

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА

„Проф. д-р Параскев Стоянов”

Факултет „Медицина“

**Катедра „Обща и клинична патология, съдебна
медицина и деонтология“**

д-р Невена Желязкова Янулова

**АПОПТОЗА И НЕКРОПТОЗА ПРИ
БЪБРЕЧНОКЛЕТЪЧЕН КАРЦИНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен
„доктор“

Научна специалност: „Патологоанатомия и
цитопатология“

Научен ръководител:

Проф. д-р Мария Цанева, д.м.

Варна, 2024 г.

Дисертационният труд съдържа **169** стандартни страници и е онагледен с 80 таблици и 65 фигури. Литературната справка включва **266** литературни източника, от които 5 на кирилица и 261 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на катедрен съвет на Катедрата по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при МУ "Проф. Д-р Параскев Стоянов" – Варна на 03.10.2024 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе 17.01.2025 г., петък, пред научно жури в състав:

Външни членове:

1. Проф. д-р Юлиан Ананиев, д.м.
2. Доц. д-р Силвия Генова, д.м.
3. Доц. д-р Екатерина Софтова-Златарова, д.м.

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Петър Генов, д.м.
2. Доц. д-р Деян Дженков, д.м.

Резервен външен член:

1. Проф. д-р Добринка Радойнова, д.м.н.

Резервен вътрешен член:

1. Доц. д-р Калин Калчев, д.м.

Съдържание:

Въведение.....	5
Цел и задачи.....	8
Материал и методи.....	9
Резултати и обсъждане.....	14
Заключение.....	61
Изводи.....	63
Приноси.....	66
Публикации, свързани с дисертационния труд.....	67

Използвани съкращения:

На кирилица:

АП - апоптоза

БКК – бъбречноклетъчен карцином

ГКТ – герминативноклетъчни тумори

КРК – колоректален карцином

МВИ – микроваскуларна инвазия

НК – некроптоза

ПК – папиларен карцином

СКК – светлоклетъчен карцином

СЗО – световна здравна организация

ТН – туморна некроза

ХК – хромофобен карцином

На латиница:

AIF – apoptosis inducing factor

CLL/SLL - chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma

DLBCL - Diffuse large B-cell lymphoma

ISUP - International Society of Urological Pathology

LVI - lymphovascular invasion

RIPK1 - Receptor interacting protein kinase 1

RIPK3 - Receptor interacting protein kinase 3

TILs - tumor infiltrating lymphocytes

WHO - World Health Organization

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Честотата на бъбречноклетъчният карцином (БКК) е между 1% и 3% от всички злокачествени висцерални неоплазми. Приблизително 40% от пациентите с този карцином умират поради прогресия на заболяването и затова се смята за една от най-малигнените неоплазми сред злокачествените урологични тумори. В повечето случаи БКК се открива с помощта на образни изследвания, които са извършени по повод урологични или други оплаквания. Сред пациентите преобладава мъжкият пол, около две трети от случаите (Muglia VF, Prando A, 2015). В България се наблюдава тенденция за нарастване на смъртността от тумори на бъбрека и пикочните пътища на 100 000 души за периода от 1980 до 2017 г. При жените смъртността нараства от 0,9 през 1980 г. на 1,4 през 2017 г., докато при мъжете съответно от 1,6 на 3,8 (Валерианова и др., 2020).

Апоптозата (АП) или програмираната клетъчна смърт е универсалният път за елиминиране на ненужни клетки и тъкани с участие на процес на фагоцитоза, без да се индуцира възпалителна реакция (Greenhalgh DG, 1998). Съществуват два основни пътя на АП: външен и вътрешен (Xu X et al., 2019). Програмираната клетъчна смърт е координиран и често енергийно зависим процес, който включва активирането на група от цистеинови протеази, наречени каспази и сложна каскада от събития, които свързват инициращите стимули с окончателната смърт на клетката (Elmore S, 2007).

АП се счита за основен защитен механизъм срещу появата и прогресията на редица неоплазми, включително и при бъбречноклетъчният карцином (Ganini C et al., 2022). Тази форма на клетъчна смърт намира приложение в областта на биомедицината за унищожаване на неопластични клетки в отговор на външно приложени стимули, предизвикващи АП, като лекарства с малки молекули (Xu X et al., 2019). Повечето

химиотерапевтици, както и лъчетерапията предизвикват клетъчна увреда на туморните клетки, активират вътрешния сигнален път, но и за осъществяването му се изисква активен *p53* (Ashkenazi A, 2002).

Апоптозо-индуциращият фактор (Apoptosis inducing factor, AIF) е апоптогенен митохондриален интермембранен протеин, като действа независимо от контрола на Bcl-2 и каспазите в процеса на клетъчна смърт (Susin SA et al., 1999). Като каспаза-независим механизъм на АП, AIF може да бъде потенциална цел за химиорадиотерапевтична интервенция при редица злокачествени заболявания (Millan A, Huerta S, 2009).

Некроптозата (НК) е алтернативна форма на клетъчна смърт, която се инициира, когато процеса на АП е инхибиран (Degterev A et al., 2005). НК, медирана от рецептор взаимодействаща протеин киназа-3 (RIPK3) и нейният субстрат смесена линия на киназен домейно-подобен протеин (MLKL), е най-добре охарактеризираната форма на регулирана некроза (Pasparakis M, Vandenabeele P., 2015). Предполага се, че НК играе ключова роля при множество аспекти на туморната биология, включително онкогенеза, туморни метастази и туморен имунитет (Liu S et al., 2021). Тя има двустранна роля при различни видове неоплазми, като механизмите, които са в основата на тези ефекти, могат да зависят от вида и стадия на тумора. Аберантното подтискане или активиране на този вид клетъчна смърт е тясно свързано с появата и развитието на неопластичните заболявания. Тези разкрития могат да осигурят нови насоки при туморната терапия и ефективно регулиране на НК в туморните клетки в близко бъдеще (Yang M et al., 2022).

RIPK3 сигнализацията има както тумор-репресивни, така и тумор-стимулиращи ефекти. Ролята на RIPK3 в развитието на различните тумори, в тяхната прогресия, метастази и рецидиви може да не е еднозначна. Про-карциногенезата или анти-карциногенезата на RIPK3 сигнализацията зависи предимно от

баланса на произведените цитокини и хемокини, както е установено при някои тумори. Необходимо е по-детайлно изясняване на RIPK3 сигналния път в патогенезата на различните видове неоплазми и по-специално на БКК (Liu S et al., 2021).

БКК се характеризира с неконтролирана клетъчна пролиферация, липса на клетъчна смърт и силна резистентност при конвенционална химиотерапия (Toth C et al., 2017). По данни на някои автори при бъбречния карцином има увреждания на вътрешния и външния сигнален път на АП (Toth C et al., 2017).

При различните видове тумори, включително и при БКК съществуват сложни взаимодействия между различните сигнални пътищата на клетъчна смърт. Предвид изявената резистентност на бъбречния карцином към стандартните терапевтични методи е необходимо търсенето на нови подходи при лечение му чрез повлияване на сигналните пътищата на АП и НК съобразено с взаимодействията помежду им, както и с връзката им с клинично-морфологичните показатели на тумора.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел

Цел на настоящото изследване е да се проучи имунохистохимичната експресия на маркера за апоптоза, apoptosis-inducing factor (AIF) и маркера за некроптоза, Receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3) при пациенти с бъбречноклетъчен карцином и да се определи прогностичната им стойност.

За реализиране на поставената цел бяха формулирани следните задачи:

2.2. Задачи

1. Да се проучат и сравнят клинично-морфологичните характеристики във връзка с преживяемостта на селектирани пациенти с карцином на бъбрека.
2. Да се определи имунохистохимичната експресия на AIF в туморната тъкан на бъбречноклетъчен карцином и се сравни със съседната нетуморна тъкан.
3. Да се оцени полуколичествено имунохистохимичната експресия на RIPK3 в туморната тъкан на бъбречноклетъчен карцином и се сравни със съседната нетуморна тъкан.
4. Да се оцени имунохистохимичната експресия на AIF и RIPK3 в метастатичните лезии на селектираните случаи с хистологично верифицирани метастази и се сравни с експресията в първичния тумор.
5. Да се изследва имунохистохимичната експресия на AIF и RIPK3 във връзка с клинично-патологичните характеристики на пациентите с бъбречноклетъчен карцином: пол, възраст, стадий

на тумора, хистологичен вид, степен на диференциация, туморни некрози, тумор-инфилтриращи лимфоцити и съдова инвазия.

6. Да се анализира маркера за апоптозата, AIF и маркера за некроптоза, RIPK3 във връзка с преживяемостта на пациентите и да се определи прогностичната им роля при бъбречния карцином.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Материали, използвани в изследването

3.1.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

- „Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ – Медицински Университет – Варна
- Използвана е информация от електронна база данни „MultiLab“ на Университетска болница „Св.Марина“ – Варна.

3.1.2. Пациентска популация

Обект на настоящото проучване са 80 пациента с БКК разпределени в три групи:

Първа група: 20 пациенти с диагноза ПК на бъбрек.

Втора група: 21 пациенти с диагноза ХК на бъбрек.

Трета група: 39 пациенти с диагноза СКК на бъбрек.

Всички пациенти са оперирани в УМБАЛ „Света Марина“- Варна. Изследвани са хистологични препарати от първичните тумори и са оценени следните хистологични показатели: хистологичен тип, присъствие и площ на ТН, TILs, съдова инвазия и степен на диференциация при СКК и ПК.

Определен е TNM стадия. При 15 от пациентите има хистологично верифицирани далечни метастази.

Нивата на имунохистохимична експресия на AIF и RIPK3 са анализирани при трите групи пациенти и при четиринадесет хистологично верифицирани далечни метастази.

3.2. Методи на изследване

3.2.1. Хистологични изследвания

От всеки туморен резектат са изследвани средно по три-четири материала, включващи туморен паренхим, огнища с некрози и съседна нетуморна тъкан, както и хистологично верифицирани метастази. Материалите са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин и след съответната обработка са включени в парафин с точка на топене 52-54°C с цел изготвяне на парафинови блокчета. Срези с дебелина 5 µm са стандартно оцветени с хематоксилин-еозин за оценка на хистологичните промени в първичния тумор и метастазите.

Критерии за категоризиране на всеки показател:

- **Възраст.** Пациентите бяха разделени в три възрастови групи: ≤ 44 г., 45-64 г. и ≥ 65 г.
- **Пол.** Пациентите бяха разделени в две категории според пола, съответно на мъже и жени.
- **Локализация на тумора.** Туморите бяха разпределени според локализацията им в левия или десния бъбрек с цел сравняване с резултати от други проучвания.
- **Хистологичен тип на тумора.** Определен е съгласно критериите на C3O за туморите на бъбрека от 2016 (Moch H et al, 2016) и 2022 година (Amin MB et al., 2022).
- **TNM-стадий.** Стадия на БКК се базира на класификацията на C3O от 2022 г. Наличието на метастази в лимфните възли

(N) и далечни метастази (M) – беше установено чрез биопсично изследване.

- **Степен на диференциация.** Използвана е четири степенна скала на ISUP, която се базира на визуализация на нуклеолите при различни микроскопски увеличения, както на плеоморфизъм, рабдоидна или саркоматоидна диференциация и на многоядрени туморни клетки. Според настоящите препоръки на СЗО при ХК не се определя степен на диференциация.
- **Площ на некрози.** Некрозата е определено полуколичествено, използвана е четиристепенна скала: I група - липсва; II група - огнищна, <10% от площта на туморната тъкан; III група - умерено изразена некроза, от 10% до 30% от площта на туморната тъкан; IV група - обширна некроза, ≥30% от площта на туморната тъкан.
- **Тумор инфилтриращи лимфоцити /TILs/.** TILs, включват интратуморни и стромални TILs. Интратуморните TIL са лимфоцити в туморните гнезда, в контакт с карциномни клетки без интервенираща строма. Стромалните TIL са в стромата на тумора и не контактуват директно с туморните клетки (Salgado R, et al., 2015). Средно по два-три препарата от всеки случай бяха анализирани за определяне интензитета (I) на TILs в туморната тъкан и/или строма (Zhang D al., 2019) по скалата: 0 - липсват; 1- леко увеличение на TILs (слабо изразени); 2 - увеличени TILs (умерено изразена); 3 - проминентни TILs (изразени).
- **Съдова инвазия /LVI/.** Присъствието, съответно липсата на LVI е отчетено в разнокалибрени съдове, като бяха оценени средно по три-четири среза от всеки туморен резектат.

3.2.2. Специфични методи на изследване

Имунохистохимичен метод и използвани антитела.

Приложен е индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024. Използвани са следните антитела:

- Recombinant Anti-AIF antibody (E20) – Mitochondrial Marker кат. №ab32516, моноклонално заешко антитяло, като маркер за апоптоза (ABCAM's RabMab technology).
- Anti-RIPK3 antibody кат. № ab62344, поликлонално заешко антитяло, като маркер за некроптоза (ABCAM's RabMab technology).

Нивата на експресия на антителата са определени чрез използване на детекционна анти-поливалентна система HRP/DAB. Реакцията беше визуализирана чрез подходящ субстратен хромогенен реагент (DAB/Diaminobenzidine).

Антителата, реактивите за оцветяване и използваните работни концентрации са представени на таблица 1.

Таблица 1. Използвани реагенти.

Антитяло	Разреждане	Позитивна контрола	Маркер за:	Фирма производител
Recombinant Anti-AIF antibody [E20] - Mitochondrial Marker (ab32516) Rabbit monoclonal [E20] to AIF	1:500	Плоскоклетъчен карцином на маточна шийка	Апоптоза	ABCAM's RabMab technology
Anti-RIPK3 antibody (ab62344) Rabbit polyclonal to RIPK3	1:300	Бъбрек	Некроптоза	ABCAM's RabMab technology

Метод на отчитане на експресията на AIF и RIPK3

Оценката на имунохистохимичната експресия е направена, като са изследвани 10 полета на най-голямо увеличение ($\times 400$) за всеки отделен случай.

Имунохистохимичната експресия на AIF/RIPK3 бе оценена полуколичествено чрез използване на H-score (histo-score) върху тъканните срези. Първо, за всяка клетка в различни полета бе определена цитоплазмената, съответно ядрената интензивност (0, 1+, 2+, или 3+). Процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет бе пресметнат, като накрая H-score бе изчислен посредством следната формула (Ishibashi H et al., 2003):

$[1x (\% \text{ клетки с } 1+) + 2x (\% \text{ клетки с } 2+) + 3x (\% \text{ клетки с } 3+)]$, в диапазон от 0 до 300.

H-score бе използван и за оценка на ядрената експресия на AIF/RIPK3. Резултатът беше оценен по формулата:

$[1x (\% \text{ ядра с } 1+) + 2x (\% \text{ ядра с } 2+) + 3x (\% \text{ ядра с } 3+)]$, в диапазон от 0 до 300.

3.2.3. Статистически методи

За статистическа обработка на данните са приложени следните методи:

А. Дескриптивен анализ:

- Вариационен анализ
- Алтернативен анализ
- Проверката на нормалността на разпределението на данните е направена графично и количествено

Б. За проверка на хипотези са прилагани:

1.Параметрични методи

2.Непараметрични методи

За ниво на значимост на нулевата хипотеза е прието $\alpha = 0.05$.

Всички статистически тестове са двустранни.

В. Таблични и графични методи за онагледяване на получените резултати.

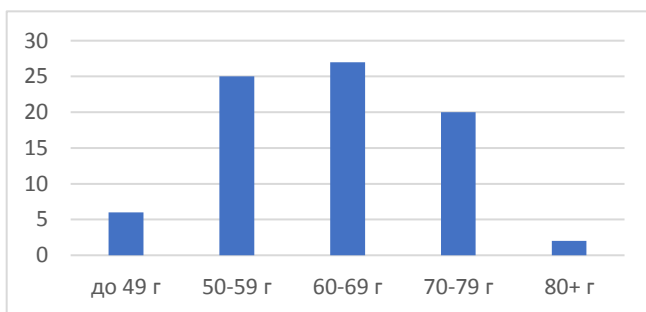
Обработката и анализът на данните са извършени със статистическия пакет IBM SPSS ver. 21, а графиките са построени в Microsoft Excel for Windows.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Клинико-морфологични характеристики на пациентите с бъбречноклетъчен карцином.

Средната възраст на болните с БКК е 62,8 години (SD10.9). Най-младият е на 28 г., а най-възрастният на 81 г. Половината от пациентите са на възраст между 54 и 70 години.

Получените от нас резултати (фиг. 1) показват, че най-голям е броят на пациентите с БКК във възрастовата група 60-69 г. По данни от литературата повечето случаи с БКК са диагностицирани във възрастта между 60 и 70 г. (Capitanio U et al., 2019; Liao Z et al., 2022), като средната възраст е 64 г. (Rosiello G et al., 2021), което е в съответствие с данните получени и от нас.



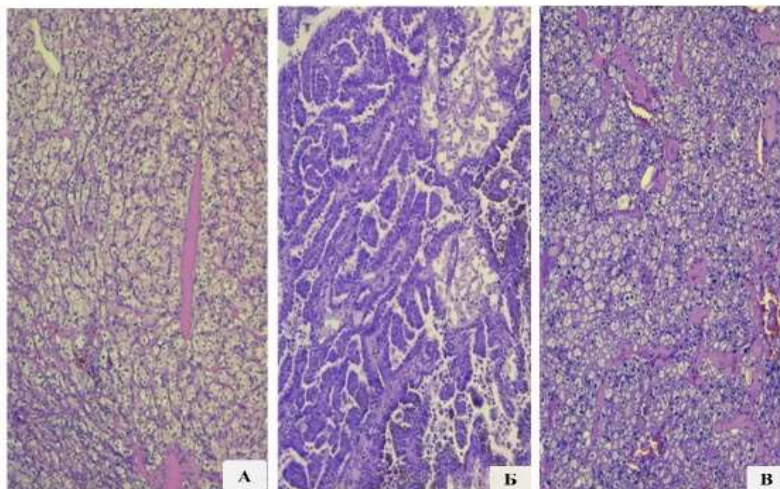
Фигура 1. *Разпределение на пациентите по възрастови групи.*

В първата група ≤ 44 г. има 4-ма пациента, във втората група от 45 до 64 г. има 40 пациента, а в третата група ≥ 65 г. има 36 пациента.

На таблица 2 са представени клинично-морфологичните характеристики на изследваните пациенти с БКК.

Ние установихме, че БКК се среща по-често при мъжкия пол - 56 (70%) случая, в сравнение с женския пол - 24 (30%) случая. Нашите данни не се различават от тези публикувани в литературата, според които този карцином се среща по-често при мъже (Scelo G et al., 2018). Според Scelo et al. (2018) при това заболяване съотношението мъже:жени е 2:1 и то не показва зависимост от възрастта, годината на изследване и региона, което внушава, че фактори различни от социално-културните и здравното поведение имат отношение към половите различия при БКК. За преобладаващото засягане на мъжкия пол и подобно съотношение между двата пола съобщават и други автори (Guo S et al., 2019), включително и при СКК (Feng X et al., 2019).

При хистологичното изследване на БКК се установи, че 39 (48,8%) са светлоклетъчни карциноми, 20 (25%) са с папиларна характеристика и 21 (26,2%) са хромофобни (фиг. 2). По данни на СЗО от 2022 г. това са трите най-често диагностицирани хистологични варианта БКК, които се срещат с честота съответно 60-75%, 13-20% и 5-7% (Amin et al., 2022).



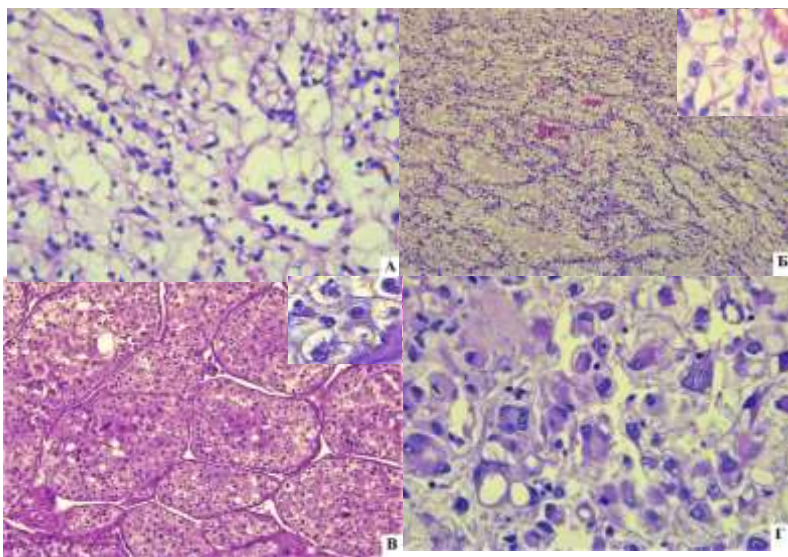
Фигура 2. *А. Светлоклетъчен карцином на бъбрек, ХЕ x 100; Б. Папиларен карцином на бъбрек, ХЕ x 100; В. Хромофобен карцином, ХЕ x 100.*

В САЩ Feng et al. (2019) анализират светлоклетъчния бъбречен карцином за период от 40 години (от 1973 до 2014 г.) и установяват, че с напредване на възрастта честотата му нараства, достига пик при лица на възраст между 60 и 79 години, след което честотата му намалява.

Таблица 2. Клинико-морфологични характеристики на изследваните 80 пациенти с БКК.

Характеристики	Брой (n) пациенти	%
Общ брой изследвани	80	100
1. Пол		
Мъже	56	70,0
Жени	24	30,0
2. Хистологичен тип		
Светлоклетъчен	39	48,8
Папиларен	20	25,0
Хромобобен	21	26,2
3. Диференциация /ISUP/		
G1	3	3,8
G2	28	35,0
G3	21	26,2
G4	7	8,8
Gx	21	26,2
4. Площ некроза		
Липсва /I група/	35	43,8
Под 10 % /II група/	16	20,0
Между 10-30 % /III група/	16	20,0
Над 30 % /IV група/	13	16,2
5. Тумор инфилтриращи лимфоцити /TILs/		
Липсват	50	62,5
Слабо изразени	21	26,3
Умерено изразени	9	11,2
Изразени	0	0
6. Съдова инвазия (LVI)		
Няма	47	58,8
Има	33	41,2
7. T стадий		
T1	35	43,8
T2	14	17,5
T3	26	32,5
T4	5	6,2
8. N стадий		
N0	19	23,8
N1	9	11,2
Nx	52	65,0
9. M стадий		
M0	3	3,7
M1	15	18,8
Mx	62	77,5
10. Локализация в бъбрека		
Ляв	42	52,5
Десен	38	47,5

При микроскопския анализ на папиларните и светлоклетъчни карциноми е определена и степен на диференциация (G) (фиг. 3), като е използвана ISUP системата, посочена в класификацията на СЗО от 2016 г. (Moch H et al. 2016) и от 2022 г. (Amin MB et al., 2022).

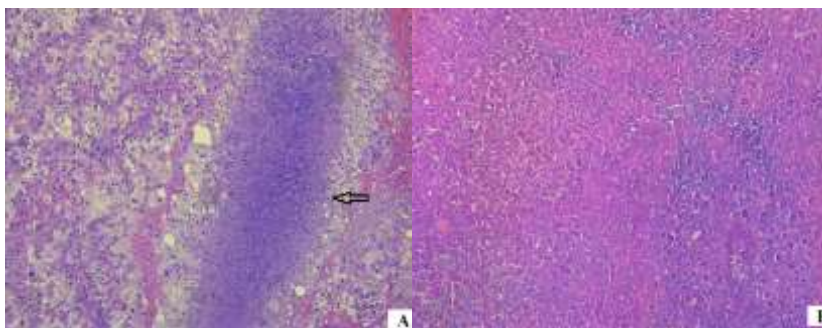


Фигура 3. Степени на диференциация на БКК по скалата на ISUP:

- А) G1 - Нуклеоли няма или са незабележими, ХЕ x 400;
 Б) G2 - Нуклеолите не са явни при увеличение 100; ХЕ x100;
 В) G3 - Нуклеолите са забележими и еозинофилни при 100 x; ХЕ x100,
 Г) G4- Ядрен плеоморфизъм, многоядрени клетки, рабдоидна диференциация, ХЕ x 400.

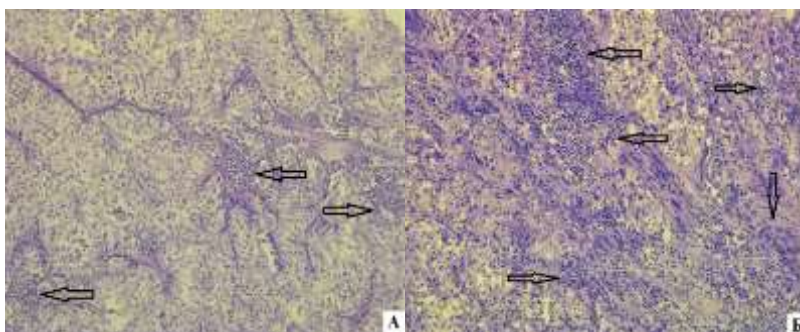
Ние установихме, че 3 (3,8%) случая имат диференциация G1, 28 (35,0%) случая G2, 21 (26,2%) случая G3 и 7 (8,8%) случая са с G4. Степен на диференциация не бе определена при 21 (26,2 %) случая на ХК, съгласно последните препоръки на СЗО (Amin MB et al., 2022), тъй като при този хистологичен вариант диференциацията няма прогностична стойност (Ohashi R et al., 2020).

По отношение на туморната некроза се установи, че в I-ва група попадат 35 (43,8%) от случаите, при които липсва некроза, във II-ра и III-та група по 16 (20%) пациента и в IV-та група - 13 (16,2 %) от случаите с БКК (фиг. 4 А и 4 Б).



Фигура 4. Видове некрози в туморната тъкан при БКК според площта им А/. Слабо изразена некроза, ХЕ x100; Б/. Умерено изразена некроза, ХЕ x100

При всички случаи на БКК бяха отчетени и TILs в туморната тъкан (фиг. 5А и фиг. 5Б). При 50 (62,5%) случая TILs липсват, при 21 (26,3%) са слабо изразени, при 9 (11,2%) от пациентите са умерено изразени и в нито един от случаите не са изразени (0%).



Фигура 5. БКК със А/ слабо изразена, ХЕ x 100 и Б/ умерено изразена инфилтрация от тумор-инфилтриращи лимфоцити, ХЕ x 100.

Ние установихме LVI в разнокалибрани съдове при 33 (41,2%) от случаите, докато LVI липсва в 47 (58,8%) от изследваните БКК.

БКК е един от най-добре васкуларизирани тумори, като характерна черта на СКК са разклонените, тънкостенни съдове между туморните гнезда и поради това не е изненадващо, че при тези тумори често се открива съдова инвазия (Delahunt B et al., 2013). БКК със съдова инвазия е с висока смъртност (Rodríguez-Cabello MA et al., 2017). По данни от литературата честотата на васкуларната инвазия варира между 16,7% и 29% (Lang H et al., 2004; Madbouly K et al., 2007). Различията в честотата е възможно да се дължат на различния брой пациенти, включвани в проучванията, както и на броя изследвани срези от всеки тумор.

Според Т-стадия на БКК, случаите се разпределят както следва: 35 (43,8%) случая са в стадий T1, 14 (17,5%) в T2, 26 (32,5%) в T3 и 5 (6,2%) в стадий T4 (табл. 2). Данните от проучването на Guo et al. (2019), включващо 41 138 оперирани пациенти с БКК сочат, че случаите в T1 стадий са 68,0%, в T2 са 10,4%, в T3 20,3% и в T4 са 1,3%. Получените от нас данни се различават от тези на Guo et al. (2019), което най-вероятно се дължи на селектираните случаи в настоящото изследване.

Анализирайки N стадия на БКК ние установихме, че при 52 (65,0%) пациента няма хистологично изследвани лимфни възли (Nx), при 19 (23,8%) случая няма метастази в лимфните възли (N0) и в 9 (11,2%) случая има метастази (N1).

В проучването на Guo et al. (2019) за БКК, в 96,8% от случаите липсват метастази (N0), а само в 3,2% има метастази в регионалните лимфни възли (N1).

По отношение на далечните метастази се установи, че за 62-ма (77,5%) от пациентите няма данни за далечни метастази и те са стадираны като Mx. При трима (3,7%) пациента няма метастази (M0), а при 15 (18,8%) има хистологично

верифицирани метастази (M1). Органи, в които има хистологично доказани далечни метастази са надбъбречна жлеза, мозък, прешлени, бял дроб, кожа, лигавица на венец, стернум, мускул.

По данни на Bianchi et al. (2012), едни от най-често срещаните локализации на далечни метастази при БКК са бял дроб, кости, черен дроб, надбъбречни жлези и мозък. Взети заедно нашите резултати и данните от литературата показват, че далечни метастази могат да се открият в различни органи на човешкото тяло.

Според локализацията на тумора установихме, че при 42-ма (52,5%) от пациентите туморът е локализиран в левия бъбрек и при 38 (47,5%) в десния бъбрек. В проучването на Guo et al. (2019) в 50,6% от случаите туморът е в десния, а в 49,4% в левия бъбрек. Според авторите (Guo S et al., 2019), десностранната локализация на БКК се асоциира с по-ранен стадий, с по-висока степен на диференциация и показва по-добра тумор асоциирана преживяемост в сравнение с локализация в левия бъбрек. Подобни зависимости при настоящото изследване не се анализираха поради подбора на изследваните пациенти.

4.2. Сравнителен анализ между различните клиничко-морфологични показатели при бъбречноклетъчен карцином

4.2.1. Зависимост между Т-стадия и клиничко-морфологичните показатели

Зависимост между Т стадия и диференциацията на тумора

Ние анализирахме Т-стадия на тумора във връзка с диференциацията на СКК и ПК и установихме значима зависимост ($\chi^2=21.278$, $p=0,017$). С цел проверка на получените резултати, ние разпределихме туморите в две групи по

отношение степента на диференциация, съответно на ниска степен на малигненост (G1 и G2) и висока степен на малигненост (G3 и G4) и отново ги съпоставихме с T-стадия (табл.3). Разликата отново е статистически значима ($\chi^2=10.897$, $p=0,012$). Прави впечатление, че с намаляване степента на диференциация се увеличава броят на карциномите в напреднал стадий - T3 и T4.

Таблица 3. *Разпределение на случаите с БКК според степента на диференциация спрямо T стадия.*

Група	T1	T2	T3	T4	Общо
G1,G2	18(58,1%)	5(16,1%)	7(22,6%)	1 (3,2%)	31(100%)
G3,G4	6 (21,4%)	3 (10,7%)	16(57,1%)	3(10,7%)	28(100%)
Общо	24 (40,7%)	8 (13,6%)	23(39,0%)	4 (6,8%)	59(100%)

Нашите данни не се различават от тези, получени от Спасова (2018) за метастатичен БКК. Тя установява статистически значима корелация между размера на тумора и високия ядрен грейд, определен по системата на Fuhrman в туморната тъкан. По-големите по размер тумори се асоциират с по-ниска диференциация (Спасова С, 2018).

Зависимост между T стадия и площта на некрозата

Статистически значима зависимост е установена между T-стадия и степента на разпространение на ТН ($\chi^2=25.148$, $p=0,003$) (табл.4). Високият T-стадий корелира с голяма по площ ТН.

Таблица 4. *Разпределение на случаите с БКК според Т-стадия спрямо степента на разпространение на ТН.*

Група	Липсва Некроза	Некроза под 10%	Некроза 10-30%	Некроза над 30%	Общо
T1	23(65,7%)	7 (20,0%)	1 (2,9%)	4 (11,4%)	35(100%)
T2	6 (42,9%)	4 (28,6%)	4 (28,6%)	0 (0,0%)	14(100%)
T3	6 (23,1%)	4 (15,4%)	9 (34,6%)	7 (26,9%)	26(100%)
T4	0 (0,0%)	1 (20,0%)	2 (40,0%)	2 (40,0%)	5 (100%)
Общо	35(43,7%)	16(20,0%)	16(20,0%)	13(16,3%)	80(100%)

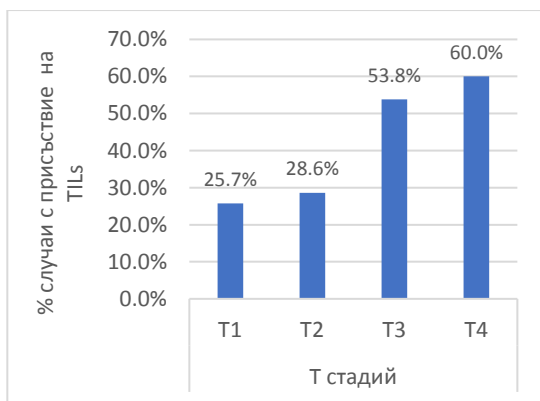
При БКК, Lam et al. (2005) също установяват, че степента на разпространение на некрозата в първичния тумор значително корелира с размера на тумора. Подобна зависимост между двата показателя е наблюдавана и от Спасова (2018). Авторът посочва, че между големината на тумора и разпространението на некрозите има статистически значима, права корелационна зависимост, но само в групата на неметастатичните БКК. В групата на метастатичните карциноми подобна зависимост не се установява (Спасова С, 2018). Leibovitch et al. (2001) също изследват некрозата при карцином на бъбрека, като откриват, че туморите с обширна некроза са със значително по-голям размер и при тях има по-често периренално и венозно ангажиране в сравнение с тумори без некроза. Според същите автори обширната ТН при БКК изглежда не е свързана с туморната биология, а по-скоро отразява връзката между размера и васкуларизацията на тумора (Leibovitch I et al., 2001).

Зависимост между Т стадия и тумор-инфилтриращи лимфоцити

Ние анализирахме Т-стадия на БКК спрямо четирите степени на интензивност на TILs в туморната тъкан и установихме статистически значима зависимост между двата

показателя ($\chi^2=13.515$, $p=0,036$). Зависимост беше установена също и при съпоставяне на Т-стадия и данните относно присъствието или липсата на TILs. Анализът на данните показва, че колкото по-голям е Т-стадия, толкова по-често присъстват TILs ($\chi^2= 5.873$, $p=0,015$) (фиг.6).

Нашите резултати се различават от тези, публикувани в литературата. В проучването на Fuchs et al. (2020), което включва 1034 КРК, TILs са разделени в три категории - ниска (0% до 10%), умерена (15% до 50%) и висока (55% до 100%). Сравнителният анализ между TNM-стадия и TILs, извършен чрез χ^2 тест показва, че по-интензивна инфилтрация с TILs се наблюдава при по-нисък TNM стадий на КРК. Различията между настоящото проучване и това на Fuchs et al. (2020) могат да се дължат, както на различните критерии при определяне на TILs, така и да са тъканно обусловени.

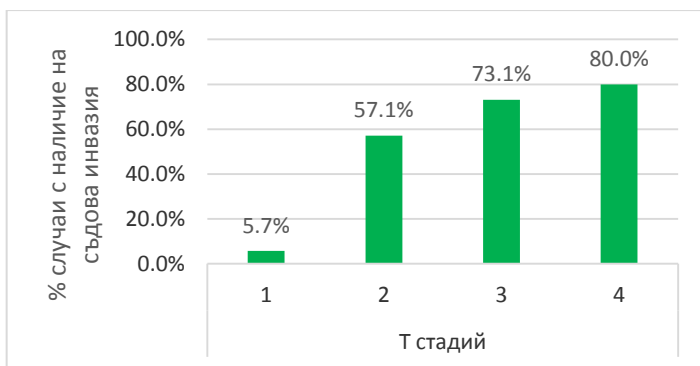


Фигура 6.
Зависимост
между Т-
стадия и
присъствието
на TILs при
случаите с БКК.

Зависимост между Т стадий и съдова инвазия

Ние установихме зависимост между Т стадия на изследваните пациентите с БКК и LVI в разнокалибренни съдове, като най-голяма честотата на случаите с LVI има при стадий Т4 ($\chi^2= 33.662$, $p<0,001$) (фиг.7).

Van Poppel et al. (1997) изследват 180 пациента с БКК след нефректомия. При тяхните пациенти, 51 (28,3%) са имали микроваскуларна инвазия, докато при 129 (71,7%) тя липсва при микроскопското изследване. Изследователите установяват значима статистическа зависимост между двата показателя: Т стадия и МВИ. При нито един от случаите в стадий Т1 и приблизително в една трета от тези в стадий Т2 няма МВИ, докато приблизително в 50% от случаите в стадий Т3 и Т4 има такава. Според Van Poppel et al. (1997) въпреки че данните показват по-голямо влияние на МВИ върху стадий Т2, отколкото Т3, те показват също, че микроскопската съдова инвазия е независим прогностичен фактор. Според същите авторите по-големите тумори имат по-често МВИ, отколкото тези с по-малки размери. При 121 от общо 129 пациента с БКК (94%), при които липсва микроскопска съдова инвазия няма прогресия на тумора, докато прогресия липсва само при 31 от 51 пациента (61%) със съдова инвазия (Van Poppel H et al., 1997).



Фигура 7. Зависимост между Т-стадия и LVI при пациенти с БКК.

Не се установи статистически значима зависимост между Т-стадия и останалите клинично-морфологични показатели като: възраст и пол на пациентите, хистологичен вариант, N и M – стадия и локализацията на БКК.

4.2.2. Анализ на туморната некроза във връзка с клинично-морфологичните показатели.

Зависимост между туморната некроза и хистологичния вариант на карцинома

Статистически значима зависимост се установи между степента на разпространение на ТН и хистологичния вариант на БКК ($\chi^2 = 18.632$, $p = 0.005$). Прави впечатление, че при ХК преобладават случаите, при които липсва ТН, докато при ПК случаите с липсваща некроза са най-малко на брой (табл.5).

При сравняване на собствените резултати с тези от друго проучване (Sengupta S et al., 2005) ние установихме, че има известни прилики в резултатите между двете изследвания. В проучването си Sengupta et al. (2005) включват 3009 БКК, като отчитат коагулационна ТН и я определят в две категории: липсва и присъства. Авторите съобщават, че при по-голяма част от случаите на ХК некроза липсва, което съответства на нашите резултати. При настоящото проучване преобладават СКК и ПК с ТН (табл. 5), докато в изследването на Sengupta et al. (2005), в малко повече от половината случаи на СКК (72%) и ПК (53%), некроза липсва. Нашите данни се различават и от други проучвания (Pichler M et al., 2012). Pichler et al. (2012) също изследват ТН при БКК и установяват, че тя се среща в 33.9% от изследваните 2,285 случая, като преобладават случаите на СКК и ПК без ТН, докато при настоящото изследване преобладават тези, при които присъства некроза. Присъствието на ТН е

независим предиктор за общата преживяемост при пациентите със СКК и ПК (Pichler M et al., 2012).

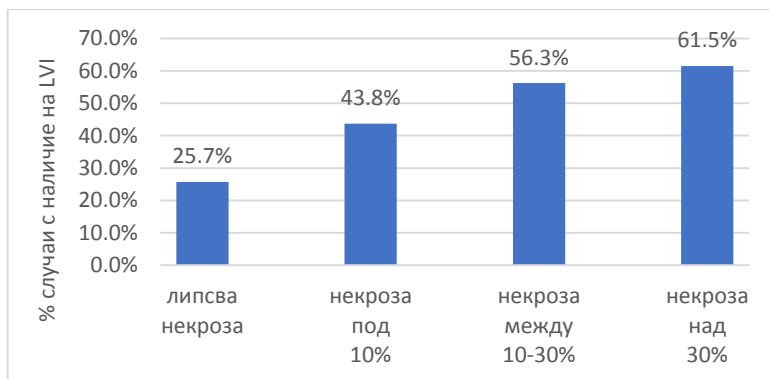
Таблица 5. *Разпределение на пациентите с БКК според хистологичния вариант на тумора спрямо разпространението на ТН.*

Група	Липсва Некроза	Некроза <10%	Некроза между 10-30%	Некроза >30%	Общо
ПК	4 (20,0%)	5 (25,0%)	3 (15,0%)	8 (40,0%)	20 (100%)
ХК	15 (71,4%)	2 (9,5%)	3 (14,3%)	1 (4,8%)	21 (100%)
СКК	16 (41%)	9 (23,1%)	10 (25,6%)	4 (10,3%)	39 (100%)
Общо	35 (43,7%)	16 (20,0%)	16 (20,0%)	13 (16,3%)	80 (100%)

Зависимост между туморна некроза и съдова инвазия при пациентите с БКК

Ние установихме зависимост между степента на разпространение на ТН и васкуларната инвазия. Колкото площта на ТН е по-голяма, толкова по-голяма е честотата на случаите с LVI ($\chi^2=6.843$, $p=0,009$) (фиг. 8).

Получените от нас резултати не се различават от тези публикувани от Pichler et al. (2012) в проучването им за БКК. Авторите установяват статистически значима зависимост между ТН и съдовата инвазия при СКК и ПК. Подобна зависимост между ТН и съдовата инвазия е установена и от Klatte et al. (2009) при СКК. С увеличаване на степента на некротата се увеличава и съдовата инвазия.



Фигура 8. Зависимост между площта на ТН и наличието на LVI при пациенти с БКК.

Зависимост между туморната некроза и локализацията на БКК

Ние анализирахме степента на разпространение на ТН във връзка с локализацията на тумора и установихме значима статистическа зависимост ($\chi^2=9.253$, $p=0,026$). В десният бъбрек се наблюдават повече случаи с некроза над 30% в сравнение с левия (табл.6).

Таблица 6. Разпределение на пациентите с БКК по локализацията на тумора в бъбрека според разпространението на ТН.

Група	Липсва Некроза	Некроза <10%	Некроза 10-30%	Некроза >30%	Общо
Ляв	19 (45,2%)	6 (14,3%)	13 (31,0%)	4 (9,5%)	42 (100%)
Десен	16 (42,1%)	10 (26,3%)	3 (7,9%)	9 (23, 7%)	38 (100%)
Общо	35 (43,7%)	16 (20,0%)	16 (20,0%)	13 (36,3%)	80 (100%)

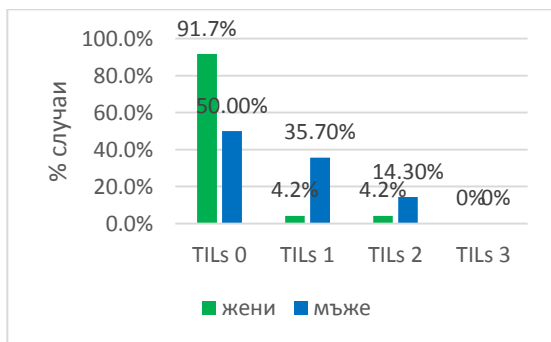
Площта на туморна некроза не корелира с възрастта, пола, TILs и N и М-стадия на пациентите с БКК.

4.2.3. Анализ на тумор-инфилтриращите лимфоцити и съдовата инвазия във връзка с клинично-морфологичните показатели

Зависимост между тумор-инфилтриращите лимфоцити и пола на пациентите

Анализирахме TILs във връзка с пола на пациентите, включени в проучването (фиг.9). Установи се статистически значима зависимост ($\chi^2 = 12.565$, $p=0,002$), като при почти 92% от туморите в женския пол няма TILs, докато при мъжкия пол този дял е 50%.

Нашите резултати се различават от тези наблюдавани при КРК (Fuchs TL et al., 2020). Авторите не установяват зависимост между TILs в туморната тъкан и пола на пациентите.



Фигура 9.
*Зависимост
между TILs и пола
на пациентите с
БКК.*

TILs не показват зависимост от възрастта, хистологичният вариант, съдовата инвазия, N и М-стадия и локализация на БКК.

Съдовата инвазия не корелира със следните клинично-морфологични показатели: възраст, пол, хистологичен вариант, разпространение (N и М-стадий) и локализация на БКК.

4.2.4. Анализ на степента на диференциация във връзка с клинико-морфологичните показатели

Зависимост между степента на диференциация и хистологичния вариант на БКК

На таблица 7 са представени данните за разпределението на пациентите спрямо четирите степени на диференциация по системата ISUP според хистологичния вариант на БКК. Сравнителният анализ показва статистически значима зависимост между показателите ($\chi^2 = 8.634$, $p = 0.035$). Прави впечатление, че при ПК липсват тумори с диференциация G1 и G4, докато при СКК има повече тумори с ниска степен на диференциация (G3 и G4).

Нашите данни се различават от тези на Bretheau et al. (1995), които не установяват зависимост между степента на диференциация определена по системата Fuhrman и хистологичния вариант на тумора. Разликата между настоящото и проучването на Bretheau et al. (1995) е възможно да се дължи на селектираните пациенти при настоящото изследване и/или използваните различни системи за диференциация.

Таблица 7. Разпределение на случаите с БКК по хистологичен вариант според степента на диференциация.

Група	G1	G2	G3	G4	Общо
ПК	0 (0,0%)	14 (70,0%)	6 (30,0%)	0 (0,0%)	20 (100%)
СКК	3 (7,7%)	14 (35,9%)	15 (38,5%)	7 (17,9%)	39 (100%)
Общо	3 (5,1%)	28 (47,4%)	21 (35,6%)	7 (11,9%)	59 (100%)

Зависимост между степента на диференциация и съдовата инвазия при БКК

Между степента на диференциация на СКК и ПК и LVI се установи статистически значима разлика ($\chi^2 = 14.130$, $p=0,003$) (табл.8). С намаляване степента на диференциация на тумора се увеличава вероятността за присъствие на инвазия в съдовете.

Таблица 8. *Разпределение на случаите с БКК според LVI спрямо степента на диференциация.*

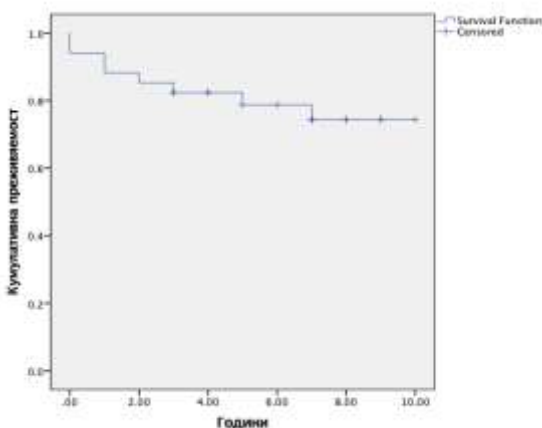
Група	G1	G2	G3	G4	Общо
Няма LVI	3 (9,1%)	21 (63,6%)	8 (24,2%)	1 (3%)	33 (100%)
Има LVI	0 (0,0%)	7 (26,9%)	13 (50,0%)	6 (23,1%)	26 (100%)
Общо	3 (5,1%)	28 (47,5%)	21 (35,6%)	7 (11,8%)	59 (100%)

Bedke et al. (2018) съобщават за резултати, подобни на настоящите. Те изследват МВИ и лимфоваскуларната инвазия (ЛВИ) при 747 случая на БКК, като установяват инвазия в 201 от тях. Авторите намират значима зависимост между МВИ и ЛВИ и степента на диференциация определена по системата на Fuhrman, като инвазията се асоциира с по-ниска диференциация на тумора (Bedke J et al., 2018). Според Bedke et al. (2018) МВИ и ЛВИ са лоши прогностични фактори при бъбречния карцином.

Степента на диференциация на БКК не корелира с възрастта и пола на пациентите, площта на туморна некроза, TILs, N и М-стадия и локализация на тумора.

4.3. Преживяемост на пациентите с бъбречноклетъчен карцином

От изследваните 80 пациента, информация за преживяемост има при 34-ма пациенти, от които 26 са живи към януари 2022 година, а 8 са починали. Средната преживяемост за периода на проследяване на тези пациенти е 8,1 години (95% ИД 6.96-9.30). На фигура 10 е представена кривата на Kaplan Meier за преживяемостта на пациентите с БКК.



Фигура 10.

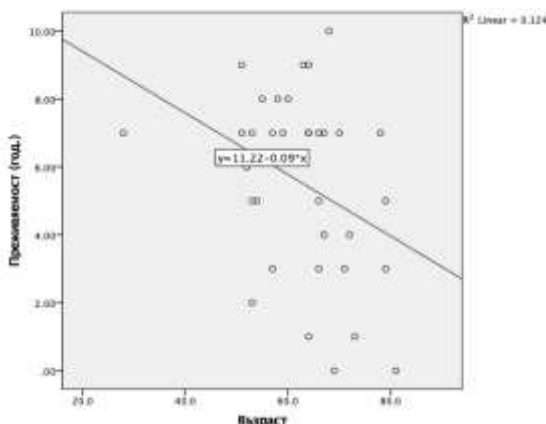
Крива на кумулативната преживяемост на пациентите с БКК.

Ние анализирахме преживяемостта на пациентите с БКК във връзка с различните клинико-морфологични показатели.

Зависимост между преживяемостта и възрастта на пациентите с БКК

Проучвайки преживяемостта във връзка с възрастта на изследваните пациенти се установи слаба обратно пропорционална зависимост ($r = -0,352$, $p = 0,041$) между двете променливи. Данните сочат, че колкото са по-възрастни пациентите, толкова повече намалява вероятността за преживяемост към 2022 г. (фиг.11).

По данни на други автори (Feng X et al., 2019) при СКК, общата преживяемост на пациентите намалява значително с напредване на възрастта при поставяне на диагнозата. Подобни резултати са получени и от други автори при СКК (Liao Z et al., 2022).



Фигура 11.
Корелация между преживяемост и възраст на пациентите с БКК.

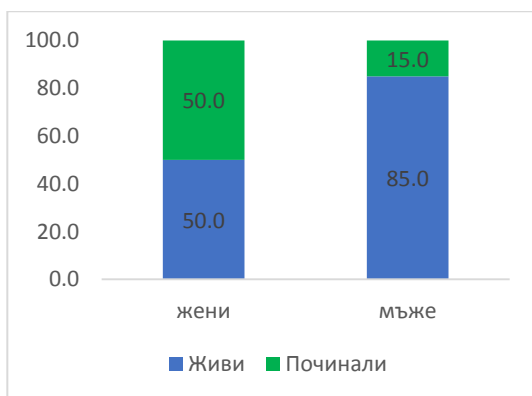
Зависимост между преживяемостта и пола на пациентите с БКК

Ние установихме, че има разлика между преживяемостта между двата пола ($p=0,044$) (фиг. 12). Средната преживяемост за мъжете е 8,7 г. (95% ИД от 7,43 до 9,89), а при жените 5,1 г. (95% ИД от 3,15 до 7,10). Данните сочат, че преживяемостта при мъжете е по-висока от тази при жените.

Нашите резултати се различават от данните, получени при други изследвания. Chang et al. (2011) отчитат, че при изследваните 328 случая с БКК пет годишната обща преживяемост за жените е 79,5% , а за мъжете 73,7%. Причините за тези различия могат да бъдат свързани с различния брой пациенти включени в двете изследвания и/или различната

продължителност на проследяване. Feng et al. (2019) също отчитат, че при СКК общата преживяемост при жените е значително по-висока от тази при мъжете (средна преживяемост за жени: 156 месеца, а за мъже: 132 месеца).

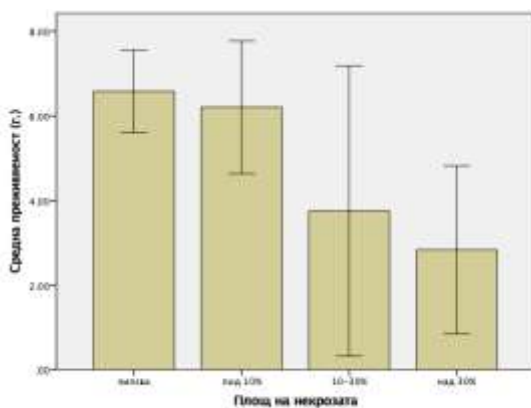
Резултатите от настоящото проучване се различават и от резултатите на Спасова (2018). Тя анализира преживяемостта на пациентите с метастатичен БКК и пола и не установява статистически значима зависимост между два показателя: пол на пациентите и месеци на преживяемост.



Фигура 12.
Преживяемост на пациентите с БКК в зависимост от пола.

Зависимост между преживяемостта и степента на разпространение на туморната некроза

При анализа на преживяемостта на пациентите с БКК във връзка със степента на разпространение на ТН, установихме статистическа значима зависимост ($F=4,815$, $p=0,007$). Средната преживяемост на пациентите е различна в зависимост от разпространението на некротата. Колкото площта на некротата е по-голяма, толкова по-малка е преживяемостта на пациентите (фиг.13).



Фигура 13.
Средна
преживяемост на
пациентите с
ББК във връзка с
ТН и площта на
нейното
разпространение.

Според Sengupta et al. (2005), присъствието на коагулационна ТН има различно прогностично значение при СКК, ПК и ХК. При пациенти със СКК и ХК, 10-годишната специфична за карцинома преживяемост е съответно 77,6% и 90,0% при липса на ТН, но само 29,2% и 68,3%, когато присъства. Независимо от по-високото разпространение на коагулационна ТН в ПК и връзката ѝ с някои неблагоприятни морфологични белези, тя няма прогностично значение. 10-годишната тумор-специфична преживяемост е 85,4% и 88,9% за пациенти с и без некроза (Sengupta S et al., 2005).

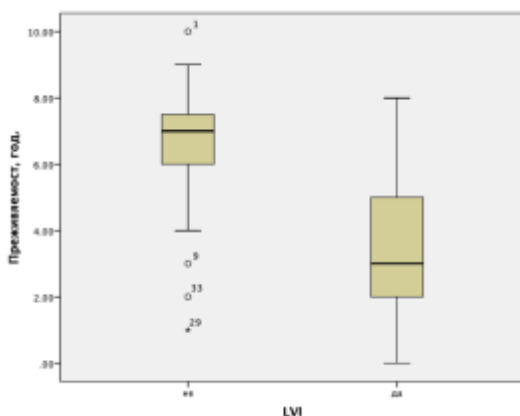
При метастатичен ББК, Спасова (2018) съобщава, че най-висока е средната обща преживяемост на пациентите, при които липсва туморна некроза (46,06 мес.), като тези средни стойности намаляват с появата на некроза и с увеличаване на нейната площ. Въпреки тази тенденция, Спасова (2018) не установява статистически значима зависимост между туморната некроза и смъртността на пациентите.

В проучването си Lam J et al. (2005) намират, че при пациенти с некроза в туморната тъкан на първичния ББК се наблюдава по-ниска 5-годишна специфична за заболяването преживяемост в сравнение с пациенти без некроза в първичния тумор (36% спрямо 75%). При пациенти с некроза в сравнение с

пациенти без некроза в първичния тумор при локализиран БКК е установена значително по-ниска 5-годишна преживяемост без заболяване (62% спрямо 92%).

Зависимост между преживяемостта и съдовата инвазия при БКК

Ние установихме статистически значима зависимост между преживяемостта и LVI ($p=0,001$) при изследваните 34 пациента. Преживяемостта на пациентите, при които липсва LVI е по-висока (фиг. 14).

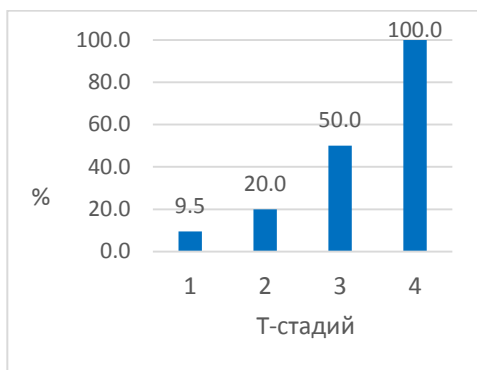


Фигура 14.
*Преживяемост
на пациентите
с БКК във
връзка с LVI.*

Bedke et al. (2018) също намират значителна зависимост между МВИ и специфичната за карцинома преживяемост при пациентите със СКК. Те установяват, че микроваскуларната, а не макроваскуларната съдова инвазия е независим предиктивен фактор за метастатичното разпространение на тумора. Според други автори МВИ е независим предиктивен показател за рецидив на заболяването и е най-важният фактор, свързан с леталния изход на пациентите с БКК (Dall'Oglio MF et al., 2007).

Зависимост между преживяемостта и Т-стадия на БКК

Ние установихме статистическа значима зависимост между вероятния риск за настъпване на летален изход в проследявания период и Т стадия на изследваните 34 пациенти. С увеличаване на стадия се увеличава и риска за настъпване на летален изход ($\chi^2=11.161$, $p=0,011$) (фиг.15).



Фигура 15.
*Зависимост
между риска за
настъпване на
летален край и Т-
стадия на БКК .*

В литературата има публикувани данни за значима асоциация между тези два показателя. В своето проучване за БКК, Chang et al. (2011) проследяват изследваните пациенти за период средно от 46,5 месеца. Според техните данни, преживяемостта е 82,3% в стадий T1, 84,5% в T2, 57,5% в T3 и 0,0% съответно в стадий T4. Според авторите TNM стадия и TN са най-важните прогностични фактори за общата преживяемост на пациентите с БКК. Liao et al. (2022) установяват при СКК зависимост между двете приживяемости: специфичната за карцинома и общата преживяемост от една страна и TNM стадия от друга.

В проучването си, Спасова (2018) извършва сравнителен анализ на Т-стадия и общата преживяемост при пациенти с метастатичен БКК. Доказва, че размерите на карцинома са от

категорично прогностично значение по отношение на общата преживяемост, като установява достоверна разлика в общата преживяемост при различните размери на тумора. Според данните, най-много са починалите пациенти с метастатичен БКК, които по време на поставяне на диагнозата са били в стадий Т3 – 15 случая (50%). Най-висока обща преживяемост – $20,66 \pm 15,52$ месеца се наблюдава при пациенти в стадий Т2, която според автора (Спасова С, 2018), е изненадващо по-голяма от пациентите със стадий Т1 ($18,50 \pm 12,46$). Най-ниска е общата преживяемост при пациентите в стадий Т4 – $10,00 \pm 9,59$ месеца, докато при стадий Т3 е $14,80 \pm 12,64$ месеца (Спасова С, 2018).

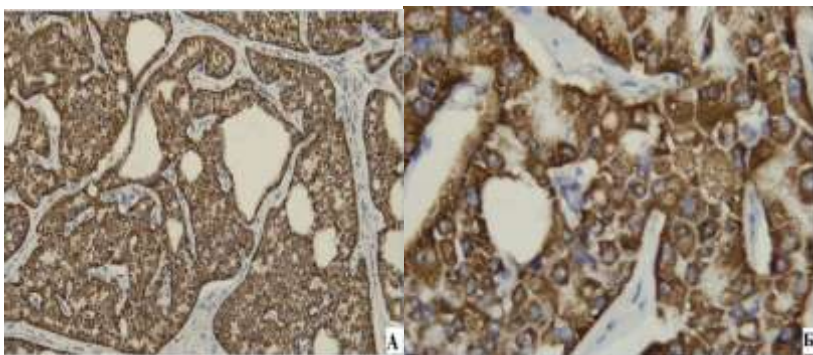
Преживяемостта при пациентите с БКК не корелира с хистологичния вариант, степента на диференциация, TILs и локализацията на карцинома.

4.4. Експресия на AIF в туморната тъкан на БКК, в съседната нетуморна тъкан и в далечните метастази.

Експресия на AIF в туморната тъкан при БКК

Цитоплазмената и ядрена експресия (фиг. 16А и фиг. 16Б) на AIF беше изследвана в туморната тъкан на всички 80 пациенти. Средната стойност на цитоплазмената експресия определена чрез H-score е 168,3 (SD=36,88), като минималната стойност е 95, а максималната 250. Средната стойност на ядрената експресия на AIF е 2,1 (SD=10,57), като минималната стойност е 0, а максималната 85.

Стойностите, получени при настоящото проучване се различават от други, публикувани в литературата (Jeong EG et al., 2006; Krasnik V et al., 2017). Причината може да е тъканно обусловена и/или да се дължи на използваните различни методи за отчитане на експресията на AIF.



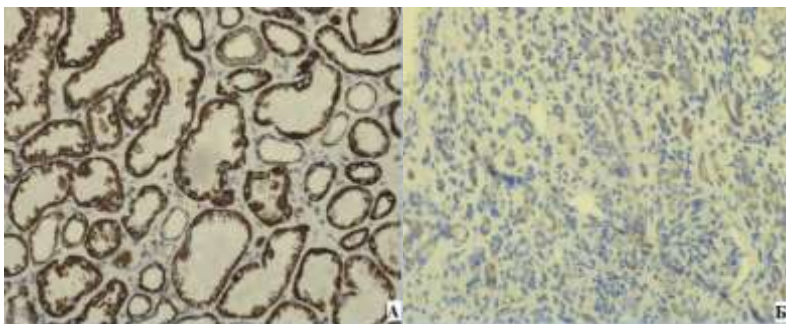
Фигура 16. *А/ Висока цитоплазмена и липсваща ядрена експресия на AIF в БКК, x 100; Б/ Висока цитоплазмена и липсваща ядрена експресия на AIF в БКК x 400.*

В проучването на Krasnik et al. (2017) са включени 54 пациенти с увеален меланом като цитоплазмената експресия на AIF е определена като процент на позитивни клетки по скала от 1 до 6 (1=1-4%; 2=5-19%; 3=20-39%; 4=40-59%; 5=60-79%; и 6=80-100%). Интензивността на положително оцветяване на клетките е оценена от 0 до 3 (0 - без оцветяване; 1 - слабо; 2 - умерено; и 3 - оцветяване). Мултипликативният скор се получава като се умножи процента на позитивни клетки по интензивността на оцветяване и полученият резултат варира между 0 – минимална стойност и 18, максимална стойност. Тридесет и трима (67 %) от пациентите са със скор ≥ 4 . Липсва нуклеарна експресия.

В изследването си Jeong et al. (2006) определят цитоплазмената експресия на AIF в клетките при КРК. При всички 103 пациенти е установена позитивна реакция. Авторите прилагат тристепенна скала за оценка: +; ++ и +++ и установяват, че в 20 случая интензитетът е леко изразен (+), в 30 е умерено изразен (++) и в 53 случая е силно изразен (+++).

Експресия на AIF в съседната нетуморна тъкан

При 40 от пациентите в настоящото проучване е определена цитоплазмената експресия на AIF в епителните клетки на бъбречните тубули в съседната нетуморна тъкан (фиг.17). Средната стойност на цитоплазмената експресия на AIF в нетуморната тъкан е 172,7 (SD=46,14) като минималната е 100, а максималната е 280, докато средната стойност на цитоплазмената експресия в туморната тъкан при тези 40 пациента е 168,8 (SD=38,03).



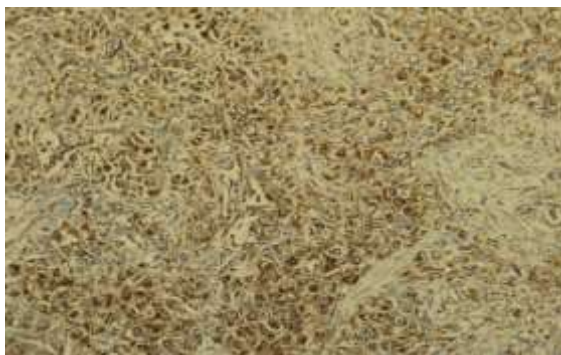
Фигура 17. А/ Висока цитоплазмена експресия на AIF в съседната нетуморна тъкан, x 200; Б/ Ниска цитоплазмена експресия на AIF в съседната нетуморна тъкан, x 100.

Средните стойности на експресия в нормалната и туморната тъкан при настоящото проучване са приблизително еднакви. Получените от нас резултати се различават от други публикувани в литературата данни (Wang Z et al., 2019). Wang et al. (2019) изследват експресия на AIF в туморната и в съседната нетуморна тъкан при 96 случая на БКК. Авторите определят общ скор, като сума от средния процент на положителните клетки по следната скала: $\leq 5\%$ - 0 точки; 6–25% - 1 точка; 26–50% - 2 точки; 51–75% - 3 точки; и $> 75\%$ - 4 точки и интензитета на реакцията, определен в четири категории от

липсващо оцветяване – 0 точки до тъмнокафяво – 4 точки. Получената сума е определена като: негативна (0–2) или отрицателна; слабо позитивна (3–5) и силно позитивна (6–8). В туморната тъкан стойностите на AIF са значително по-ниски в сравнение с нормалната бъбречна тъкан, в която е отчетена интензивна реакция (Wang Z et al., 2019).

Експресия на AIF в далечните метастази

При 15 от изследваните в настоящото проучване пациенти има хистологично верифицирани далечни метастази (pM1) с различна локализация. Ние определихме цитоплазмената експресия (фиг. 18) на AIF в 14 от метастазите и получихме средна стойност от 147,5 (SD=46,51), като минималната стойност е 65, а максималната 215. Средната стойност на AIF при първичните БКК е 151,8, минималната 95, а максималната 225.



Фигура 18.
*Експресия на
AIF в
цитоплазмата
на туморните
клетки от
метастаза на
БКК в бял дроб,
x 200.*

4.4.1. Сравнителен анализ между средните стойности на експресията на AIF в туморната тъкан и съседната, нетуморна тъкан.

При анализиране на средните стойности на цитоплазмената експресия на анти тялото за апоптоза в

туморните и нетуморните клетки (табл. 9) не се установи статистически значима зависимост ($p=0,627$). Получените от нас резултати показват, че апоптозата в туморната тъкан на БКК, която може да се индуцира от AIF не е потисната.

Таблица 9. Средни стойности на цитоплазмената експресия на AIF в туморната тъкан на БКК и в съседната нетуморна тъкан.

Група	Брой случаи, n	Средна стойност на цитоплазмената експресия на AIF	Стандартно отклонение (SD)	P-value
В туморни клетки	40	172,7	46,14	0,627
В нетуморни клетки	40	168,8	38,03	

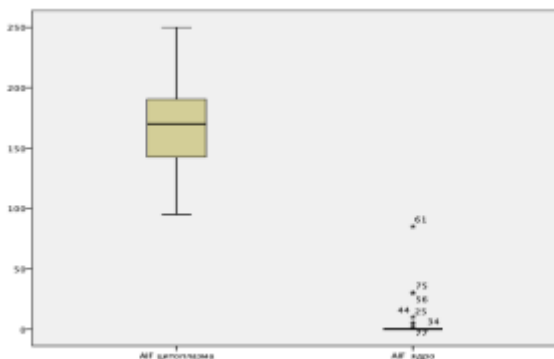
Wang et al. (2019) определят AIF при БКК имунохистохимично и чрез RT-qPCR и установяват, че апоптозоиндуциращият фактор е сигнификантно по-нисък в туморната тъкан в сравнение с нормалната тъкан. Според авторите понижена експресия на AIF е свързана с бъбречната туморогенеза. Общата преживяемост на пациентите, проследени постоперативно в рамките на 6 до 118 месеца показва, че при негативна експресия преживяемостта е по-ниска в сравнение с пациентите с позитивна експресия (Wang Z et al., 2019).

Освен при БКК, ниска експресия на AIF е установена и при други тумори. Letkovska et al. (2021) изследват цитоплазмената експресия на AIF при 216 тестикуларни тумори и съобщават, че експресията в сперматогенните клетки на нетуморната тестикуларна тъкан е сигнификантно по-висока в сравнение с тази в туморните клетки.

При други тумори като стомашен карцином се наблюдава повишена експресия на AIF в туморната тъкан. Lee et al. (2006) изследват цитоплазмената експресия на AIF в туморната и нетуморната тъкан при 60 случая на стомашен карцином. Те използват тристепенна скала за оценка на имунохистохимичната реакция: -, + и ++. Позитивна експресия е установена при 42 от случаите, докато в нормалната стомашна мукоза има позитивност само в париеталните клетки. Негативни са също стромалните клетки, фибробластите и гладкомускулните клетки. Според Lee et al. (2006) повишената експресия на AIF не зависи от хистологичния тип и дълбочината на инвазия на стомашния карцином. Според същите автори, увеличената експресия на маркера за апоптоза в туморните, в сравнение с нормалните мукозни клетки, предполага, че AIF експресията може да играе роля в стомашната туморогенеза (Lee JW et al., 2006).

4.4.2. Сравнителен анализ между цитоплазмената и ядрената експресия на AIF в туморната тъкан

Анализирайки средните стойности на цитоплазмената с ядрената експресия на AIF е отчетена статистически значима разлика, като стойностите на цитоплазмена експресия са значително по-високи в сравнение с тези на ядрената експресия на антитялото в туморните клетки на БКК ($p < 0,001$) (фиг. 19).



Фигура 19.
Зависимост
между
цитоплазмена-
та и ядрена
експресия на AIF
в туморните
клетки на БКК.

4.4.3. Сравнителен анализ между цитоплазмената експресия на AIF в първичния тумор и далечните метастази

При сравнителното изследване на цитоплазмената експресия на AIF в първичния тумор с тази в далечните метастази не се установи сигнификантна разлика между средните стойности ($p=0,737$) (табл.10).

Таблица 10. Средни стойности на цитоплазмена експресия на AIF в туморните клетки на първичния БКК и в далечните метастази.

Група	Брой случай, n	Средна стойност на цитоплазмена експресия на AIF	Стандартно отклонение (SD)	P-value
AIF първичен тумор	14	151,8	36,43	0,737
AIF метастаза	14	147,5	46,51	

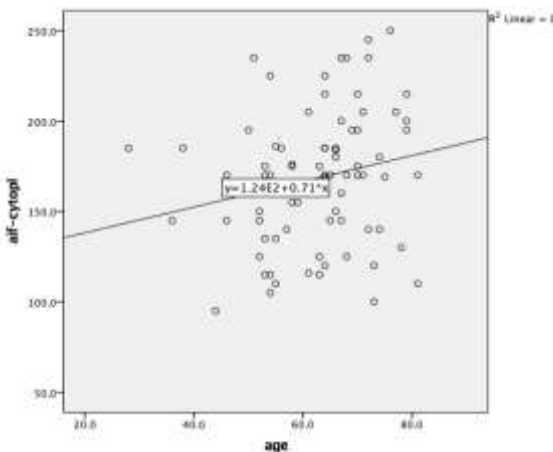
Подобни на нашите резултати, че липсва зависимост между експресията на AIF в първичния тумор и далечните

метастази са установени и при други тумори: КРК и стомашен карцином (Jeong EG et al., 2006; Lee JW et al., 2006). Letkovska et al. (2021) анализират експресията на AIF в туморната тъкан при герминативноклетъчни тестикуларни тумори и установяват понижена експресия на AIF в сравнение с нетуморната тъкан. Пациентите с по-авансирало заболяване (пациенти с три или повече метастази, метастази в медиастинални лимфни възли, чернодробни метастази или други небелодробни висцерални метастази) имат по-ниско ниво на AIF в туморната тъкан в сравнение с пациентите с добра/интермедиерна прогноза и по-малко авансирало заболяване. Обаче, тези разлики са статистически незначими с изключение на пациенти с небелодробни висцерални метастази, които имат ниска експресия на AIF в сравнение с тези, при които липсват подобни метастази (Letkovska K et al., 2021). Според авторите понижаването на AIF може да представлява един от механизмите на инхибиране на апоптозата с последващо улесняване на клетъчното оцеляване и метастазиране (Letkovska K et al., 2021).

4.5. Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на AIF при БКК в зависимост от клинично-морфологичните показатели и преживяемостта на пациентите

Зависимост между цитоплазмената експресия на AIF и възрастта на пациентите

Статистическа зависимост между показателите: цитоплазмена експресия на AIF и възраст на пациентите липсва ($F=2,513$, $p=0,088$). При повторно тестване на двата показателя чрез корелационния метод на Spearman се отчете слаба значима зависимост ($\rho=0,23$, $p=0,039$) (фиг.20). Стойностите на AIF с напредване на възрастта се повишават.



Фигура 20.
Зависимост
между
цитоплазмената
експресия на AIF
в туморната
тъкан на БКК и
възрастта на
пациентите.

Липса на зависимост между цитоплазмената експресия на AIF и възрастта на пациентите е наблюдавана не само при СКК (Xu S et al., 2014), но и при КРК (Jeong EG et al., 2006) и стомашен карцином (Lee JW et al., 2006). Не всички автори не намират зависимост между двата показателя при БКК. Получените от нас резултати се различават от тези на Wang Z et al. (2019) при БКК. Честотата на положителната експресия на AIF при пациенти на възраст <60 години е по-висока от тази при пациентите на възраст ≥ 60 години.

Зависимост между цитоплазмената експресия на AIF и хистологичния вариант на тумора

Цитоплазмената експресия на AIF във връзка с хистологичния вариант на БКК беше анализирана чрез дисперсионен анализ. Значима зависимост се установи само между два от вариантите БКК: ПК и СКК ($p=0,003$). Средната стойност на експресия в групата на ПК е 185,0 и е по-висока от тази в групата на светлоклетъчните, при които е 154,6. На таблица 11 са посочени средните стойности на цитоплазмена експресия на AIF според хистологичния вариант на карцинома.

Таблица 11. Средни стойности на цитоплазмената експресия на AIF според хистологичния вариант на БКК.

Хистологичен вариант	Брой случаи, n	Средна стойност на цитоплазмената експресия на AIF	Стандартно отклонение (SD)
ПК	20	185,0	42,17
ХК	21	177,8	25,15
СКК	39	154,6	34,90

При стомашен карцином цитоплазмената експресията на AIF в туморните клетки не показва зависимост от хистологичния тип (интестинален и дифузен) (Lee JW et al., 2006). При ГКТ на тестиса, Letkovska et al. (2021) съобщават, че експресията на AIF е значително по-висока при несеминомните в сравнение със семиномите тумори.

Зависимост между цитоплазмената експресия на AIF и съдовата инвазия

Анализирайки експресията на AIF в цитоплазмата на туморните клетки във връзка с LVI, ние установихме статистически значима зависимост ($p=0,014$). Стойностите на цитоплазмената експресия са по-високи, когато липсват туморни емболи, докато те са по-ниски, когато те присъстват (табл. 12).

Таблица 12. Зависимост между средните стойности на цитоплазмена експресия на AIF и LVI при БКК.

Съдова инвазия	Брой случаи, n	Средни стойности на цитоплазмена експресия на AIF	Стандартно отклонение (SD)	P-value
Има	33	156,4	39,33	0,014
Няма	47	176,7	32,96	

Зависимост между цитоплазмената експресия на AIF и T стадия на БКК

Чрез дисперсионен анализ се анализира експресията на AIF в цитоплазмата на туморните клетки във връзка с различните T стадии. Ние установихме статистически значима разлика между два от T стадията: T1 и T3 ($p=0,001$) (табл. 13). При по-малък размер на тумора, експресията на апоптозния маркер е по-висока за разлика от туморите с по-големи размери, където експресията намалява.

Таблица 13. Средни стойности на експресия на AIF в цитоплазмата на туморните клетки спрямо T стадия на БКК.

T-стадий	Брой случаи, n	Средни стойности на цитоплазмената експресия на AIF	Стандартно отклонение (SD)
T1	35	184,6	31,97
T2	14	169,9	30,44
T3	26	147,7	37,44
T4	5	157,0	34,02

В едно друго проучване върху експресията на AIF при БКК също е установена статистически значима разлика във връзка с T-стадия (Wang Z et al., 2019). Авторите посочват, че по отношение на клиничния T стадий, AIF позитивна експресия в стадий T3 на карцинома е сигнификантно по-ниска от тази в стадий T1. В друго проучване, включващо само светлоклетъчен БКК не е установена зависимост между експресията на AIF и размера на тумора (Xu S et al., 2014). Причините за тези различия не са известни.

Не установихме статистически значима зависимост между цитоплазмената експресия на AIF и следните клинично-морфологични показатели: пол на пациентите, степен на диференциация, степен на разпространение на туморната

некроза, TILs, N- и M-стадия, локализацията на карцинома, както и с преживяемостта на пациентите с БКК.

4.6. Сравнителен анализ на нуклеарната експресия на AIF в зависимост от клинично-морфологични характеристики на тумора и преживяемостта на пациентите с БКК

Нуклеарната експресия на AIF при бъбречноклетъчен карцином не корелира с никой от изследваните клинично-морфологични показатели: възраст, пол, хистологичен вариант, степен на диференциация на карцинома, туморна некроза, TILs, LVI, T, N и M стадия, локализацията на тумора и преживяемост на пациентите.

В достъпната ни литература не се откриха много данни, оценяващи имунохистохимичната нуклеарна експресия на AIF във връзка с клинично-морфологичните показатели при БКК. С акцент върху нуклеарната експресия на AIF е изследването на Krasnik et al. (2017) върху увеален меланом и връзката на нуклеарната експресия с прогнозата на пациентите. Авторите съобщават, че те не откриват подобна локализация на AIF независимо, че той постоянно присъства в цитоплазмата на туморните клетки.

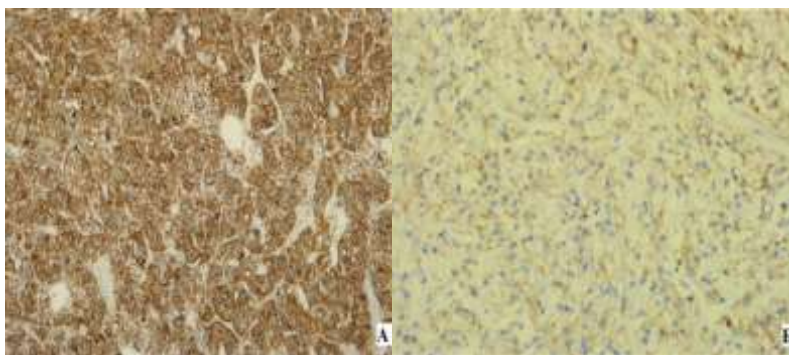
Субклетъчната локализация на AIF при БКК е проучена от Wang et al. (2019) чрез имунофлуоресценция. В нетуморната тъкан AIF по-често присъства в митохондриите, отколкото в ядрото. В туморната тъкан нуклеарната експресия се повишава, докато митохондриалната намалява и тези промени са асоциирани със степента на диференциация на БКК. Най-висока нуклеарна експресия има при G4 на тумора и най-ниска при G1. Обратно, митохондриалната експресия е най-висока при G1 на тумора и с понижаване на степента на диференциация тя също намалява (Wang Z et al., 2019). Според авторите тези резултати внушават, че AIF претърпява нуклеарна транслокация в

тъканите на БКК и тя зависи от степента на диференциация на тумора (Wang Z et al., 2019).

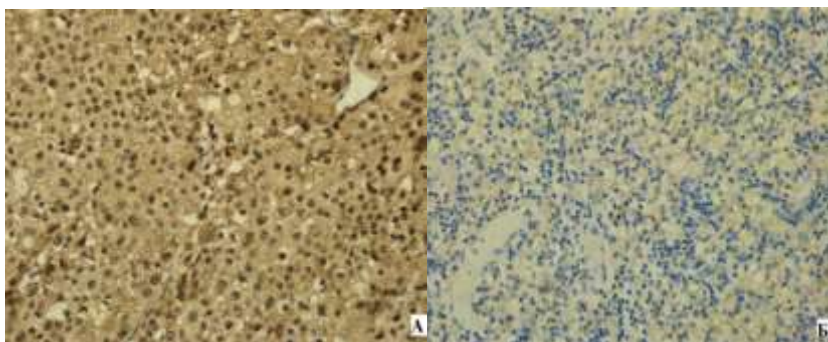
4.7. Експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БКК, в съседната нетуморна епителна тъкан и в далечните метастази

Цитоплазмената (фиг. 21) и ядрената експресия на RIPK3 (фиг. 22) беше изследвана в туморната тъкан на всички 80 пациенти. Средната стойност на цитоплазмената експресия на RIPK3, определена чрез H-score е 137,1 (SD=43,96) като минималната стойност е 0, а максималната е 285. Средната стойност на ядрената експресия на RIPK3 е 27,9 (SD=46,89) като минималната стойност е 0, а максималната е 195.

Средната стойност на цитоплазмената експресия в настоящото проучване се различава от средната стойност на цитоплазмената експресия на RIPK3 при мамарен карцином ($119,6 \pm 56,4$), определена също чрез H-score (Стоева М., 2022). Съществува съществена разлика и по отношение на средната стойност на ядрената експресия при настоящото изследване и проучването на Стоева (2022), където стойността е $189,4 \pm 54,2$.



Фигура 21. А/ Интензивна цитоплазмена експресия на RIPK3 в клетките на БКК, $\times 100$; Б/ Слаба цитоплазмена експресия на RIPK3 в клетките на БКК, $\times 200$.



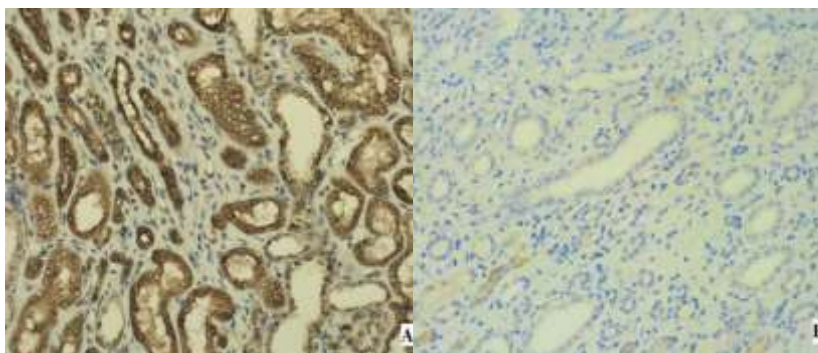
Фигура 22. А/ Умерена до интензивна ядрена експресия на RIPK3 в клетките на БКК, х 200; Б/ Слаба до липсваща ядрена експресия на RIPK3 в клетките на БКК, х 200.

При 40 от случаите с БКК бе определена и цитоплазмената експресия в епителните клетки на бъбречните тубули в съседната нетуморна тъкан (фиг. 23). Средната стойност на цитоплазмена експресия на RIPK3 в нетуморната тъкан е 171,75 (SD=41,84) като минималната е 75, а максималната е 270, докато средната стойност на цитоплазмената експресия в туморната тъкан при тези 40 пациента е 149,8 (SD=45,59) (табл. 14).

При КРК (Стефанова Н, 2017) анализът на цитоплазмената експресия на RIPK3 в съседната на тумора нетуморна тъкан, на базата на средните стойности, показва по-ниски нива на експресия, в сравнение с нашите – $149,38 \pm 92,00$.

Стоева (2022) определя цитоплазмената експресия на RIPK3 в 19 случая с фиброкистична болест, разпределени в две групи - непролиферативен и пролиферативен тип. Средната стойност в групата на пролиферативния тип фиброкистична болест е $180,6 \pm 8,4$, а при непролиферативен тип средната стойност е $187,5 \pm 10,1$. Анализът на цитоплазмената експресия на RIPK3 в това проучване за мамарен карцином, на базата на

средните стойности, не се различава съществено от средните стойности в настоящото проучване (Стоева М, 2022).



Фигура 23. А/Умерена до интензивна цитоплазмена експресия на RIPK3 в съседната нетуморна тъкан x200; Б/ Слаба до липсваща цитоплазмена експресия на RIPK3 в съседната нетуморна тъкан x200.

Таблица 14. Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморните и в нетуморните епителни клетки при БКК.

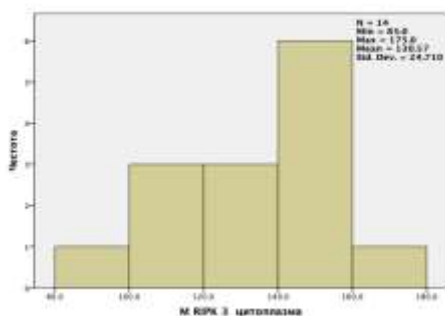
Група	Брой случаи, n	Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)
Туморни клетки	40	149,8	45,59
Нетуморни епителни клетки	40	171,7	41,84

При 15 от изследваните пациенти има хистологично верифицирани далечни метастази (pM1) с различна локализация. Определихме цитоплазмената експресия (фиг. 24) на RIPK3 в

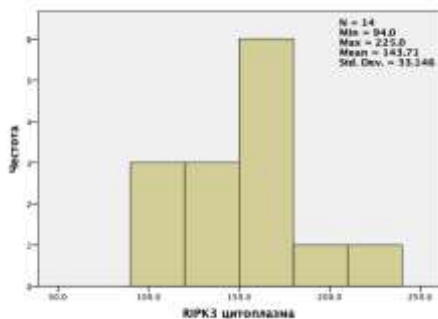
14 от метастазите и установихме, че средната стойност е 130,6 (SD=24,71) (фиг.25), а тази в първичните БКК е 143,7 (SD=33,14) (фиг. 26).



Фигура 24.
Експресия на
RIPK3 в
цитоплазмата на
туморните
клетки от
метастаза на
БКК в бял дроб,
 $\times 100$.



Фигура 25.
Цитоплазматична
експресия на
RIPK3 в
туморната
тъкан на
метастазите на
БКК.



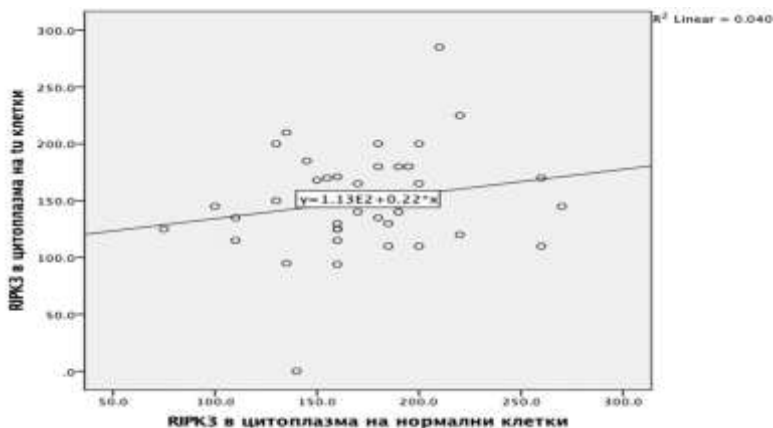
Фигура 26.
Цитоплазматична
експресия на
RIPK3 в туморна
тъкан на БКК с
далечни
метастази.

4.7.1. Сравнителен анализ между средните стойности на експресията на RIPK3 в туморната тъкан и в съседната, нетуморна тъкан.

При сравняване на стойностите на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната и съседната нетуморна тъкан при изследваните 40 случая се отчете значима статистическа разлика ($p=0,017$) (фиг.27). Цитоплазмената експресия в туморната тъкан е по-ниска от тази в съседната нетуморна тъкан.

Получените от нас резултати не се различават от тези на Feng et al. (2015), които оценяват имунохистохимичната цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан при пациенти с дебелочревен карцином и я сравняват с тази в нормалната лигавица, използвайки тристепенна скала на оценка на интензитета: 0, 1 и 2. Те установяват по-високо цитоплазмено ниво на експресия на RIPK3 в нормалната мукоза в сравнение с туморната тъкан. Подобни резултати на понижено ниво на тъканна експресия на RIPK3 при КРК, в сравнение със съседната нетуморна тъкан, са установени и от Morigaki et al. (2015). Получените от нас резултати не се различават от тези на Стоева (2022), която изследва цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на мамарен карцином и в контролната група с фиброкистична болест. В тъканите с фиброкистична болест експресията е по-висока в сравнение с туморната тъкан.

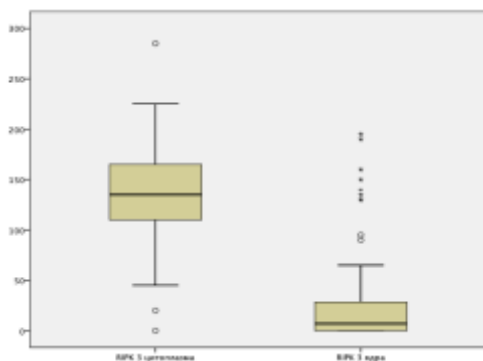
По отношение на КРК, Стефанова (2017) не открива статистически значима разлика в цитоплазмената позитивност на RIPK3 между туморната и нетуморна тъкан.



Фигура 27. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморните клетки и в нормалните клетки на бъбречните тубули.

4.7.2. Сравнителен анализ между цитоплазмената и ядрената експресия на RIPK3 в туморната тъкан

На фигура 28 са посочени средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на RIPK3 в туморните клетки на БКК. Разликата между тях е статистически значима ($p < 0,001$), като средните стойности на цитоплазмената експресия са по-високи от тези на ядрената експресия.

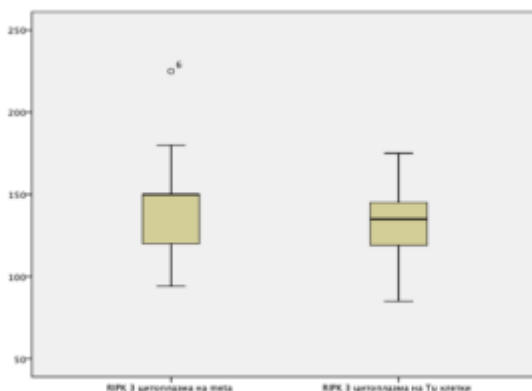


Фигура 28. Средни стойности на цитоплазмена и ядрена експресия на RIPK3 в туморните клетки на БКК.

В проучването си Стоева (2022) анализира зависимостта между ядрената и цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на мамарен карцином и за разлика от нас не открива сигнификантна зависимост между двата показателя. Според нас, тези различия могат да са тъканно обусловени.

4.7.3. Сравнителен анализ между цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БКК и далечните метастази

На фигура 29 са представени средните стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на 14 от метастазите и в туморната тъкан на първичния БКК. Между двете стойности не се установи сигнификантна разлика ($p=0,191$).

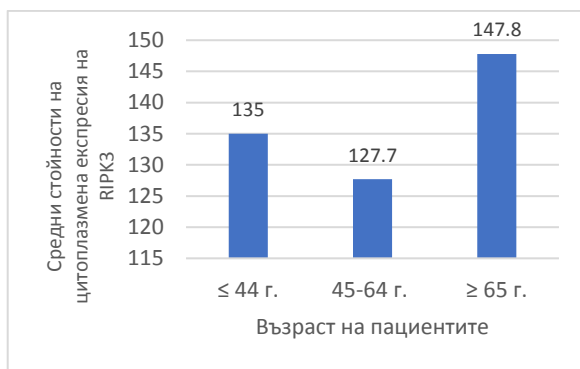


Фигура 29. Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БКК и на далечните метастази.

4.8. Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от клинично-морфологичните характеристики и преживяемостта на пациентите

Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и възрастта на пациентите

На фигура 30 са показани средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 спрямо възрастта на пациентите. Не се установи значима зависимост между двата показателя ($p=0,081$). При повторно тестване на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморните клетки във връзка с възрастта на пациентите чрез метода на Spearman се установи слаба значима зависимост ($\rho=0,222$, $p=0,048$). Експресията на RIPK3 в туморната тъкан на БКК се повишава с напредване на възрастта на пациентите.



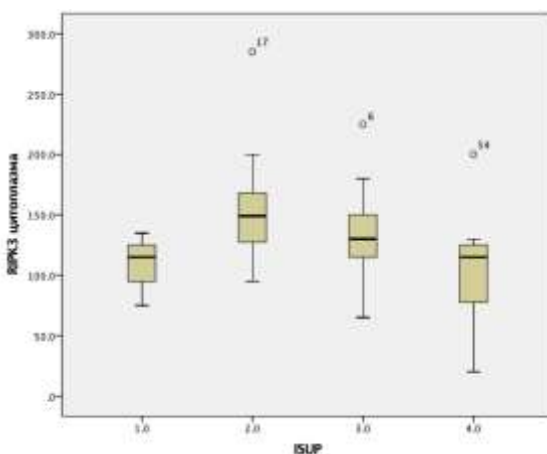
Фигура 30. Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 при БКК спрямо възрастта на пациентите.

В проучването на Feng et al. (2015) при КРК зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 в тумора и възрастта на пациентите не е установена. Пациентите са били разделени в

две възрастови групи: <65 и ≥ 65 г. Подобни резултати са получени и от Стоева (2022), когато сравнява двата показателя при карцином на гърдата. Chung et al. (2019) не намират зависимост между експресията на RIPK3 в цитоплазмата на туморните клетки и възрастта, при пациенти с белодробен аденокарцином, претърпели базирана на цисплатина химиотерапия след белодробна резекция.

Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и степента на диференциация на БКК

На фигура 31 са посочени средните стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 при папиларен и светлоклетъчен БКК с различна степен на диференциация (G1-G4) определена по системата ISUP. Установи се статистически значима зависимост между показателите ($F=3,314$, $p=0,026$), като средните стойности на RIPK3 в групата със степен на диференциация G2 са по-високи в сравнение с тези със G4.



Фигура 31. Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 при двата БКК :ПК и СКК с различна степен на диференциация (G1-G4) определена по системата ISUP.

В литературата има публикувани данни, според които липсва статистически значима зависимост между цитоплазмените нива на RIPK3 и степента на диференциация при КРК (Feng et al. 2015; Стефанова Н, 2017). Резултатите от проучването на Стоева (2022) върху мамарен карцином са подобни на получените от нас и те показват зависимост на експресията на RIPK3 в туморните клетки от степента на диференциация. Високата експресия се асоциира с по-добра диференциация на тумора.

Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и съдовата инвазия

Анализирайки експресията на RIPK3 в цитоплазмата на туморните клетки във връзка с LVI, установихме статистически значима зависимост ($p=0,031$). На таблица 15 са посочени средните стойности на двата показателя.

Средните стойности на RIPK3 са по-високи в присъствие на съдова инвазия.

Таблица 15. Зависимост между средните стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 спрямо LVI при БКК.

Съдова инвазия	Брой случаи, n	Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-value
Има	33	149,7	45,72	0,031
Няма	47	128,3	40,87	

Получените от нас данни се различават от тези при КРК. Анализирайки цитоплазмената експресия на RIPK3 и съдовата инвазия, Стефанова (2017) не установява статистически значима разлика. Подобни резултати са публикувани и от Feng et al. (2015), които също не откриват статистическа значимост между

двата показателя. Различията между данните от литературата и настоящото изследване могат да бъдат тъканно обусловени.

Експресията на RIPK3 в цитоплазмата на туморните клетки на БКК не показва зависимост от следните клинично-морфологични показатели: пол на пациентите, хистологичен вариант, площ на ТН, TILs, T, N и M стадия, локализация на тумора и преживяемост на пациентите.

4.9. Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от клинично-морфологичните показатели и преживяемостта на пациентите

Нуклеарната експресия на RIPK3 в туморната тъкан на бърбечноклетъчния карцином не корелира с никой от изследваните клинично-морфологични показатели: възраст и пол на пациентите, хистологичен вариант, степен на диференциация, площ на некротата, TILs, съдова инвазия, T, N и M стадия, локализация на тумора и преживяемост на пациентите.

В своето изследване за КРК, Стефанова (2017) също не установява значима зависимост между нуклеарната експресия на RIPK3 и възрастта и пола на пациентите, степента на диференциация, площта на ТН, LVI, T- и N- стадия и локализацията на тумора.

Стоева (2022), в проучването си върху мамарен карцином също не открива зависимост между ядрената експресия на маркера за некроптоза и възрастта на пациентите, хистологичния вариант и степента на диференциация на карцинома, T- и M- стадия.

Взети заедно, получените от нас резултати показват, че нуклеарната транслокация на RIPK3 няма отношение към клинично-морфологичните показатели на БКК.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заболяваемостта и смъртността от БКК показват през годините една постоянна тенденция към нарастване в световен мащаб. Диагнозата на пациентите често се поставя при авансирал стадий на карцинома поради късната поява на клинична симптоматика. Непрекъснато се появява нова информация за разнообразието от генетични характеристики и особености на тези тумори, която е необходимо да се вземе предвид при хистологичното им верифициране и лечение. Известните понастоящем стандартни подходи за лечение на БКК в някои случаи са недостатъчни поради резистентност към химиотерапия и лъчелечение. Нараства необходимостта от нови и различни стратегии за терапия на неповлияващите се от класическата терапия случаи, както и в случаите на регионално и далечно разпространение на тумора.

Активирането на пътищата на една или друга форма на клетъчна смърт може да бъде използвано в търсенето на нови подходи при лечението на БКК. В литературата има данни, че туморните клетки на бъбречния карцином са устойчиви на вътрешния и външен път на АП. АП е програмирана клетъчна смърт, която може да се осъществи и по друг, алтернативен път, който е каспаза-независим и участник в него е АIF. Ролята на АIF при БКК е слабо проучена и са необходими допълнителни изследвания, поради което той е обект на настоящото проучване.

Друга форма на клетъчна смърт е НК. Основен участник в процеса е RIPK3, за която е известно, че може да има както тумор-стимулираща, така и тумор-супресивна функция при различните тумори.

Необходими са допълнителни задълбочени проучвания върху ролята на RIPK3 по отношение развитието на туморите, прогресията, метастазите, възникването на рецидиви, както и на анти-туморния имунитет при БКК, а също и на корелацията ѝ с клинично-морфологичните показатели.

VI. ИЗВОДИ

1. При авансирал бъбречноклетъчен карцином (T3 и T4 стадий) туморите показват по-ниска степен на диференциация, по-голяма по площ некроза, по-висок интензитет на TILs и има по-висок риск от настъпване на смърт в сравнение с по-ранните стадии на карцинома (T1 и T2 стадий).
2. T стадия на бъбречноклетъчния карцином не показва зависимост от възрастта, пола, хистологичния вариант, N и M стадия и локализацията на тумора.
3. Туморната некроза по-често се среща при папиларния бъбречноклетъчен карцином, отколкото при хромофобния му вариант. От клинично-морфологичните показатели голямата по площ туморна некроза корелира с лимфоваскуларната инвазия, десностранината локализация на тумора и малката преживяемост на пациентите.
4. По-често при бъбречноклетъчен карцином TILs липсват при женския в сравнение с мъжкия пол.
5. При липса на съдова инвазия преживяемостта на пациентите с бъбречноклетъчен карцином е по-висока в сравнение с пациентите при които тя присъства.
6. При светлоклетъчния бъбречноклетъчен карцином преобладават ниските степени на диференциация на тумора (G3 и G4), докато при папиларния карцином липсват най-високата и най-ниска степен на диференциация (G1и G4).
7. Преживяемостта на пациентите с бъбречноклетъчен карцином намалява с увеличаване на възрастта на пациентите и на площта на туморната некроза. Тя е по-продължителна при мъжкия в сравнение с женския пол.

8. Не се открива статистически значима разлика в цитоплазмения интензитет на AIF в туморната и нетуморната тъкан на бъбречноклетъчния карцином.
9. Експресията на AIF в цитоплазмата на туморните клетки е по-висока в сравнение с ядрената експресия.
10. Нуклеарната експресия на AIF при бъбречноклетъчен карцином не корелира с никой от изследваните клинично-морфологични показатели: възраст, пол, хистологичен вариант, степен на диференциация на карцинома, туморна некроза, TILs, съдова инвазия, T, N и M стадия, локализацията на тумора и преживяемост на пациентите.
11. Цитоплазмената експресия на AIF в туморните клетки се повишава с възрастта и има по-високи стойности при липса на туморни емболи в сравнение със случаите с LV инвазия.
12. В цитоплазмата на папиларния бъбречноклетъчен карцином, експресията на апоптозо-индуциращия фактор е по-висока от тази на светлоклетъчния вариант и разликата е статистически значима.
13. Експресията на AIF в цитоплазмата на туморните клетки при T1 стадий е по-висока в сравнение с T3 стадий.
14. RIPK3 в цитоплазмата на туморните клетки намалява в сравнение със съседната нетуморна тъкан.
15. Цитоплазменото ниво на RIPK3 в туморните клетки е по-високо от ядреното съдържание.
16. Експресията на RIPK3 в цитоплазмата на туморните клетки на бъбречноклетъчния карцином не показва зависимост от следните клинично-морфологични показатели: пол на пациентите, хистологичен вариант, площ на некротата, TILs, T, N и M стадия, локализация на тумора и преживяемост на пациентите.
17. RIPK3 в цитоплазмата на туморните клетки се повишава с увеличаване на възрастта на пациентите с бъбречноклетъчен

карцином и с поява на лимфоваскуларна инвазия и се понижава с намаляване степента на диференциация на тумора.

18. Нуклеарната експресия на RIPK3 в туморната тъкан на бъбречноклетъчния карцином не корелира с никой от изследваните клинично-морфологични показатели: възраст и пол на пациентите, хистологичен вариант, степен на диференциация, площ на некрозата, TILs, съдова инвазия, T, N и M стадия, локализация на тумора и преживяемост на пациентите.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

7.1. Научни приноси с оригинален характер:

- Осъществен е комплексен клинико-морфологичен и имунохистохимичен анализ на бъбречноклетъчния карцином във връзка с преживяемостта на пациентите.
- Оценени са имунохистохимично чрез AIF и RIPK3 процесите на апоптоза и некроптоза като прогностични и предиктивни маркери.

7.2. Научни приноси с практическо-приложен характер:

- Оценено е значението на основните клинико-морфологични показатели като възраст, площ на туморната некроза и съдовата инвазия като прогностични фактори за намалена преживяемост при пациенти с БКК.
- Потвърден е морфологичният профил на авансирания бъбречноклетъчен карцином по отношение на степента на диференциация, туморната некроза, инфилтрацията на TILs и е оценен рискът от настъпването на смърт.
- Установено е, че между нуклеарната експресия на двата маркера на апоптоза и некроптоза (AIF и RIPK3) и клинико-морфологичните показатели липсва зависимост.
- Доказано е, че цитоплазмената експресия на AIF при бъбречноклетъчен карцином има отношение към лимфоваскуларната инвазия и авансиране на тумора.
- Оценена е ролята на цитоплазмената експресия на RIPK3 при бъбречноклетъчен карцином за туморната диференциация и появата на лимфоваскуларна инвазия.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Пълнотекстови статии:

1. **Yanulova N**, Tzaneva M. Role of the apoptosis-inducing factor in physiological conditions and in malignant neoplasms. Varna Medical Forum, 2022; Vol. 11 (2):78-84.
2. **Yanulova N**. The role of RIPK3 in the process of necroptosis in malignant tumors. Varna Medical Forum, 2023; Vol. 12 (2):55-63.

С БЛАГОДАРНОСТ

- *На научния ми ръководител проф. д-р Мария Цанева д.м., за ценните идеи, напътствията и помощта*
- *На колегите ми, д-р Надежда Стефанова и д-р Мартина Стоева, за предадените знания и опит при осъществяване на настоящия проект*
- *На колегите ми лекари от Клиниката по обща и клинична патология за отзивчивостта и подкрепата, както и на Светлана Костадинова – лаборант в клиниката, изработил препаратите*
- *На проф. д-р Клара Докова д.м., за помощта при статистическата обработка на данните*
- *На семейството ми, за разбирането, подкрепата и обичта*

