

РЕЦЕНЗИЯ

От Проф. д-р Веселина Методиева Първанова, д м

Относно: Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен **“ДОКТОР”**, в област на висшето образование: “Здравеопазване и спорт” Професионално направление: „Медицина” (шифър 7.1) Научна специалност: „Онкология” (шифър 03.01.46) на

д-р Д-р Маргарита Стоянова Таушанова

Със заповед № 1351/02.08.2013 г. на изп. директор на СБАЛО-ЕАД като рецензент на дисертационния труд на тема **„Тройно негативен карцином на млечната жлеза - молекулярно-генетична характеристика, диагностика и възможности за лечение”**, Ви представям:

1. **Оценка на актуалността на темата:**

Незадоволителните знания и резултати при лечение на тройно-негативните карциноми на млечната жлеза (ТНКМЖ), тяхната медицинска и социална значимост, поставят изследователя в позиция на изключително трудни решения, които са извън рутината на ежедневието.

Тройно-негативният карцином на млечната жлеза (ТНКМЖ) се характеризира с липса на естрогенен и прогестеронов рецептор, както и на рецептор 2 на епидермалния растежен фактор - HER2. Съставлява 15%-20% от новодиагностицираните случаи при КМЖ, на възраст <40 г., в по-напреднал стадий, често с фамилна анамнеза за рак на гърдата и мутация на BRCA1. За него е типична ранната изява на рецидиви между първата и третата година след диагностицирането, за разлика от другите подтипове, изходът от ТНКМЖ е по-неясно свързан със стадия на болестта. Метастазите са по-агресивни от другите подтипове КМЖ и се появяват често

във вътрешните органи, конкретно в белите дробове и мозъка и по-рядко в костите. Анализът на 21 генни копия на КМЖ определят 6 различни подтипа с различен генетичен подпис, който детерминира клетъчните подтипове на този вид тумор: **два базално-клетъчни (BL1 и BL2), имуномодулиран (IM), мезенхимален (M), мезенхимално-стволов (MSL), луминален-андроген рецепторен (LAR).**

Задълбоченото изясняване на биологията на ТНКМЖ може да разграничи близо 60% от пациентите с негативни лимфни възли, които са подходящи за локо-регионална терапия, от останалите 40%, които се нуждаят от комплексно лечение. Това прави темата на дисертанта актуална и с изключителен принос в онкологичната практика.

Дисертационният труд съдържа 78 стандартни страници (без книгописа), 27 фигури, 22 таблици и 183 литературни източника, повечето от последните 5 години. Представен е в 8 глави с уводна част, която определя значимостта на проблема и следва богат литературен обзор в 26 стр. с подзаглавия в следната хронология: *Обща характеристика на карцинома на млечната жлеза; Тройно-негативен карцином на млечната жлеза (ТНКМЖ); Епидемиология и Етиология.*

Биологична характеристика - задълбоченото изясняване на биологията на ТНКМЖ е съществена поради значително припокриване между ТНКМЖ и базалноклетъчния РМЖ, които не са идентични. Всеки от 6-те подтипа се характеризира с определени биомаркери, активиране на различни сигнални пътища, което е в основата на специфични прицелни терапии. Идентифицирането на клетъчни линии, съответстващи на тройно-негативните подтипове тумори, предоставя ключови модели за предклинични проучвания с нови лекарствени средства. Двата базално-клетъчни подтипа (BL1 и BL2) са с най-висока честота сред ТНКМЖ - 75% и небазално-клетъчните са при 25% от болните. Те имат експресия на гени, които имат отношение към специфични промени в клетъчния цикъл и загуба на контрол върху пролиферативните процеси, т. е. повечето клетките са в клетъчен цикъл, ДНК-репликация, G2, G1, S-фаза. Това се подкрепя и от високата експресия на Ki67. С оглед на изразените пролиферативни процеси, при тях се реализира добър отговор на лечението с антимиотични агенти и таксани. BRCA1 /2 гените играят важна роля в ДНК

репликацията с налична мутация при ТНКМЖ. LAR се отличава твърде много от останалите подтипове, свързани с постменопаузален статус и прилагане на хормонозаместваща терапия.

Генна експресия – се използва за определяне на предиктивни и прогностични маркери, които се опитват да разграничат пациенти с ER-негативен рак, които имат добра прогноза, както и да определят ефекта на антрациклин-базираната химиотерапия при ТНКМЖ.

Молекулярните маркери предоставят информация за риска от рецидиви, като 90% от BRCA1 мутиралите тумори са тройно негативни или имат базално-епителен фенотип с дисфункцията на ДНК-репарацията, могат да се използват за определяне на ползата от ДНК-таргетна терапия, като например антрациклини, платина и производните, и полимеразни инхибитори.

Имунофенотипизирана класификация на ТНКМЖ на база експресия на цитокератини, като при разлика в експресията на CK5/14, тройно-негативният карцином може да се раздели на 2 групи позитивен и частично позитивен за CK5/14; Ниските стойности на *CAVEOLIN (CAV1)* се свързват с по-голям размер на тумора и негативен естроген-рецепторен статус, т. е с лош отговор на лечение с Тамоксифен. Като стромален маркер той има отношение към прогнозата за възникване на ранни рецидиви и метастази в лимфните възли. Изследвания установяват, че тройно негативните карциноми с повишени нива на CAV1 са с по-висока средна обща преживяемост.

Андрогенни рецептори - за разлика от другите подтипове, при тройно негативния рак те се изявяват в 25%-45%. Счита се, че повишението на AR е свързано с добра прогноза при ER-негативни тумор, както и при ТНКМЖ. Известно е, че ER експресия води до прогресия на рака на гърдата, но туморите са с по-ниска злокачественост и по-добра прогноза, което се отнася и за AR.

Хистологична характеристика на ТНКМЖ, който основно произхожда от базалния слой на млечните канали (миелоепителните клетки), най-често срещани са инвазивните дуктални КМЖ, като 40-100% от другите по-редки хистологични типове

(медуларен, анапластичен, аденоидно-кистичен, апокринен) също показват негативна експресия на ER, PR, HER2, макар и с различна прогнозата при всеки един, независимо от тройно негативния феномен. ТНКМЖ е предимно слабо диференциран, има висок пролиферативен индекс, централни некрози, лимфоцитна пролиферация, като BRCA1 мутацията е по-честа при медуларния и метапластичния карцином.

Патологична и молекулярна диагностика - поради невъзможното рутинно прилагане на генетични тестове, имунохистохимичният анализ (ИХН) остава метод на избор в диагностичния процес. Въпреки големите възможности на ехографските и мамографските техники, те не могат да разкрият някои детайли на интратуморните характеристики, като некроза и фиброза, които са типични за този вид тумор. Потвърждаващите биопсии на метастатичните лезии може да променят схемите на лечение до 20% при случаи на рак на млечната жлеза. Ретроспективните прегледи установяват, че честотата на съвпадение е около 15-40% за ER и PR статуса и 7%-26% за HER2- статуса.

Стадиране - чрез ИХХ с моноклонални антитела могат да бъдат доказани метастази в лимфните възли при 10% до 20% от случаите, които са определени като негативни според стандартното изследване.

Клинично протичане при ТНКМЖ е характерно с ранни локални рецидиви, органни метастази, предимно в белия дроб и мозъка, по-рядко в костите, в сравнение с другите подтипове карцином на млечната жлеза.

Диагностиката - въпреки неговия голям размер при диагностициране, ТНКМЖ остава неразпознат до 18% при първоначалната мамография, като ултразвукът показва по-висока чувствителност (92-100%). МРТ остава най-високо сензитивен образен метод за откриване на този вид тумор. Дава информация както за размера, наличието на мултифокалност, инфилтрация на кожата и дермална лимфна инвазия, изразена васкуларна характеристика, както и отчитане на ранния отговор от проведената неoadювантна химиотерапия и pCR при ТНКМЖ.

Лечение – при локалните методи - хирургично и лъчелечение (ЛЛ) не се налага друго извън приетия стандарт. Изследователи предполагат относителна лъчева

резистентност на ТНКМЖ като следствие от ER - негативен статус. Предполага се, че ER - негативни клетки при ТНКМЖ и базално клетъчния рак проявяват резистентност към ЛЛ поради удължен клетъчен цикъл и са възможни повече възстановявания на сублетални ДНК-увреждания, което доведе до проучвания в посока на едновременно ЛЛ с Цисплатин или в неоадювантен аспект моно ХТ.

Лекарствено лечение - ТНКМЖ не подлежи на лечение с хормонотерапия и с анти-HER2 агенти. Именно за това стандартната ХТ лежи в основата на системното лечение. Крайната прогноза за болните с ТНКМЖ е по-лоша, отколкото с не тройно негативен карцином, свързано с частичния отговор по отношение на тумора и лимфните възли след проведената терапия, както и с липсата на високоефективни таргетни лечения. Оттук рискът от рецидиви е по-висок, общата преживяемост (ОП) е по-кратка в сравнение с другите подтипове РМЖ.

Следва подробно разглеждане на **неоадювантна и адювантна химиотерапия с приложение на Антрациклини** при ТНКМЖ. Приложението на **Таксани** е с по-висока ефективност, като за **Капецитабин** са необходими допълнителни резултати от клинични изпитвания при адювантното лечение на РМЖ. Приложение на **Платина** - голям е интересът към приложението на платина в неоадювантната терапия на ТНКМЖ. Използвана е както самостоятелно, така и в комбинация с други агенти. Употребата на цисплатина в адювантното лечение все още се проучва и на този етап не се препоръчва. **Ангиогенни агенти** - ефективността на моноклоналното антитяло бевацизумаб е доказана в големи клинични изпитвания във фаза III в комбинация с паклитаксел, доцетаксел или капецитабин като първа и втора линия за лечение на метастазирало заболяване. **Високодозна химиотерапия** намира място само в клинични проучвания за РМЖ.

Лечение при метастазирания ТНКМЖ е изключително трудно поради това, че стандартните химиотерапевтични режими, съдържащи антрациклини и таксани вече са били приложени като адювантна или неоадювантна терапия. Неуспехът се свързва с **множествената лекарствена резистентност** към стандартните терапии. Пациенти с прогресия или резистентност могат да бъдат лекувани с лекарствени продукти като капецитабин, гемцитабин, винорелбин или албумин-свързан паклитаксел, както и

техни комбинирани режими. ***Незадоволителният ефект от прилаганите терапевтични методи на ТНКМЖ в сравнение с останалите карциноми на гърдата, особено в напреднал стадий, го превръща в предизвикателство за медицинските онколози.***

Целта на проучването ***„Прецизиране на диагностиката на тройно негативния карцином на млечната жлеза чрез изследване на панел от молекулярни маркери, както и генни мутации, характеризиращи биологията на този изключително агресивен злокачествен тумор, с оглед оптимизиране на лечебната тактика”*** е формулирана добре, като може да се ограничи в областта на лекарственото лечение, но това пък би ограничило интереса на другите специалисти в областта на онкологията към дисертационния труд.

За постигане на тази цел са поставени правилно следните задачи:

1. Определяне на основни характеристики на група болни с ТНКМЖ с оглед прецизиране на диагностиката и терапевтичния подход;
2. Оценка на връзката между някои прогностични белези и появата на метастази с цел подобряване на лечебното поведение при този вид тумор на млечната жлеза;
3. Определяне на СЗП при болни с ТНКМЖ, на които е приложено адювантно лечение с антрациклин-таксан съдържаща химиотерапия, в сравнение с получили само антрациклини или с група болни без адювантна терапия;
4. Определяне на средната преживяемост без прогресия при добавяне на Vevacizumab към таксан-съдържаща химиотерапия при метастазирало заболяване като първа линия лечение;
5. Имунохистохимични характеристики на ТНКМЖ при болни с доказана BRCA1-мутация и връзката им с молекулярните маркери, с оглед косвена оценка на вида на тумора при невъзможност за провеждане на генетичен тест;
6. Създаване на диагностичен алгоритъм за изследване на молекулярни маркери при ТНКМЖ с оглед определяне на прогнозата при болни с това заболяване;
7. Приложение на посочените диагностични методи за оценка на прогнозата при болни с ТНКМЖ;
8. Оптимизиране на терапевтичния подход при болни с малък размер на тумора или с негативни лимфни възли, въз основа на получените резултати от изследваните молекулярни маркери.

Клиничен материал и методи

Клиничното проучване е при 130 жени с хистологично и имунохистохимично доказан карцином на млечната жлеза, ER, PR, HER2 негативен, наблюдавани за периода 2005 г. до март 2013 г. При болните е извършено оперативно, лъчелечение, проведена е адювантна химиотерапия. Основната група е представена от 80 болни с ТНКМЖ, разпределени по 20 болни в три групи с ХТ и в една от 20 болни без ХТ. Всички болни са метастазирали, доказано с рутинните методи за диагностика. Следва разделянето им в групи и проведена химиотерапия от първа линия по три схеми, съобразно 2 схеми адювантната ХТ и без ХТ. Използвана е контролна група от 30 болни с гранично ТНКМЖ (T1-2N0M0) след адювантна ХТ 3-4 цикъла FEC и 3-4 цикъла с таксан (Paclitaxel/Docetaxel), при които не е установено метастазиране до м. март 2013 г. и друга контролна група от 20 болни след адювантна ХТ, изследвани за BRCA 1 мутация.

Използвани са стандартни образни и лабораторни диагностични методи, като патоморфологичната хистологична верификация и имунохистохимично изследване на рецепторен статус, CISH за изследване на HER2 при необходимост от уточняване на HER2/++/. С цел определяне честотата на молекулярните маркери при болните с ТНКМЖ е проведено ИХХ при 64 пациентки с панел от 7 молекулярни маркера изследвани имунохистохимично с диагностична и прогностична стойност като CK5/6, CK14, VEGF, EGFR, Ki67, CAV1 и AR и представени литературни данни за честотата им главно при базален тип на ТНКМЖ. С оглед търсене на корелация между молекулярните маркери при ТНКМЖ и доказана мутация в BRCA1 при 10 жени за посочените маркери, доказана с генетични тестове.

Лечебни методи включват прилагане на различни химиотерапевтични схеми на лечение с точно определени дози и честоти за адювантна и първа линия ХТ при метастазирало заболяване в 4 групи.

Групи	1-група	2-група	3-група	4-група
Адювантна ХТ	FEC	FEC	FEC+Таксан	Без ХТ
Първа линия ХТ	Таксол+Bevasizumab	Xeloda/Navelbin	Xeloda/Navelbin	Антрациклин+/Таксан

Използвани са най-съвременни статистически методи, като резултатите от проучването са обработени с помощта на софтуерен продукт SPSS v13 for Windows.

Оценка на резултата

При 130 болни с метастазирал и неметастазирал ТНКМЖ е представена честотата на изследваните характеристиките на болните както следва: разпределение по Възраст, разделени в три групи < 40, 41-65 и > 65 г.; Стадий на заболяването – I; IIa-b; IIIa-b, Големина на първичния тумор ≤ 2 см или > 2 см, Степен на малигненост в три групи, както следва - G1; втора – G 2-3, и трета група не може да се определи; Лимфни възли на база общ брой изследвани лимфни възли и засегнатите от тях с метастази, както и на броя болни с повече от 1 метастатичен лимфен възел; Хистологичен вид: инвазивен дуктален, инвазивен лобуларен, дукто-лобуларен и други хистологични видове; Разпределение на болните според вида проведена адювантна и първа линия химиотерапия за метастазирало заболяване в 4 групи.

Следват добре формулирани Обобщения на резултатите в проучването със статистическа значимост: 1. Метастазираният ТНКМЖ възниква най-често в пре- и постменопаузалната възраст с размер на тумора $<$ или $=$ на 2 см, което определя по-нисък риск от метастазирание, докато при увеличаване на размера на тумора се повишава значително честотата на метастазирание, като преобладава нискодиференцираният инвазивен дуктален карцином. 2. Наличието дори и на един метастазирал лимфен възел при диагностиката на ТНКМЖ повишава риска от метастазирание на заболяването. При позитивен лимфен възел се повишава и честотата на органното метастазирание, което е свързано с по-лоша прогноза. Само органно метастазирание няма отношение към размера на тумора, но има връзка с метастазирането въобще, независимо от предилекционния орган. 3. СЗП се увеличава при болните, провеждали адювантна химиотерапия. Наблюдава се тенденция за нарастването и при болни, провеждали комбинация на антрациклин и таксан в сравнение само с антрациклин-съдържаща химиотерапия. 4. Болните, провеждали лечение за метастазирал ТНКМЖ като първа линия с комбинацията таксан + бевацизумаб имат задоволителна СЗП, съответстваща на резултатите от проведените до момента клинични изпитвания. Най-нисък е този интервал при непровеждали адювантна химиотерапия болни, т. е тези, които би трябвало да са с по-малко рискови

фактори. 5. От изследването на панел от 7 молекулярни маркери честотата им не се отличава значително от общо констатираната за ТНКМЖ. Не може да се обясни причината за много ниските нива на Ki67 в изследваната група болни. Наличната експресия на Caveolin 1 в значителен процент от болните би могла да бъде добър прогностичен показател. Изследването на AR може да се използва както за маркер за прогноза, така и за чувствителност към лечение. Значителната експресия на базалните цитокератини показва, че преобладава базалният тип ТНКМЖ, но е налице и подчертана хетерогенност при този тумор, т. е. наличие на базални и небазални типове. Набелязаната висока честота на базалните маркери при болните с доказана BRCA1 мутация, независимо от малкия им брой сочи, че при болните с лоша прогноза, базалният фенотип е водещ. Биха могли да се направят косвени изводи при липса на възможност за генетично изследване, за предполагаема мутация при млади жени, наследствено обременени и с имунохистохимичен облик на базален тип тройно негативен карцином.

Както в големите европейски проучвания, така и тук, не може категорично да се посочат най-прецизните биомаркери за прогноза и насока за лечение. Тези маркери идват в съображение при колебание в диагностичния подход и избора на терапевтичното поведение. Те могат да помогнат и тогава, когато алтернативите за лечение при болни с ТНКМЖ са изчерпани. С оглед посочените особености на ТНКМЖ и с цел оптимизиране на неговата диагностика и лечение, авторката предлага ***„Примерен диагностичен и терапевтичен алгоритъм при ТНКМЖ”***.

Следват 10 извода, от които 2. и 3. не различават ТНКМЖ от общите за КМЖ, докато останалите са свързват със спецификата на диагностиката, лечението, прогнозата и проследяване при ТНКМЖ. Всички изводи определят приносите на дисертационния труд.

3. Оценка на приносите

Представени са 5 приноса, които ясно дефинират необходимостта от проведеното проучване, като първо подробно научно обобщение на проблема у нас с

оценка на ефекта при прецизиране на диагностиката, лечението и проследяване на болните с ТНKMЖ.

Темата на дисертационният труд се дискутира в 4 публикации у нас и 1 в чужбина за периода 2007-2013, в които дисертантът е първи автор. Не са посочени цитирания.

4. Критични бележки и препоръки към дисертационния труд.

Дисертантът е коригирал направените забележки и спазил препоръки по отношение ясно дефиниране и описание на използваните и сравнявани групи болни в Клиничния материал. Въведена е еднаквост на използваната терминология и съкращения.

Би било предимство за читателя ако литературните източници бяха цитирани не по реда на използване, а по азбучен ред. На места остават некоригирани части в библиографията на литературните източници, както и на публикациите на дисертанта, съобразно БДС.

5. Заключение.

Дисертационният труд е първото в страната клинично проучване по трудния диагностичен и лечебен онкологичен проблем – лекарственото лечение на ТНKMЖ в адювантен аспект и при метастазирало заболяване. Авторът прави обстоен обзор на проблема, на биологичните характеристики на тумора, на най-съвременните диагностични методи на ТНKMЖ при реални възможности за провеждане у нас, както и задълбочен анализ на имунохистохимично изследване на рецепторен статус, за изследване на HER2 и при необходимост от уточняване на HER2 /+ +/. За оптимизиране на лечението на това заболяване са необходими много допълнителни изследвания на СК14, Caveolin-1, Ki-67 и AR. Все още е невъзможно рутинно прилагане на генетични тестове, затова имунохистохимичният анализ е метод на избор в диагностичния процес. Въпреки големите възможности на ехографските и мамографските техники, те не могат да разкрият детайли на интратуморните характеристики, като некроза и фиброза, които са типични за този вид тумори и се налага допълване на образната диагностика с МРТ.

Клиничното проучване е в посока усъвършенстване алгоритъма при диагностика и лечение на рядко срещания ТНКМЖ, характерен за болни в пре- и менопаузална възраст с незадоволителни лечебни резултати, особено при метастазирало заболяване. Оптимизират се последователните стъпки при диагнозата, лечението и проследяването на този коварно протичащ КМЖ. Докладването на резултатите в международен план ще натрупа данни от опита на много изследователи в обединените им усилия за изясняване на подходите и детайлите при лечението на ТНКМЖ.

Представеният дисертационен труд е съвременен, резултат от личната дейност на авторката, новаторски и притежава всички качества, които отговарят на изискванията и критериите за присъждане от Научното жури на научната и образователна степен „доктор” в областта на научната специалност „Онкология” на д-р Маргарита Стоянова Таушанова.

6 ноември 2013 г.

Рецензент:

Проф. д-р Веселина Първанова