрира умерено интензивно оцветяване на клетъчните мембрани на туморните клетки. Изследваните 17 лимфни възела са с изразена синусна хистиоцитоза. Туморният хетерогенитет и в този случай е регистриран единствено на резектат и изисква различен терапевтичен подход.

Случаите демонстрират значителните проблеми и предизвикателства, до които може да доведе туморният хетерогенитет. Ясно личи, че той може да бъде на ниво ранни и прекурсорни лезии както и да представлява екстремно редки комбинации от туморни варианти на РМЖ при които няма доказани утвърдени в практиката диагностични и терапевтични подходи.

Тези данни донякъде поставят под въпрос самостоятелното интерпретиране на теорията на болният лоб и нейното приложение при орвано-съхраняващи операции. В научната литература е потвърдена по-ниската вариабилност на близки туморни фокуси, но високата честота на мултифокалност при наличен туморен хетерогенитет в нашата извадка, противоречи на идеята за общ ембрионален произход и линейна еволюция на тумора.

2. Задача 2: Да се определи зависимост на честотата на туморен хетерогенитет от използвания метод за хистологична верификация

2.1 Зависимост на честота на туморен хетерогенитет от брой на добити тъканни цилиндри:

От получените резултати не се наблюдава статистическа зависимост между медианният брой на добитите тъканни цилиндри и откритият хетерогенитет върху щанцова биопсия $K-W = 0.1208$, $P = 0.7281$ (Табл. 4)

Таблица 4 Зависимост между медианен брой на тъканни цилиндри и откритият хетерогенитет върху щанцова биопсия

	n	медианен брой тъканни материали /цилиндри	среден брой материали /цилиндри	min /max
пациенти без туморен хетерогенитет на щанц	107	4.0000	4.3301	1-15
пациенти с туморен хетерогенитет на щанц	3	4.0000	3.8571	1-7

Липсва статистически значима връзка между медианният брой на тъканните проби и общият хетерогенитет, въпреки тенденцията за добиване на 1 тъканен цилиндър повече в групата на хетерогенните тумори $K-W = 0,3930$; $p = 0,5307$ (Табл. 5)

Таблица 5 Зависимост между медианен брой на тъканни цилиндри и общият хетерогенитет

	n	медианен брой тъканни материали /цилиндри	среден брой материали /цилиндри	min /max
пациенти без туморен хетерогенитет	98	4.0000	4.2653	1-15
пациенти с туморен хетерогенитет	12	5.0000	4.7500	1-12

Макар да е общоприето че по-голямо количество на добит материал гарантира по-висока диагностична стойност на метода, нашите резултати потвърждават публикуваните в

литературата данни, че осигуряване на повече от 4 ядра (тъканни цилиндри) не дава по-добри резултати при диагностично изследване на рак на гърда.

2.2 Чувствителност и специфичност при отделните диагностични методи

Чувствителност на ДИБ (Щанц) за откриване на туморен хетерогенитет срещу хетерогенитет на база щанц + резектат след неоадювантна химиотерапия е едва 25%.

Специфичност на ДИБ (Щанц) за откриване на туморен хетерогенитет срещу хетерогенитет на база щанц + резектат след неоадювантна химиотерапия е 100%

Конкордантността между хетерогенитет установен върху иглена биопсия и общият хетерогенитет на база щанц + резектат при проведените от нас анализи остава ниска –

Карра = 0.3726, $p < 0,0001$ (Табл.6).

Таблица 6 Съпоставка между хетерогенитет на иглена биопсия и установен общ показател резектат + щанц

	Без хетерогенитет (общ показател резектат+щанц)	С хетерогенитет (общ показател резектат+щанц)
Без хетерогенитет на CNB	98 (89.09 %)	9 (8,18 %)
С хетерогенитет на CNB	0 (0.00%)	3 (2,73 %)

Чувствителността на резектат след НАХТ за откриване на туморен хетерогенитет срещу общ хетерогенитет на база щанц + резектат след неоадювантна химиотерапия достига 91,67%

Специфичността на резектат след НАХТ за откриване на туморен хетерогенитет срещу общ хетерогенитет на база щанц + резектат след неоадювантна химиотерапия достига 100%

Конкордантността между хетерогенитета установен върху резектат и общият хетерогенитет на база щанц + резектат след неоадювантна химиотерапия при проведените от нас анализи е висока Карра = 0.9515, $p < 0,0001$ (Табл. 7)

Таблица 7 Съпоставка между хетерогенитет на резектат и установен общ показател резектат + щанц

	Без хетерогенитет (общ показател резектат+щанц)	С хетерогенитет (общ показател резектат+щанц)
Без хетерогенитет на резектат	98 (89,09%)	1 (0,91%)
С хетерогенитет на резектат	0 (0.00%)	11 (10 %)

Конкордантността между хетерогенитета установен върху иглена биопсия и този установен върху резектат след неoadjuвантна химиотерапия при проведените от нас анализи е ниска. Получените резултатите показват слаба съгласуваност при съпоставяне на двата хирургични метода Карра = 0.254, $p < 0,0001$ (Табл. 8)

Таблица 8 Съпоставка между хетерогенитет установен на иглена биопсия и върху резектат

	Без хетерогенитет на резектат	Хетерогенитет на резектат
Без хетерогенитет на CNB	98 (89,09%)	9 (8,18%)
С хетерогенитет на CNB	1 (0,91%)	2 (1.82 %)

До момента в литературата е описана висока, макар и вариабилна чувствителност и специфичност на CNB спрямо хирургична ексцизия със стойности между 85 и 100%, като същото се отнася и до оценка в експресията на биомаркери между 79% - 100%. /Meattini I et al, 2017/ Получените от нас данни се покриват със стойностите за специфичност на метода CNB спрямо хирургична ексцизия, като трябва да се има предвид, че данните в научната литература не се свързват с хетерогенни тумори при рак на гърда. От тук идват и разликите с определената от нас чувствителност между двата метода – едва 25%. В нашият случай винаги остава проблемът с малкият обем изследван материал при хетерогенни тумори. Стандартът за 4 до 6 броя изследвани цилиндри е оптимален само при цялостно обхващане на туморната маса. Дори тогава голяма част от мултифокалните и синхронни лезии, които често са с различен профил, остават неоценени.

В потвърждение на дотук описаният времеви хетерогенитет и ниска конкордантност е установеният от нас случай на отчетен след дебелоиглена биопсия хетерогенен тумор,

който не се „потвърждава“ върху материал от резектат вследствие на пълен патологичен отговор след проведената неoadювантна химиотерапия.

3. Получени резултати по задача 3: Да се оцени повлияването на тумори с хетерогенитет от неoadювантна химиотерапия

Таблица 9 представя разпределение на подбраните на случаен принцип случаи с нехетерогенни тумори според морфологичен вариант, фокалност, степен на диференциация и молекулярен субтип преди и след проведена НАХТ, сравнима със случаите с хетерогенитет от таблица 2 / задача 1.

Таблица 9 Нехетерогенни тумори

№	Възраст	Морфологичен вариант на базална клеточна оценка на тумора (Биопсия Резектат и метастази)	Фокалност на тумора на базална клеточна оценка	ypT	ypN	G преди неoadювантна терапия	G след неoadювантна терапия	Молекулярен субтип преди неoadювантна терапия	Молекулярен субтип след неoadювантна терапия	Терапия	pT по Саталоф след проведена неoadювантна терапия	pN по Саталоф след проведена неoadювантна терапия
1	67	/Лобуларен)	унифокален	2	2	3	3	2	1	Епирубицин +Ендоксан	2	2
2	68	NST	унифокален	2	1	2	2	2	2	Епирубицин +Ендоксан	2	3
3	38	NST	унифокален	Tis	0	3	Пълен патологичен отговор	3	Пълен патологичен отговор	Доцетаксел + Херцептин-Перджета	1	2
4	73	NST	унифокален	1b	1	3	3	3	4	Паклитаксел + Карбоплатина	3	4
5	67	NST	унифокален	2	0	2	2	1	1	Епирубицин +Ендоксан	2	2
6	72	NST	унифокален	1a	0	3	2	3	2	Доцетаксел + Херцептин-Перджета	1	2
7	41	NST	унифокален	1c	0	3	3	2(HER2)	2	Доцетаксел + Херцептин-Перджета	3	2
8	34	NST	унифокален	Tis	0	3	Пълен патологичен отговор	3	Пълен патологичен отговор	Доцетаксел + Херцептин-Перджета	1	2
9	41	NST	унифокален	2	2	3	3	2HER2	3	Доцетаксел + Херцептин-Перджета	3	2
10	30	NST	унифокален	1c	1	2	2	2	2	Епирубицин +Ендоксан	3	4
11	33	NST	унифокален	0	0	3	Пълен патологичен отговор	4	Пълен патологичен отговор	Паклитаксел + Карбоплатина	1	1
12	44	NST	унифокален	1	1	3	3	3	3	Доцетаксел + Херцептин-Перджета	3	3

Легенда: G grade: 1- високодиференциран, 2- умеренодиференциран,

3 -нискодиференциран

Молекулярен субтип: 1- луминален А, 2- луминален Б, 2(HER2)- луминален HER2,

3- HER2 обогатен, 4- ТНKG

Оценка по Саталоф рТ: 1- тотален (липсва остатъчен тумор), 2- терапевтичен ефект > 50 %, 3- терапевтичен ефект < 50 %, 4- липсва терапевтичен ефект, рN: 1- терапевтичен ефект, без метастази, 2- без метастази, но без терапевтичен ефект, 3- терапевтичен ефект, метастатичен лимфен възел, 4- налични метастази без терапевтичен ефект

Отчитане на отделните променливи след проведена НАХТ показва следното:

3.1 Посттерапевтичен Т статус:

Проследявайки урТ на пациенти с хетерогенен тумор:

- пет от случаите са с Т1
- два случая са с Т2
- три случая са с Т3
- два случая са с Т4.

Съпоставени с групата на нехетерогенните тумори съответно са:

- два случая са с Тis
- пет случая са с Т1
- четири случая са с Т2
- при една пациентка няма остатъчен Тумор - Т0 след неoadjuvantна терапия
- Съпоставянето на туморен обем и инфилтрация след проведена НАХТ (урТ) между туморите от групата с хетерогенитет и тези без хетерогенитет не показва статистически сигнификантна разлика $\chi^2 = 10.480$, $df = 6$, $p = 0.1058$

От получените в нашето изследване резултати при определяне повлияване на ракът на гърда от неoadjuvantна химиотерапия прави впечатление липсата на отчетен пълен патологичен отговор в групата с изявен туморен хетерогенитет. Пациентите в тази група са също с отчетена значително по-висока честота на остатъчен тумор след проведена НАХТ, което съответства на публикуваните в научната литература данни.

3.2 Посттерапевтичен N статус:

Проследявайки урN в групата на пациенти с хетерогенен тумор получените резултати са както следва:

- N0 са две пациентки, а една е с микрометастаза
- три пациентки са в урN1 група
- пет са в групата на урN2
- една е в групата на урN3

Проследявайки урN в групата на пациенти с нехетерогенен тумор са както следва:

- шест са в групата урN0
- четири са в групата урN1
- две са в групата урN2
- Съпоставянето на урN статус между туморите от групата с хетерогенитет и тези без хетерогенитет не показва статистически сигнификантна разлика.

$$\chi^2 = 6.933, df = 6, p = 0.3270$$

Въпреки големите вариации в терапевтичното повлияване на тумора, прави впечатление липсата на отчетен пълен патологичен отговор в групата с изявен туморен хетерогенитет. Както и по-изразено лимфно ангажиране след проведена НАХТ при хетерогенната група пациенти.

3.3 Туморна диференциация (Grade):

Туморната диференциация определена в туморните компоненти преди неoadювантна терапия на база морфологични характеристики на NST (Non specified type) и/или лобуларна/муцинозна компонента в групата пациенти с хетерогенен тумор, показва следното разпределение:

G3 (ниско диференцирани) са четири пациентки

G2 (умерено диференцирани) са шест пациентки

G1 (високо диференцирани) са два случая (от които един муцинозен приет за G1)

Съпоставени с туморната диференциация на групата пациенти с нехетерогенен тумор са както следва:

G3 (ниско диференцирани) са девет случая

G2 (умерено диференцирани) са три случая

Съпоставянето на туморната диференциация във всяка от двете групи (преди и след проведена неoadювантна химиотерапия) не показва статистически сигнификантна разлика. Съпоставянето на туморната диференциация преди и след проведена неoadювантна химиотерапия при хетерогенните тумори не показва сигнификантна промяна в туморния грейд. Stuart-Maxwell $\chi^2 = 2.333$, $df = 2$, $p = 0.3114$ (Табл.10)

Таблица 10 Съпоставянето на туморната диференциация преди и след проведена неoadювантна химиотерапия при хетерогенните тумори

	G1 (преди НАХТ)	G2 (преди НАХТ)	G3 (преди НАХТ)
G1 (след НАХТ)	0	0	0
G2 (след НАХТ)	2	4	1
G3 (след НАХТ)	0	2	3

Съпоставянето на туморната диференциация преди и след проведена неoadювантна химиотерапия при нехетерогенните тумори не показва сигнификантна промяна в туморния грейд. Stuart-Maxwell $\chi^2 = 1.000$, df (conservative) = 2, $p = 0.607$ (Табл.11)

Таблица 11 Съпоставянето на туморната диференциация преди и след проведена неoadювантна химиотерапия при нехетерогенните тумори

	G1 (преди НАХТ)	G2 (преди НАХТ)	G3 (преди НАХТ)
G1 (след НАХТ)	0	0	0
G2 (след НАХТ)	0	3	1
G3 (след НАХТ)	0	0	5

Три случая не са сравнени поради пълен патологичен отговор в резектата.

Съпоставянето на наличието на промяна в туморната диференциация в двете групи преди проведена неoadювантна химиотерапия не показва статистически сигнификантна разлика. $\chi^2 = 2.250$, $df = 1$, $p = 0.1336$

Въпреки несигнификантните разлики, отчетливо личи липсата на високодиференцирани тумори G1 в групата пациенти с нехетерогенен тумор. Наличието на такива в групата на

пациенти с хетерогенен тумор се дължи на NST компонентата, която е високостепенна и не се е повлияла от проведената неoadювантна химиотерапия.

3.4 Посттерапевтичен сурогатен молекулярен статус:

При съпоставянето на сурогатен молекулярен субтип на тумори след неoadювантна химиотерапия в групата с изявен хетерогенитет се установи следното:

- Луминален А субтип са четири случая
- Луминален Б са седем случая, от които:
 - четири са луминален Б
 - три са HER 2 enriched (обогатен) субтип
- Един от случаите е ТНKG /тройно негативен карцином на гърда/

При групата пациенти с нехетерогенни тумори разпределението на сурогатен молекулярния субтип след неoadювантна химиотерапия е следният:

- Луминален А е отчетен при два случая
- Луминален Б са четири случая,
- Два случая са HER2 позитивни
- Един случай е ТНKG /тройно негативен карцином на гърда/
- Три случая са с пълен патологичен отговор

При три от случаите с нехетерогенни тумори след НАХТ се наблюдава пълен патологичен отговор, като два от тях са HER2 позитивни и един е тройно негативен тип. При пет случая имаме промяна на сурогатен молекулярен субтип след неoadювантна химиотерапия – от тях при три се касае за имунохистохимично отчетена понижена HER 2 експресия след терапия (очакван ефект), при един имаме промяна от луминален Б тип в луминален А тип поради намалена пролиферативна активност (също очакван ефект след проведена терапия) и при един се касае за загуба на естрогенна експресия при HER 2 обогатен субтип на луминален Б.

При изследване на резектат от хетерогенни тумори след неoadювантна химиотерапия - при шест от случаите се установява наличие на едновременно съществуващи две туморни компоненти, като в три от случаите те са с различен сурогатен молекулярен субтип. Като цяло, в хетерогенната популация се наблюдава промяна на сурогатен молекулярен субтип при осем случая.

В нехетерогенната популация се наблюдава промяна на сурогатния молекулярен субтип при пет случая, засягаща промяна на стероидния и HER2 рецептурен статус при четири случая и пролиферативната активност при един случай.

Промени настъпили в молекулярната експресия след проведена НАХТ са широкоизвестни в публикуваната до момента литература и са аналогични с получените от нас резултати, което е и основна причина за наложилата се в практиката преоценка на остатъчен тумор след проведена терапия или при рецидив.

Въпреки отчетените тенденции, съпоставянето на промяната на сурогатния молекулярен субтип при случаите в двете групи след неoadювантна терапия не показва статистически сигнификантна разлика. Тенденцията да има такава при хетерогенните тумори е добре набелязана, но при изследваният малък брой пациенти е незначима статистически $\chi^2 = 3.600$, $df = 1$, $p = 0.0577$

3.5 Терапевтичен отговор:

При съпоставяне на хетерогенни и нехетерогенни тумори според отговор към терапия на първичният тумор - урТ категория по Саталоф се установи:

За Хетерогенната група:

- Категория 2 по Саталоф са четири случая, в които имаме повече от 50% терапевтичен ефект, но по-малко от пълен или почти пълен терапевтичен отговор (по малко от 5% остатъчен тумор)
- Категория 3 по Саталоф са шест случая с по - малко от 50% терапевтичен ефект
- Категория 4 по Саталоф са два случая без данни за терапевтичен ефект

При хетерогенните тумори нямаме отчетен случай с пълно повлияване на първичният тумор

За Нехетерогенната група:

- Категория 1 по Саталоф в групата с нехетерогенните тумори имаме четири случая на пълен или почти пълен патологичен отговор
- Категория 2 по Саталоф с повече от 50% патологичен отговор (непълен) са три случая
- Категория 3 по Саталоф с повлияване по - малко от 50% са пет случая

При нехетерогенните тумори нямаме случай на неповлияване на първичния тумор.

При сравняване на отговор към терапия, отчетен по Саталоф при първичният тумор в двете групи показва статистически сигнификантна разлика $\chi^2 = 14.400$, $df = 4$, $p = 0.0061$

При съпоставяне на хетерогенните и нехетерогенните тумори според отговор към терапия по урN категория по Саталоф се установи:

При групата на хетерогенни тумори разпределението е както следва:

- Категория 2 по Саталоф е един случай, при който не са налице нито метастази, нито данни за терапевтичен ефект.
- Категория 3 по Саталоф имаме при пет случая с данни за терапевтичен ефект и наличие на остатъчни метастази в лимфните възли.
- Категория 4 по Саталоф са пет случая с липса на терапевтичен ефект в метастатичната компонента, като в един от тях са налице данни за некротична NST компонента при витална муцинозна компонента на тумора.

В хетерогенната група имаме един случай с данни за повлияване без метастатична компонента.

При групата на нехетерогенни тумори разпределението е както следва:

- Категория 1 по Саталоф - един случай с данни за повлияване без метастатична компонента.
- Категория 2 по Саталоф - седем случая, които са без данни за повлияване или метастази.
- Категория 3 по Саталоф - два случая с данни за метастатичен процес (данни за витална метастаза) и терапевтично повлияване.
- Категория 4 по Саталоф – два случая без данни за повлияване от терапия в метастатичната компонента.

При сравняване отговор към терапия, отчетен по Саталоф при аксиларни метастази в двете групи не се отчете статистически сигнификантна разлика $\chi^2 = 3.771$, $df = 3$, $p = 0.2872$

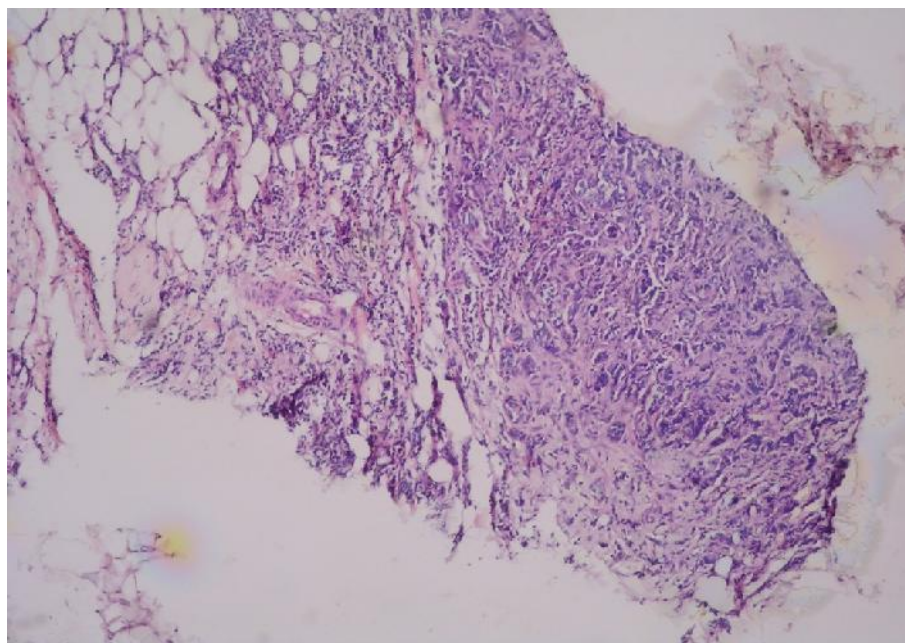
От получените в нашето изследване резултати при определяне повлияване на ракът на гърда от неoadювантна химиотерапия прави впечатление липсата на отчетено пълно терапевтично повлияване в групата с изявен туморен хетерогенитет. Пациентите в тази група са също с отчетена значително по-висока честота на остатъчен тумор и лимфно ангажиране след проведена НАХТ - урN, но с по-висока степен на диференциация. При хетерогенните тумори, възможността за наличие едновременно на терапевтично резистентни и чувствителни клетъчни популации в рамките на единична лезия, определя възможността за развитие на терапевтична резистентност и персистиране на минимална резидуална болест. Тази зависимост се очаква да съкрати времето свободно от прогресия, да увеличи рискът от рецидив и да влоши общата прогноза.

Разглеждайки получените от нас резултати обаче, макар първоначално да се наблюдава тенденция към затегнат ход и резистентност към терапия при хетерогенните тумори, след статистическа обработка, разликите в терапевтичният отговор между двете групи остават несигнификантни. Подобни данни публикува и Yates L.R et all, 2015, който не отчита разлики в отговора към НАХТ при хетерогенни тумори на гърда.

На фигура 5 и фигура 6 нагледно е представена хистологична находка на два случая от изследваната обща популация един с пълен патологичен отговор и един с непълен (частичен) патологичен отговор

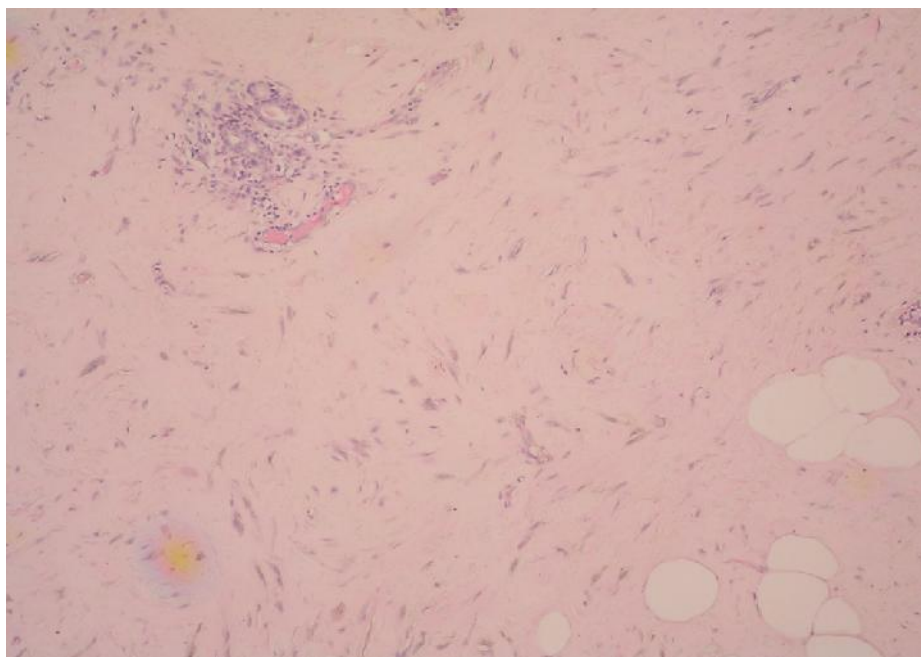
Пример за пълен патологичен отговор при високостепенен карцином на гърдата, състояние след терапия и четворен негативен статус за ER, PgR, AR и HER 2. Ki 67 определен на биопсия като 60%.

Преди неoadювантната терапия, туморът е със следният хистологичен вид (фиг.5.1)



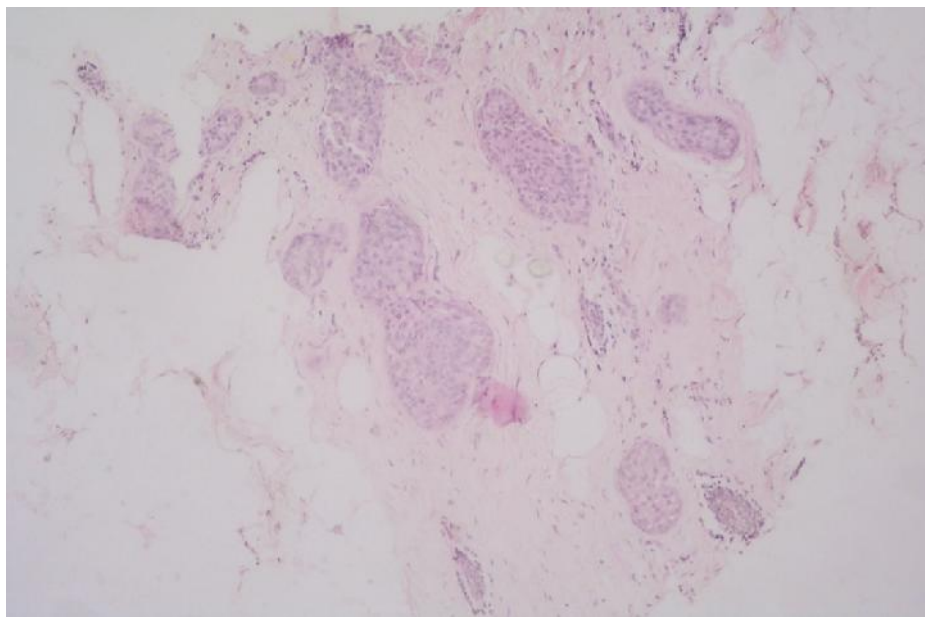
Фигура 5.1 Първичен тумор – високостепенен NST дуктален карцином G2-3 (ХЕ, 40х)

В резектата от операцията, последвала неoadювантната терапия не се попада на остатъчен тумор (фиг.5.2.)

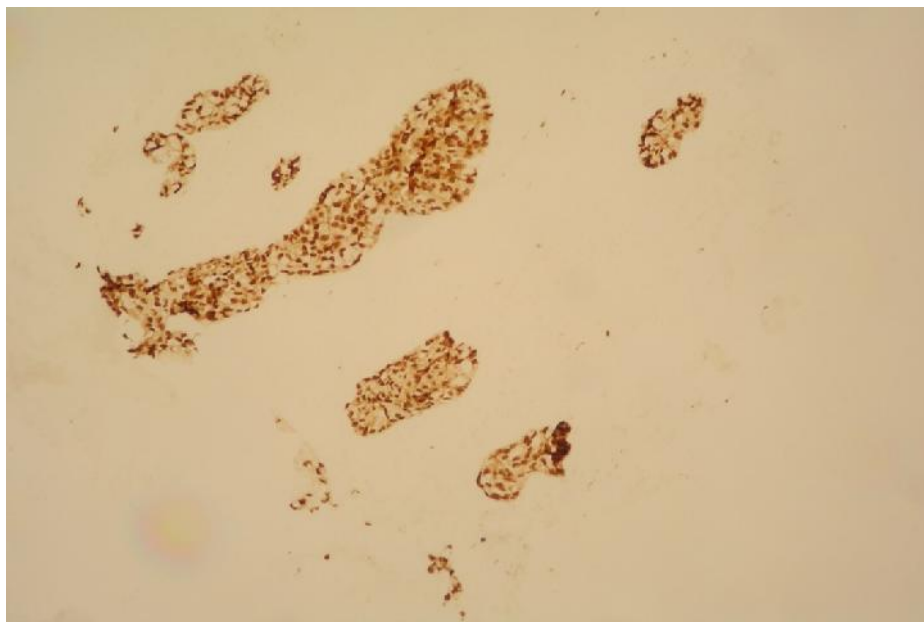


Фигура 5.2 Паренхим от гърда с атрофични терминални дуктолобуларни единици, целуларна фиброзна строма в туморното ложе. (ХЕ, 200х)

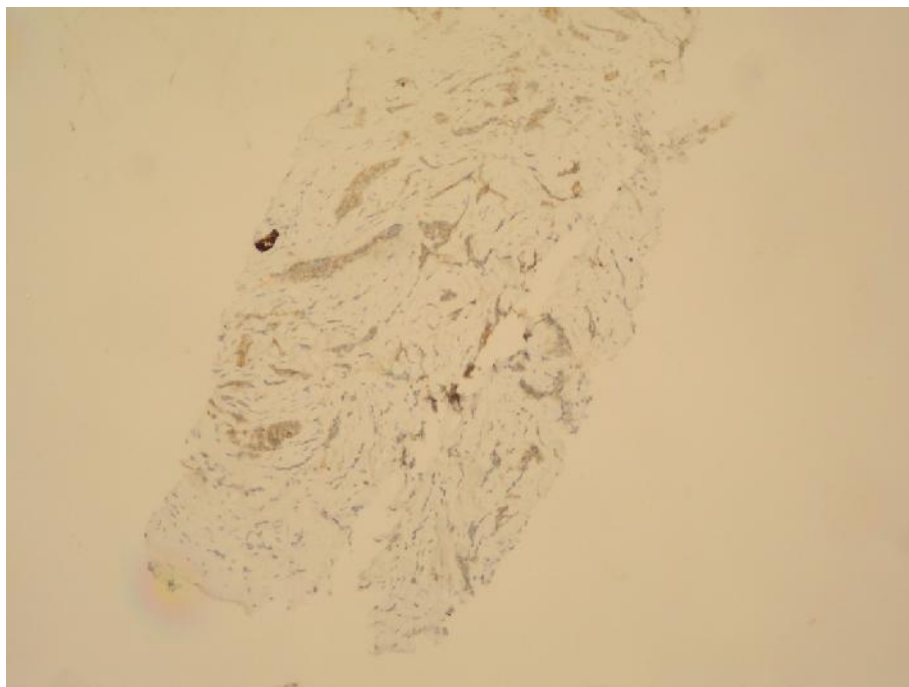
Пример за непълен патологичен отговор при пациентка с G2 NST дуктален карцином, доказан на иглена биопсия (Фиг.6.1) и съответно статус за ER (Фиг. 6.2), HER2 (Фиг. 6.3) и Ki-67 (Фиг. 6.4)



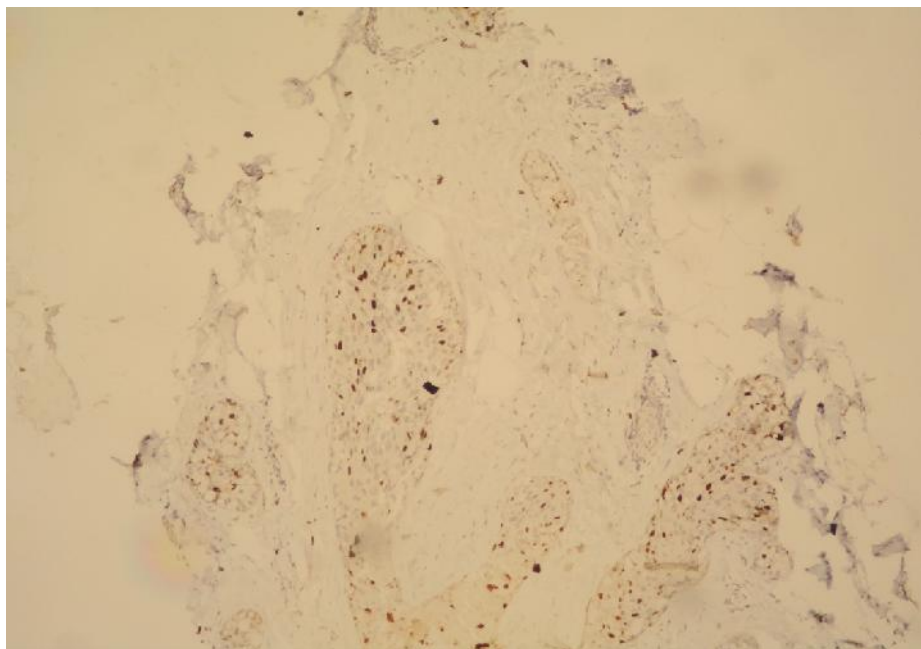
Фигура 6.1 Предоперативна биопсия инвазивен NST (дуктален) карцином G2- гнезда от туморни клетки и структури с характеристика на DCIS -G2 (20х HE)



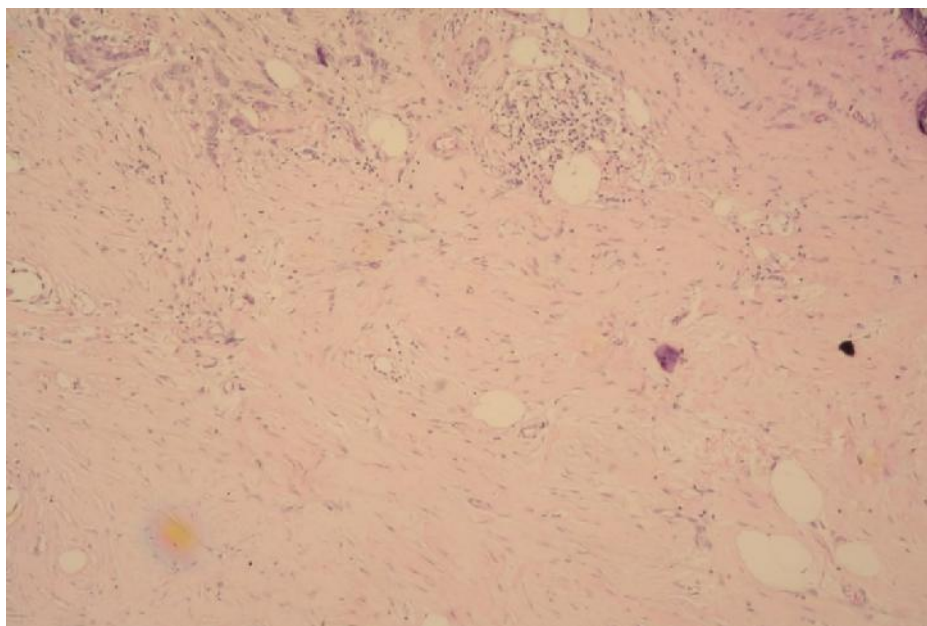
Фигура 6.2 след имунохистохимично изследване – ER+ статус умерен интензитет в повече от 80 % от туморните клетки (20x ER). PgR експресия при туморните клетки на пациентката е слаба и в неголям процент от клетките



Фигура 6.3 HER 2 2+ Слабо до умерено циркомференциално оцветяване в повече от 10% от туморните клетки (20x HER 2). Случаят е верифициран като негативен на ISH



Фигура 6.4 Ki 67 – 25 % от ядрата на туморните клетки са позитивни за маркера (20 x Ki 67)
В резектата от операцията, последвала неoadювантната терапия се попада на остатъчен
тумор на малка площ (фиг. 6.5)



Фигура 6.5 Посттерапевтично са отчетени фокуси на целуларна фиброза в туморното ложе,
сред която се попада на групи туморни клетки (до около 15 % от площта на туморното ложе
в изследваните срези). Наблюдават се малки струпвания на лимфоцити и
микрокалцификати (ХЕ, 100х).

4. Получени резултати при работа по Задача 4: Да се определят рецидиви и преживяемост при пациенти с доказан туморен хетерогенитет и неoadjuвантна химиотерапия.

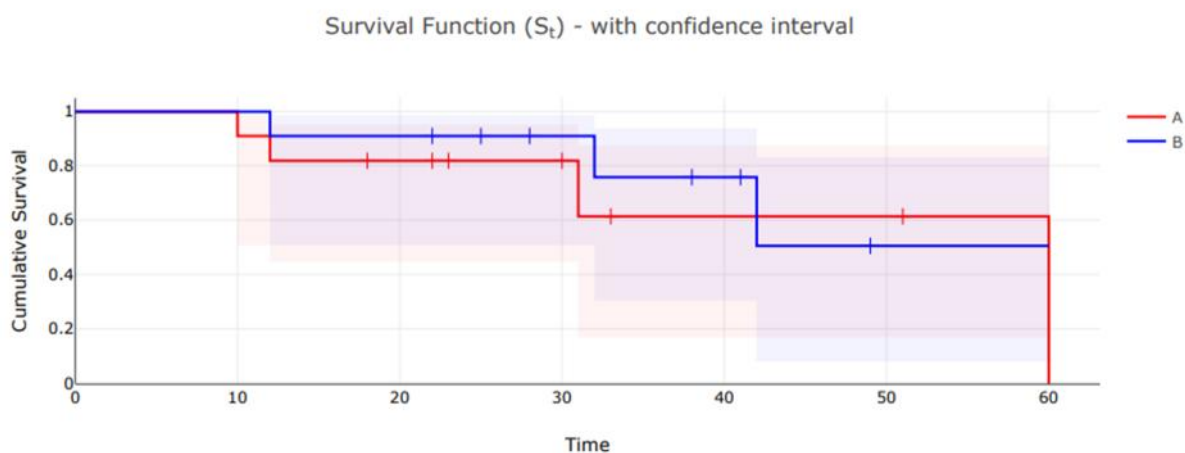
Изследваният брой случаи е твърде малък, за да се правят генерални обобщения за практиката, но същевременно се открояват някои тенденции, които могат да служат като насока за бъдещи проучвания.

В проведеното от нас проучване при два от случаите на пациенти с туморен хетерогенитет са установени тласъци на заболяването, като при едната е с поява на метастази в черен дроб (пациентката преживява 5 години), а при другата са налице костни метастази (пациентката е починала).

Съответно при два от случаите на пациенти без хетерогенитет са установени тласъци на заболяването, като при едната е с поява на метастази в бял дроб (пациентката е починала), а при другата са налице плеврални метастази (пациентката е починала). Останалите пациенти, които са починали, са в напреднал стадий с персистиращо заболяване.

Не се установи разлика в общата преживяемост между групата на пациентите с хетерогенни тумори и пациентите с тумори без изявен хетерогенитет.

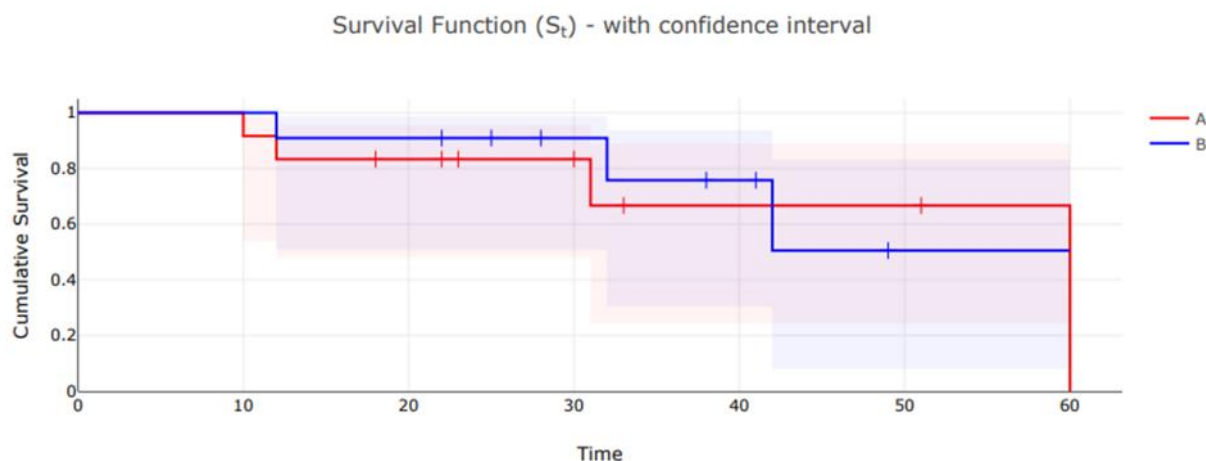
Log-rank test $\chi^2 = 0.0981347$; Df=1; p= 0.754080 (фиг. 7)



Фигура 7 Криви на Kaplan- Meier показващи общата преживяемост в групата на пациентите с хетерогенни тумори (A) и пациентите с тумори без изявен хетерогенитет (B).

Не се установи разлика в преживяемостта без заболяване между групата на пациентите с хетерогенни тумори и пациентите с тумори без изявен хетерогенитет.

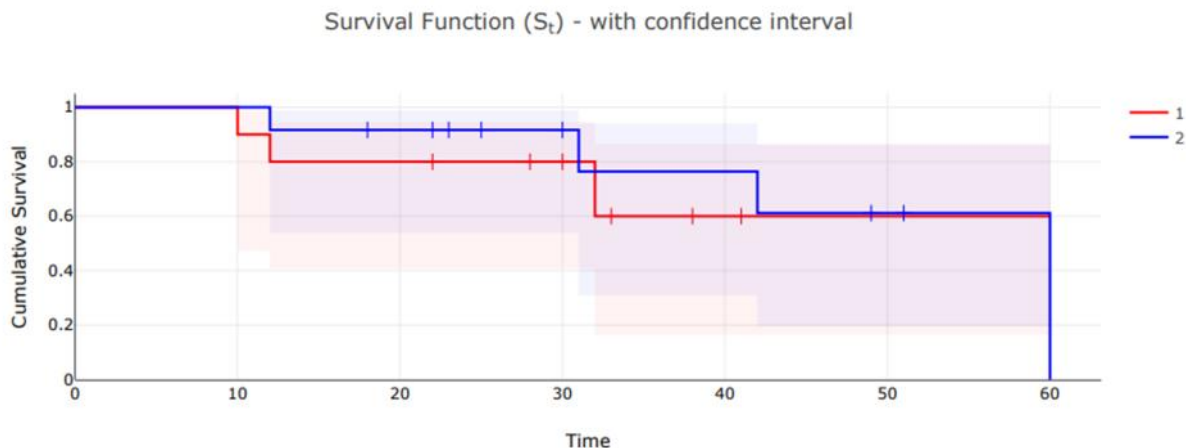
Log-rank test $\chi^2 = 0.00279535$; Df=1; p= 0.957835 (фиг. 8)



Фигура 8 Криви на Kaplan - Meier показващи преживяемост без заболяване в групата на пациентите с хетерогенни тумори (A) и пациентите с тумори без изявен хетерогенитет (B). Въпреки малкото изследвани и анализирани пациенти се отчита липсата на значимо влияние на туморния хетерогенитет върху общата преживяемост и свободната от болест преживяемост. Допускаме, че същността на туморния хетерогенитет, морфологичният и молекулярен тип на туморните компоненти са определящи в клиничен смисъл. Ако и двете туморни компоненти могат да бъдат таргетирани или повлияни с конкретна неoadювантна терапия, наличието на хетерогенитет не променя клиничното поведение и еволюция. Ако едната компонента е нискостепенна, позитивна за стероидни рецептори, с добра клинична прогноза, а другата високостепенна, подходяща за таргетна терапия или химиотерапия, то неoadювантната терапия би повлияла само високостепенната, агресивна компонента, като не се очаква повлияване на индолентната тубуларната компонента, водещо до персистенция на тумора. Подобни промени в биологията на тумора определят персистенция, и отчетени тенденции в краткосрочен план, но не се очаква да доведат до събитие влошаващо значително общата прогноза и преживяемост. Получените от нас резултати подкрепят твърдението в литературата, че туморният хетерогенитет е водещ фактор при персистенция и само при подходящи условия е основен фактор при прогресия на туморите. (обобщен анализ от Dzobo K et al, 2018).

Не се установи разлика в общата преживяемост между групата на пациентите с тумори ypT in situ и ypT1 срещу тези с ypT 2-4

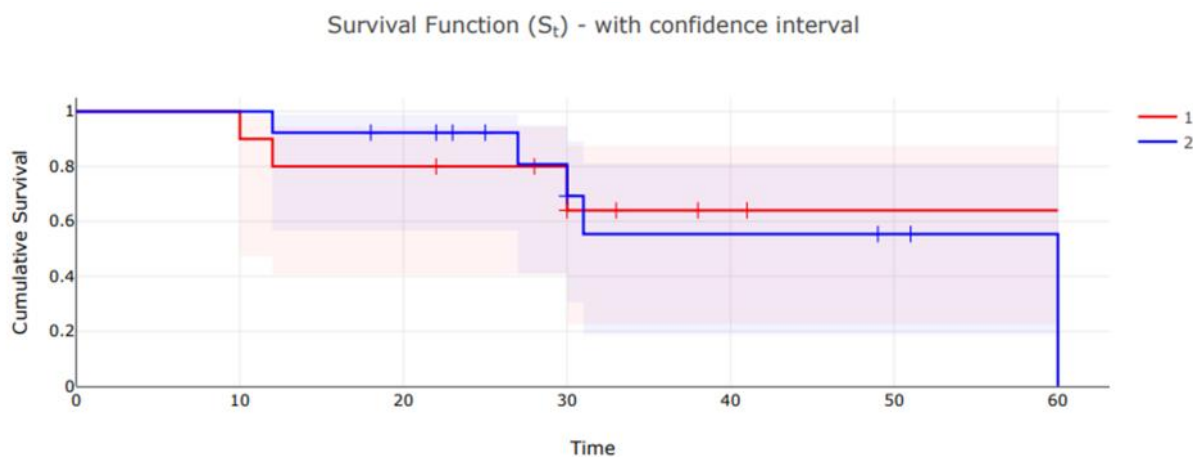
Log-rank test $\chi^2 = 0.477286$; Df=1; p= 0.489654 (фиг.9)



Фигура 9 Криви на Kaplan - Meier показващи общата преживяемост в групата на пациентите с ypT in situ и ypT1 (A) и тези с ypT 2-4 (B).

Не се установи разлика в преживяемостта без заболяване между групата на пациентите с тумори ypT in situ и ypT1 срещу тези с ypT 2-4

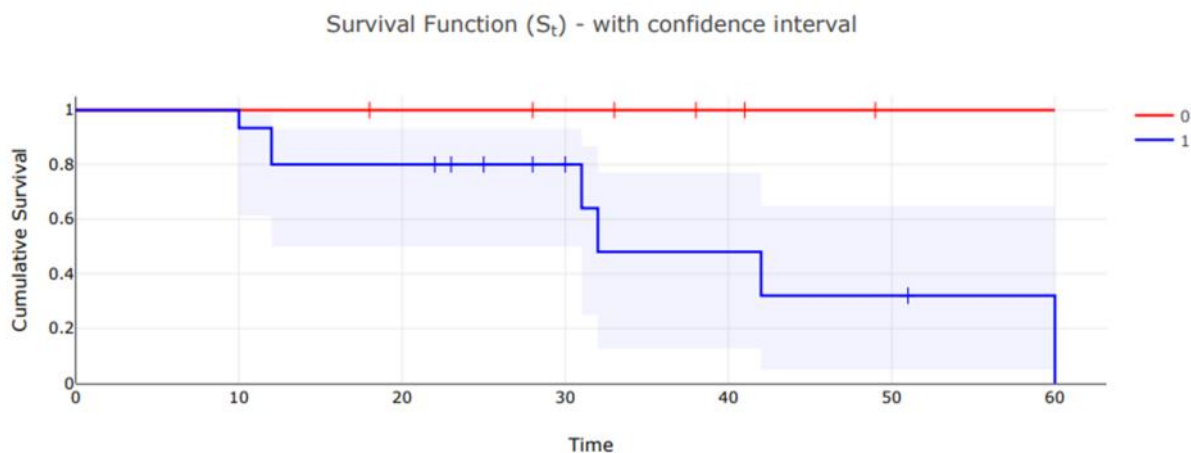
Log-rank test $\chi^2 = 0.00279535$; Df=1; p=0.957835 (фиг. 10)



Фигура 10 Криви на Kaplan - Meier показващи преживяемост без заболяване в групата на пациентите с ypT in situ и ypT 1 (A) срещу тези с ypT 2-4 (B).

Не се установи статистически значима разлика в общата преживяемост между групата на пациентите с тумори и урN позитивен статус и урN негативен статус.

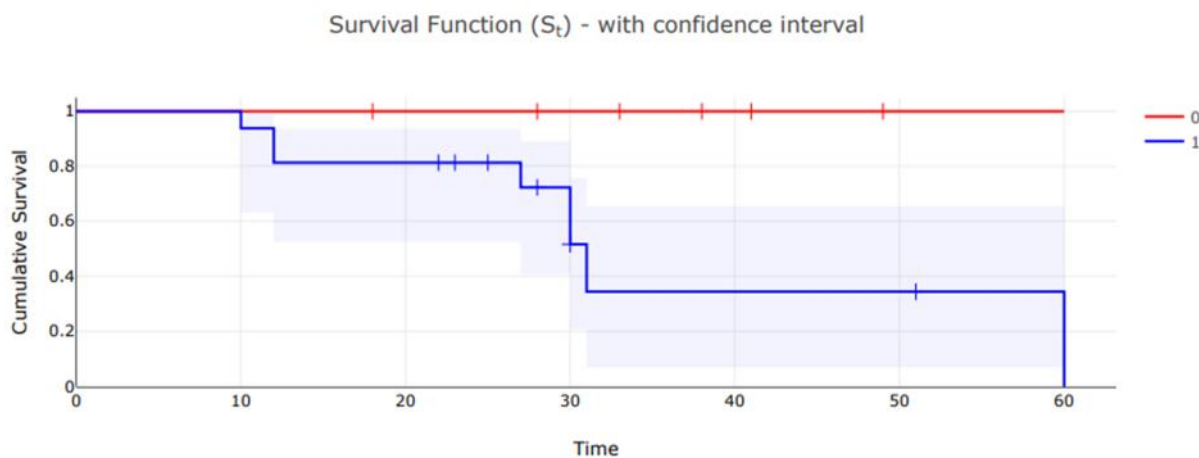
Log-rank test $\chi^2 = 3.746566$; Df=1; p= 0.0529161 (фиг.11)



Фигура 11 Криви на Kaplan - Meier показващи общата преживяемост в групата на пациентите с урN негативен статус (А) и пациентите с урN позитивен статус (В).

Установява се значима разлика в преживяемостта свободна от заболяване между групата на пациентите с тумори и урN позитивен статус и урN негативен статус.

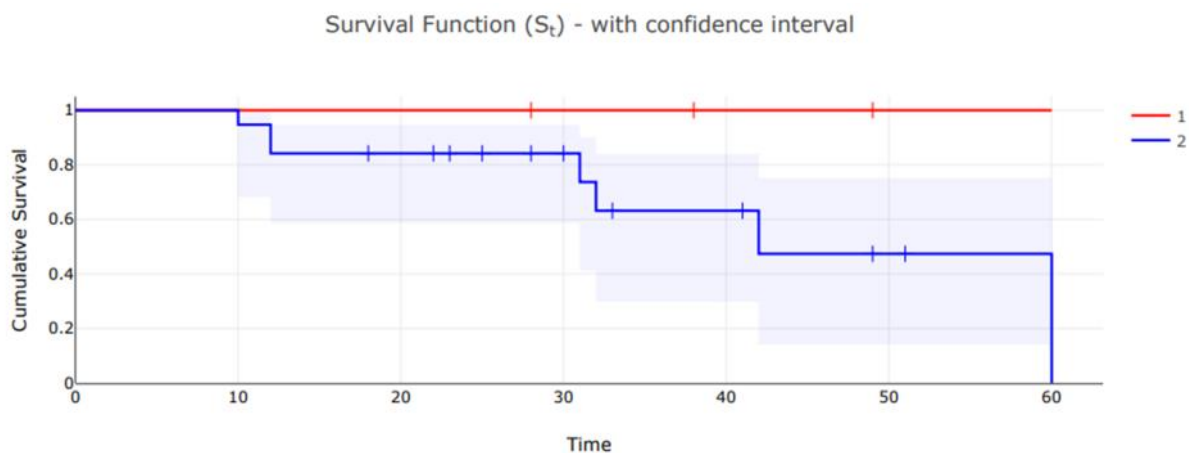
Log-rank test $\chi^2 = 4.305432$; Df=1; p= 0.0379908 (фиг.12)



Фигура 12 Криви на на Kaplan - Meier показващи преживяемост без заболяване в групата на пациентите с урN негативен статус (А) и пациентите с урN позитивен статус (В).

Не се установи разлика в общата преживяемост между групата на пациентите с пълен /почти пълен патологичен отговор и пациентите с остатъчен тумор, повлиян в различна степен или без повлияване.

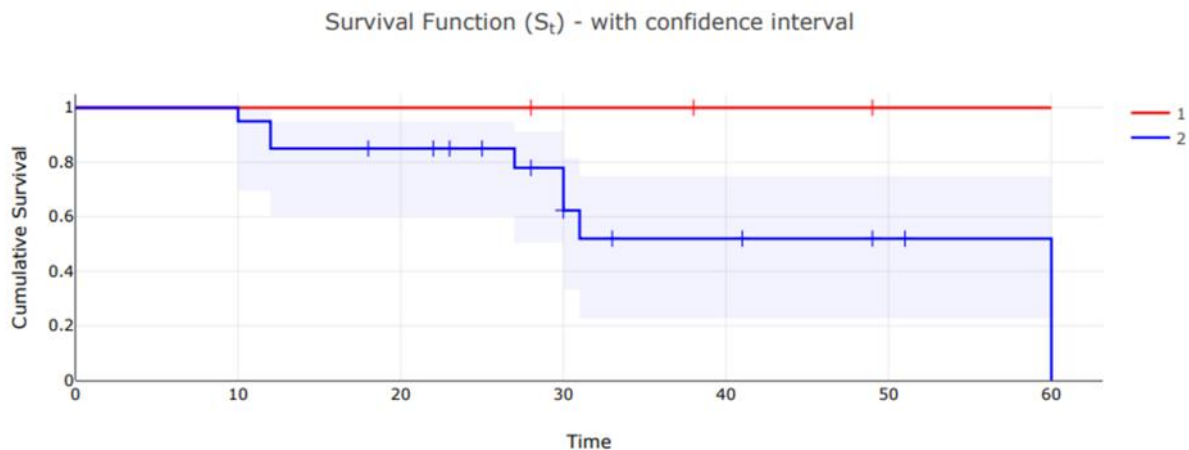
Log-rank test $\chi^2 = 1.227413$; Df=1; p= 0.267911 (фиг. 13)



Фигура 13 Криви на Kaplan - Meier показващи обща преживяемост в групата на пациентите с пълен /почти пълен патологичен отговор (А) и пациентите с остатъчен тумор, повлиян в различна степен или без повлияване (В).

Не се установи разлика в преживяемостта без заболяване между групата на пациентите с пълен /почти пълен патологичен отговор и пациентите с остатъчен тумор, повлиян в различна степен или без повлияване.

Log-rank test $\chi^2 = 1.393110$; Df=1; p= 0.237881 (фиг. 14)



Фигура 14 Криви на на Kaplan - Meier показващи преживяемостта без заболяване в групата на пациентите с пълен /почти пълен патологичен отговор (A) и пациентите с остатъчен тумор, повлиян в различна степен или без повлияване (B).

В проведеното от нас изследване не беше проследена преживяемостта по степен и молекулярен субтип, тъй като хетерогенните тумори са трудни за субстратифициране.

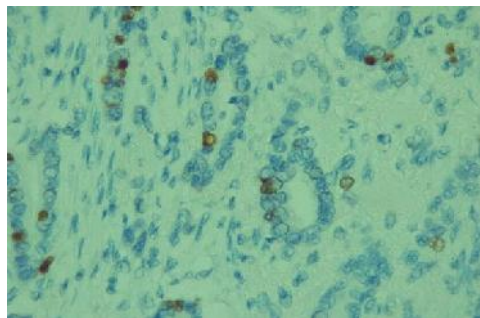
От описаните по-горе резултати, макар и незначителна, съществува тенденция негативният посттерапевтичен TNM статус да се свързва с по-добра прогноза. В най-голяма степен това се отнася за негативният нодален статус след проведена неoadювантна терапия, който показва макар и статистически незначима тенденция да бъде свързан с по-добра обща преживяемост, спрямо случаите с позитивен нодален статус. Друг показател с отчетлива тенденция за разлика в преживяемостите, макар и несигнификантна показва урТ- отговор на основния тумор към неoadювантна терапия, отчетен по Саталоф. Представените от нас резултати за пореден път утвърждават туморният обем и нодалният статус като отдавна доказали се показатели със самостоятелна прогностична стойност, част от Nottingham prognostic index, използван успешно за стратифициране на пациентите с рак на гърда от 1973 г, като се свързват с лоша прогноза.

Въпреки малкото изследвани и анализирани пациенти се отчита липсата на значимо влияние на туморния хетерогенитет върху общата преживяемост и свободната от болест преживяемост. В натрупаните до момента данни в различни публикации се потвърждава идеята, че хетерогенните тумори са в по-висока степен терапевтично резистентни, без това да се отразява сигнификантно на общата преживяемост, което е съвместимо с получените от нас резултати.

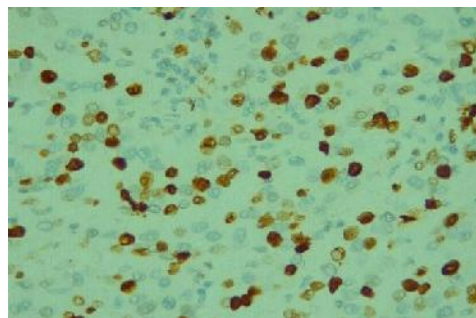
5. Получени резултати по задача 5: Да се определи ролята на пролиферативна и апоптотична активност преди и след неoadювантна химиотерапия при популация от тумори, съдържащи случаи и с туморен хетерогенитет

Отчетената средна стойност на Ki-67 в изследваната популация е 26% (варираща от 8% до 94%).

Примери за стойности на Ki-67 по-ниски от 14% и равни или по-високи от 14% са представени на Фиг. 15.



А

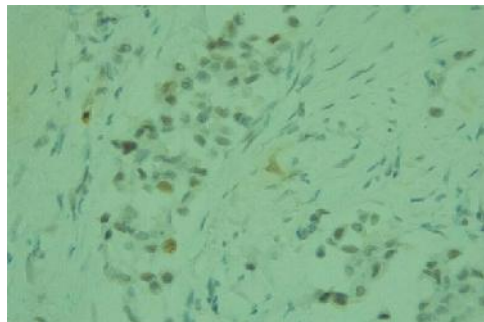


В

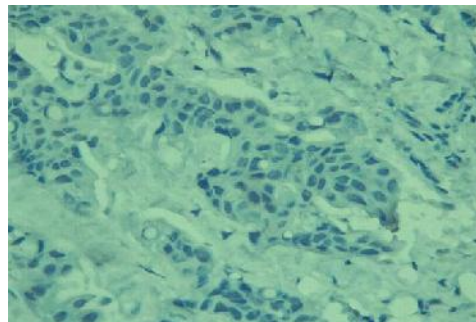
Фигура 15 А. Ki-67 стойности под 14%, Ki-67, 400х; В. Ki-67 стойности равни или по-високи от 14% Ki-67, 400х

Caspase-3 беше отчетена позитивна в 17 от случаите и негативна в 88.

Примери за имунохистохимично позитивизиране и негативизиране на caspase-3 са представени на Фигура 16.



А



В

Фигура 16 А. Caspase-3 позитивна, caspase-3, 400х; В. Caspase-3 негативна, caspase-3, 400х

В изследваната популация случаите негативни за caspase-3 бяха с измерена средна стойност на Ki-67 от 25% (варираща между 8% до 94%). Случаите позитивни за caspase-3 демонстрират средни стойности на Ki-67 от 35% (варираща между 12% и 87%). Подобен паралелен ръст на апоптоза и пролиферация, с преобладаване на пролиферативната активност е описан в литературата при туморна прогресия с висок търновър и потвърждава теорията за апоптозо-индуцирана пролиферация при малигенени процеси.

Сравнени стойностите на двата маркера, експресирани в двете групи не показаха статистически сигнификантна разлика. $K-W=1.7631$, $p=0.1842$.

5.1 Ki-67 зависимости с изследваните прогностични маркери

Сравнявайки го с изследваните прогностични параметри Ki-67 демонстрира следните отношения:

Статистически сигнификантна разлика беше открита между Ki-67 индекс (на диагностична биопсия) и степента на диференциация (G) $K-W = 24.2932$, $p<0.0001$.

Както се и очаква високодиференцираните тумори (G1) експресират най-ниски стойности на Ki-67 индекс, а нискодиференцираните (G3) тумори най-високи стойности на Ki-67 индекс (Таблица 12)

Таблица 12 Ki-67 нива (на диагностична биопсия) и степен на диференциация (G)

Грейд	Брой	Средна стойност	Минимална	Максимална
G1	2	12	10	14
G2	47	20	8	73
G3	54	37	11	94

Статистически сигнификантна разлика беше отчетена между експресия на Ki-67 (на диагностична биопсия) и (сурогатен) молекулярен субтип на тумора (на диагностична биопсия) $K-W = 28.5439$, $p< 0.00000967538$.

Луминален А карциноми се представят с най-нисък Ki-67% индекс, сравнен с останалите категории. (Таблица 13)

Таблица 13 Ki-67 ниво (на диагностична биопсия) и (сурогатен) молекулярен субтип на тумора (на диагностична биопсия)

Молекулярен субтип	Брой	Средна стойност	Минимална	Максимална
Луминален А	15	14	9	20
Луминален Б Ki-67 $\geq 14\%$	45	35	8	94
Луминален Б HER2 позитивен	7	25	19	43
HER 2	21	35	14	61
TNT	9	27	18	87

Статистически сигнификантна разлика се откри между нива на Ki-67 (на диагностична биопсия) и обем и инфилтрация на първичният тумор след НАХТ при оперативна интервенция и хистологично изследване $K-W = 11.7944$, $p < 0.0377169$.

Туморите демонстрирали пълен патологичен отговор (отнесени към уT0 и уTis) са сред туморите с най-висок Ki-67 индекс сред изследваната група. (Таблица 14)

Таблица 14 Ki-67 (на диагностична биопсия) и патологичен отговор на НАХТ, изследван на препарат от оперативна интервенция.

урТ	Брой	Средна стойност	Минимална	Максимална
0	12	37.5	14	87
1	22	25.5	9	70
2	47	23	8	94
3	8	35	14	90
4	12	21,5	10	73
In situ (ypTis)	4	48	40	60

Не беше открита статистически сигнификантна разлика между нива на Ki-67 експресия (на диагностична биопсия) и степен на ангажиране на регионални лимфни възли след НАХТ при радикална операция и хистологично изследване.

K-W = 4.19294, $p > 0.241366$ (Таблица 15)

Таблица 15 Ki-67 нива (на диагностична биопсия) и ниво на ангажиране на регионални лимфни възли (базирано на посттерапевтична биопсия)

урN	Брой	Средна стойност	Минимална	Максимална
0	32	27.5	11	70
1	31	27	9	94
2	26	25.5	10	87
3	13	20	8	59

Не беше открита статистически сигнификантна разлика между нива на Ki-67 (на диагностична биопсия) и ефекта от НАХТ отчетена според категория по Саталоф Т

K-W = 3.2385, $p = 0.0719229$ (Таблица 16)

Таблица 16 Ki-67 нива (на диагностична биопсия) и ефекта от НАХТ отчетена според категория по Саталоф Т

Саталоф Т	Брой	Средна стойност	Минимална	Максимална
А-пълнен отговор	18	40	14	61
В, С, D – непълен и липсващ отговор	71	26	9	94

Не беше открита статистически сигнификантна разлика между Ki67 нива (на диагностична биопсия) и ефекта от НАХТ отчетена според категория по Саталоф N.

K-W = 1.40937 $p > 0.703338$ (Таблица 17)

Таблица 17 Ki-67 нива (на диагностична биопсия) ефекта от НАХТ отчетена според категория по Саталоф N,

Саталоф N	Брой	Средна стойност	Минимална	Максимална
A	8	39	18	60
B	22	26	14	70
C	32	26	9	87
D	23	35	9	94

5.2 Caspase-3 зависимости с изследваните прогностични маркери

При сравняване на изследваните прогностични фактори и параметри caspase-3 демонстрира следните зависимости:

Отчетена беше тенденция към асоцииране на caspase-3 (на диагностична биопсия) с обем и инфилтрация на първичният тумор след НАХТ и оперативна интервенция, но пациентският брой беше прекалено малък, правейки статистическата значимост до голяма степен недостоверна $\chi^2 = 27.02$, Df=5, p=0. 0001 (Таблица 18)

Таблица 18 Експресия на caspase-3 (на диагностична биопсия) спрямо обем и инфилтрация на първичният тумор след НАХТ и оперативна интервенция

урТ	0	1	2	3	4	In situ
Caspase-3 негативна	9 (8.57%)	17 (16.19%)	42 (40.00%)	8 (7.62%)	12 (11.43%)	0 (0.00%)
Caspase-3 позитивна	3 (2.86%)	5 (4.76%)	5 (4.76%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (3.81%)

Статистически сигнификантна връзка беше отчетена между експресия на caspase-3 (на диагностична биопсия) и терапевтичен ефект след НАХТ отчетена според категория по Саталоф T $\chi^2 = 5.97$, Df=1, p=0. 0145.

Повече от **1/3 от пациентите** с пълен патологичен отговор след НАХТ са caspase-3 позитивни на диагностична биопсия, сравнено с едва 1/8 експресиращи caspase-3 от тези с непълен или липсващ терапевтичен отговор. (Таблица 19)

Таблица 19 Експресия на caspase-3 (на диагностична биопсия) асоциирана с терапевтичен ефект след НАХТ отчетена според класификация по Саталоф Т

Саталоф Т	А (пълнен отговор)	В, С, D (непълнен или липсващ отговор)
Caspase-3 негативна	11 (12.36%)	63 (70,79%)
Caspase-3 позитивна	7 (7.87%)	8 (8.99%)

Не беше открита статистически сигнификантна връзка между експресия на caspase-3 (на диагностична биопсия) и степен на диференциация.

$\chi^2 = 0.64$, Df=2, p=0.7251 (Таблица 20)

Таблица 20 Caspase-3 (на диагностична биопсия) и степен на диференциация

Грейд	G1	G2	G3
Caspase-3 негативна	2 (1.94%)	40 (38.83%)	44 (42.72%)
Caspase-3 позитивна	0 (0.00%)	7 (6.80%)	10 (9.71%)

Не беше открита статистически сигнификантна връзка между caspase-3 експресия (на диагностична биопсия) и урN статус $\chi^2 = 2.7$, Df=3, p=0.4401 (Таблица 21)

Таблица 21 Експресия на caspase-3 (на диагностична биопсия) и урN статус

урN	N0	N1	N2	N3
Caspase-3 негативен	24 (23.53%)	27 (26.47%)	22 (21.57%)	12 (11.76%)
Caspase-3 позитивен	8 (7.84%)	4 (3.92%)	4 (3.92%)	1 (0.98%)

Не беше отчетена статистически сигнификантна връзка между caspase-3 експресия (на диагностична биопсия) и терапевтичен отговор отчетен по Саталоф категория N $\chi^2 = 3.88$, Df=3, p=0.2746 (Таблица 22)

Таблица 22 Caspase-3 (на диагностична биопсия) и отчетен отговор по Саталоф категория N

Саталоф N	A	B	C	D
Caspase-3 негативна	6 (7.06%)	17 (20.00%)	25 (29.41%)	22 (25.88%)
Caspase-3 позитивна	2 (2.35%)	5 (5.88%)	7 (8.24%)	1 (1.18%)

Не беше отчетена статистически значима връзка между експресия на caspase-3 (на диагностична биопсия) и молекулярен (сурогатен) субтип на тумора $\chi^2 = 6.98$, Df=4, p=0.1372 (Таблица 23)

Таблица 23 Caspase-3 (на диагностична биопсия) и молекулярен (сурогатен) субтип на тумора

Молекулярен субтип	Луминален А	Луминален Б Ki-67 $\geq 14\%$	Луминален Б HER2 позитивен	HER2	TNT
Caspase-3 негативен	12 (12.37%)	40 (41.24%)	7 (7.22%)	14 (14.43%)	8 (8.25%)
Caspase-3 позитивен	3 (3.09%)	5 (5.15%)	0 (0.00%)	7 (7.22%)	1 (1.03%)

В проведеното от нас изследване макар и несигнификантно Caspase-3 и Ki-67 индекс отчетени на диагностична биопсия могат да бъдат свързани с основните прогностични фактори – степен на диференциация, T и N статус, докато описаните данни в литературата остават разнопосочни. Високите нива на caspase-3 са с тенденция към по-добър отговор към НАХТ, без да са отнесени към обща преживяемост. По този начин биха могли да допълнят предиктивната стойност на пролиферативният маркер Ki-67 при оценка на терапевтичен ефект и при определяне на последващо терапевтично поведение за пациенти недостигнали пълен патологичен отговор след НАХТ.

Тъй като не се отчете статистически значима зависимост между терапевтичен ефект от НАХТ и експресия на caspase-3 или пролиферативен индекс Ki-67 в контекста на различни молекулярни субтипове е трудно да се оцени терапевтичен отговор при луминален А, луминален Б и тройно негативен карцином единствено на база експресия на двата маркера (Ki-67 и/или активирана caspase-3). Това поставя под въпрос желанието в онкологичната

общност да бъде въведено самостоятелно Ki-67-базирано проследяване на терапевтичен ефект след НАХТ при напреднали хормон позитивни карциноми на гърда.

Резултатите от проведеното от нас изследване върху Ki-67 и caspase-3 освен всичко гореспоменато показват, че наличието на над 10% хетерогенни тумори (класифицирани съобразно компонентата с по-лоша клинична прогноза) в случайно избрана популация не води до сигнификантни отклонения във валидността на резултатите и изводите, представени от други проучвания. Това разбира се не изключва наличието на подобен процент неотчетен хетерогенитет в извадките описани в тези проучвания.

VII. Изводи

- Отчетена е честота на хетерогенни тумори сред случайна извадка от пациенти с диагностициран рак на гърда - 10.91%, при едва 2 % отчетен молекулярен хетерогенитет. До 90% от случаите са доказани на резектат. Няма доказана статистически значима връзка между броят на тъканните цилиндри и честотата на отчетеният хетерогенитет на ДИБ.
- Групата на хетерогенните тумори се характеризира със значително по-млада възраст, оформя тенденция към по-голям туморен обем, по-ниска степен на диференциация, по-висока честота на мултифокалност или мултицентричност, по-висока честота на първична резистентност и рецидив, както и честота на втори първичен тумор.
- След проведена неoadюватна химио или таргетна терапия в над 50% от изследваните пациенти се отчита промяна в сурогатния молекулярен субтип, а в близо 10% от случаите се установява наличие на втора туморна компонента, която е с различна молекулярна експресия, изискваща различен терапевтичен подход. Промените са по-често застъпени в хетерогенната популация в посока загуба на рецепторна експресия.
- Проблемни остават случаите с молекулярен хетерогенитет, при които луминален А тип карцином на гърда се комбинира с HER2 позитивен или тройнонегативен карцином, затруднявайки последваща таргетна терапия, с невъзможност за прогнозиране на терапевтичен ефект и дългосрочни ползи.
- След проведена неoadюватна химио или таргетна терапия, при пациентите с доказан интратуморен хетерогенитет се отчита по-висока честота на непълен или липсващ патологичен отговор, който впоследствие се свързва с прогресия на онкологичното заболяване, по-висока честота на рецидиви и метастазиране, но без скъсяване на общата преживяемост.

- Изследването на Caspase-3 и Ki-67 експресия в проведеното от нас проучване, подкрепя достъпните към момента данни в литературата за налична апоптозо- индуцирана пролиферация, застъпена в най-голяма степен в групата на хетерогенни тумори, оставаща предпоставка за по- затегнат ход на протичане и по-лоша прогноза.
- Високите нива на Caspase-3 при изходна биопсия са по-информативни от тези на Ki-67, предполагащи по- добър ефект от НАХТ, но като цяло по-лоша прогноза за пациентите. За разлика от Ki-67, Caspase-3 не показва статистически значима връзка с определени молекулярни подтипове, хистологичен грейд или Т категория след НАХТ.
- След проведена неoadюватна химио или таргетна терапия негативният нодален статус (ypN) и отговорът на основния тумор (ypT) са показатели демонстриращи, макар статистически незначима, тенденция към по-добра свободна от болест преживяемост и обща преживяемост в двете групи.
- При пациентите от групата с нехетерогенни тумори се отчете тенденция към по-добра свободна от прогресия преживяемост свързана с постигнатият пълен патологичен отговор, но не беше отчетена статистически значима разлика между групата на пациентите с хетерогенни тумори и пациентите с тумори без изявен хетерогенитет.
- Не се установява статистически значима разлика в общата преживяемост между групата на пациентите с хетерогенни тумори и пациентите с тумори без изявен хетерогенитет.

VIII. Приноси с научен и оригинален характер

- Проведеното изследване подобрява разбирането за интратуморен хетерогенитет при пациенти с Рак на млечната жлеза.
- Проведеното проучване е първото комплексно изследване на пациенти с проявен морфологичен и/или молекулярен хетерогенитет (на база рутинно използвани в практиката сурогатни маркери ER, PgR, HER2, Ki-67), базирано на стандартни изследвания при хоспитализирани пациенти в УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ Плевен
- Добавят се научни данни за честотата на морфологичен и/или молекулярен хетерогенитет и отражението му върху туморната еволюция при стандартен терапевтичен подход.
- Събрана е подробна информация и е отчетена значимостта на стандартните прогностични променливи включени в Nottingham prognostic index, в комбинация с морфологични и молекулярни характеристики в често проблематичната група от хетерогенни тумори.

- Изследвана е експресия на Caspase-3 като маркер с добавена информативна стойност към високовариабилният и несигурен прогностичен и оценъчен пролиферативен маркер - Ki-67.
- Направен е опит за комплексна оценка на сложното и мултифакторно влияние на морфологичен и/или молекулярен хетерогенитет и неговото отражение върху еволюция, прогноза и терапевтичен ефект при пациенти с рак на гърда.

IX. Приноси с приложен характер:

- Отчетена е конкретна честота на хетерогенни тумори при пациенти с рак на гърда, валидна за българска популация лекувана в УМБАЛ „Г. Странски“ Плевен.
- Отчетена е ниска честота в общата популация от хетерогенни тумори доказана на ДИБ в сравнение с тази отчетена на ексцизионна биопсия.
- Доказана е връзката на тумори с проявен морфологичен и/или молекулярен хетерогенитет и фактори с ниска прогностична стойност- голям туморен обем, ниска диференциация и позитивен нодален статус.
- Отчетени са конкретни маркери в лицето на Ki-67 в комбинация с Caspase-3 имащи отношение към проследяване на терапевтичен ефект и еволюция на тумора при рак на гърда.
- Според представените от нас данни необходимостта от преоценка на HER2 статус след НАХТ остава противоречива при HER2- позитивни пациенти, поради липса на компонента, която да налага друг терапевтичен подход в случаите без пълно повлияване. Не се отчитат дългосрочни ползи от промяна в терапевтичният режим на база така описаният тип и честота на HER2 конверсия при рецидив и метастази.
- Събрани са данни оправдаващи общо ретестване в динамика на основните морфологични характеристики и сурогатни молекулярни биомаркери, след проведена НАХТ при рак на гърда с наличен интратуморен хетерогенитет, с възможност за отчитане на пропуснатата индолентна или променена в хода на терапията компонента от изходна биопсия предполагаща по-различна прогностична оценка, терапия и проследяване.
- Получените резултати позволяват изграждане на диагностичен и терапевтичен алгоритъм при пациенти с хетерогенен рак на млечната жлеза, който може да се използва като елемент/основа за комплексен подход с цел прецизиране и индивидуализиране на терапията при пациенти с доказан морфологичен и/или молекулярен хетерогенитет.

Публикации и участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд:

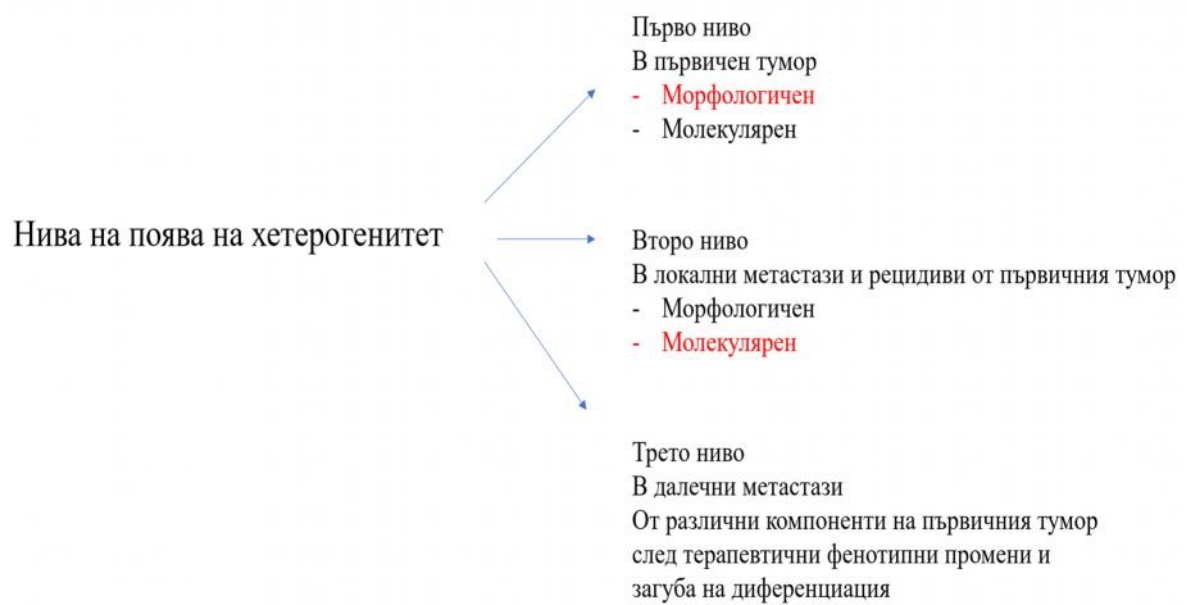
Nanev V, Milev H, Dimitrova D, Naneva S, Strashilov S, Yordanov A, Mihailova M, Ivanova S, Karcheva M, Ivanov I. Evaluation of cleaved caspase-3 and Ki-67 index on diagnostic biopsy in response to neoadjuvant chemotherapy in the context of post-treatment tumour ypT stage, ypN stage, grade, and molecular subtype. *Prz Menopauzalny*. 2024 Mar;23(1):31-40. doi: 10.5114/pm.2024.136962. Epub 2024 Mar 28. PMID: 38690065; PMCID: PMC11056723. Scopus Q2, SJR 2023 0.628; Web of Science Q2, IF 2023 2,5

Nanev V, Naneva S, Yordanov A, Strashilov S, Ivanov I. (2022). Resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer with proven intratumoral heterogeneity: a clinical case. *Oncology in Clinical Practice*. 18. 134-138. 10.5603/OCP.2022.0015. Scopus Q4, SJR 2022 0.167; Web of Science Q4, IF 2022 0,5

Nanev V, Toneva L, Yordanov A, Strashilov S, Ivanov I. A case of non-palpable, multifocal, heterogeneous left breast carcinoma with mammographic presentation of clustered multiple microcalcifications. *Arch Balk Med Union*. 2020;55(3):489-494. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2020.55.3.15> Scopus Q4, SJR 2020 0.145



Приложение № 2



Приложение № 3 Решение на комисията по етика на научно- изследователската дейност при медицински университет- Плевен

		МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ гр. ПЛЕВЕН
Комисия по етика на научно-изследователската дейност КЕНИД Медицински университет - Плевен Ул. "Климент Охридски" № 1 Телефон: 064 884 197		Изм. <u>207-хемия/03.06.2022</u>
РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА ПО ЕТИКА НА НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА ДЕЙНОСТ ПРИ МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН		
Главен изследовател	доц. д-р Милена Карчева, дм	
Изследователски център(ове)	➤ Катедра „Патологоанатомия“, Факултет Медицина, МУ-Плевен; ➤ Клиника по Онкологична Хирургия, УМБАЛ“Д-р Георги Странски“-Плевен	
Заглавие на проекта	<i>„Оценка на експресията на апоптолитичния фактор Caspase 3 и пролиферативен индекс оценен чрез Ki 67 преди и след неоадювантна химиотерапия при отделни молекулярни субтипове карцином на гърда в контекста на туморен хетерогенитет и анализ на тяхното клинично значение“</i>	
Протокол № 67		
Получени, разгледани и одобрени от КЕНИД документи	✓ Форма-заявление за разглеждане и даване на решение за извършване на научни изследвания върху човешки същества; ✓ План-проект на научното изследване; ✓ Изследователски фиш на пациента ✓ Декларация за информирано съгласие на пациенте; ✓ Автобиографии на изследователския екип; ✓ Разрешения от ръководителите на изследователските центрове	
Комисията по етика на научно-изследователската дейност при Медицински Университет - Плевен реши да разреши провеждането на научно изследване на тема: <i>„Оценка на експресията на апоптолитичния фактор Caspase 3 и пролиферативен индекс оценен чрез Ki 67 преди и след неоадювантна химиотерапия при отделни молекулярни субтипове карцином на гърда в контекста на туморен хетерогенитет и анализ на тяхното клинично значение“</i> с главен изследовател доц. д-р Милена Карчева, дм, без периодичен надзор.		
юни 2022 г. гр. Плевен	Председател на КЕНИД: (проф. д-р С. Александър Янковски, д.м.н.) Секретар на КЕНИД: (доц. Макрета Драганова) 	

Приложение 4

Клиничен случай	Фокалност	Едно/ двустранна	Синхронна/ метахронна	Хистологични варианти	Терапевтичен подход	Прежи ваемост
Случай 1	мултифокален	едностранна	синхронна	NST G2 DCIS G2 LCIS	Оперативен Лъчелечение Хормонолечение	> 5 г.
Случай 2	мултифокален	едностранна	синхронна	LELC G3 NST G3 DCIS G2	Оперативен Лъчелечение Хормонолечение	> 5 г.

Лимфоепитилиома лайк – NST (дуктален) G3 с изразена стромна реакция (съгласно действащата СЗО класификация)