

FEC₁₀₀. Effekt ved primær inoperabel ca. mammae og risiko for febril neutropeni

Jørgen Smeby

Veileder: Professor Erik Wist, Kreftsenteret, Ullevål Universitetssykehus



Prosjektoppgave
Det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO
24.02.09

Innhold

	side
1.0 Sammendrag	3
1.1 Bakgrunn	3
1.2 Resultater	3
1.3 Konklusjoner	4
2.0 Bakgrunn	4
2.1 Primær inoperabel Ca.mammae	4
2.2 Neoadjuvant behandling	5
2.3 Herceptin-2-positive svulster	7
3.0 Metode	9
3.1 Pasientseleksjon	9
3.2 Behandlingsprotokoll	9
3.3 Forbehandling	10
3.4 Vurdering av respons	11
4.0 Resultater	12
4.1 Behandlingsrespons	12
4.2 Bivirkninger	14
4.3 Residiv og død	15
5.0 Diskusjon	15
6.0 Litteratur	18

1.0 Sammendrag

1.1 Bakgrunn

Grunnlaget for oppgaven er en gjennomgang av journalene til pasienter ved Ullevål Universitetssykehus (UUS) som har mottatt FEC₁₀₀-kur i sammenheng med brystkreftbehandling. FEC₁₀₀ består av 5-fluorouracil, Epirubicin og Cyklofosamid, med en høyere dosering av Epirubicin (100 mg/m²) enn det som tidligere er benyttet på den aktuelle pasientgruppen. Pasientene kan deles inn i to grupper; de med primært inoperabel brystkreft og de med Her-2 positive tumores. Førstnevnte gruppe mottar FEC₁₀₀ i forkant av operasjon, såkalt neoadjuvant setting, og det optimale behandlingsresultatet er patologisk komplett remisjon (pCR). Med det menes at det ikke er gjenværende cancertev ved histologisk undersøkelse. De mest sentrale endepunktene for denne gruppen er andel pasienter med pCR og gjennomsnittlig prosentvis reduksjon av tumorstørrelse.

Gruppen med Her-2 positive tumores mottok derimot FEC₁₀₀ kuren i etterkant av kirurgi, dvs. i adjuvant setting, og dermed er pCR og reduksjon av tumorstørrelse irrelevante parametre. Analyserte parametre for disse pasientene, og også for de primært inoperable, er hovedsakelig forekomst av febril neutropeni, laveste nadirverdi av neutrofile granulocytter, dokumentert infeksjon og bruk av Neulasta i sammenheng med behandlingen.

Andre endepunkter som er undersøkt i materialet er residiv, residivdato, død, dødstidspunkt og dødsårsak.

Kort oppsummert kan det sies at hensikten med oppgaven har vært å kvantifisere de positive og negative effektene av FEC₁₀₀ behandlingen. Positive effekter utgjøres av patologisk komplett remisjon og stor reduksjon av tumorstørrelse, ettersom begge disse anses å være viktige prognostiske faktorer for overlevelse, og lavere residiv- og dødsrate [1]. Negative faktorer vil være økt grad av bivirkninger som svært lave nadirverdier av neutrofile, febril neutropeni og infeksjoner. På lengre sikt er de viktigste kliniske endepunktene total og sykdomsfri overlevelse.

1.2 Resultater

Av 53 pasienter med primært inoperabel brystkreft oppnådde totalt 28,3% pCR etter mottatt FEC₁₀₀. Blant de som kun mottok FEC₁₀₀ var pCR-raten 27,3%, mens hos de som gikk over til Taxan i løpet av behandlingen var pCR på 30%.

For hormonreseptor-negative var pCR 42,9%, mens det for hormonreseptor-positive var 18,8%. Her var det forskjeller avhengig om man skiftet over til Taxan eller ei.

Total pCR, dvs. pCR i bryst og aksille, var 20,8% for hele gruppen primært inoperable, og 31,8% og 9,4% for hhv. hormonreseptor-negative og -positive.

Av totalt 106 pasienter som hadde mottatt FEC₁₀₀ var median av laveste nadirverdi neutrofile granulocytter $0,3 \times 10^9/l$. 24,5% av pasientene ble innlagt med febril neutropeni, mens 58% mottok Neulasta i løpet av behandlingsforløpet. 6% utviklet febril neutropeni til tross for mottatt Neulasta. For de ovennevnte bivirkningene var tallene markant dårligere blant de som mottok FEC₁₀₀ i adjuvant setting.

Ved journalgjennomgang var residiv oppstått hos 9,4% , nærmere bestemt hos 11,3% av de primært inoperable og 7,5% av de Her-2 positive. Ved samme tidspunkt var ett dødsfall registrert, dette var blant de primært inoperable.

1.3 Konklusjoner

Ved en sammenligning med andre studier av neoadjuvante regimer ved primært inoperabel brystkreft kommer pCR-raten her svært godt ut. Den observerte forskjellen i behandlingseffekt mellom hormonreseptor-negative og –positive samsvarer med funn i andre studier.

Anående forekomsten av febril neutropeni så er den såpass høy at man bør vurdere å gi Neulasta (G-CSF) profylaktisk til alle pasienter ved hver kur.

Når det gjelder tallene for residiv og død så hadde det gått for kort tid mellom behandling og journalgjennomgang til at man kan si noe fornuftig ut fra de.

2.0 Bakgrunn

2.1 Primær inoperabel ca.mammae

Primær inoperabel brystkreft omtales også som lokalavansert brystkreft (LABC) og omfatter ifølge Norsk Bryst Cancer Gruppe (NBCG) følgende [2]:

T3: primærtumor >5 cm i største diameter, målt klinisk, ultralydmessig eller mammografisk.

T4: innvekst i hud, papille eller muskel eller der det foreligger inflammatorisk cancer. Uavhengig av størrelse.

N2: sammenvokste lymfeknutemetastaser.

Hos pasienter med små bryster kan svulster på 3-5 cm i størrelse kirurgisk sett være primær inoperabel, og bør dermed behandles slik [3]. Men at man benytter neoadjuvant behandling for denne gruppen betyr ikke at de er definert som LABC. Det har kun betydning for om man kan utføre brystbevarende operasjon. Et nødvendig kriterium er at pasientene ikke skal ha påviste fjernmetastaser. Slike pasienter følger et helt annet behandlingsregime.

Andelen primært inoperable tumores av totalt antall brystkrefttilfeller avhenger sterkt av hvor utbygd screeningprogrammet er i den aktuelle populasjon. I deler av verden med dårlig eller fraværende screening vil lokalavansert brystkreft være hyppig, mens i områder med godt utbygd screening, for eksempel Norge, vil det være relativt sjelden [4]. Pasienter med lokalavansert brystkreft består derfor i vestlige land hovedsakelig av de som har unngått legehjelp tidligere og de med spesielt aggressive tumores [5]. I den sammenheng må det tas i betraktning at screening i Norge kun utføres på kvinner mellom 50-69 år. Det kan derfor tenkes at andelen primært inoperable tumores av totalt antall brystkrefttilfeller vil være større i gruppen utenfor screeningpopulasjonen. I grupper som er del av periodiske screeningprogrammer utgjør LABC mindre enn 5% av nyoppdagede tilfeller av brystkreft, mens den i enkelte utviklingsland utgjør 30-50% [4]. Dette har medført en mangel på store randomiserte kliniske studier for denne gruppen, ettersom slike studier i hovedsak gjennomføres i land med godt utbygde screeningprogrammer og dermed lav insidens av LABC [4].

Tall fra NBCG viser at ved tradisjonell behandling ligger 5-års residivfri overlevelse for denne gruppen på ca. 30%, men med langt bedre prognose for T3 svulster enn T4.

[2]. Her må det bemerkes at den behandlingen som gis nå er annerledes. Norske tall fra 1996-2000 viser 5 års overlevelse på nesten 60% for stadium III og i underkant av 15% for stadium IV [6]. Amerikanske studier viser en 3- og 5-års overlevelse for kvinner med stadium III brystkreft på hhv. 70% og 55%, og tallene er sannsynligvis minst like gode i Norge nå. Prognosen for hele gruppen med primært inoperable er heterogen og avhenger bl.a. av tumorstørrelse, antall affiserte lymfeknuter og tilstedeværelse av inflammatorisk carcinom [1].

Pasienter med store svulster har lavere overlevelsesrate; Valagussa et al. fant 5-års overlevelsesrater på 65%, 36% og 16 % for svulster på henholdsvis <5cm, 5-10cm og >10cm [1]. Denne studien ble gjort tidlig på 1980-tallet og overlevelsraten har bedret seg siden den gang. Affeksjon av lymfeknuter er også en dårlig prognostisk faktor [7]. Jo høyere antall involverte lymfeknuter og høyere "nodal stage", jo dårligere er prognosen [1].

Roller til hormonreseptor-status er mer uklar, men studier har funnet at hormonreseptor-positivitet er assosiert med lengre overlevelse [8]. Med hormonreseptor-positivitet menes tilstedeværelse av østrogen- og/eller progesteronreseptor i tumorkjernene [9]. Andre faktorer som har blitt vurdert som mulige prognostiske markører er grad av proliferasjon, p53, Her-2 og "nuclear grade" [1].

2.2 Neoadjuvant behandling

Begrepet neoadjuvant behandling innebærer at kjemoterapi blir gitt som primærbehandling, dvs. i forkant av lokal behandling (kirurgi og/eller strålebehandling). Dette ble introdusert som del av terapi av inoperable brystkreft for over 30 år siden [4]. Likevel finnes det pr. dags dato ingen generell konsensus angående behandling av pasienter med lokalavansert brystkreft ved diagnosetidspunktet [2]. Men en utbredt enighet finnes om at behandlingen bør være multimodal, dvs. at radiologer, patologer, kirurger og onkologer bør ta del i behandlingen i så stor grad som mulig [4].

Det finnes både fordeler og ulemper ved neoadjuvant kjemoterapi (og hormonterapi) som kan oppsummeres slik [4]:

Fordeler:

- tidlig initiering av systemisk behandling
 - dette kan tenkes å ha positiv effekt ved å hindre mikrometastaser
- inhibisjon av postkirurgisk vekstspurt
 - dette er omdiskutert
- leveranse av kjemoterapi via intakt tumorvaskulatur
- in vivo måling av respons
 - dette gjøres ved at man sammenligner tumorstørrelse ved behandlingsstart med ulike tidspunkter i terapisyklusen. Ved manglende reduksjon av tumorstørrelse kan man endre til en annen type cytostatika. Dette er naturlig nok ikke mulig ved adjuvant kjemoterapi, der tumor allerede er fjernet.
- mindre radikal lokal/regional terapi er nødvendig
 - gjøres ikke i Norge
- bevaring av bryst gjøres mulig
 - gjelder ikke for Norge, men andre land
- god biologisk modell for å evaluere effekt av kjemoterapi på tumor

Ulemper:

- lokal behandling forsinkes for non-responders
- induksjon av resistens mot cytostatika
- stor tumorbyrde
- kun klinisk staging er mulig; upresist
- tap av patologisk prognostiske markører som initiell tumorstørrelse og antall involverte aksillære lymfeknuter [1]

Totalt sett vurderes fordelene i stor grad å overskygge ulempene. De viktigste kliniske fordelene er muligheten til å klinisk monitorere effekten på primærtumor og at reduksjon av tumorstørrelse kan muliggjøre brystkonserverende kirurgi.

De fleste forskningsrapporter angående neoadjuvant behandling av lokalavansert brystkreft er basert på cytostatika-regimer som inneholder anthracycline [4]. De gjeldende retningslinjene fra NCCN inkluderer også et slikt regime, nærmere bestemt FEC₁₀₀, som er den aktuelle behandlingen for denne oppgavens pasienter. FEC₁₀₀ består av 5-fluorouracil, Epirubicin og Cyklofosfamid. Epirubicin er anthracycline-komponenten i dette regimet. Gitt i adjuvant setting til pasienter med Her2-negative svulster så gis FEC i dosering 60 mg/m² (FEC₆₀), mens i denne oppgavens populasjon ble det gitt 100 mg/m², altså FEC₁₀₀ [10].

Hovedmålet med behandlingen er å oppnå histologisk dokumentert komplett remisjon (pCR) ettersom dette har vist å gi langt bedre langtids prognose sammenlignet med inkomplett eller manglende respons [4].

Studier har vist at de fleste som mottar neoadjuvant terapi viser respons på behandlingen. En oversikt over flere studier viste at 10-20% oppnådde klinisk komplett respons (cCR) og 50-60% klinisk partiell respons. Andel pCR varierte fra 3,7% til 30% [1]. Et problem i denne sammenhengen er at klinisk komplett remisjon ikke alltid korrelerer med patologisk komplett remisjon. I enkelte studier hadde 1/3 av pasientene med cCR fortsatt gjenværende sykdom ved patologisk vurdering [1].

For å overkomme dette problemet vurderes det å innføre PET i vurdering av tumorstørrelse. Dette vil sannsynligvis føre til høyere sensitivitet i vurderingen av terapieresponsen, sammenlignet med klinisk undersøkelse, mammografi, ultralyd og MR. En studie antydte at PET, ved hjelp av vurdering av tumorens metabolisme og perfusjon, muligens kan predikere respons på neoadjuvant behandling [11]. Mye er fortsatt uklart angående denne problemstillingen. Pasienter med komplett respons, enten den er vurdert klinisk eller patologisk, har uansett bedre utfall enn de med inkomplett respons [1] [12].

Det samme problemet som nevnt over gjelder for vurdering av aksillære lymfeknuter. I en studie fant man at 53% av pasienter som ble vurdert å ha komplett remisjon av aksillær sykdom både ved klinisk undersøkelse og ultralyd, viste seg å ha aksillære metastaser ved patologisk undersøkelse [1].

I tillegg til de anthracycline-holdige regimene, som for eksempel FEC og FAC, så har de siste årene taxaner blitt innført i neoadjuvante regimer [1]. Dette gis som regel som del av et anthracyclineholdig regime. Det hefter imidlertid usikkerhet ved om det er mest effektivt å gi anthracycline og taxan sekvensielt eller i kombinasjon [1]. Som

vist i NBCG sine retningslinjer gir man her til lands først FEC₁₀₀ og skifter eventuelt over til Taxan senest etter fire kurer FEC₁₀₀, dersom den klinisk vurderte responsen er <80% reduksjon av lengste diameter. En ulempe ved kombinasjonsterapi med doxorubicin og docetaxel er at det gir hyppigere febril neutropeni [13].

Et annet viktig spørsmål er hvilken effekt dose-hyppigheten har på respons og overlevelse. En studie fra M.D Anderson Cancer Center, som riktignok ble utført på operable tumores, viste dobling av pCR ved ukentlig administrasjon av paclitaxel sammenlignet med hver tredje uke [14]. Andre studier viser derimot ikke liknende resultater og mer forskning må til for å utarbeide klare retningslinjer på dette feltet. I Norge gis FEC₁₀₀ over seks kurer med en varighet på totalt 15 uker, dvs. tre uker mellom hver kur [10].

Hvor mange kurer som må gis for å oppnå maksimal respons er en annen sentral problemstilling. I én studie ble neoadjuvant kjemoterapi gitt helt til maksimal respons ble oppnådd. Enkelte oppnådde maksimal respons etter én terapisyklus mens andre trengte opptil åtte kurer. Median antall kurer for å oppnå partiell remisjon var fire, og for komplett remisjon fem [15]. Dette tyder på at en individualisering av varighet av terapien vil kunne bedre raten av komplett remisjon. NBCG sine retningslinjer angir seks sykluser med FEC₁₀₀. [10].

Neoadjuvant kjemoterapi kan også benyttes ved operabel brystkreft, og overlevelsesratene hos pasienter behandlet med adjuvant eller neoadjuvant kjemoterapi har vist seg å være ekvivalente. Dette temaet vil imidlertid ikke behandles i denne oppgaven.

2.3 Herceptin-2-positive svulster

Her-2 (ERBB2) er et proto-onkogen som koder for en transmembran tyrosin kinase reseptor og tilhører EGF reseptor familien [16]. Amplifikasjon og/eller overekspresjon av Her-2 finnes i ca. 20% av nyoppdagede tilfeller av brystkreft [17]. Den antatte onkogenetiske mekanismen er at amplifikasjon fører til høye nivåer av proteinekspresjon med påfølgende konstitutiv aktivering av signalveien som tyrosin kinase reseptoren igangsetter [16].

Amplifikasjon og/eller overekspresjon av Her-2 er assosiert med et mer aggressivt klinisk forløp og redusert overlevelse, sammenlignet med tumores med normale nivåer av Her-2 [17]. Her-2 er således en negativ prognostisk faktor.

I kjølvannet av oppdagelsen av Her-2 som et onkogen i brystkreft så har det blitt utviklet terapiformer direkte rettet mot dette. Trastuzumab er et humanisert monoklonalt antistoff som blokkerer tyrosin kinase aktivitet ved å binde seg til det ekstracellulære domenet av Her-2 [10]. En gjennomgang av forskning på området har vist at trastuzumab gir en klar signifikant effekt på sykdomsfri overlevelse og overlevelse uten fjernspredning sammenlignet med kjemoterapi alene [10]. Reduksjon i risiko for tilbakefall er på ca. 50%. Trastuzumab gis sammen med kjemoterapi. Ovennevnte forskning ble gjort på trastuzumab i adjuvant setting, som er det vanligste, men som man ser på behandlingsalgoritmen for primært inoperabel ca.mammae (se figur 1) så brukes det også i neoadjuvant setting ved UUS, dersom det er manglende respons på FEC₁₀₀ ved Her-2 positive tumores.

Lapatinib, en oral lavmolekylær tyrosin kinase reseptor inhibitor, har vist seg å ha effekt ved metastatisk Her-2 positiv brystkreft [16].

Av mer relevans for denne oppgaven er valg av kjemoterapi i adjuvant setting ved Her-2 positive tumores. Her-2 status anses som en prediktiv faktor for ulike systemiske terapier, dvs. at man ut fra statusen kan forutsi forventet effekt av spesifikke former for kjemoterapi og annen behandling [17]. Et åpenbart eksempel er Trastuzumab, som hovedsakelig kan forventes å ha effekt hos Her-2 positive. Videre har studier vist assosiasjon mellom Her-2 positivitet og en relativt, men ikke absolutt, lavere gevinst fra ikke-anthracycline-, ikke-taxan-holdige regimer. Resultatene på dette området har til en viss grad vært motstridende [18]. Derimot antyder resultater fra prospektive randomiserte kliniske forsøk en respons på anthracycline terapi [19]. Denne sensitiviteten skyldes muligens ikke selve overekspresjonen av Her-2, men en ko-amplifikasjon av topoisomerase II, som er det direkte målet for anthracycliner [20].

Randomiserte studier har i tillegg vist at Her-2 amplifikasjon/overekspresjon er assosiert med bedre effekt av mer intensivert anthracycline-holdig kjemoterapi [10]. Resultater som støtter dette ble funnet i en neoadjuvant studie, der responsraten var langt bedre ved høydosert FEC sammenlignet med moderat dosert FEC for de Her-2 positive, mens denne forskjellen ikke ble observert hos de Her-2 negative [21].

Generelt kan det sies at antracycline-holdige kurer med høyere epirubicindose eller mer dose-tett behandling gir bedret overlevelse i høyrisikogrupper [10].

De ovennevnte observasjonene danner grunnlaget for at man har valgt å gi epirubicin i økt dose, 100mg/m² istedenfor 60mg/m², hos Her-2 positive sammenlignet med Her-2 negative i adjuvant setting. Som følge av økt dosering kan man forvente økt forekomst av bivirkninger, hvor febril nøytropeni er den farligste.

NBCG sine retningslinjer for adjuvant behandling ved Her-2 positive tumores er følgende:

∞ seks kurer med FEC₁₀₀ gitt med tre ukers intervall

∞ Trastuzumab 6 mg/kg (første dose 8 mg/kg) hver 3. uke i ett år (totalt 17 kurer)

Ovennevnte er felles for alle Her-2 positive i visse aldersgrupper, mens hormonbehandling og taxan gis i tillegg ved hhv. hormoneseptor positivitet og lymfeknute positiv status. Angående hormonbehandling så har en stor retrospektiv studie vist at Her-2 positive pasienter har dårlig prognose på tamoxifen, og da spesielt for de PgR-negative [10]. To mindre neoadjuvante studier har vist at Her-2 positive sannsynligvis har best effekt av aromataseinhibitorer [10]. Man har nok foreløpig ikke kommet frem til endelige svar på dette spørsmålet.

Når det gjelder påvisning av Her-2 positivitet så skal Her-2 undersøkelse gjøres på alle invasive tumores, både primærtumor og eventuelle residiv eller metastaser. Dette gjøres enten ved immunhistokjemi (IHC) og/eller FISH/CISH/SISH. Førstnevnte metode kan i noen tilfeller gi et usikkert svar og da går man videre med in situ hybridisering (FISH/CISH/SISH). Begge metodene kan gjøres på cytologisk og histologisk materiale, men IHC bør ikke brukes kun på cytologisk materiale [9].

3.0 Metode

3.1 Pasientseleksjon

Oppgaven er basert på en gjennomgang av journalene til pasienter som ble behandlet med FEC₁₀₀ ved Onkologisk poliklinikk/Kreftsentrets poliklinikk, Ullevål Universitetssykehus (UUS) i perioden 1.05.2005-23.05.2007. Det har således ikke eksistert noen inklusjonskriterier utover at pasientene har mottatt ovennevnte kur. Behandlingsindikasjonene kan deles inn i to grupper: primært inoperable tumores, slik det er definert ovenfor, og Her2-positive tumores. Det må bemerkes at det finnes Her-2 positive tumores også i gruppen med primært inoperable.

Pasientene har blitt funnet ved hjelp av en prosedyrerapport fra journalsystemet på UUS. Den opprinnelige listen bestod av 129 pasienter.

Syv pasienter med påvist metastaser eller residiv fra tidligere kjent ca.mammae ved behandlingsstart var blant de som hadde mottatt FEC₁₀₀ i den aktuelle perioden, da på indikasjon som primært inoperabel. Disse har ikke blitt inkludert i analysen ettersom kjemoterapien i disse tilfellene ikke kan anses for å være med kurativ hensikt.

Patologisk komplett remisjon kunne ikke ses på som et sannsynlig behandlingsresultat hos disse.

Videre viste det seg i løpet av journalgjennomgangen at 16 av pasientene, 15 av disse i Her2-positiv-gruppen, kun hadde mottatt FEC₆₀. Disse har ikke blitt inkludert i den videre analysen.

Den endelige pasientpopulasjonen bestod av totalt 106 pasienter, 53 i gruppen med Her2-positive og 53 primært inoperable. 16 i sistnevnte gruppe var Her-2 positive, dvs. 30,2% av gruppen.

3.2 Behandlingsprotokoll

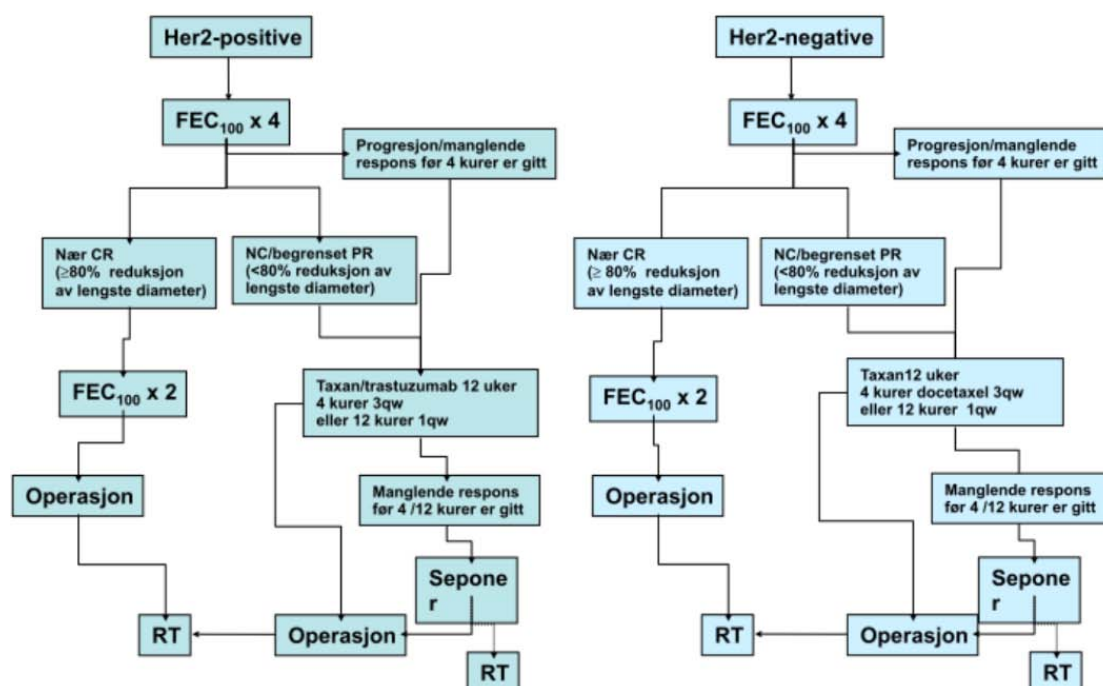
FEC₁₀₀ kuren har blitt gitt i samsvar med retningslinjer fra NCCG [2] [10]. Kurene ble gitt med tre ukers mellomrom, maksimalt antall kurer er seks. Alle tre cytostatika ble gitt på første kurdag. Dosering beregnes ut fra pasientens kroppsoverflate. 5-FU gis 600 mg/m² gis utblandet i 100 ml NaCl 9 mg/ml gitt som bolusinfusjon.

Cyklofosfamid gis 600 mg/m², mens Epirubicin gis 100 mg/m². Cyklofosfamid og Epirubicin blandes begge ut i 100 ml/glukose 50 mg/ml, og gis som infusjon over 3-5 minutter. Doseringen av Epirubicin utgjør forskjellen fra tidligere FEC-kurer, som bestod av 60 mg/m².

I gruppen primært inoperable har behandlingsforløpet fulgt NCCG sitt forslag til behandlingsalgoritme. Se figur 1.

Figur 1.

Behandlingsalgoritme for primært inoperabel ca mammae



Essensen er at det gis totalt seks FEC₁₀₀-kurer dersom effekten klinisk vurderes som en tumorreduksjon på >80% av lengste diameter. Det byttes til Taxan, og trastuzumab for Her-2 positive, etter fire kurer eller tidligere dersom effekten ikke er tilfredsstillende. I begge tilfeller etterfølges cytostatikabehandlingen av operasjon og stråleterapi. I etterkant av operasjon undersøkes det eksiderte preparatet av patolog, som igjen danner grunnlag for vurdering av remisjon.

Vanligste dosebegrensende årsak er neutropeni. I den aktuelle behandlingen fulgte man hovedsakelig NCCG sine retningslinjer som gjaldt ved det tidspunktet [10] :

- nederste akseptable grense for å gi kur er neutrofile granulocytter $1.0 \times 10^9/l$
- ved verdier under 1.0 utsettes kur i 2-7 dager inntil neutrofile er steget over 1.0 .
- Deretter gis kur med tillegg av G-CSF (gjelder alle resterende kurer).
- Ved verdier mellom 1.0 og 1.5 og forutgående febril neutropeni-episode gis G-CSF ved de påfølgende kurer (sekundær profylakse)

De ovennevnte retningslinjene har nylig blitt endret, slik at det nå gis mindre rom for utsettelse.

3.3 Forbehandling

Begge gruppene har i forkant av behandlingen vært gjennom standard trippeldiagnostikk, som inkluderer klinisk undersøkelse, billeddiagnostikk med mammografi, ultralyd og i enkelte tilfeller MR mamma og FNAC (finnålsaspirasjons cytologi) eller sylindربیopsi. I begge gruppene blir det gjort undersøkelse på østrogen- og progesteronreseptor (hormonreseptorer) og Her-2 i

cytologisk materiale. Disse undersøkelsene gjøres også på histologisk materiale fra operasjonspreparatet, og reseptorstatus samsvarer ikke alltid mellom de to undersøkelsene. Jeg har i disse tilfellene vurdert svaret fra histologisk materiale som endelige, ettersom det anses som sikrere.

For gruppen som mottok FEC₁₀₀ i adjuvant setting, dvs. de primært operable og Her-2-positive, så ble trippeldiagnostikk etterfulgt av kirurgi og deretter FEC₁₀₀. Gruppen med primært inoperable gikk gjennom en mer omfattende utredning før behandling ble igangsatt. Følgende basisutredning ble gjort:

- ∞ blodprøver (preoperative rutineprøver inkl. ALP, γ -GT og s-Ca²⁺)
- ∞ rgt. thorax eller CT thorax
- ∞ ultralyd eller CT lever
- ∞ skjelettescintigrafi eller MR columna/bekken
- ∞ andre undersøkelser på individuelle indikasjoner

3.4 Vurdering av respons

I gruppen med primært inoperable er andel pasienter med pCR det viktigste endepunktet. Behandlingsresponsen har blitt inndelt etter RECIST-kriteriene [22]. Tumorstørrelse ved diagnose er basert på måling ved palpasjon, ettersom det var kun denne metoden som var oppgitt i alle journalene. Måling ved mammografi var kun oppgitt i enkelte journaler. Tumorstørrelse ved operasjonstidspunkt er hentet ut fra patologiremissene. Ut fra en sammenligning av disse to målingene så har behandlingseffekten blitt plassert i følgende grupper, i samsvar med RECIST-kriteriene:

- pCR (patologisk komplett remisjon)*: ikke gjenværende cancertev ved histologisk undersøkelse
- *pPR (patologisk partiell remisjon)*: >30% reduksjon av lengste diameter
- *SD (stable disease)*: verken kriterier for PR eller PD oppfylles
- PD (progressive disease)*: >20% økning, ingen CR, PR eller SD dokumentert før økning i sykdom

Ovennevnte gjelder kun for primærtumor, ikke for affiserte lymfeknuder. Tilfellene der det kun ses rester av carcinoma in situ har blitt klassifisert som pCR. Gjennomsnittlig prosentvis reduksjon av tumorstørrelse har blitt regnet ut for de ulike gruppene.

Antall affiserte lymfeknuder som andel av antall fjernede lymfeknuder ved operasjon er blitt undersøkt ved hjelp av gjennomgang av patologiremissene. Ut fra disse dataene har man delt inn i følgende utfall:

- total pCR* (dvs. ikke påvist cancertev i bryst eller lymfeknute)
- pCR bryst*
- ingen pCR*

Endepunkter som har blitt undersøkt i begge grupper er residiv, residivdato, død, dødsdato og dødsårsak. Angående disse parametrene må det tas i betraktning at det hadde gått relativt kort tid fra behandlingen ble avsluttet til journalene ble

gjennomgått. Pasientene i oppgaven mottok behandling i perioden fra mai 2005 til mai 2007, mens journalene ble gjennomgått fra oktober 2007 til januar 2008.

For å undersøke omfanget av bivirkninger ved FEC₁₀₀ har følgende parameter blitt hentet ut fra journalene: laveste nadirverdi av nøytrofile granulocytter etter FEC₁₀₀. febril neutropeni. dokumentert infeksjon. antibiotikabehandling. Mottatt G-CSF (Neulasta).

Dette har blitt analysert hos både primært inoperable og Her-2 positive.

De ovennevnte hendelsene har kun blitt inkludert dersom de inntraff innen tre uker etter siste dosering med FEC₁₀₀. Nadirverdiene ble målt ti dager etter forrige FEC₁₀₀ kur. Som dokumentert infeksjon har kun tilfellene der det er påvist vekst ved dyrkning blitt inkludert. Som febril neutropeni regnes feber >38,5°C og neutrofile granulocytter <0,5 x 10⁹.

4.0 Resultater

4.1 Behandlingsrespons

Dersom en ser gruppen av primært inoperable under ett, dvs. uavhengig av hormonreseptorstatus og eventuell Taxanbehandling, så oppnådde 28,3% (15 av 53) av pasientene pCR (Tabell 1). Ni av disse mottok kun FEC₁₀₀, dvs. 27,3% (9 av 33) av de som fikk dette behandlingsregimet. Mens seks byttet over fra FEC₁₀₀ til Taxan i behandlingsforløpet, noe som utgjør 30% (6 av 20) av de som mottok dette regimet. Videre så oppnådde 58,5% pPR totalt sett, med en fordeling på 63,6% og 50% i henholdsvis FEC₁₀₀-gruppen og FEC₁₀₀→Taxan-gruppen. Dersom man slår sammen pCR og pPR så har totalt 86,8% av pasientene hatt effekt av den neoadjuvante behandlingen. I FEC₁₀₀-gruppen har 91% hatt effekt, mens 80% har hatt det i FEC₁₀₀→Taxan-gruppen.

Det er verdt å merke seg at ingen hadde progressiv sykdom.

I de ovennevnte utregningene har kategorien "Ukjent, men ikke pCR" blitt ansett som SD.

Tabell 1.

TOTALT	pCR	pPR	SD	PD	Ukjent, men ikke pCR	Total
FEC100	9	21	2		1	33
FEC100-->Taxan	6	10	2		2	20
TOTAL	15	31	4		3	53
%-vis	28,3	58,5	7,5		5,7	100

Ved å analysere behandlingseffekt på grunnlag av hormonreseptorstatus så ser man at blant de hormonreseptor-negative (Tabell 2), dvs. negativ østrogen- og progesteronreseptor, så oppnådde 42,9% pCR og 47,6% pPR. Totalt hadde altså 90,5% av disse effekt av behandlingen. De resterende 9,5% består av pasienter som pga. mangelfull informasjon i patologiremissene ikke kunne plasseres i en kategori. I denne gruppen finnes det dermed ingen dokumenterte tilfeller av manglende behandlingseffekt.

Videre sees at blant hormonreseptor-negative som kun mottok FEC₁₀₀ så oppnådde 50% pCR og 50% pPR. Blant de som skiftet over til Taxan så var fordelingen 33% pCR, 44,4% pPR og 22,2% ukjent.

Gjennomsnittlig prosentvis tumorreduksjon er 91,4% for FEC₁₀₀-gruppen og 78% for FEC₁₀₀→Taxan-gruppen.

Tabell 2.

ER-neg/PgR-neg	pCR	pPR	SD	PD	Ukjent, men ikke pCR	Total	Gj.snittlig %-vis reduksjon
FEC ₁₀₀	6	6				12	91,4
FEC ₁₀₀ →Taxan	3	4			2	9	78
TOTAL	9	10			2	21	
%-vis	42,9	47,6			9,5	100	

Blant hormonreseptor-positive (Tabell 3), dvs. positiv østrogenreseptor og/eller positiv progesteronreseptor, hadde 18,8% pCR og 65,6% pPR. 84,4% hadde dermed effekt av behandlingen. 12,5% hadde ingen dokumentert effekt, dvs. SD.

Hormonreseptor-positive som kun fikk FEC₁₀₀ fordelte seg slik: 14,3% pCR, 71,4% pPR og 9,5% SD. Blant de som skiftet over til Taxan var fordelingen: 27,3% pCR, 54,5% pPR og 18,2% SD.

Gjennomsnittlig prosentvis tumorreduksjon var 61,8% for FEC₁₀₀-gruppen og 65,6% for FEC₁₀₀→Taxan gruppen.

Tabell 3.

ER+ og/eller PgR+	pCR	pPR	SD	PD	Ukjent, men ikke pCR	Total	Gj.snittlig %-vis reduksjon
FEC ₁₀₀	3	15	2		1	21	61,8
FEC ₁₀₀ →Taxan	3	6	2			11	65,6
TOTAL	6	21	4		1	32	
%-vis	18,8	65,6	12,5		3,1	100	

Dersom man ser hele gruppen under ett, uavhengig av hormonreseptor-status og Taxanbehandling, så hadde 20,8% total pCR, 7,5% pCR bryst og 71,7% ingen pCR. Blant hormonreseptor-negative var fordelingen: 38,1% total pCR, 4,8% pCR bryst og 57,1% ingen pCR.

Blant hormonreseptor-positive var fordelingen: 9,4% total pCR, 9,4% pCR bryst og 81,2% ingen pCR.

Tabell 4.

	total pCR	pCR bryst	ingen pCR	TOTAL
ER-neg/PgR-neg	8	1	12	21
%-vis	38,1	4,8	57,1	100
	total pCR	pCR bryst	ingen pCR	TOTAL
ER+ og/eller PgR+	3	3	26	32
%-vis	9,4	9,4	81,2	100

4.2 Bivirkninger

Laveste nadirverdi etter FEC₁₀₀

Begge gruppene sett sammen så var median nadirverdi for neutrofile granulocytter $0,3 \times 10^9/l$ (Tabell 5). Verdiene lå mellom 0 og 4,5. 11,4% hadde 0 som laveste verdi. 85% av pasientene hadde laveste verdi under 1,0.

Dersom man analyserer på bakgrunn av behandlingsindikasjon ser man at de primært inoperable hadde følgende verdier: median nadirverdi $0,4 \times 10^9/l$, laveste-høyeste målte verdi: 0-4,5, 5,8% hadde 0 som laveste verdi, 79% hadde laveste verdi under 1,0.

Her-2 positive hadde følgende verdier: median nadirverdi $0,30 \times 10^9/l$, laveste-høyeste målte verdi: 0 – 3,5, 17% hadde 0 som laveste verdi og 92,5% hadde laveste verdi under 1,0.

Nadirverdiene har også blitt analysert på bakgrunn av hvem som har mottatt Neulasta. Det viser at de som mottok Neulasta hadde en gjennomsnittlig nadirverdi på 0,32, mens de som ikke mottok det hadde et gjennomsnitt på 0,90.

Tabell 5.

	Median	Laveste-høyeste verdi	Andel over/under $1,0 \times 10^9/l$
Primært inopr.	0,4	0-4,5	21%/79%
Her-2 pos.	0,3	0-3,5	7,5%/92,5%
Begge grupper	0,3	0-4,5	15%/85%

Bruk av Neulasta (G-CSF)

I den totale pasientpopulasjonen mottok 58% Neulasta pga. forutgående febril neutropeni og/eller lave neutrofile granulocytter. Blant de primært inoperable var andelen 49%, mens den blant Her-2 positive var 68%.

Febril neutropeni

Totalt ble 24,5% av pasientene innlagt med febril neutropeni i løpet av behandlingsperioden. Dette inntraff hos 17% av de primært inoperable og 32% av Her-2 positive.

I tillegg må det bemerkes at seks pasienter utviklet febril neutropeni til tross for bruk av Neulasta. Det betyr at 8% av pasientene som mottok Neulasta ble innlagt med febril neutropeni.

Dokumentert infeksjon og bruk av antibiotika

Det var kun to dokumenterte tilfeller av infeksjon i hele pasientpopulasjonen, noe som utgjør 1,9% av pasientene. Begge tilfellene var blant de Her-2 positive og utgjør 3,8% av disse. Ingen dokumenterte infeksjoner blant de primært inoperable med andre ord. Bruk av antibiotika var derimot mer utbredt. Totalt mottok 31,1% av pasientene antibiotika, 24,5% av de primært inoperable og 37,7% av de Her-2 positive.

Tabell 6.

	<i>Neulasta</i>	<i>Febril neutropeni</i>	<i>Dok. infeksjon</i>	<i>Mottatt antibiotika</i>
Primært inopr.	49 %	17 %	0 %	24,50 %
Her-2 pos.	68 %	32 %	3,80 %	37,75 %
Begge grupper	58 %	24,50 %	1,90 %	31,10 %

4.3 Residiv og død**Residiv**

Som nevnt over må man angående disse endepunktene ta i betraktning det korte tidsrommet fra behandlingen ble avsluttet til journalene ble gjennomgått. Det ble totalt registrert 10 tilfeller av residiv, dvs. 9,4% av pasientene. Hos de Her-2 positive var det fire tilfeller, noe som utgjorde 7,5% av pasientene. Hos de primært inoperable var det seks tilfeller, dvs. 11,3% av pasientene. Det er verdt å merke seg at to av disse kom hos pasienter som hadde total pCR ved operasjonstidspunktet.

Død

Ved tidspunkt for journalgjennomgang var det kun ett dødsfall i hele gruppen. Dette var blant de primært inoperable og skyldtes hjernemetastaser.

5.0 Diskusjon

I en oversiktsartikkel over 21 studier på neoadjuvant kjemoterapi ved LABC varierte pCR fra 3% til 46%, med en medianverdi på 13%. Kun studier der minst 70% av pasientene hadde tumor >5 cm eller var definert som LABC ifølge TNM ble inkludert. De fleste kjemoterapiregimene var anthracycline-holdige [5]. Oversikten danner med andre ord et godt sammenlikningsgrunnlag for tallene i denne oppgaven. Et problem er imidlertid at det ikke kommer frem om de har definert pCR kun på grunnlag av primærtumor eller om affeksjon av lymfeknuter også er inkludert. Differensiering på grunnlag av hormonreseptorstatus eller andre parametre er heller ikke gjort.

Dersom man kun går ut fra primærtumor så kommer tallene i denne oppgaven svært godt ut, sammenlignet med ovennevnte tall. Med en pCR på 28,3% er det kun to studier i oversikten som har bedre resultater. Det er kun tre av de 21 studiene som har pCR over 20%. Også dersom man går ut fra total pCR, dvs. pCR i både bryst og lymfeknuter, så kommer denne oppgavens tall veldig godt ut, med en total pCR på 20,8%.

Som nevnt tidligere er behandlingseffektene relativt like ved FEC₁₀₀- og FEC₁₀₀→Taxan-regimene, med en pCR på henholdsvis 27,3% og 30%. Dette samsvarer ikke med funnene i en skotsk RCT der man sammenlignet effekt av anthracycline med anthracycline + taxan. Raten av pCR økte fra 16% til 34% ved å tillegge Taxan [23]. I den skotske studien ble pasientene randomisert til de to behandlingsgruppene, altså uavhengig av tidligere respons på cytostatika. Dette utgjør en forskjell fra hvordan det er gjort ved Ullevål, hvor man først gir Taxan ved manglende respons på FEC₁₀₀. Da har man med en gang å gjøre med en gruppe som er mer behandlingsresistent. Dette kan utgjøre en del av forklaringen på de ulike resultatene i de to studiene.

Uansett så må den neoadjuvante behandlingen sies å ha effekt ettersom, dersom man ser begge behandlingsregimer under ett, 86,8% av pasientene hadde pCR eller pPR.

Når det gjelder ulikheten i behandlingseffekt mellom hormonreseptor-negative og -positive, nærmere bestemt pCR på henholdsvis 42,9% og 18,8%, så er dette i samsvar med funn i andre studier [5]. Som man ser av tabell 2 og 3 så er det størst forskjell mellom gruppene, både for pCR og gjennomsnittlig tumorreduksjon, blant de som kun mottok FEC₁₀₀. Blant de som skiftet over til Taxan så er forskjellene mindre, med pCR-rater på 27,3% og 33% og gjennomsnittlig tumorreduksjon på 65,6% og 78% for hhv. hormonreseptor-positive og negative. Innad blant de hormonreseptor-positive så var pCR nesten det dobbelte ved FEC₁₀₀→Taxan-regime sammenlignet med kun FEC₁₀₀, dvs. pCR på hhv. 27,3% og 14,3%. Dette kan muligens tyde på at skifte til Taxan kan gjøres i større grad hos hormonreseptor-positive. Men andre studier, gjort i adjuvant setting, har imidlertid funnet resultater som strider imot dette [24].

Når det gjelder hyppighet av febril neutropeni så kan tallene sammenlignes med en nylig publisert studie der enkelte pasienter mottok Epirubicin (90 mg/m²) og Cyclophosphamid (600 mg/m²) (EC), uten tillegg av G-CSF, hver tredje uke. Doseringen av Epirubicin var altså noe lavere enn i vårt tilfelle. Kjemoterapien ble gitt i adjuvant setting. 15,8% av de som mottok ovennevnte kur utviklet neutropeni [25]. Dette er betydelig lavere enn de 24,5% som utviklet febril neutropeni i vår populasjon. Om dette utelukkende skyldes den økte doseringen av Epirubicin, eller om andre faktorer kan være medvirkende er uklart. Verdt å merke seg i den ovennevnte studien er at en annen gruppe pasienter mottok samme dosering EC, men annenhver uke, og da med tillegg av pegfilgrastim (G-CSF). I denne gruppen ble det ikke observert noen tilfeller av neutropeni.

Med tanke på den høye raten av febril neutropeni ved FEC₁₀₀, kan man vurdere om G-CSF bør gis profylaktisk hos alle pasienter ved hver kur. I den sammenheng må man sammenligne de økonomiske kostnadene ved å gi alle G-CSF med kostnadene ved innleggelser pga. febril neutropeni. G-CSF er heller ingen garanti mot neutropeni, noe som illustreres ved at 8% av pasientene som mottok Neulasta i vår oppgave likevel ble innlagt med febril neutropeni. Retningslinjer fra EORTC sier at ved bruk av et kjemoterapi-regime assosiert med febril neutropeni hos >20% av pasientene er profylaktisk G-CSF anbefalt [26]. De aktuelle resultatene ved FEC₁₀₀ oppfyller dette kravet.

Som man ser av tabell 5 og 6 så hadde de Her-2 positive, som mottok FEC₁₀₀ i adjuvant setting, lavere nadirverdier, høyere hyppighet av febril neutropeni og mottok

hyppigere G-CSF og antibiotika, sammenlignet med de primært inoperable. Dette til tross for at de fulgte det samme kjemoterapi-regimet. Hvorfor det er slik vites ikke.

Når det gjelder residiv og død er det som nevnt tidligere for tidlig å komme med slutninger. Men det er verdt å merke seg at to av de totalt seks registrerte tilfellene av residiv hos de primært inoperable forekom hos pasienter med tidligere oppnådd pCR. Så til tross for at pCR er assosiert med bedre sykdomsfri overlevelse, så utgjør det ingen garanti, verken på individ- eller gruppenivå.

6.0 Litteratur

1. Sharon H. Giordano: Update on Locally Advanced Breast Cancer. *The Oncologist*. 2003;8:521-530.
2. <http://www.nbcg.no/nbcg.blaaboka.html> Kap. 14.
3. Vicente Valero, Aman U. Buzdar and Gabriel N. Hortobagyi: Locally Advanced Breast Cancer. *The Oncologist* 1996;1;8-17.
4. Gabriel N. Hortobagyi, S. Eva Singletary and Eric A. Storm: Locally advanced breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M and Osborne CK (eds.): *Diseases of the breast*, third edition. ISBN: 0-7817-4619-1. Lippincott, Williams & Wilkins. Philadelphia. 2004. Pp. 951-964
5. Mathew J, Asgeirsson KS, Cheung KL et al. : Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer: A review of the literature and future directions. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Feb;35(2):113-22. Epub 2008 May 23.
6. <http://www.nbcg.no/nbcg.blaaboka.html> Kap. 4.
7. Toonkel LM, Fix I, Jacobson LH et al: Locally advanced breast carcinoma: results with combined regional therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1986 Sep;12(9):1583-7.
8. Stewart JF, King RJ, Winter PJ et al: Oestrogen receptors, clinical features and prognosis in stage III breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1982 Dec;18(12):1315-20.
9. <http://www.nbcg.no/nbcg.blaaboka.html> Kap. 11.
10. <http://www.nbcg.no/nbcg.blaaboka.html> Kap. 13.
11. Mankoff DA, Dunnwald LK, Gralow JR, et al: Blood Flow and Metabolism in Locally Advanced Breast Cancer: Relationship to Response to Therapy. *J Nucl Med*. 2002 Apr;43(4):500-9.
12. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al: Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999 Feb;17(2):460-9.
13. Nabholz JM, Falkson C, Campos D, et al: Docetaxel and doxorubicin compared with doxorubicin and cyclophosphamide as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer: results of a randomized, multicenter, phase III trial. *J Clin Oncol*. 2003 Mar 15;21(6):968-75.

14. Green MC, Buzdar AU, Smith T, et al: Weekly paclitaxel followed by FAC as primary systemic chemotherapy of operable breast cancer improves pathologic complete remission rates when compared to every 3-week P therapy followed by FAC- final results of a prospective phase III randomized trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21: 2002 (abstr 135).
15. Lippman ME, Sorace RA, Bagley CS, et al: Treatment of locally advanced breast cancer using primary induction chemotherapy with hormonal synchronization followed by radiation therapy with or without debulking surgery. *NCI Monogr.* 1986;(1):153-9.
16. Abeloff MD, Wolff AC, Weber BL, et al: Cancer of the breast. In: Abeloff MD et al (eds.): *Abeloff's Clinical Oncology*, fourth edition. ISBN: 978-0-443-06694-8. Churchill, Livingstone, Elsevier. Philadelphia. 2008. Pp. 1880-1919
17. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007 Jan 1;25(1):118-45.
18. Ménard S, Valagussa P, Pilotti S, et al: Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):329-35.
19. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, et al: HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006 May 18;354(20):2103-11.
20. Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, et al: Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int J Oncol.* 2004 Jan;24(1):201-9.
21. Petit T, Borel C, Ghnassia JP, et al: Chemotherapy response of breast cancer depends on HER-2 status and anthracycline dose intensity in the neoadjuvant setting. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1577-81.
22. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Feb 2;92(3):205-16.
23. Heys SD, Hutcheon AW, Sarkar TK, et al: Neoadjuvant docetaxel in breast cancer: 3-year survival results from the Aberdeen trial. *Clin Breast Cancer.* 2002 Oct;3 Suppl 2:S69-74.
24. Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, et al: Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA.* 2006 Apr 12;295(14):1658-67.

25. Jones RL, Walsh G, Ashley S, et al: A randomised pilot Phase II study of doxorubicin and cyclophosphamide (AC) or epirubicin and cyclophosphamide (EC) given 2 weekly with pegfilgrastim (accelerated) vs 3 weekly (standard) for women with early breast cancer. *British Journal of Cancer* (2009) 100, 305–310.
26. Aapro MS, Cameron DA, Pettengell R, et al: EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. *Eur J Cancer*. 2006 Oct;42(15):2433-53.