



Új törekvések az emlőrák neoadjuváns szisztémás kezelésében

Doktori Tézisek

Dr. Rusz Orsolya

Témavezető:

Prof. Dr. Kahán Zsuzsanna, D.Sc.

Onkoterápiás Klinika
Szegedi Tudományegyetem

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged

2018



Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. **Rusz O**, Vörös A, Varga Z, Kelemen G, Uhercsák G, Nikolényi A, Ormándi K, Simonka Z, Kahán Z
One-year neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer
Pathology & Oncology Research 21:977-84 (2015)
IF: 1.940

- II. **Rusz O+**, Papp O+, Vízkeleti L, Molnár BÁ, Lotz G, Szundi Cs, Ács B, Bende KCS, Kahán Z, Székely T, Báthori Á, Kulka J, Szállási Z, Tőkés AM
LAPTM4B gene copy number gain is associated with inferior response to anthracycline-based chemotherapy in hormone receptor negative breast carcinomas
Cancer Chemotherapy and Pharmacology (2018 May)
IF: 2.808

- III. Tőkés AM+, **Rusz O+**, Cserni G, Tóth E, Tőkés T, Vízkeleti L, Kószó R, Kahán Z, Kulka J, Szállási Z
Influence of mutagenic versus non-mutagenic pre-operative chemotherapy on the immune infiltration of breast cancer
A publikáció közlés alatt

+egyenlő közreműködés

Bevezetés

A neoadjuváns szisztémás terápia (NST) alkalmazásával a műtét és a sugárkezelés radikalitása mérsékelhető, továbbá a kezelésre kialakult terápiais válaszból, következtetni lehet a betegség prognózisára is. A direkt klinikai hasznon túl, a NST lehetőséget nyújt a tumor jellemzőinek, a kezelés hatására bekövetkező változásainak tanulmányozására is, amely hozzájárulhat a terápiais választ és a túlélést befolyásoló tényezők részletesebb megértéséhez, a beteg számára plusz megterhelő beavatkozás nélkül.

A hormon receptor (HR) pozitív emlőtumорок kezelésében az endokrin terápia alkalmazása javasolt, függetlenül a terápia céljától (adjuváns, neoadjuváns, palliatív), akár monoterápiaként, akár kemoterápiát követően. Kuratív célból tamoxifen vagy aromatáz gátló (letrozole, anastrozole, exemestane) kezelés adható, a női nemi hormonszinttől függően, kiegészítve gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonistával (goserelin, leuprorelin). Az endokrin terápiákkal történő első klinikai kezelésektől, nagyjából 10 év telt el a neoadjuváns alkalmazásukig. Kezdetben csak idős betegek esetében alkalmazták, akiknél a kemoterápia és annak mellékhatásainak elkerülése volt a cél, amelyek kifejezetten nehezen toleráltak ebben a populációban. Manapság a neoadjuváns endokrin terápia lehetősége, minden olyan betegnél felmerül, akiknél a legjobb terápiais válasz várható, ez leginkább a Luminal A-szerű tumorokra igaz, melyeket tipikusan alacsony grádus, erős ER/PgR pozitivitás, HER2 negativitás és alacsony osztódási ráta jellemez.

A kemoterápiával ellentétben, az endokrin terápia nem fokozza a daganatos sejtek apoptózist, helyette inkább lassítja, feltartóztatja az osztódást. Következésképpen, a maximális terápiais hatás eléréséhez, hosszabb alkalmazás szükséges, adjuváns kezelésben ez 5-10 évet jelent. A klinikai eredmények alapján, a patológiai teljes válasz (pCR) aránya, ami 0-17.5% közötti, összefüggésben áll a neoadjuváns endokrin terápia hosszával. A pCR arány ennek ellenére meglepően alacsony, a neoadjuváns kemoterápiánál tapasztaltakhoz képest, ahol a HR negatív esetekben az arány 40% körüli. Azonban a neoadjuváns endokrin terápia esetében akkor is nagyon jó túlélés várható, ha a kezelést követően marad reziduális tumor. Ez arra enged következtetni, hogy a pCR nem a legmegbízhatóbb módja a terápiais válasz felmérésére, ennél a terápiais megközelítésnél.

A HR negatív tumorok esetében, az egyetlen szisztémás kezelési lehetőség, a kemoterápia (önmagában vagy kiegészítve HER2-gátló kezeléssel, a HER2 státusztól függően). Jelenleg számos, főként kombinált kemoterápiás protokoll áll rendelkezésre, azonban nincs olyan biomarker, amely segítene dönteni a megfelelő terápia vagy

terápiakombináció kiválasztásában. Az egyik leggyakrabban alkalmazott hatóanyagok az emlőrák kezelésében, az antraciklinek (epirubicin, doxorubicin). Számos tanulmány számolt be már arról, hogy bizonyos terápiaerezisztens tumorok, képesek a citoplazmatikus organellumaikban felhalmozni az antraciklineket, ezzel megakadályozva a sejtmagba történő eljutást és csökkentve a citotoxikus hatást. Azonban ennek a folyamatnak a pontos szabályozása hosszú ideig tisztázatlan maradt. Egy nem rég megjelent tanulmányban, a 8q22 kromoszóma amplifikációját és hozzá kapcsolódó lysosomal-associated transmembrane protein 4b (LAPTM4B) fokozott kifejeződését írták le, amely összefüggést mutatott a rossz prognózissal és a rossz terápias válasszal ösztrogén receptor (ER) negatív, antraciklin kezelést kapott betegeknél. A LAPTM4B lizoszómális protein, amely képes a lizoszóma membránját stabilizálni, így az antraciklint a lizozómában visszatartani és csökkenteni a sejtmagba történő eljutást. A *LAPTM4B* kiütése, nem teljesen, de jelentősen csökkentette a lizozómák doxorubicin visszatartását. Ezen eredmények alapján, úgy tűnik, a LAPTM4B egy potenciális biomarkere lehet az antraciklin érzékenységnek.

A HR negatív esetekben, az invazív tumor teljes eltűnése a neoadjuváns kemoterápiát követően fontos cél a kedvező prognózis eléréséhez. Néhány esetben azonban, a reziduális tumor ellenére, hosszú túlélés figyelhető meg. A preklinikai vizsgálatok alapján, ennek háttérében az állhat, hogy a kemoterápiáknak tumorellenes immunstimuláló hatásuk is van, amely hozzáadódik a terápias hasznukhoz. Minden egyes kemoterápiás szer esetében, több komplex immunmoduláló hatást is azonosítottak már. E direkt immunmoduláló hatásokon túl, feltételezhető, hogy a kemoterápiák mutagén hatása is közrejátszhat a tumorellenes immunválasz indukálásában, hiszen a kezelés hatására kialakult, szerzett mutációk, gyakran megváltozott fehérjeszerkezetet és megváltozott peptid szekvenciát eredményeznek, amely új epitópokká válhatnak. Ezek az új epitópok részben immunogénnek tekinthetőek, mert a beteg normál genomjában nincsenek kódolva, így a reaktív T-sejtek nem tolerálják. Az új epitópok felismerése a citotoxikus T-sejtek által, immunrendszer közvetítette tumor regressziót eredményezhet.

Egy korábbi tanulmány, a jelenlegi kemoterápiás hatóanyagokat nagyon mutagén (ciszplatin), kevésbé mutagén (ciklofoszfamid) és marginálisan/nem mutagén (paclitaxel, doxorubicin és gemcitabin) csoportokba kategorizálta. Feltételezhető, hogy ez az eltérő mutagén hatás, közrejátszhat a kemoterápiák különböző immunmodulátor hatásaiban is.

Célkitűzések

- I. Egyéves neoadjuváns endokrin terápia hatásának retrospektív elemzése, HR pozitív és HER2 negatív emlőrákos betegeknél.
A reziduális tumor jellemzői és a betegség kimenetele közötti összefüggés vizsgálata.

- II. Fluoreszcens in situ hibridizációs próbával a *LAPTM4B* kópiaszámának meghatározása ER negatív emlőtumoros betegek, kezelés előtti szövettani mintáin; a kópiaszám és a tumor antraciklin-alapú *versus* nem-antraciklin-alapú terápiára kialakult terápias válaszának összevetése.

- III. Pre-operatív taxán-antraciklin kombinált kezelés (mint nem mutagén protokoll) *versus* ciklofoszfamid-alapú kezelés (mint kevésbé mutagén protokoll) *versus* taxán-platina kezelés (mint nagyon mutagén protokoll) hatásának tanulmányozása a tumor strómát infiltráló limfocita arányra.

Betegek és módszerek

1.1 Vizsgált populáció

Egyéves neoadjuváns endokrin terápia emlőrákban

A vizsgálatba 42 neoadjuváns endokrin terápiával kezelt beteget vontunk be, akik a kezelést 2005 áprilisa és 2014 januárja között kapták. A beteg alkalmas volt neoadjuváns endokrin terápiára, amennyiben szövettanilag igazolt ER és PgR pozitív, stádium II vagy III invazív emlőtumora volt és a képalkotó vizsgálatok kizárták a távoli áttét lehetőségét. A betegeknél egyéves letrozole (n=33 menopauza csoportban) vagy goserelin plusz letrozole (n=7) vagy goserelin plusz tamoxifen (n=2) (premenopauza csoportban) kezelés volt tervezve. A terápiás választ háromhavonta fizikális vizsgálattal vagy szükség esetén képalkotó vizsgálattal követték. Progresszió esetén, a kezelés neoadjuváns endokrin terápia helyett, neoadjuváns kemoterápiával folytatódott. Egy év hormonterápia után, a kezelést követő képalkotó eredményeket és a kezdeti tumor stádiumát is figyelembe véve, a műtétet minden esetben személyre szabottan tervezték meg.

A műtétilag eltávolított reziduális tumor mérete alapján, az alábbi rizikócsoportokat különböztettük meg:

Rizikócsoport 1: nincs invazív tumor (stádium 0)

Rizikócsoport 2: kis volumenű reziduális tumor (stádium IA-IIA)

Rizikócsoport 3: nagy volumenű reziduális tumor (stádium IIB \leq) + klinikai progressziót mutató esetek

LAPTM4B génekópiaszám és a terápiás válasz alakulása antraciklin-alapú kezelésre HR negatív emlőtumorban

Összesen 143 HR negatív emlőtumoros esetet válogattunk be retrospektíven, és analizáltunk két különböző kohorszban.

Az első kohorszban 69 HR negatív beteg (64 tripla negatív és 5 HER2 negatív) core biopszia mintáját gyűjtöttük össze, akiknél az emlőrákos megbetegedést 2004 és 2016 között diagnosztizálták. A betegbeválasztás további szempontja volt még, hogy legalább 2 ciklus kemoterápiában részesültek, amelyet műtét követett. A neoadjuváns kezelést megelőzően minden esetben szövettanilag igazolt volt az alapbetegség, valamint a távoli áttét lehetőségét képalkotó vizsgálattal kizárták. 50 beteg a 69 esetből (72.5%), antraciklin-alapú neoadjuváns kezelést kapott, míg 19 beteg (27.5%) a kontroll csoportban, nem antraciklin-alapú kezelésben részesült.

A második kohorszban, 74 HR negatív (39 tripla negatív, 27 HER2 pozitív és 8 ismeretlen HER2 státusz) beteg műtéti emlőmintáját gyűjtöttük össze, a betegek az adjuváns kezelést 1999 és 2006 között kapták. 57/74 (77.0%) antraciklin-alapú és 13/74 (17.6%) eset nem antraciklin-alapú (kontroll csoport) kezelésben részesült. 4/74 (5.4%) betegnél a kezelésre vonatkozó adatok nem voltak elérhetőek.

Mutagén versus nem mutagén pre-operatív kemoterápia hatása a tumor strómát infiltráló limfocita arányra

Retrospektíven, 112 emlőrakkal diagnosztizált, pre-operatíván 2005 és 2017 között kezelt beteget választottunk be és elemeztünk. A betegbeválasztási kritériumok az alábbiak voltak: mind a core biopszia, mind a műtéti minta elérhető volt, a klinikai és a kezelési adatok ismertek, legalább 2 ciklus kemoterápiában részesült a műtétet megelőzően és a pre-operatív kezelést követően maradt vissza reziduális tumor. Minden betegnél történt emlőműtét. A 112 beteg közül 103 esetben a műtét kuratív jelleggel történt, míg 9 esetben már a kezelés kezdetekor ismert csontáttét volt.

A HR és HER2 státusz alapján, a betegeket négy alcsoportba soroltuk. Az alkalmazott pre-operatív kemoterápiás kezelés alapján pedig, platina-alapú (n=28), ciklofoszfamid-alapú (n=42) és antraciklin-alapú (n=42) csoportokat különböztettünk meg.

1.2 Patológia jellemzők meghatározása

A betegek szövettani és immunhisztokémiai eredményeit a leletekből gyűjtöttük össze. HR negatívnak akkor tekintettünk egy esetet, ha az ER és PgR kifejeződés kevesebb, mint 1% volt.

A neoadjuváns kezelésre adott patológiai választ az alábbiak szerint osztályoztuk. Teljes patológiai válasz (pCR) azokat az eseteket foglalta magába, akiknél vagy (i) sem az emlőben, sem a nyirokcsomóban nem volt reziduális karcinóma vagy (ii) invazív tumor nem, de in situ ductalis karcinóma (DCIS) jelen volt az emlőben és a nyirokcsomó negatív volt. Részleges terápiás (pPR) válasznak tekintettük, ha (i) minimális reziduális tumor/majdnem teljes válasz (pl. <10% visszamaradó tumor) vagy (ii) egyértelmű a terápiás válasz, de a visszamaradó tumor 10-50% között volt vagy (iii) a tumor sejtek több mint 50% továbbra is jelen volt a core biopsziával összehasonlítva, bár egyértelmű jele volt a terápiás válasznak. Nem válaszolónak tekintettük azokat az eseteket, akiknél nem volt terápiás válasz kimutatható (pNR).

LAPTM4B kópiaszám meghatározás FISH technikával

A *LAPTM4B* kópiaszámának meghatározását, interfázisos fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) analízissel végeztük. A prehibridizációs lépést ZytoLight® FISH-Tissue Implementation Kit (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Németország) segítségével, a hibridizációt saját rendelésre készült, Texas Red/FITC kettős jelölésű *LAPTM4B/CEN8q* FISH (ZYTOMED Systems GmbH Németország, Berlin) próbával végeztük. A sejtmagok kontrasztját DAPI és halványodást gátló oldat elegyével festettük (Vector Laboratories Inc., USA, CA, Burlingame). Minden mintánál legalább két digitális FISH képet rögzítettünk, 63-szoros nagyításban Leica DFC 365FX nagy felbontású CCD kamerával felszerelt Leica DM RXA fluoreszcens mikroszkóppal (Leica Microsystems GmbH, Németország, Wetzlar). Minden esetben, a piros (*LAPTM4B*) és a zöld (CEN8 centromer régió) fluoreszcens jeleket, minimum 50 interfázisban lévő sejten külön megszámláltuk. A kapott eredményekből az alábbi paramétereket határoztuk meg: átlagos *LAPTM4B* kópiaszám/sejt, átlagos CEN8q kópiaszám/sejt, *LAPTM4B/CEN8q* arány, átlagos *LAPTM4B* kópiaszám/sejt az amplifikált sejtpopulációban és a poliszómiás vagy amplifikált sejtarány.

TIL analízis

A core biopszia és a műtéti szövetminták formalin fixált és paraffinba ágyazott blokkjait négy különböző patológiai intézetből gyűjtöttük össze (Országos Onkológiai Intézet, Sebészeti és Molekuláris Patológiai Osztály; valamint a Bács-Kiskun Megyei Oktatókórház, a Semmelweis Egyetem és a Szegedi Tudományegyetem patológiai intézeteiből).

A vizsgálathoz minden esetben egy, a reprezentatív tumor blokkból készült, 4µm metszetet festettünk hematoxilín-eozinnal. A tumor stróma limfocita infiltrációját (StrTIL) százalékban adtuk meg és a Nemzetközi TIL Munkacsoport 2014 ajánlásai szerint értékeltük. A StrTIL szövet-patológiai vizsgálatát GCs, AMT, AV, ET és JK végezték. Minden ellentmondásos eredményt újraértékeltek és megvitattak.

1.3 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzésekhez SPSS 20.0 (SPSS Inc., USA, IL, Chicago) programot használtuk. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel végeztük, amennyiben az adatok eloszlása nem a normális eloszlást követte, nem-paraméteres próbát alkalmaztunk. A túlélés analíziseknél Kaplan-Meier módszert (log-rank teszt), illetve a betegség kiújulás kockázatának és 95% konfidencia intervallumának (95% CI) becslésére Cox-regressziós modellt alkalmaztunk.

Eredmények

2.1. Egyéves neoadjuváns endokrin terápia emlőrákban

Terápiás hatás értékelése

Ebben a vizsgálatban összesen 42 beteg adatait elemeztük, közülük négy esetben az emlőrák kétoldali volt (n=46 tumor). Minden, menopauzás beteg letrozole kezelésben részesült, míg a premenopauzások közül 2 beteg tamoxifen és 7 beteg letrozole kezelést kapott, goserelinnel kombinálva. Három betegnél (n=4 tumor, 8.7%) lokális progresszió miatt, a hormonterápiáról kemoterápiára kellett váltani. Ezeket a betegeket belevettük ugyan a túlélési elemzésbe, de a műtéti kimenetelt és a patológiai terápiás választ nem vettük figyelembe.

A szövettani vizsgálatot követően, mind a 42 értékelhető tumor esetében kimutatható volt patológiai terápiás válasz. A legjobb hatást, pCR, a tumorok 14.3% (6/42) sikerült elérni (összes tumorra vonatkoztatva 6/46, 13.0%). Négy esetben sem az emlőben sem a nyirokcsomóban nem volt kimutatható reziduális tumorszövet, míg 2 esetben csak DCIS maradt (rizikócsoport 1). A legtöbb eset (25/46, 54.3%) a rizikó 2 csoportba tartozott, közülük két betegnél invazív karcinóma csak a nyirokcsomóban volt azonosítható, egy nyirokcsomó negatív esetben pedig az emlőben izolált tumorsejtek maradtak vissza. Végezetül, a rizikó 3 csoportba 11/46 (24.0%) olyan eset került, ahol a reziduális tumor stádiuma IIB vagy annál rosszabb volt és 4/46 (8.7%) olyan eset került, ahol klinikai progresszió igazolódott a kezelés alatt.

Összefüggés a neoadjuváns endokrin terápiára adott válasz és a tumor jellemzői között

A magasabb kezdeti ER kifejeződés jobb terápiás választ eredményezett a neoadjuváns endokrin terápiára. A jó terápiás válasz valószínűsége egyenes arányban 7%-kal nőtt, minden 1% ER expresszió növekedése esetén (esélyhányados: 1.070; 95% CI: 1.007–1.138, p=0.029). Azonban, nem volt összefüggés a kezdeti grádus vagy a PgR, Ki67 és TOP2A kifejeződése illetve a terápiás válasz között.

Az ER, PgR és a HER2 kifejeződés változását a neoadjuváns kezelés hatására, 32 tumorban volt lehetőség elemezni. Többek között azokat az eseteket nem tudtuk figyelembe venni, akiknél klinikai progresszió volt (n=4), illetve akiknél nem maradt vissza invazív tumor az emlőben (n=8). Az átlagos kifejeződése (\pm SD) mind az ER (85.2 \pm 15.1% vs. 65.4 \pm 32.9%; p=0.002); mind a PgR (66.1 \pm 32.3% vs. 7.7 \pm 17.7%; p=0.001), továbbá a Ki67 (17.9 \pm 12.2% vs. 10.1 \pm 13.0%; p=0.012) és a TOP2A (16.8 \pm 17.8 vs. 7.4 \pm 12.8; p=0.029) esetében is szignifikánsan csökkent a kezelést követően. Egy betegnél a tumor teljesen elvesztette az ER

és PgR pozitívitasát az endokrin terápiát követően. A HER2 státuszban nem tapasztaltunk jelentős különbséget, egyedül egy esetben, a core biopsziából elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat HER2 negativitást mutatott, de a kezelést követően az ismételt HER2 vizsgálat pozitívitasát igazolt, valamint a FISH gén amplifikációt.

Túlélés analízis a neoadjuváns endokrin terápiát követően

Medián 45.2 hónapos (min-max: 17.2-111.6 hónap) utánkövetés során, 6 betegnél alakult ki távoli áttét és 1 betegnél metachron ellenoldali emlőrák. 3 beteg elhalálozott, közülük 2 beteg emlőrák következtében, míg egy beteg egyéb betegség miatt. A becült átlagos progressziómentes túlélés (PFS) 74.2 (95% CI: 60.4-88.0) hónap, a becült teljes túlélés 92.8 (95% CI: 80.0–105.7) hónap volt. A kezelést követően visszamaradt tumorvolumen összefüggést mutatott a betegek progressziómentes túlélésével ($p=0.001$), a PFS 85.3 hónap volt a rizikó 1 csoportba tartozó esetekben, 70.6 hónap volt a rizikó 2 csoport esetében és a legrosszabb a rizikó 3 csoportnál, 41.4 hónap.

A tumor progresszió kockázat arányt a rizikócsoport 3 vonatkoztatva, rizikócsoport 1 esetében 0.131 (95% CI: 0.016-1.056, $p=0.056$), míg a rizikócsoport 2 esetében 0.101 (95% CI: 0.022-0.468, $p=0.003$). A kezelés előtti vagy a kezelés utáni ER, PgR és TOP2A kifejeződés valamint ezek változása és a PFS között nem volt szignifikáns összefüggés. A magas Ki67 expresszió (>15%) a műtéti mintában, azonban nagyobb kockázatot jelentett a betegség kiújulására (kockázat arány: 5.432, 95% CI: 1.202-24.553, $p=0.028$).

A kinyújtott utánkövetés során (medián: 61.0 hónap; min-max: 17.8-136.4 hónap), a várható átlagos PFS 93.0 hónap volt (95% CI: 77.0-108.9). Ezalatt az időszak alatt, 5 további betegnél alakult ki áttét, így összesen 11/42 betegnél fejlődött ki metasztázis a teljes utánkövetés során (1/5 rizikócsoport 1; 4/23 rizikócsoport 2; 6/14 rizikócsoport 3); illetve egy újabb betegnél alakult ki ellenoldali emlőrák. Összesen 13 beteget veszítettünk el, 8 betegnél a primer betegség progressziója, míg 5 betegnél egyéb ok miatt történt elhalálozás.

Az a 34 eset, akik csak endokrin terápiában részesültek, közülük 26 beteg tumormentes maradt az utánkövetésünk során.

Azok közül az esetek közül, akik továbbiakban neoadjuváns ($n=3$) vagy adjuváns ($n=5$) kemoterápiás kezelésben részesültek, három betegnél alakult ki távoli áttét és egy betegnél ellenoldali emlőrák.

A túlélési eredmények újraértékelése a három rizikócsoportban ugyanazt az eredményt hozta, mint korábban. A rizikócsoport 1 és 2 progressziómentes túlélésében nem volt különbség ($p=0.618$), míg a rizikócsoport 3-hoz hasonlítva, szignifikánsan jobb volt a PFS (becült

átlagos PFS: 113.9 hónap 95% CI: 92.2-135.7 (rizikócsoport 1); 97.5 hónap, 95% CI: 83.2-111.8 (rizikócsoport 2); 50.9 hónap, 95% CI: 24.7-77.1 (rizikócsoport 3); $p < 0.001$).

2.2. *LAPTM4B* génkópiaszám és a terápiás válasz alakulása antaciklin-alapú kezelésre HR negatív emlőtumorban

Összesen 143 HR negatív emlőrákos beteget válogattunk be, két kohorszba.

Az első kohorszban 69 core biopsziát vizsgáltunk, 64/69 tripla negatív és 5/69 HER2 pozitív emlőrákos betegről. A neoadjuváns kemoterápiát követően, pCR alakult ki 26 (37.7%) esetben, pPR 38 (55.1%) esetben és pNR volt megfigyelhető 5 (7.2%) esetben. Az átlagos *LAPTM4B*/CEN8q arány ≥ 2.0 volt, és 6/69 (8.6%) esetben volt nagyobb 3.71-nél.

Az átlagos *LAPTM4B* kópiaszám/sejt arány összehasonlítva a neoadjuváns antraciklin-alapú kezelést kapott csoportban, magasabb *LAPTM4B* kópiaszám volt megfigyelhető a pNR csoportban, a pCR csoporthoz képest (4.1 ± 1.1 vs. 2.6 ± 0.1 , $p = 0.029$). Összevettük az átlagos *LAPTM4B* kópiaszámot azon betegek között is, akiknél egyáltalán nem volt vagy csak minimális terápiás válasz ($>50\%$ reziduális tumor, pNR+pPRiii) mutatkozott antraciklin-alapú kezelésre és azok között, akiknél pCR alakult ki. Az eredmény ugyanaz volt, magasabb a génkópiaszám a gyengébb terápiás választ mutató betegcsoportban (3.3 ± 0.3 vs. 2.6 ± 0.1 , $p = 0.035$).

Hasonló eredményt kaptunk a CEN8q esetében is, a pNR és pNR+pPRiii csoport összevetve a pCR csoporthoz képest (3.7 ± 0.9 vs. 2.2 ± 0.1 , $p = 0.048$ és 2.9 ± 0.3 vs. 2.2 ± 0.1 , $p = 0.040$).

A nem antraciklin-alapú kezelést kapott csoportban, egy esetben volt megfigyelhető pNR. Így az átlagos *LAPTM4B*/sejt kópiaszámot csak a pNR+pPRiii és a pCR csoportok között tudtuk összehasonlítani, amely szerint nem volt szignifikáns különbség ($p = 0.360$).

Az átlagos CEN8q kópiaszám esetében is hasonló eredmény volt megfigyelhető, a pNR+pPRiii vs. pCR csoportot összevetve ($p = 0.879$).

Az adjuvánsan kezelt kohorszban, 74 beteg sebészi mintáját vizsgáltuk (39/74 tripla negatív, 27/74 HER2 pozitív és 8/74 ismeretlen HER2 státusz). Az utánkövetés során, távoli áttét alakult ki 30 (40.5%) esetben.

LAPTM4B/CEN8q arány ≥ 2.0 mindössze 4/74 (5.4%) esetben volt megfigyelhető. *LAPTM4B* génkópiaszám szempontjából elemezve az adjuváns antraciklin-alapú kezelt csoportot, az átlagos kópiaszám magasabb volt a metasztatikus, mint a nem metasztatikus esetekben (2.2 ± 0.2 vs. 1.9 ± 0.1 , $p = 0.046$). A betegeknek abban a csoportjában, akik más, nem antraciklin-alapú kezelést kaptak, nem volt szignifikáns különbség a metasztatikus és nem metasztatikus esetek *LAPTM4B* kópiaszámában.

Az átlagos CEN8q kópiát tekintve, nem volt különbség a metasztatikus vs. nem metasztatikus esetek között, sem az antraciklin sem a nem antraciklin kezelt betegekben.

A HER2 pozitív és tripla negatív eseteket összehasonlítva, szintén nem volt szignifikáns különbség az átlagos *LAPTM4B* kópiaszám/sejt arányban ($p=0.328$)

A Kaplan-Meier-féle túlélés analízis szerint, a magasabb *LAPTM4B* kópiaszám negatív előrejelzője a távoli áttétmentes túlélésnek (DMFS) az antraciklin kezelt adjuváns csoportban (log-rank test, $p=0.037$). A rosszabb túlélést meghatározó úgynevezett „cut-off” érték az alábbiak szerint lett definiálva: az amplifikált sejtpopuláció (*LAPTM4B*/CEN8q ≥ 2.0) aránya nagyobb, mint 15% és az átlagos kópiaszám nagyobb, mint 2.5 mintánként. Ez alapján, a kritérium alapján a 22/57 beteg közül, akik antraciklin-alapú adjuváns kezelést kaptak és távoli áttét alakult ki, 6/22 esetben volt magas a *LAPTM4B*, míg 16/22 esetben alacsony. A Cox regressziós analízis szintén igazolta az összefüggést az emelkedett *LAPTM4B* kópiaszám és a rosszabb DMFS között ($p=0.044$).

2.3. Mutagén versus nem mutagén pre-operatív kemoterápia hatása a tumor strómát infiltráló limfocita arányra

112 egyén mintája volt elérhető a vizsgálatban. A betegek többségénél ($n=103$) kuratív célból történt a neadjuváns kemoterápiás kezelés és az emlőműtét, míg 9 betegnél csontáttét volt igazolható már a pre-operatív kemoterápia kezdetekor.

28 beteg platina-alapú kezelést kapott, akik közül, 64.3% ($n=18$) HR-negatív (főként tripla negatív, 46.4%, $n=13$), míg 35.7% ($n=10$) HR pozitív volt.

A 42 ciklofoszfamid-alapú kezelésen átesett beteg közül, 23.8% ($n=10$) HR negatív és 76.2% ($n=32$) HR pozitív volt.

A 42 antraciklin-alapú kemoterápiával kezelt beteg 45.2%-a ($n=19$) HR negatív és 54.8 százalékának ($n=23$) HR pozitív karcinómája volt.

A betegek többsége több, mint 4 ciklus pre-operatív kemoterápiát kapott és az átlagos ciklusszám hasonló volt mind a három kezelési csoportban.

A huszonkét HER2 pozitív eset közül, 68.2% ($n=15$) kapott pre-operatív trastuzumab kezelést is. Trastuzumabbal kombinált pre-operatív kezelésben részesült nyolc beteg a platina-alapú, öt beteg a ciklofoszfamid-alapú és kettő beteg az antraciklin-alapú csoportban.

A StrTIL kemoterápia előtt és után

A kezelés előtti core biopszia mintákban, a medián StrTIL 3.00% volt. 50% körüli értéket (limfocita túlsúly) csak egy esetben figyeltünk meg. A kezelés utáni mintákban 50%

vagy afeletti StrTIL értéket, már 10 betegnél állapítottunk meg (platinum-alapú kezelést kapott (n=4), FEC (n=1) és docetaxel+epirubicin kezelést kapott (n=5)).

A medián, kezelés utáni StrTIL szignifikánsan emelkedett, 6.25%-ra ($p < 0.001$). A kezelés előtti StrTIL alacsonyabb, mint 1% arányt mutatott 14 esetben, míg a kezelést követően a reziduális tumorban, összesen két esetben volt megfigyelhető ilyen alacsony érték.

A növekedés a StrTIL számában, szignifikáns volt mind a HR pozitív, mind a HR negatív esetekben. Azonban HR pozitív/HER2 negatív eseteken belül, a változás csak a grádus III tumorokban volt szignifikáns (Δ StrTIL pozitív: n=14 (66.7%); nulla: n=3 (14.3%); negatív: n=4 (19.0%); $p=0.007$), de a grádus I-II tumorokban nem (Δ StrTIL pozitív: n=11 (36.6%); nulla: n=14 (46.7%); negatív: n=5 (16.7%); $p=0.075$).

Amikor a kezelés előtti és kezelés utáni StrTIL elemeztük a három terápiás csoportban, egyforma szignifikáns növekedést tapasztaltunk, terápiától függetlenül.

Túlélés analízis a StrTIL státusz szempontjából

A túléléssel kapcsolatos adatok 103 esetben voltak értékelhetőek. A medián DMFS 28.2 hónap (min-max: 2.6-118.3 hónap). Távoli áttét alakult ki 31/102 (30.1%) esetben. 21/31 (67.7%) betegnél a kezdeti emlőrák HR negatív volt és 19/31 (61.3%) esetben a kezelés utáni StrTIL alacsonyabb volt 10.0%-nál vagy csökkenést mutatott a kezelés előtti értékhez képest. Egyváltozós Cox analízis szerint, egyedül a HR státusz és a kezelés utáni patológiai nyirokcsomó státusz bizonyultak DMFS befolyásoló faktoroknak. A többváltozós analízisben, a StrTIL változás is erős prognosztikai hatást mutatott.

A Cox analízist elvégezve külön a HR negatív esetekben, igazolta mind a kezelés utáni StrTIL, mind a Δ StrTIL független prognosztikus szerepét. Minden 1% növekedés a kezelés utáni StrTIL-ben 2.6%-kal csökkentette a távoli áttét kialakulás valószínűségét (kockázati arány: 0.974; 95% CI: 0.948-1.000; $p=0.05$) valamint minden 1% növekedés a Δ StrTIL-ben, 4.3%-kal csökkentette a távoli áttét kialakulás kockázatát (kockázati arány: 0.957; 95% CI: 0.932-0.983; $p=0.001$). A jelen vizsgálat eredményei alapján, a kezelés előtti StrTIL nem befolyásolta a DMFS-t, továbbá a HR pozitív esetekben semmilyen szempontból nem tudtuk igazolni a StrTIL prognosztikus szerepét. Kaplan-Meier analízist is végeztünk, a HR negatív és HR pozitív esetekben külön-külön. A HR negatív esetekben, ha a StrTIL nem változott vagy növekedett a kezelés hatására, jobb túlélés volt megfigyelhető.

Következtetések

3.1 Egyéves neoadjuváns endokrin terápia biztonságosságát és hatásosságát vizsgálva hormonfüggő emlőrákban, a nemzetközi eredménnyel egybehangzó tapasztalatokat gyűjtöttünk.

- A konvencionálisan vizsgált patológiai biomarkerek közül, az ER kifejeződés a legjelentősebb előrejelzője a neoadjuváns endokrin terápiára adott válasznak.
- A neoadjuváns endokrin terápiát követően, a vizsgált reziduális tumor magas Ki67 (>15%) kifejeződése kedvezőtlen progressziómentes túlélésre utalt.
- A vizsgálat során megfigyeltük, hogy a rizikócsoport 1 (stádium 0) és rizikócsoport 2 (stádium IA-IIA) progressziómentes túlélésében nem volt szignifikáns különbség, tehát a pCR hiánya nem jelent feltétlen rossz prognózist. Ellenben azoknál a betegeknél, akiknél a kezelést követően IIB vagy annál rosszabb patológiai stádium volt megfigyelhető, ezekben az esetekben már szignifikánsan rosszabb progressziómentes túlélést tapasztaltunk.

3.2 Igazoltuk, hogy az emelkedett *LAPTM4B* génekópiaszám specifikus előrejelzője lehet az antraciklin kezelésre mutató rezisztenciának.

- Beállítottunk a *LAPTM4B* kópiaszámának meghatározására alkalmas FISH módszert és alkalmaztuk neoadjuváns kemoterápiával kezelt, HR negatív emlőtumoros esetek, kezelés előtt vett tumormintáinak vizsgálatára.
- A vizsgálat során megfigyeltük, hogy a neoadjuváns antraciklin kezelésre rezisztens vagy csak gyengén válaszoló esetekben (a tumor méretcsökkenés <50%), az átlagos *LAPTM4B* kópiaszám/sejt magasabb volt, mint a jó regressziót vagy patológiai komplett választ mutató esetekben.
- Hasonló összefüggés mutatkozott az adjuváns antraciklin-alapú terápiával kezelt csoportban: magasabb átlagos *LAPTM4B* génekópiaszám mellett a távoli metasztázis kialakulásának valószínűsége nagyobb volt az utánkövetés során, illetve a távoli áttétmentes túlélés rövidebb volt.
- A nem antraciklin-tartalmú kemoterápiával kezelt esetekben a *LAPTM4B* kópiaszám és a terápiás válasz illetve a túlélés között nem tudtunk összefüggést igazolni.

3.3 Az irodalmi adatok alapján 3 különböző mutagenitású csoportba sorolt, pre-operatív kemoterápia a tumor stróma limfocita infiltrációra (StrTIL) vonatkozó hatását vizsgáltuk.

- A vizsgálat valamennyi kezelési csoportjában a StrTIL egyenlő mértékű növekedést mutatott kemoterápiát követően.
- Eredményeink szerint, a StrTIL növekedése pre-operatív kemoterápiás kezelés hatására, kedvező prognózist jelez HR negatív emlőrákban.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni a témavezetőmnek Prof. Dr. Kahán Zsuzsannának, a szegedi Onkoterápiás Klinika vezetőjének, elsősorban kitartó támogatásáért, szakmai irányításáért, valamint, hogy bevezetett az emlődaganat onkológiájába és a témában átadott rengeteg ismeretért.

Külön hálával tartozom Dr. Tőkés Anna-Máriának és Dr. Szállási Zoltánnak a munkám tudományos, szakmai irányításáért és a közös együttműködésért.

Köszönöm Dr. Vízkeleti Laura és Dr. Varga Zoltán segítségét a statisztikai analízisekben és Papp Orsolyának a FISH meghatározásban végzett munkáját.

Nagyon szépen köszönöm Dr. Fábián Gabriellának a hasznos szakmai tanácsait és ötleteit, valamint minden egyéb adminisztratív segítségét, ami a PhD fokozat megszerzéséhez volt szükséges.

Hálás vagyok a cikkekhez nyújtott munkájukért Prof. Dr. Cserni Gábornak, Dr. Vörös Andrásnak, Dr. Kővári Bencének és Dr. Báthori Ágnesnek, az emlőmunkacsoport tagjainak.

Külön köszönet illeti meg az emlőrák munkacsoport további tagjait is:

Dr. Ormándi Katalin, Dr. Hoffmann Csilla, Prof. Dr. Lázár György, Dr. Paszt Attila, Dr. Simonka Zsolt, Dr. Lázár Máté, Dr. Kószó Renáta, Dr. Kelemen Gyöngyi, Dr. Nikolényi Alíz, Dr. Valicsek Erzsébet, Dr. Dobi Ágnes, Dr. Hamar Sándor, Dr. Kaizer László, Dr. Csörgő Erika és Dr. Kuthi Levente.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm anyukám és barátaim kitartó támogatását és türelmét.