



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ”**

ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА”

**КАТЕДРА “НУКЛЕАРНА МЕДИЦИНА,
МЕТАБОЛИТНА ТЕРАПИЯ И ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ”**

Д-р Теменужка Руменова Радева- Петкова

**Проучване експресията на маркери за некротична клетъчна смърт и
предиктивната им стойност при неoadювантно лъчехимиолечение на локално
авансирал карцином на ректума**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за

присъждане на образователна и

научна степен „Доктор“

Област на висшето образование: Здравеопазване и спорт,

Професионално направление: Медицина (шифър 7.1),

Научна специалност: Медицинска радиология и рентгенология (вкл.
използване на радиоактивни изотопи)

Научен ръководител:

Проф. д-р Елица Петкова Енчева-Мицова, д.м.

Варна 2025 г.

Дисертационният труд съдържа 140 стандартни страници и е онагледен с 16 таблици и 57 фигури. Литературната справка включва 262 литературни източника, от които 2 на кирилица и 260 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на катедрен съвет на Катедрата по „Нуклеарна медицина, метаболитна терапия и лъчелечение“ при Медицински университет ”Проф. Д-р Параскев Стоянов” – Варна, решение на ФС протокол №..... и съгласно заповед на Ректора на МУ-Варна е избрано следното научно жури в състав

Външни членове:

1. Проф. д-р Татяна Димитрова Хаджиева, д.м.н.
2. Проф. д-р Иглика Спасова Михайлова, д.м.
3. Проф. д-р Марианна Петрова Янева, д.м.н.

Резервен външен член:

1. Проф. д-р Веселина Методиева Първанова, д.м.н.

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Анелия Димитрова Клисарова, д.м.н.
2. Проф. д-р Елица Петкова Енчева-Мицова, д.м.

Резервен вътрешен член:

1. Проф. д-р Борислав Георгиев Чаушев, д.м.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 25.04.25г. от 11:00ч. във виртуална зала на електронната платформа Webex към МУ-Варна на открито заседание на научното жури. Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на

МУ- Варна и са публикувани на интернет страницата на Медицински университет - Варна.

Съдържание

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	8
II. Цел и задачи на дисертационния труд.....	10
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ.....	11
3.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд.....	11
3.2. Клиничен материал	11
3.2.1. Критерии за включване на лицата.....	11
3.2.2. Критерии за изключване	11
3.2.3. Средна възраст и разпределение по пол на пациентите с КР.....	12
3.2.4. Разпределение по възрастови групи на пациентите с КР	12
3.2.5. Хистология. Разпределение на пациентите по степен на диференциация на тумора.	14
3.2.6. Разпределение на пациентите по клиничен Т-стадий и N стадий.....	14
3.2.7. Разпределение пациентите по клиничен стадий.....	16
3.3. Диагностични методи за стадиране на тумора преди постъпване в клиниката по лъчелечение	17
3.4. Рутинни клинични процедури и изследвани показатели след постъпване в клиниката по лъчелечение	17
3.5. Метод за определяне на серумната концентрация на HMGB1- ELISA.....	17
3.6. Лечебни методи	18
3.7 Методи за отчитане на степента на отговор на тумора след проведеното НЛХЛ.....	21
3.8 Статистически дизайн и анализ.....	22
IV. РЕЗУЛТАТИ.....	24
4.1. Обективен отговор към проведеното НЛХЛ - The tumor objective response rate (ORR)	24
4.2. Промяна на Т- стадий на пациентите след НЛХЛ	26
4.3. Промяна на N- категорията след НЛХЛ	27
4.4. Разпределение на пациентите които са провели оперативно лечение след НЛХЛ.....	28
4.4.1. Разпределението на пациентите, спрямо интервала от време след НЛХЛ, след който са провели оперативно лечение.	28
4.5. Анализ на пациентите с отчетена прогресия след приключване на НЛХЛ.....	29
4.6. Концентрацията на HMGB1 в серума на пациентите преди и след НЛХЛ. Проверка на нормалното разпределение.....	30
4.6.1. Средна Концентрация на HMGB1 в серума преди стартиране и след приключване на НЛХЛ33	

4.6.2. Връзка между ниските и високите концентрации на HMGB1, преди и след НЛХЛ, със степента на отговор след проведената терапия.	34
4.6.3. Сравнение на средните стойности на концентрация на HMGB1 преди и след НЛХЛ според степента на отговора след проведената терапия.	36
4.6.4. Сравнение на пациентите по двойки (Pairwise Comparisons) в зависимост от степента на отговора им след проведеното НЛХЛ, и средните стойности на концентрациите на HMGB1 след приключване на терапията.	40
4.6.5. Концентрации на HMGB1 преди и след края на НЛХЛ, в зависимост от степента на отговор след края на проведената терапия.	41
4.6.6. Възможност на стойностите на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ, да предсказват отговора към проведеното лечение.	45
4.6.7. Възможност на разликата в стойностите на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, да предсказват отговора към проведеното лечение.	46
4.7. Сравнителен анализ на ОП общата преживяемост (overallsurvival- OS) спрямо серумната концентрация на HMGB1 при пациенти с ЛАКР.....	47
4.7.1. Средна ОП в зависимост от концентрацията на HMGB1 преди стратификация на НЛХЛ.	47
4.7.2. Средна ОП в зависимост от концентрацията на HMGB1 след приключване на НЛХЛ.....	48
4.7.3. Средна ОП в зависимост от разликата в концентрациите на HMGB1 преди и след НЛХЛ.....	49
4.7.4. Средна ОП в зависимост от степента на отговор към проведеното НЛХЛ.....	50
4.8. Асоциация между стойностите на концентрация на HMGB1 и отговора към проведеното НЛХЛ.....	51
4.9. Сравнение между стойностите на серумната концентрация на HMGB1 според Т и N категорията на пациентите преди и след НЛХЛ.	51
4.10. Връзка между стойностите на SUV преди НЛХЛ и отговора към проведеното лечение.	60
4.11. Възможност стойностите на SUV max преди лечение да предсказват отговора към проведеното НЛХЛ.	61
V. ДИСКУСИЯ	62
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	68
VIII. ИЗВОДИ	69
IX. ПРИНОСИ	70
X. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	71
XI. Благодарности.....	72

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Използвани съкращения на кирилица

КР- карцином на ректум

ЛАКР- локално авансирал карцином на ректум

НЛХЛ- неoadювантно лъчелечение, съчетано с химиотерапия

КРК- колоректален карцином

КДЧ- карцином на дебело черво

ИТМ- индекса на телесна маса

ФАП- фамилна аденоматозна полипоза

ЙОЛ- йонизиращи лъчения

ЕРЕ- ендоректална ехография

КТ- компютърна томография

МРТ- магнитно резонансна томография

ЛЛ- лъчелечение

ТМЕ- тотална мезоректална ексцизия

ИОЛ- интраоперативно лъчелечение

ОР- органи в риск

ОП- обща преживяемост

ПЕТ/КТ- позитронно емисионна томография/компютърна томография

ЛХЛ- лъчехимио лечение

ДОД- дневна огнищна доза

ООД- обща огнищна доза

Използвани съкращения на латиница

DAMPs- damage-associated molecular patterns

HMGB1- high mobility group box 1

ECOG- - Eastern Cooperative Oncology Group

RAS - Rat sarcoma oncogen

PI3K- Phosphoinositide 3-kinase
CR- complete response
pCR- pathologic complete response
IMRT- Intensity modulated radiotherapy
IGRT- image guided radiotherapy
SIB- simultaneous integrated boost
VMAT- volumetric modulated arc therapy
cCR- clinical complete response
W&W- Watch and wait
R- Responders
NR- Non Responders
DFS- Disease-free survival
OS- overall survival
SUVmax- The maximum standardized uptake value
ELISA- enzyme-linked immunoassay
GTV- gross tumor volume
PTV- planning target volume
CTV- clinical target volume
CBCT-cone beam CT
KV- kilovoltage
MV- megavoltage
MU- monitor units
PD- progressive disease
SD- stable disease
CR- complete response
PR- partial response
ROC- receiver operating characteristic
OR- Odds Ratio

ORR- Objective response rate

AUC- area under the curve

CI- confidence interval

HR- hazard ratio

Проучване експресията на маркери за некротична клетъчна смърт и предиктивната им стойност при неoadювантно лъчехимио лечение на локално авансирал карцином на ректума

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Карциномът на ректума (КР) е вторият по честота (28%) тумор на дебелото черво, след карцинома на проксималния отдел (42%), в световен мащаб (1). Според данни на GLOBOCAN 2018, карциномът на дебелото черво (КДЧ) е четвъртият най-чест тумор в света, докато КР е осмият най-често срещан, заедно представляват третата най-често диагностицирана неоплазма в световен мащаб, и съставляват 11% от всички новооткрити малигнени тумори (2). Очаква се повишаване на заболяемостта и смъртността през следващите години като за 2040 год. се очаква новите случаи да достигнат 1 117 278. Независимо от напредъка на съвременната медицина, лечението на КР продължава да бъде предизвикателство. Настоящият стандарт за лечение на локално авансирал карцином на ректума (ЛАКР) е мултимодален подход, включващ неoadювантно лъчелечение (ЛЛ), съчетано с химиотерапия (НЛХЛ), последвано от тотална мезоректална ексцизия (ТМЕ) и адювантна химиотерапия (ХТ), базирана на флуоропиримидин. Това подобрява локалния контрол (ЛК) и честотата на рецидивите, но не е установена полза за общата преживяемост (ОП) (3). Към момента няма ефективен метод за прогнозиране на това кои пациенти ще отговорят на терапията. Циркумферентната резекционна линия се превърна в един от най-важните параметри при оценката на пациенти с ЛАКР, като отстояние >1 мм колерира с добра прогноза. По подобен начин екстрамуралната съдова инвазия, директната туморна инвазия на кръвоносните съдове, са важна прогностична характеристика, показваща хематогенно разпространение и намалена преживяемост (4). Използването на съвременните техники на облъчване като модулирано по интензитет ЛЛ (IMRT, VMAT) в комбинация с образно ръководено ЛЛ (IGRT) позволява конформално разпределение на дозата в мишенния обем. По този начин се реализира максималната доза в тумора и се свежда до минимум дозата, получена от околните здрави тъкани. Това води до намаляване на страничните реакции и подобряване на лечебните резултати (5). Въпреки този напредък

на съвременните техники на облъчване, отговорът към НЛХЛ при КР варира при различните пациенти (6). Репопулацията на туморните клетки по време на терапията е важна причина за неуспех на лечението (6). Стратегиите за преодоляване на туморната репопулация възникват успоредно с прогреса в разкриването на основните биологични механизми. Към момента науката не разполага с надежден биомаркер, който да предсказва отговора към проведеното НЛХЛ при КР. Молекулните биомаркери имат потенциала да предскажат отговора на НЛХЛ в ранен момент с достатъчна чувствителност и специфичност, но досега нито един биомаркер не е валидиран за рутинна употреба в клиничната практика. Йонизиращите лъчения (ЙОЛ), могат да причинят различни типове клетъчна смърт: апоптоза, некроза, автофагия, митотична катастрофа (7). Некрозата е клетъчна смърт, която настъпва по два механизма: неконтролирано, т.е. генетично нерегулирана форма на клетъчна смърт (8) и програмирано т.е генетично регулирана форма на клетъчна смърт, така наречената некроптоза. Некротичната клетъчна смърт води до увеличаване на клетъчната пропускливост с освобождаване на различни вътреклетъчни молекули (8). Тези молекули са известни като молекулярни модели, свързани с увреждане (DAMPs- Damage molecules patterns). Една от тези молекули е HMGB1 (High mobility group box 1 (HMGB1)). Локализацията на HMGB1 в ядрото е свързана основно с регулиране на събития свързани с възстановяване на ДНК увредите, докато извън ядрото се свързва с клетъчната пролиферация, автофагия, възпаление и имунитет (9). Възможно ли е HMGB1 да оказва влияние на отговора на тумора към НЛХЛ при пациенти с ЛАКР? Въпросите свързани с дуалистичната ролята на HMGB1 все още търсят своите отговори. Настоящият дисертационен труд има за цел да проучи основните маркери за некротична клетъчна смърт и тяхната предиктивност при НЛХЛ на ЛАКР.

II. Цел и задачи на дисертационния труд

Да се проучи експресията на HMGB1 като маркер за некротична клетъчна смърт и предиктивната му стойност по отношение на отговор на проведено НЛХЛ при ЛАКР.

Задачи

1. Подбор на подходящи пациенти и оценка на клинично-паталогичните характеристики на пациентите и на тумора: възраст, пол, стадий на заболяването, хистология на тумора, степен диференция, размер на тумора, пърформанс статус (PS) по ECOG.
2. Оценка на отговора на проведеното НЛХЛ - пълен отговор, частичен отговор, без промяна и с прогресия на заболяването чрез анализ на образни изследвания, морфологични изследвания, хистопатологични изследвания.
3. Сравнително да се проучат серумните нива на концентрация на HMGB1 при пациенти с ЛАКР преди стартиране и след приключване на НЛХЛ.
4. Да се проучи наличието на корелации между серумните стойности на концентрация на HMGB1 и клинично-паталогичните характеристики при пациенти с ЛАКР, провели НЛХЛ.
5. Да се анализира предиктивната възможност на нивата на HMGB1 в серума на пациенти с ЛАКР за отговор към НЛХЛ.
6. Да се проучи прогностичният потенциал на HMGB1 по отношение на преживяемостта на пациентите.
7. Да се проучи наличието на корелация между стойностите на SUVmax от стадирация ПЕТ/КТ на първичния тумор и степента на отговор след проведено НЛХЛ при пациенти с ЛАКР.
8. Да се установи разликата в стойностите на HMGB1 преди и след приключване на НЛХЛ.
9. Да се установи разликата в стойностите на концентрацията на HMGB1 при пациентите отговарящи на терапията (responders) и при тези, които не отговарят на терапията (not responders).

Научна хипотеза

Стойностите на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, в серума на пациенти с ЛАКР, имат значение за лечебните резултати.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

3.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

- Клиника по лъчелечение – УМБАЛ, “Св. Марина” Варна
- Катедра по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика – Медицински Университет и Университетска болница “Св. Марина” Варна

3.2. Клиничен материал

В проучването са включени общо 65 пациенти с ЛАКР на възраст над 18 години. Пациентите са анализирани проспективно. При всички пациенти хистологично бе потвърден ЛАКР. По отношение на локализация на първичния тумор, при 45 пациента (69%) КР бе разположен в средна трета (среден КР), и при 20 (31%) в долна трета (нисък КР). Проучването е проведено в Клиниката по лъчелечение към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, в периода 2015-2021, след одобрение от Комисията по етика на научните изследвания при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна. Всички участници имат предварително подписано информирано съгласие.

3.2.1. Критерии за включване на лицата

- възраст >18г
- пациенти с хистологично верифициран ЛАКР, които подлежат на НЛХЛ
- клиничен стадий II (T3-4, N0) или III (всяко T, N1-2), оценен с МРТ, ПЕТ/КТ, КТ
- пациенти с налична пълна медицинска документация (данни за заболяването на пациента, доказващи хистологията на тумора, изясняващи локалното и далечно туморно разпространение, TNM, изяснен общ и локален статус на пациента;).

3.2.2. Критерии за изключване

- наличие на тежки придружаващи заболявания
- влошено общо състояние (PS > 2 по ECOG)

- пациенти неотговарящи на критериите за включване

3.2.3. Средна възраст и разпределение по пол на пациентите с КР

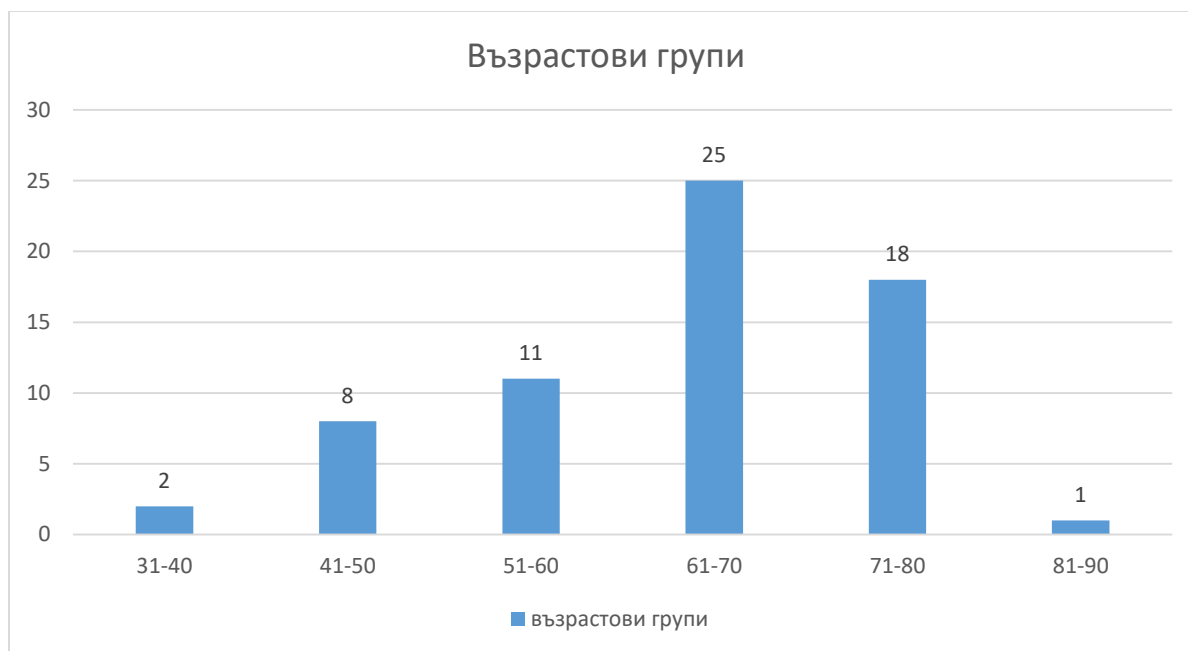
Средна възраст на пациентите е $63 \pm 10,6$, като 37 % (24) от тях мъже и 63% (41) – жени (фигура 1).



Фигура 1. Разпределение на пациентите по пол.

3.2.4. Разпределение по възрастови групи на пациентите с КР

Получените от нас резултати (фигура 2) показват, че най-голям брой пациенти с КР - 25 (38%) са във възрастовата група – 61-70г.



Фигура 2. Разпределение на пациентите по възрастови групи.

За последващата статистическа обработка на данните за възрастта на пациентите, те бяха разделени в две групи: ≤ 65 г. (32 пациента, представляващи 49% от всички 65 и > 65 г. (33 пациента, представляващи 51% от всички 65) (фигура 3).



Фигура 3. Разпределение на пациентите по възрастови групи.

3.2.5. Хистология. Разпределение на пациентите по степен на диференциация на тумора.

Всички 65 пациенти включени в проучването са с диагноза КР, и при всички е хистологично верифициран аденокарцином. Разпределението на пациентите по степен на диференциация на тумора е както следва: G1- 3 пациента, представляващи 5% от всички 65 пациента; G2- 60 пациента, представляващи 92% от всички 65 пациента; G3- 2 пациента представляващи 3% от всички случаи (фигура 4).

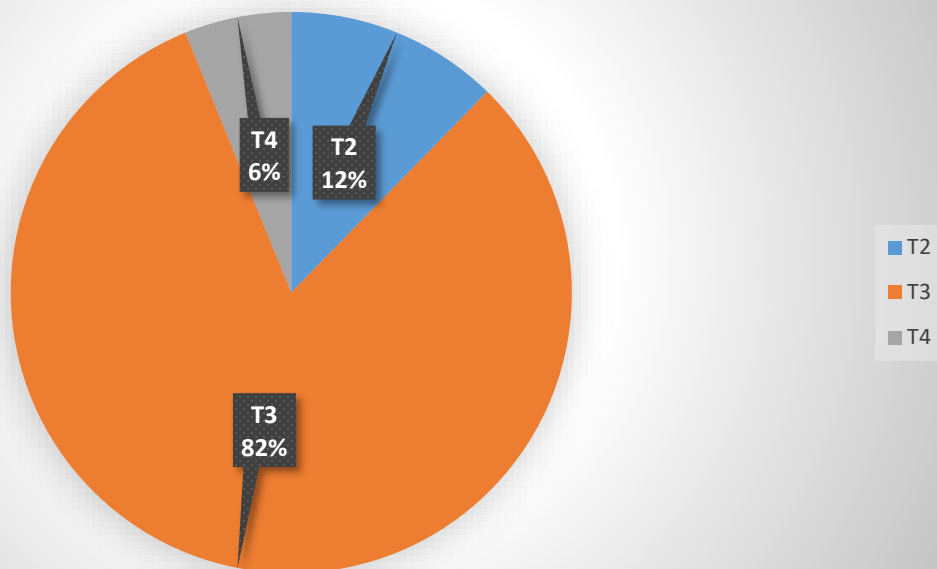


Фигура 4. Разпределение на пациентите по степен на диференциация на тумора.

3.2.6. Разпределение на пациентите по клиничен T-стадий и N стадий

Разпределение на пациентите по T- стадий е както следва: T2- 8 пациента, представляващи 12% от всички 65 случаи; T3- 53 пациента, представляващи 82% от всички 65 случаи; T4- 4 пациента представляващи 6% от всички случаи (фигура 5).

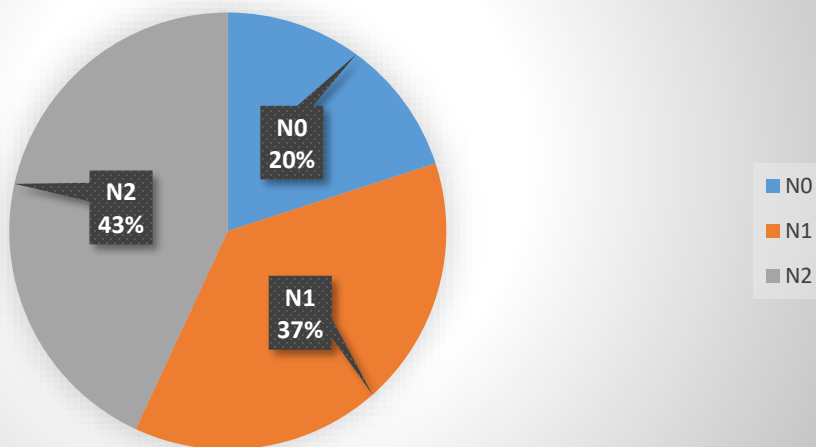
Разпределение на пациентите по T-стадий



Фигура 5. Разпределение на пациентите в зависимост от T- стадий.

Разпределение на пациентите по N- стадий е както следва: N0- 13 пациента, представляващи 20% от всички 65; N1- 24 пациента, представляващи 37% от всички 65 пациента; N2- 28 пациента представляващи 43% от всички 65 пациента (фигура 6).

Разпределение на пациентите по N-стадий



Фигура 6. Разпределение на пациентите в зависимост от N- категорията.

3.2.7. Разпределение пациентите по клиничен стадий

При анализ на разпределението на пациентите по клиничен стадий се установи: 80% от пациентите са в клиничен стадий III, 20% от пациентите са в клиничен стадий II (фигура 7).



Фигура 7. Разпределение на пациентите по клиничен стадий.

3.3. Диагностични методи за стадиране на тумора преди постъпване в клиниката по лъчелечение

При всички пациенти предварително бяха проведени следните диагностични методи - дигитално ректално изследване, фиброколоноскопия с биопсия, ендоректална ехография МРТ, КТ, ПЕТ/КТ. В таблица 1 пациентите са разпределени според образния метод, който използван за стадиране преди стартиране на НЛХЛ.

Таблица 1. Разпределение на пациентите според образния метод, който е използван за стадиране преди стартиране на НЛХЛ.

Образен метод за стадиране преди НЛХЛ	Брой пациенти, %
МРТ+ПЕТ/КТ	50, (77%)
КТ+ПЕТ/КТ	5, (7%)
КТ+МРТ	5, (8%)
ПЕТ/КТ	5, (8%)

3.4. Рутинни клинични процедури и изследвани показатели след постъпване в клиниката по лъчелечение

При всички пациенти беше извършен клиничен преглед, включващ: анамнеза и статус, определяне на ECOG статус. При всички пациенти бяха проведени рутинни лабораторни изследвания, преди старта на НАЛХЛ и веднъж седмично по време на терапията, включващи: периферна кръвна картина, стандартен набор от биохимични показатели, определящи чернодробна и бъбречна функция.

3.5. Метод за определяне на серумната концентрация на HMGB1- ELISA

При всички пациенти беше взета венозна кръв за определяне на серумната концентрация на HMGB1 преди стартиране на НЛХЛ и след приключване на терапията в деня на последната фракция. Материалът за изследване е серум, взет със затворена система за отделяне на серум с гел Vacutainer SST II Advance на фирмата Beckton Dickinson. След венепункцията кръвта престоява 30 минути на стайна температура, за да се осъществи кръвосъсирването и след това серумът се отделя чрез центрофугиране за 15 минути при 1 000×g и се съхранява при температура –80°C до извършването на анализа. За изследването

е използван ELISA кит за определяне на HMGB1 в плазма на човек (Human HMGB1/HMGB1 Elisa Kit), сандвич ELISA (96 ямков ензимно-свързан имуносорбентен тест) кит, каталожен № LS-F4038-1 на фирма LifeSpan Bio Sciences: таргет- HMGB1 / HMGB1, реактивност- човек, специфичност- HMGB1. Пробите са изработени във Факултет по фармация, Катедра биохимия на МУ Варна.

3.6. Лечебни методи

1. Лъчелечебен Метод

1.1. Локализационна КТ

- позиция на пациента: супинация с ръце върху гръдния кош. Като ориентир за отстоянието на тумора от аналния ръб е поставя рентген контрастен маркер (счма) на ануса. Всеки пациент, след изпразване на пикочния мехур, приема 500 мл. вода с разтворена в нея 1 амп. Урографин 45 мин преди провеждане на КТ с цел адекватно изпълване на пикочен мехур и контрастиране на тънките черва. Провежда се КТ трансверзални срезове с дебелина 3 мм.

1.2 Контуриране на мишенни обеми и органи в риск

- контуриране на клиничните мишенни обеми (КМО) на локализационната КТ, като се използват МРТ и ПЕТ-КТ след сливане (регистрация) на образите.
- GTV- същински туморен обем, включва- макроскопски видимият тумор на КТ, МРТ, ПЕТ-КТ.
- CTV (CTV45, CTV50) клиничният мишенен обем, включва:
 - CTV45- целия ректум, мезоректалното, пресакралното пространство и регионалния лимфен басейн в зависимост от Т стадия на заболяването и локализацията на първичния тумор (при Т3 тумор се включват вътрешно илиачни ЛВ, при Т4 с ангажиране на сфинктери или дистална трета на влагалище се включват и външно илиачни ЛВ, ингвинални л.в.); като горна граница на обема е ниво L5/S1 и 2см отстояние от GTV в краниална посока; долната граница на обема достига тазовото дъно и 2см. отстояние от GTV в каудална посока; аналния сфинктер и

перинеума с исшиоректалното пространство, когато туморите са на ≤ 6 см от АРЛ;

- CTV50 включва: GTV с минимум 1,5-2см осигурителна граница, целия ректум, мезоректум, пресакрално пространство и ангажираните лимфни възли.
- PTV (PTV45, PTV50) планираният мишенен обем
 - PTV45= CTV45+7mm;
 - PTV50= CTV50+3-5mm.
- контуриране на органите в риск: пикочен мехур, главички на бедрени кости, тънки черва, тазови кости.

1.3 Предписание на дозата и фракциониране

- Приложени са два режима на фракциониране, чрез прилагане на последователен и едновременен, съответно 28/25 фракции до обща огнищна доза (ООД) 50,4/50Gy. При последователният буст на първия етап мишенният обем PTV 45 включва ректума с регионалния лимфен басейн и в него се реализира ООД 45Gy при ДОД 1,8. На втория етап се облъчва PTV 50 ,4 до ООД 5,4Gy при ДОД 1,8 или сумарно с първи етап се реализира ООД 50,4Gy. При едновременно интегрираният буст (SIB техника) се провеждат 25 фракции: мишенният обем PTV 45 включва ректума с регионалния лимфен басейн и в него се реализира ООД 45Gy при ДОД 1,8; На втория етап се облъчва PTV 50 до ООД 50Gy при ДОД 2 Gy или сумарно с първи етап се реализира ООД 50,4Gy: 34 (52%) пациента са облъчени с едновременен буст, 31 (48%) пациента с облъчени с последователен буст.

1.4 Дозиметрично планиране

- при дозиметричното планиране се използват техники на облъчване: IMRT (модулирано по интензитет ЛЛ), VMAT (обемно ротационно модулирано по интензитет ЛЛ), в комбинация с IGRT (образно ръководено ЛЛ).

1.5 Оценка на дозиметричен план

- дозиметричните планове са индивидуално анализирани за всеки пациент и целта е 95% от планираният мишенен обем PTV да е покрит с 95% изодозната линия (принципите на ICRU50, 62), при следните толерантни дози в органите в риск: тънки черва $250\text{cm}^3 < 45\text{Gy}$, пикочен мехур $V50 < 50\%$, главички на бедрени кости $V50 < 50\%$.

1.6 Верификация на изработения план на линейния ускорител

- в процеса на планиране на ЛЛ, дозиметричната проверка на плана е задължителна. За всеки дозиметричен план се сравняват резултатите от планиращата система и доставената на апарата доза. Във всеки случай, когато верификацията на плана не удовлетворява зададените критерии, се налага репланиране.

1.7 Изпълнение на лъчетерапевтичната процедура

- облъчването се осъществява на линеен ускорител Varian Clinac IX (Varian TM). По време на курса ЛЛ ежедневно, на линейния ускорител преди всяка фракция на облъчването, се извършва верификация (IGRT) на позицията на пациента и позицията на тумора чрез: компютърен томограф с конусовиден сноп (CBCT-cone beam CT), планарни спрегнати KV графии (подходящо за дефиниране позицията на кости).

1.8 Проследяването на пациентите по време на ЛЛ включва

- ежедневен контрол на общото състояние и поносимостта към лечението, проследяване за наличие на оплаквания, свързани с радиобиологичните реакции на органите в риск, ежеседмичен контрол на кръвната картина и биохимични показатели. При наличие на ранни лъчеви реакции се прилагат необходимите терапевтични мерки за намаляване тежестта и степента на изява. Най-често наблюдаваните реакции по време на НЛХЛ са обща уморяемост, диария и ректален дискомфорт, парене при уриниране, зачервяване на кожата около ануса и ректален дискомфорт, като те не са разгледани, т.к. не са обект на настоящата дисертация.

2. Химиотерапевтичен метод

- При всички пациентите едновременно с ЛЛ е приложена ХТ с Capecitabine, таблетки от 500 mg. Дозировката е по протокол, 825mg/m². Приемът на Capecitabine е осъществяван в дните на облъчването през целия курс на ЛЛ, 2 пъти дневно.

3.7 Методи за отчитане на степента на отговор на тумора след проведеното НЛХЛ

След приключване на НЛХЛ, пациентите се насочват за контролна ФКС и преценка провеждането на оперативно лечение. За отчитане на степента на отговор на тумора след проведеното НЛХЛ се използват различни клинични методи.

Клинични методи

- Дигитално изследване на ректума
- ФКС с биопсия
- Образни диагностични методи: МРТ, КТ, ПЕТ/КТ, ЕРЕ
- Оперативен протокол-описва In situ разпространението на резидуалния първичен тумор, вида на оперативната интервенция, обикновено предна резекция или абдомено перинеална.
- Хистопатологичен протокол

В таблица 2 пациентите са разпределени според образния метод, който е използван за рестадиране след приключване на НЛХЛ

Таблица 2. Разпределение на пациентите според използвания образен метод за рестадиране след приключване на НЛХЛ.

Образен метод за рестадиране след НЛХЛ	Брой пациенти
ПЕТ/КТ	21, (32%)
МРТ	15, (23%)
КТ	14, (22%)
КТ+ПЕТ/КТ	1, (1%)

При 14 (22%) от пациентите след приключване на НЛХЛ не е проведено образно изследване. При 2 от тях проведена само контролна ФКС и отчетена негативна биопсия. При 12 от тях е проведена предна резекция и стадирането е на база хистопатологичен протокол.

Възможните типове отговор към провежданото НЛХЛ отчетохме като:

- **Пълен отговор - complete response (CR)**
 - при отсъствие на данни за първичен тумор и регионални лимфни възли на проведените образни изследвания, негативна биопсия (clinical complete response-cCR),
 - отсъствие на тумор и регионални лимфни възли на трайния препарат след провеждане на оперативно лечение (pathological complete response-pCR).
- **Частичен отговор - PR (partial response)**
 - при намаляване на размерите на лезиите спрямо изходното измерване (downsizing), понижаване на Т и/или N стадия (downstaging)
- **Прогресия - PD (progressive disease)**
 - прогресия на болестта - повишаване на TNM стадий, по отношение на отделните категории
- **Стабилна болест - SD (stable disease)**
 - незначителна регресия на тумора, която да се оцени като частичен отговор, или незначително нарастване в размера на тумора, което да се оцени като прогресия на болестта, запазване на изходния TNM стадий.

3.8 Статистически дизайн и анализ

Статистическият анализ е осъществен чрез програмен пакет SPSS version 19. За проверка на статистическите хипотези при работа със SPSS се работи с грешка от I род, равна на 0,05 ($\alpha = 0,05$). За оценка е използвано равнището на значимост (Sig. level), което представлява съответната вероятност на изчислената емпирична характеристика. Сравнени са равнището на значимост с грешката $\alpha = 0,05$. Ако равнището на значимост е по-малко от α (Sig. Level < 0,05), нулевата хипотеза (H_0) се отхвърля и се приема за вярна алтернативната (H_a) и обратно – ако (Sig. Level > 0,05), нулевата хипотеза (H_0) се приема

(1) Дескриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност, стандартна грешка на средната, минимални и максимални стойности, медиана.

(2) Непараметрични методи:

- Kolmogorov–Smirnov Test; Shapiro Wilk test; за проверка на нулевата хипотеза и определяне на типа на разпределение на стойностите с оглед подбор на параметричен или непараметричен корелационен метод за анализ; Нулевата хипотеза гласи, че разпределението на изследваната променлива е нормално. При равнище на значимост $2\text{-Tailed}P < 0,05$ тя се отхвърля и се приема алтернативната, т.е. не е нормално.
- Jonckheere-Terpstra test- за оценка на зависимост между ординален признак и ординален/непрекъснат признак
- Wilcoxon–Mann–Whitney test- за оценка на зависимост между категоричен признак с две променливи и ординален/ непрекъснат признак
- Pairwise Comparisons test

(3) Статистическо изследване на зависимости чрез корелационен анализ:

- chi-square or χ^2 test- за доказване на причинна връзка е ползван Хи-квадрат анализ (ChiSquare) за разлика на два относителни дяла.

(4) Kaplan–Meier Test за преживяемост- при методиката “Каплан-Маер”, за оценка на статистическата достоверност на резултатите, за вероятностна преживяемост са ползвани тестове – лог-ранк (Log-Rank);

(5) ROC анализ- За определяне на диагностичната точност на измерената концентрация на HMGB1 се определи възможно най-голямата площ под кривата (AUC) при receiver operating characteristic (ROC) анализа.

(6) Регресионен анализ, OR- оценка на рисков фактор: при доказана причинна връзка за оценка на изследвания фактор като рисков, е използван методът: „Отношение на шансовете“ (Odds Ratio – OR). Ако: $OR > 1.00$ – проучваният фактор е рисков; $OR = 1.00$, проучваният фактор не оказва влияние; OR

(7) За Графичен и табличен метод за представяне на получените резултати бе използван Microsoft Office (Excel) за Windows 10.

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0.05$ при доверителен интервал 95%.

IV. РЕЗУЛТАТИ

Проучени са 65 пациенти с диагноза КР, клиничен стадий II (T3–4, N0) или III (всяко T, N1–2), дистална туморна граница в рамките на 10 cm от аноректалното съчленение, провели НЛХЛ в клиника по лъчелечение на УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД. Всички пациенти проведеха НЛХЛ в пълен обем до ООД= 50–50.4 Gy в 25–28 фракции, в комбинация с перорален Капецитабин (в пълен обем). ECOG статусът на всички пациенти бе оценен на 1. Всички пациенти толерираха проведеното НЛХЛ и не се наблюдава лъчева и хематологична токсичност над степен 2.

4.1. Обективен отговор към проведеното НЛХЛ - The tumor objective response rate (ORR)

Установи се, че при 52,3% от изследваните пациенти е наблюдаван отговор на НЛХЛ (пълен и частичен отговор), спрямо 47,7 % при които не се отчита отговор (стабилна болест и прогресия на заболяването). Пълен отговор (CR) е отчетен при 13 пациенти (20%), частичен отговор (PR) при 21 пациенти (32%), стабилно заболяване (SD) при 22 пациенти (34%), при 9 пациенти (14%) е отчетена прогресия (PD) (фигура 8, фигура 9). При 3(23%) от пациентите постигнали пълен отговор, той се потвърждава освен от образните изследвания и от проведената оперативна интервенция.



Фигура 8. Степен на отговор на тумора към проведеното НЛХЛ, (ORR).



Фигура 9. Степен на отговора на тумора след проведено НЛХЛ по групи.

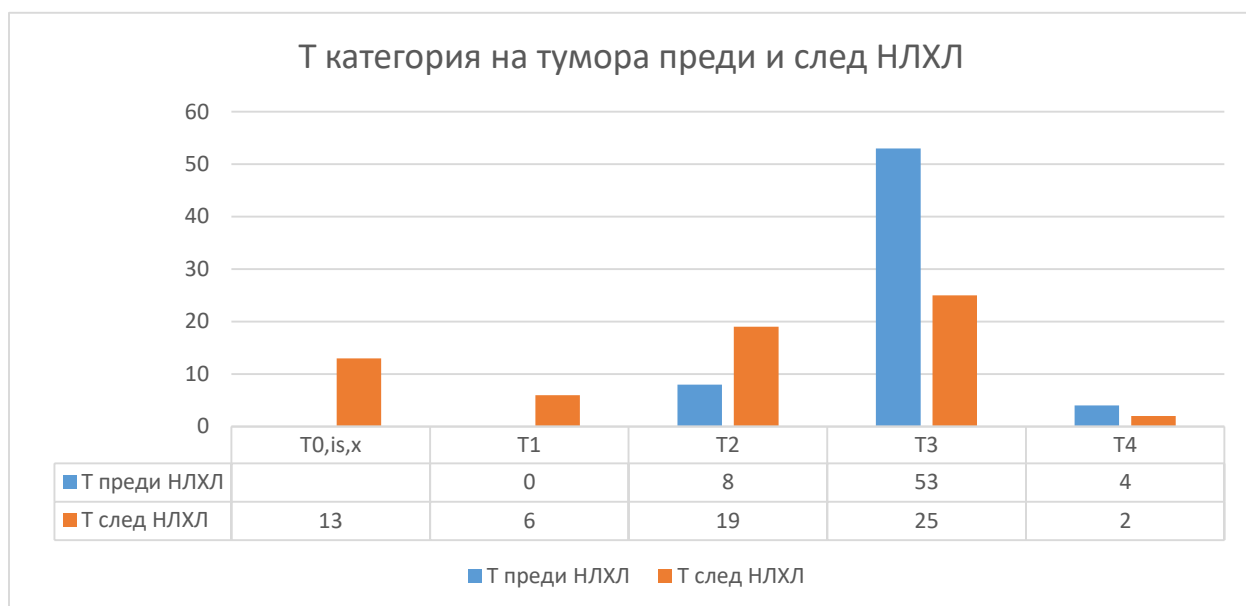
При пациентите с отчетен пълен отговор (CR) и частичен отговор (PR), стадирането преди стартиране на НЛХЛ е представено в таблица 3.

Таблица 3. Пациентите с отчетен пълен отговор (CR) и частичен отговор (PR), стадиране преди стартиране на НЛХЛ.

Отчетен отговор след НЛХЛ	TNM преди НЛХЛ	Брой пациенти	Отчетен отговор след НЛХЛ	TNM преди НЛХЛ	Брой пациенти
CR	cT3cN0	4	PR	cT2cN1	1
	cT3cN1	4		cT2cN2	1
	cT3cN2	3		cT3cN0	2
	cT2cN1	2		cT3cN1	6
				cT3cN2	8
				cT4cN1	1
				cT4cN2	1

4.2. Промяна на T- стадий на пациентите след НЛХЛ

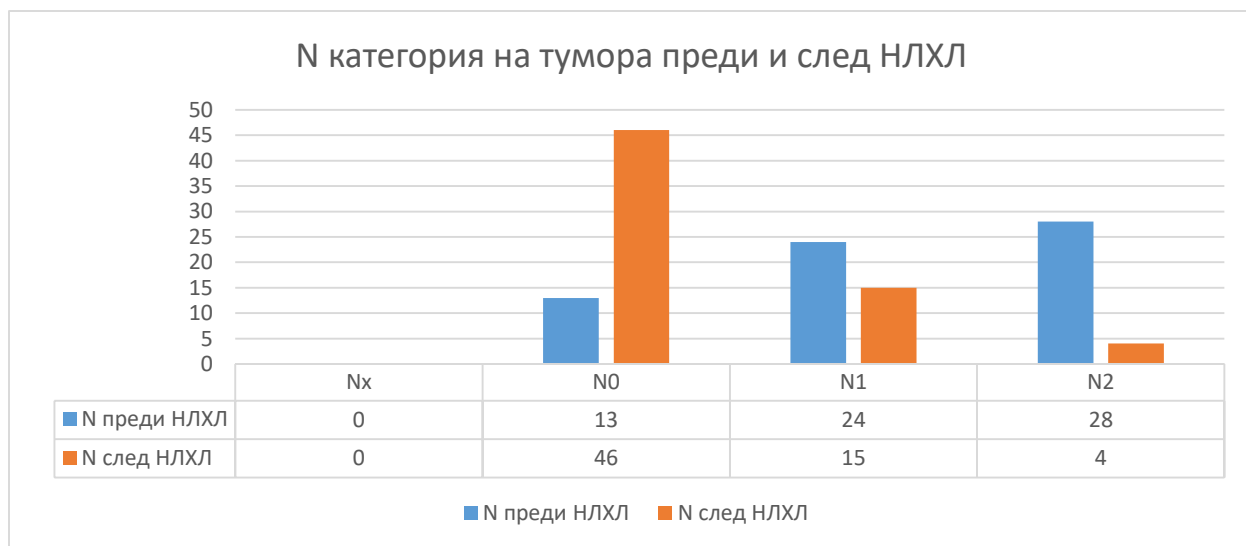
Разпределение на пациентите по T- стадий след НЛХЛ е както следва: To, is, - 13 пациента, представляващи 20% от всички 65; T1- 6 пациента, представляващи 9% от всички 65; T2- 19 пациента представляващи 29% от всички пациенти, T3- 25 пациента представляващи 39% от всички пациенти, T4- 2 пациента представляващи 3% от всички 65 пациенти (фигура 10).



Фигура 10. Промяна на T- категорията на тумора след НЛХЛ.

4.3. Промяна на N- категорията след НЛХЛ

Разпределение на пациентите по N- стадий след НЛХЛ е както следва: N0- 46 пациента, представляващи 71% от всички 65 пациента; N1- 15 пациента представляващи 23%, N2- 4 пациента, представляващи 6% от всички пациенти (фигура 11).



Фигура 11. Промяна на N- категорията на тумора след НЛХЛ.

4.4. Разпределение на пациентите които са провели оперативно лечение след НЛХЛ.

Разпределението на пациентите според това дали са провели оперативно лечение след НЛХЛ е както следва: 49 пациента, представляващи 75% от всички 65 пациента, са провели оперативно лечение след НЛХЛ (фигура 12). При 41 пациента (84%) проведената оперативна интервенция е предна резекция, при 8 (16%) абдоминоперинеална резекция. При 16 от пациентите не е проведена оперативна интервенция. Причината за липса при 10 от тях е, че след отчетена негативна биопсия от контролна ФКС са оставени на проследяване чрез контролни ФКС и образни методи (Watch and Wait стратегия). При 6 от пациентите не е проведена операция, поради отчетена прогресия с далечно метастазиране.



Фигура 12. Разпределение на пациентите според наличие на оперативно лечение след НЛХЛ.

4.4.1. Разпределението на пациентите, спрямо интервала от време след НЛХЛ, след който са провели оперативно лечение.

Разпределението на пациентите, спрямо интервала от време след НЛХЛ, след който са провели оперативно лечение, е както следва: 30 от пациентите (61%) са оперирани след осмата седмица от НЛХЛ; 13 от пациентите (27%) са оперирани между 6 и 8 седмица, 5 от пациентите (10%) са оперирани на между втора и четвърта седмица, 1 от пациентите (2%) е опериран след по- малко от 2 седмици след НЛХЛ (фигура 13). Преобладават пациентите оперирани след 8. Болшинството са оперирани след 6-та седмица 88%.



***Фигура 13.** Разпределение на пациентите според интервала от време след, който е извършено оперативното лечение.*

4.5. Анализ на пациентите с отчетена прогресия след приключване на НЛХЛ

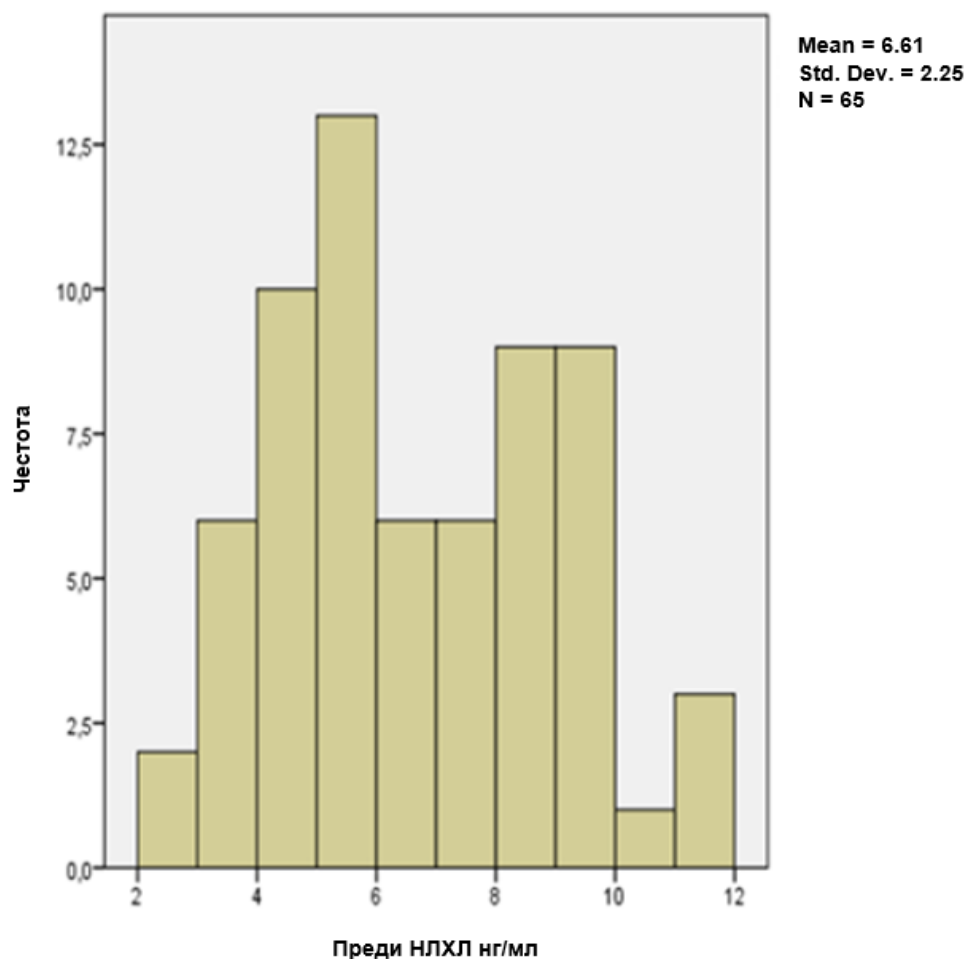
При 9 от пациентите (от всички 65) е отчетена прогресия след приключване на НЛХЛ: При трима от пациентите са открити метастази в бял дроб и черен дроб (34%), при двама са открити метастази в черен дроб (22%), при двама са открити метастази в бял дроб (22%), при един са отчетени перитонеални метастази (11%), един от пациентите е с покачване на T/N категорията (11%) (фигура 14). При всички пациенти с отчетена прогресия има проведен ПЕТ/КТ. При пациента с установено покачване на T/N стадия са проведени ПЕТ/КТ, МРТ и оперативна интервенция. При 6 от пациентите с установена прогресия няма данни да е проведена оперативна интервенция, при 3 от тях е проведена оперативна интервенция.



Фигура 14. Разпределение на пациентите с отчетена прогресия.

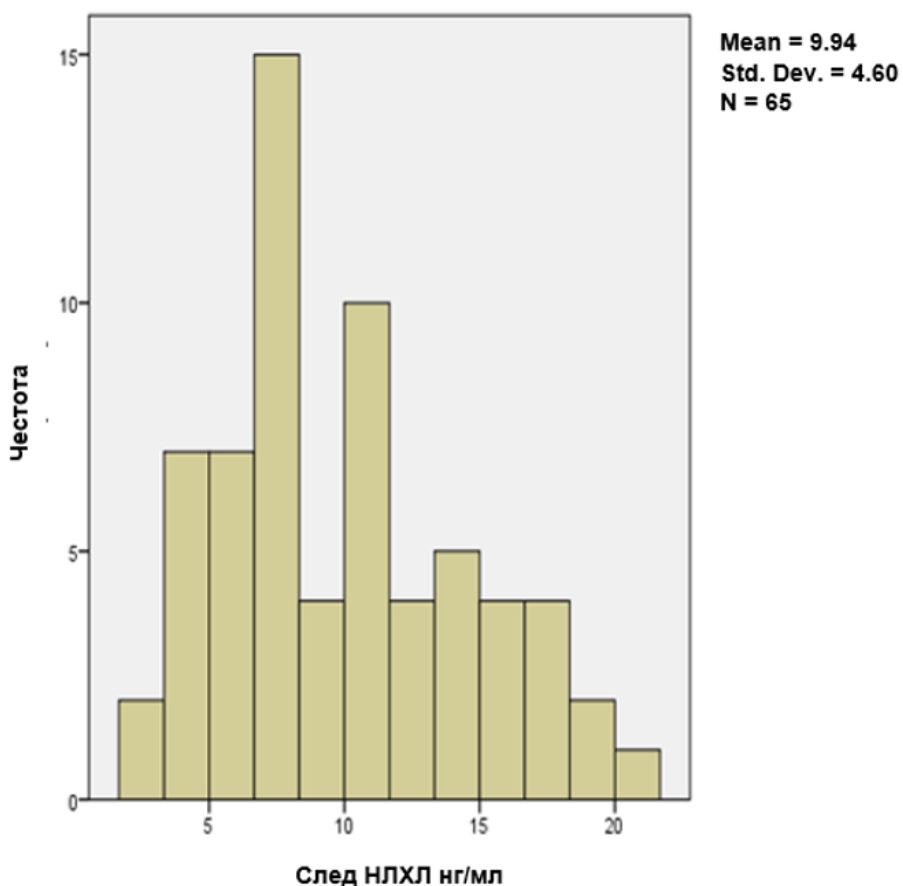
4.6. Концентрацията на HMGB1 в серума на пациентите преди и след НЛХЛ. Проверка на нормалното разпределение.

Концентрацията на HMGB1 в серума на пациентите преди и след НЛХЛ беше изследвана при всички 65 пациенти. Средната стойност на концентрацията на HMGB1 преди НЛХЛ е $M = 6,61$ нг/мл, $SD = 2,25$. Средната стойност на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ е $M = 9,94$ нг/мл, $SD = 4,60$. За проверка на нормалното разпределение (test of normality) на концентрацията на HMGB1 в серума на пациентите преди и след НЛХЛ бяха използвани тестът на Kolmogorov Smirnov и тест на Shapiro-Wilk. Анализът на серумната концентрация на HMGB1, чрез Kolmogorov Smirnov ($p = 0.099$) и Shapiro-Wilk ($p = 0.093$), преди НЛХЛ не достига статистическа значимост. Това показва, че стойностите на концентрацията на HMGB1 преди НЛХЛ, следваха нормалното разпределение (фигура 15), (таблица 4).



Фигура 15. Разпределение на стойностите на концентрациите на HMGB1 преди НЛХЛ.

Анализът на серумната концентрация на HMGB1, чрез Kolmogorov Smirnov ($p=0.003$), Shapiro- Wilk ($p=0.041$), след НЛХЛ достига статистическа значимост. Това показва, че стойностите на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ, не следват нормалното разпределение (Фигура 16), (таблица 4).

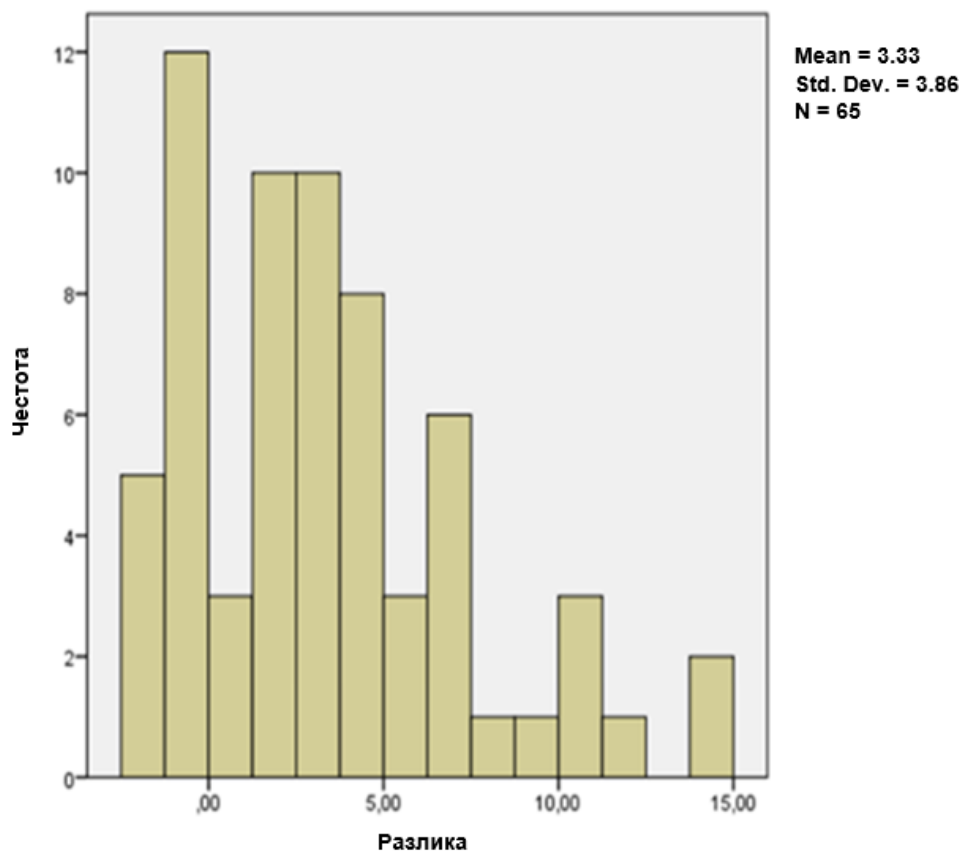


Фигура 16. Разпределение на стойностите на концентрациите на HMGB1 след НЛХЛ.

Таблица 4. Тест за нормално разпределение преди и след НЛХЛ, Kolmogorov Smirnov, Shapiro Wilk test.

Концентрация на HMGB1	Kolmogorov Smirnov		Shapiro Wilk	
	N	p	n	P
Преди НЛХЛ	65	0,099	65	0.093
След НЛХЛ	65	0,003	65	0.041

Анализът на разликата в концентрациите на HMGB1 преди и след НЛХЛ ($M = 3,33$, $SD = 3,86$), чрез Kolmogorov Smirnov ($p = 0,086$); Shapiro- Wilk, ($p = 0.01$), също достига статистическа зависимост. Това показва, че разликата в концентрациите на HMGB1 преди и след края на терапията също не следва нормалното разпределение (фигура 17), (таблица 5).



Фигура 17. Разликата в разпределението на стойностите на концентрациите на HMGB1 преди и след НЛХЛ.

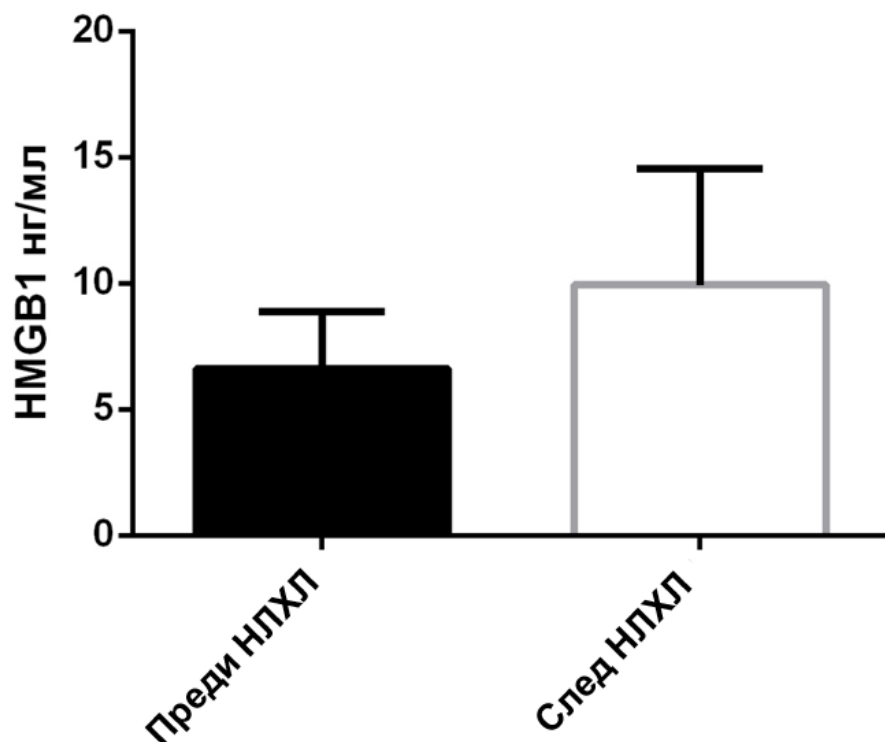
Таблица 5. Тест за нормалното разпределение на разликата в концентрациите на HMGB1 преди и след НЛХЛ, Kolmogorov Smirnov, Shapiro Wilk test.

Концентрация на HMGB1	Kolmogorov Smirnov		Shapiro Wilk	
	N	p	p	p
Разлика	65	0.086	65	0.01

4.6.1. Средна Концентрация на HMGB1 в серума преди стартиране и след приключване на НЛХЛ

Проведе се Wilcoxon Rank тест на база средните концентрации. Той показва, че средната концентрацията на HMGB1 в серума на пациенти след НЛХЛ ($M = 9,94$, $SD = 4,60$) е сигнификантно по- висока, в сравнение с тази преди НЛХЛ, ($M = 6,61$, $SD = 2,25$),

($p < 0.0001$) (фигура 18).



Фигура 18. Сравнение между средната концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ.

4.6.2. Връзка между ниските и високите концентрации на HMGB1, преди и след НЛХЛ, със степента на отговор след проведената терапия.

Извърши се статистически анализ между две групи пациенти, такива, които са с пълен (CR) или частичен отговор (PR) към проведената терапия (CR+PR), и такива със стабилна болест (SD) или прогресия (PD), (PD+SD), спрямо нивата концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ. Като ниски стойности преди НЛХЛ се приемат стойности на концентрацията на $HMGB1 \leq 6,60$ нг/мл, като високи се приемат стойности на концентрацията на $HMGB1 > 6,60$ нг/мл. Анализът Chi-square не показва сигнификантна

връзка между стойностите на концентрация на HMGB1 преди НЛХЛ и степента на отговор след НЛХЛ, $p = 0,360$ (таблица 6).

Таблица 6. Сравняване на ниските и високите стойности на концентрациите на HMGB1 преди НЛХЛ, спрямо отговора след НЛХЛ. Анализът *Chi-square* не показва сигнификантна връзка между стойностите на концентрациите на HMGB1 преди НЛХЛ и степента на отговор след терапията ($p = 0,360$).

Степен на отговор след НЛХЛ	HMGB1 Преди НЛХЛ		N	p
	ниски стойности HMGB1 $\leq 6,60$ нг/мл	високи стойности HMGB1 $> 6,60$ нг/мл		
CR+PR	17	17	34	0.360
	50%	50%	100%	
SD+PD	19	12	31	
	61.3%	38.7%	100	
Общо	36	29	65	
	55,4%	44,6%	100%	

Chi-square тест проведен за двете групи пациенти, такива, които са с пълен (CR) или частичен отговор (PR) към проведената терапия (CR+PR), и такива със стабилна болест (SD) или прогресия (PD), (PD+SD) и стойностите на концентрация на HMGB1 след НЛХЛ, не показва сигнификантна връзка между стойностите на концентрация на HMGB1 след НЛХЛ и степента на отговор след терапията, $p = 0,063$. Анализът показва, че има тенденция за връзка между стойностите на концентрация на HMGB1 след ЛЛ и степента на отговора (таблица 7). Като ниски стойности на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ се приемат стойности на концентрацията на HMGB1 $\leq 8,38$ нг/мл, като високи се приемат стойности на концентрацията на HMGB1 $> 8,38$ нг/мл.

Таблица 7. Сравняване на ниските и високите стойности на концентрациите на HMGB1 след НЛХЛ, спрямо отговора след терапията. Анализът Chi-square не показва сигнификантна връзка между стойностите на концентрациите на HMGB1 след НЛХЛ и степента на отговор след ЛЛ ($p = 0,063$).

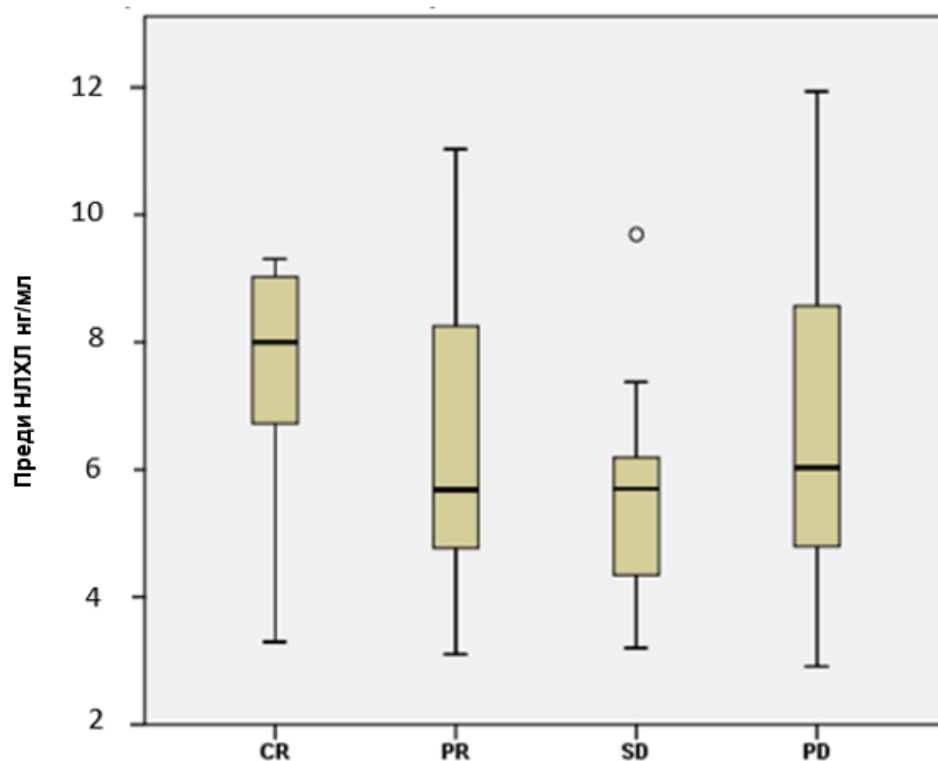
Степен на отговор след НЛХЛ	HMGB1 след НЛХЛ		N	p
	ниски стойности HMGB1 $\leq 8,38$	високи стойности HMGB1 $> 8,38$		
CR+PR	21	13	34	0.063
	61,8%	38,2%	100%	
SD+PD	12	19	31	
	61.3%	38.7%	100	
Общо	33	32	65	
	50,8%	49,2%	100%	

4.6.3. Сравнение на средните стойности на концентрация на HMGB1 преди и след НЛХЛ според степента на отговора след проведената терапия.

При анализа на средната стойност на концентрация на HMGB1 преди НЛХЛ, спрямо степента на отговора след проведената терапия (CR, PR, SD, PD), Jonckheere-Terpstra тест не показва сигнификантна връзка, ($p = 0,236$) (таблица 8), (фигура 19);

Таблица 8. Сравняване на средната стойност на HMGB1 преди НЛХЛ, спрямо степента на отговора след проведената терапия. Jonckheere-Terpstra тестът не показва сигнификантна връзка, ($p = 0,236$).

Степен на отговор след НЛХЛ	Брой	Средна стойност на концентрацията HMGB1 преди НЛХЛ	Стандартно отклонение	P-value
CR	13	7,53	1,79;	0,236
PR	21	6.37	2.04	
SD	22	5.64	2.01	
PD	9	6.68	2.67	

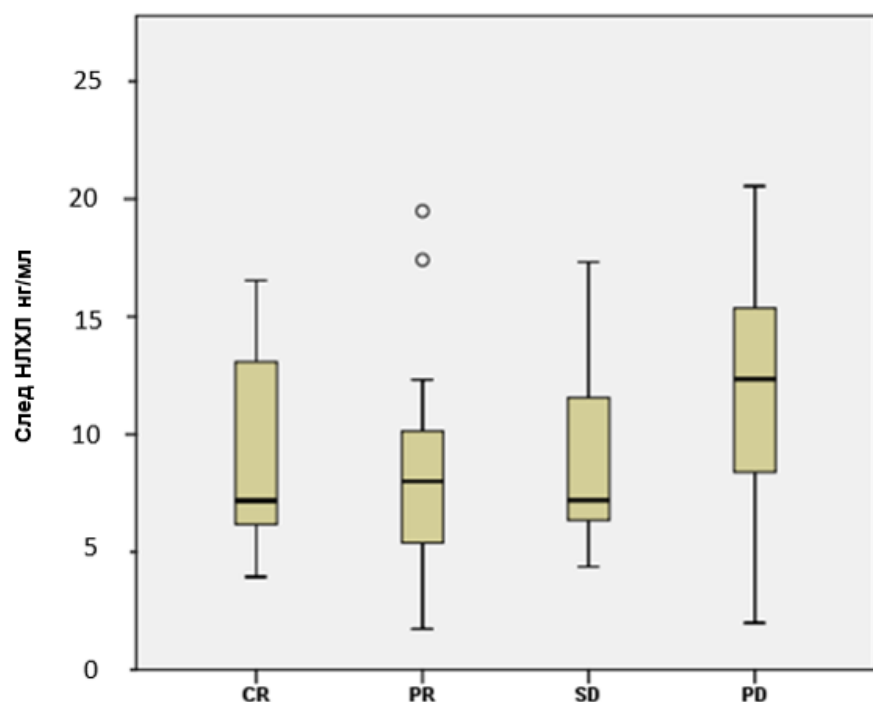


Фигура 19. Сравнение средната стойност на концентрацията HMGB1 преди НЛХЛ и степента на отговор след проведената терапия. При анализа на средната стойност на концентрация на HMGB1 след НЛХЛ, спрямо степента на отговора след проведената терапия. Jonckheere-Terpstra тестът не показва сигнификантна разлика, ($p = 0,236$).

При анализа на средната стойност на концентрация на HMGB1 след НЛХЛ, спрямо степента на отговора след проведената терапия (CR, PR, SD, PD), Jonckheere-Terpstra тест показва сигнификантна разлика $p=0,029$ (таблица 8), (фигура 19).

Таблица 8. Сравняване на средната стойност на HMGB1 след ЛЛ, спрямо степента на отговора след ЛЛ. Jonckheere-Terpstra тестът показва сигнификантна разлика ($p=0,029$).

Степен на отговор след НЛХЛ	Брой	Средна стойност на концентрацията HMGB1 след НЛХЛ	Стандартно отклонение	P-value
CR	13	9.47	3.98	0,029
PR	21	8.37	4.31	
SD	22	9.20	4.52	
PD	9	12.03	4.76	

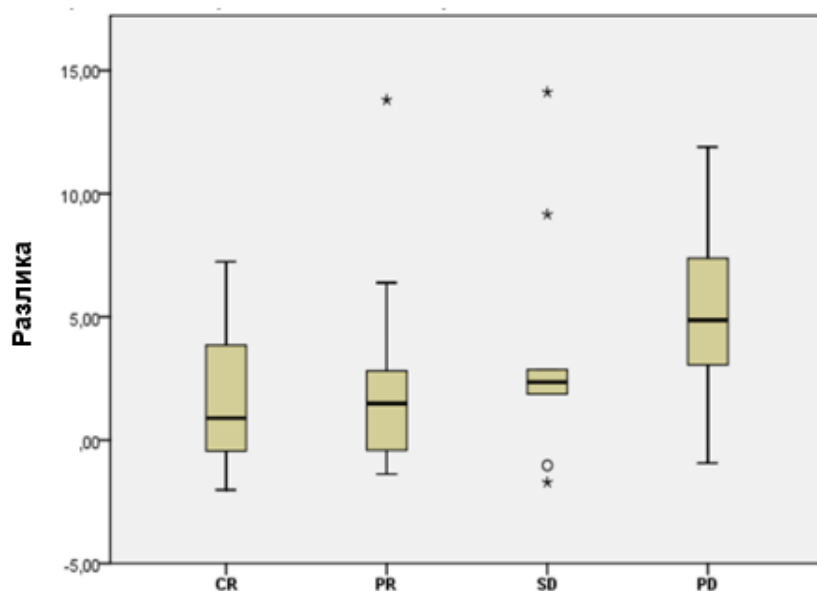


Фигура 19. Сравнение средната стойност на концентрацията HMGB1 след НЛХЛ и степента на отговор след проведената терапия, Jonckheere-Terpstra тест.

При анализа на разликата на средната стойност на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, при различните случаи спрямо степента на отговора след проведената терапия (CR, PR, SD, PD), Jonckheere-Terpstra тестът също показва сигнификантна разлика ($p=0,001$), (таблица 9), (фигура 20).

Таблица 9. Сравняване на разликата на средната стойност на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ, спрямо степента на отговора след ЛЛ. Jonckheere-Terpstra тестът показва сигнификантна разлика ($p=0,001$).

Степен на отговор след НЛХЛ	Брой	Средна стойност на концентрацията на HMGB1, разлика	Стандартно отклонение	P-value
CR	13	1,93	3,04	0,001
PR	21	1,99	3,48	
SD	22	3,56	5,00	
PD	9	5,34	3,45	



Фигура 20. Сравнение на разликата на средната стойност на концентрацията HMGB1 преди и след НЛХЛ и степента на отговор след проведената терапия, Jonckheere-Terpstra тест.

4.6.4. Сравнение на пациентите по двойки (Pairwise Comparisons) в зависимост от степента на отговора им след проведеното НЛХЛ, и средните стойности на концентрациите на HMGB1 след приключване на терапията.

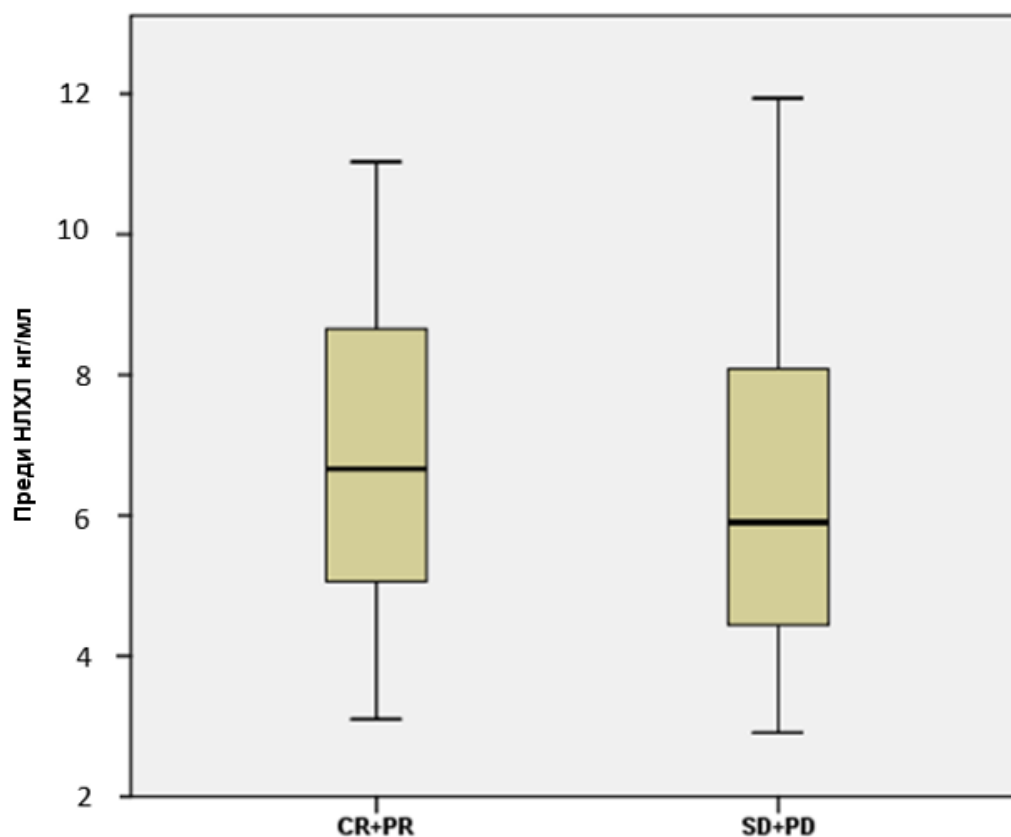
Анализът на средните концентрации на HMGB1, при различните двойки случаи в зависимост от степента им на отговор след проведеното НЛХЛ, (Pairwise Comparisons), показва следните резултати: Jonckheere-terpstra test показва сигнификантна разлика при анализа на средните стойности на концентрациите на HMGB1 при случаите с частичен отговор и прогресия на заболяването (PR-PD, $p=0.002$), и при анализа на пациентите с пълен отговор и прогресия на заболяването (CR-PD, $p=0.031$). Не се откри сигнификантна разлика при анализа на пациентите с частичен отговор и пълен отговор (PR-CR, $p=1.00$); частичен отговор и стабилна болест (PR-SD, $p=1.00$); пълен отговор и стабилна болест (CR-SD, $p=1.00$); стабилна болест и прогресия на заболяването (SD-PD, $p=0.203$) (таблица 10).

Таблица 10. Анализ на средните стойности на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ при различните групи пациенти по двойки, според степента на отговора им след края на терапията.

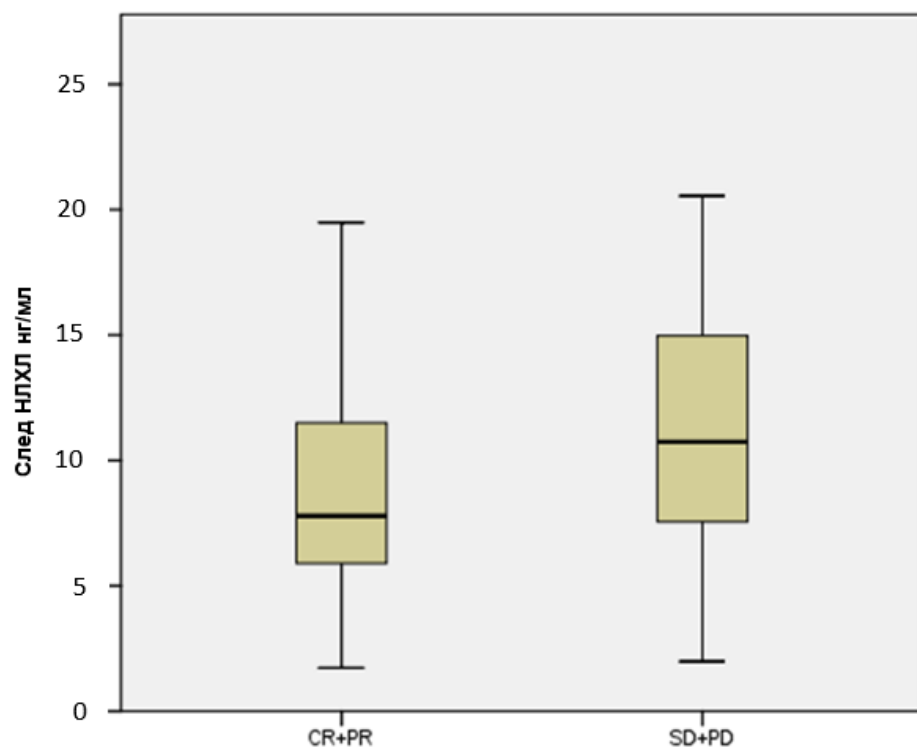
Групи	Средна стойност на концентрацията на HMGB1 при отделните групи, според степента на отговор	P с корекция
PR-CR	PR (M= 8.37, SD= 4.31) vs. CR (M= 9.47, SD= 3.98)	1.000
PR-SD	PR (M= 8.37, SD= 4.31) vs. SD (M= 9.20, SD= 4.52)	1.000
PR-PD	PR (M= 8.37, SD= 4.31) vs. PD (M= 12.03, SD= 4.76)	0.002
CR-SD	CR (M= 9.47, SD= 3.98) vs. SD (M= 9.20, SD= 4.52)	1.000
CR-PD	CR (M= 9.47, SD= 3.98) vs. PD (M= 12.03, SD= 4.76)	0.031
SD-PD	SD (M= 9.20, SD= 4.52) vs. PD (M= 12.03, SD= 4.76)	0.203

4.6.5. Концентрации на HMGB1 преди и след края на НЛХЛ, в зависимост от степента на отговор след края на проведената терапия.

Тестът на Mann-Whitney се приложен за анализ на средните концентрации на HMGB1 преди и след края на НЛХЛ, при случаи с пълен и частичен отговор (CR, PR), и стабилна болест и прогресия на заболяването (SD, PD), установи сигнификантна разлика в стойностите на концентрациите след приключване на терапията ($p=0,030$) (таблица 11, фигура 22). Стойностите на концентрацията при случаите със стабилна болест и прогресия на заболяването са сигнификантно по- високи. Преди НЛХЛ не се установи статистически значима разлика ($p=0,368$) (таблица 11, фигура 21).

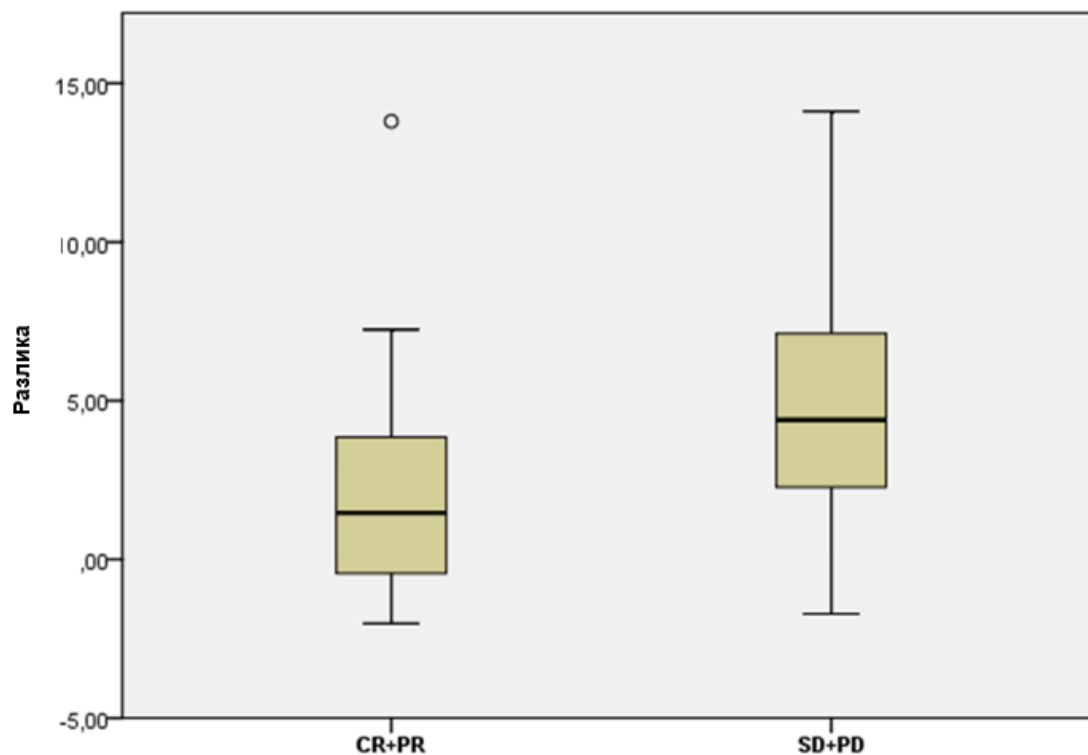


Фигура 21. Сравнение средната стойност на концентрацията HMGB1 преди НЛХЛ и степента на отговор след проведената терапия при пациенти с пълен и частичен отговор (CR+PR) и при пациенти със стабилна болест и прогресия на заболяването (SD+PD).



Фигура 22. Сравнение средната стойност на концентрацията HMGB1 след НЛХЛ и степента на отговор след проведената терапия при пациенти с пълен и частичен отговор (CR+PR), и при пациенти със стабилна болест и прогресия на заболяването (SD+PD).

При анализа на разликата в средните стойности на серумната концентрация на HMGB1 преди и след края на НЛХЛ при случаи с пълен и частичен отговор (CR+PR), и стабилна болест и прогресия на заболяването (SD+PD), Mann Whitney тест установи статистическа значима разлика в средните стойности на концентрациите ($p=0,002$) (фигура 23, таблица 11).



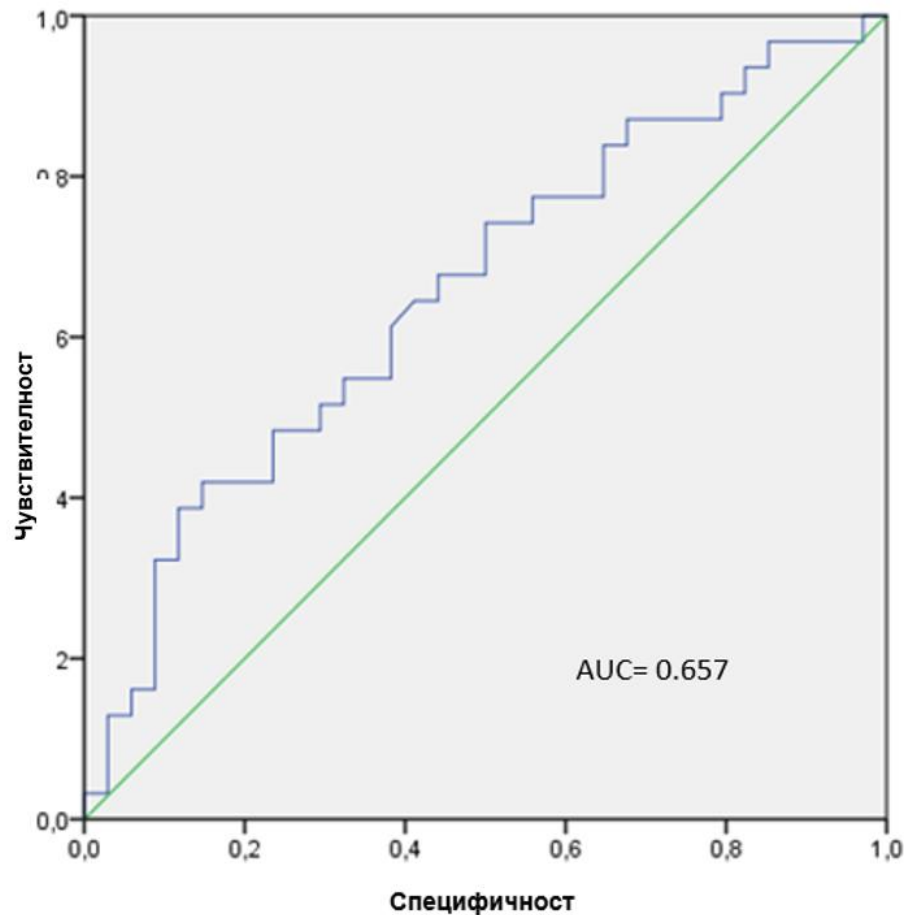
Фигура 23. Сравнение на разликата на средните стойности на концентрациите HMGB1, преди и след НЛХЛ и степента на отговор след проведената терапия при пациенти с пълен и частичен отговор (CR+PR), и при пациенти със стабилна болест и прогресия на заболяването (SD+PD).

Таблица 11. Сравнение на средните стойности на серумната концентрация на HMGB1 преди и след края на НЛХЛ при двете двойки случаи (CR+PR и SD+PD).

	Степен на отговор	N	Средна стойност на концентрацията на HMGB1	Std. Dev.	p
Преди НЛХЛ нг/мл	CR+PR	34	6,82	2,00	0.368
	SD+PD	31	6,38	2,51	
След НЛХЛ нг/мл	CR+PR	34	8,79	4,16	0.030
	SD+PD	31	11,21	4,80	
Разлика	CR+PR	34	1,97	3,27	0.002
	SD+PD	31	4,82	3,96	

4.6.6. Възможност на стойностите на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ, да предсказват отговора към проведеното лечение.

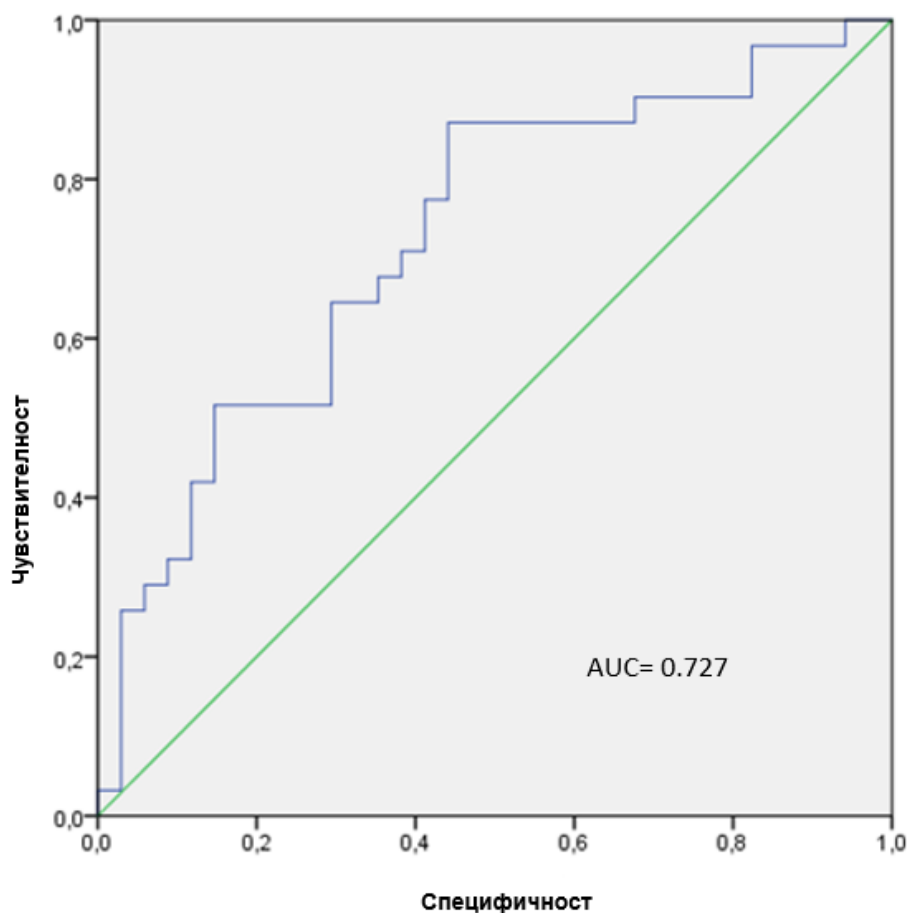
ROC анализът установи, че стойности на концентрацията на HMGB1, след НЛХЛ, над 7,73 нг/мл потенциално могат да бъдат предиктор за лош отговор към проведеното лечение ($AUC = 0,657$, 95% CI: 0. 524–0.790, $p = 0,034$) с чувствителност 74% и специфичност 50% (фигура 24).



Фигура 24. ROC крива; Диагностичната точност на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ се определя чрез оценка на най-голямата площ под кривата ($AUC = 0,657$, 95% CI: 0. 524–0.790, $p = 0,030$).

4.6.7. Възможност на разликата в стойностите на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, да предсказват отговора към проведеното лечение.

ROC анализът установи, че покачването на концентрацията на HMGB1 с 2,02 нг/мл потенциално може да бъде негативен предиктор за лош отговор към проведеното лечение ($AUC = 0,727$, 95% CI: 0.603–0.851, $p = 0,02$) с чувствителност 77,4% и специфичност 56,9% (фигура 25).



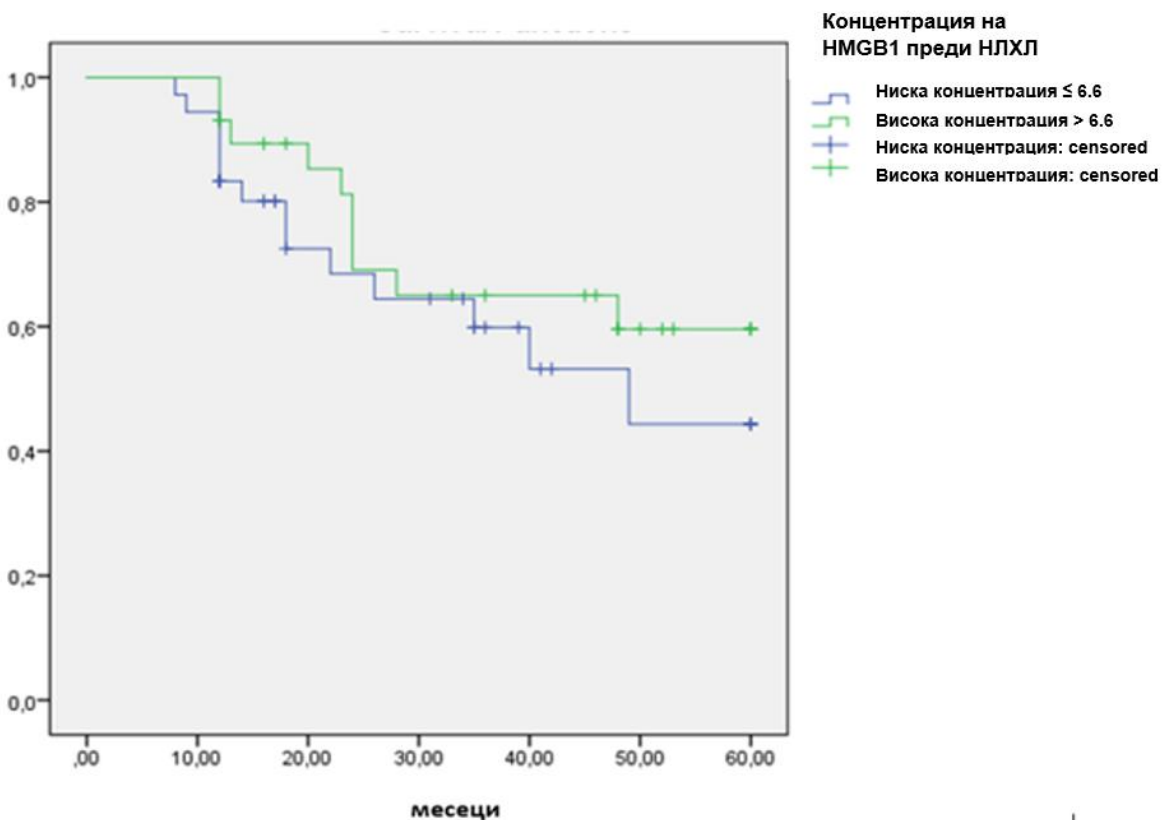
Фигура 25. ROC крива; Диагностичната точност на разликата в концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ се определя чрез оценка на най-голямата площ под кривата ($AUC = 0,727$, 95% CI: 0.603–0.851, $p = 0,02$).

4.7. Сравнителен анализ на ОП общата преживяемост (overallsurvival- OS) спрямо серумната концентрация на HMGB1 при пациенти с ЛАКР.

За да изследваме влиянието на концентрацията на HMGB1 върху, използвахме Kaplan-Meier test.

4.7.1. Средна ОП в зависимост от концентрацията на HMGB1 преди стратиране на НЛХЛ.

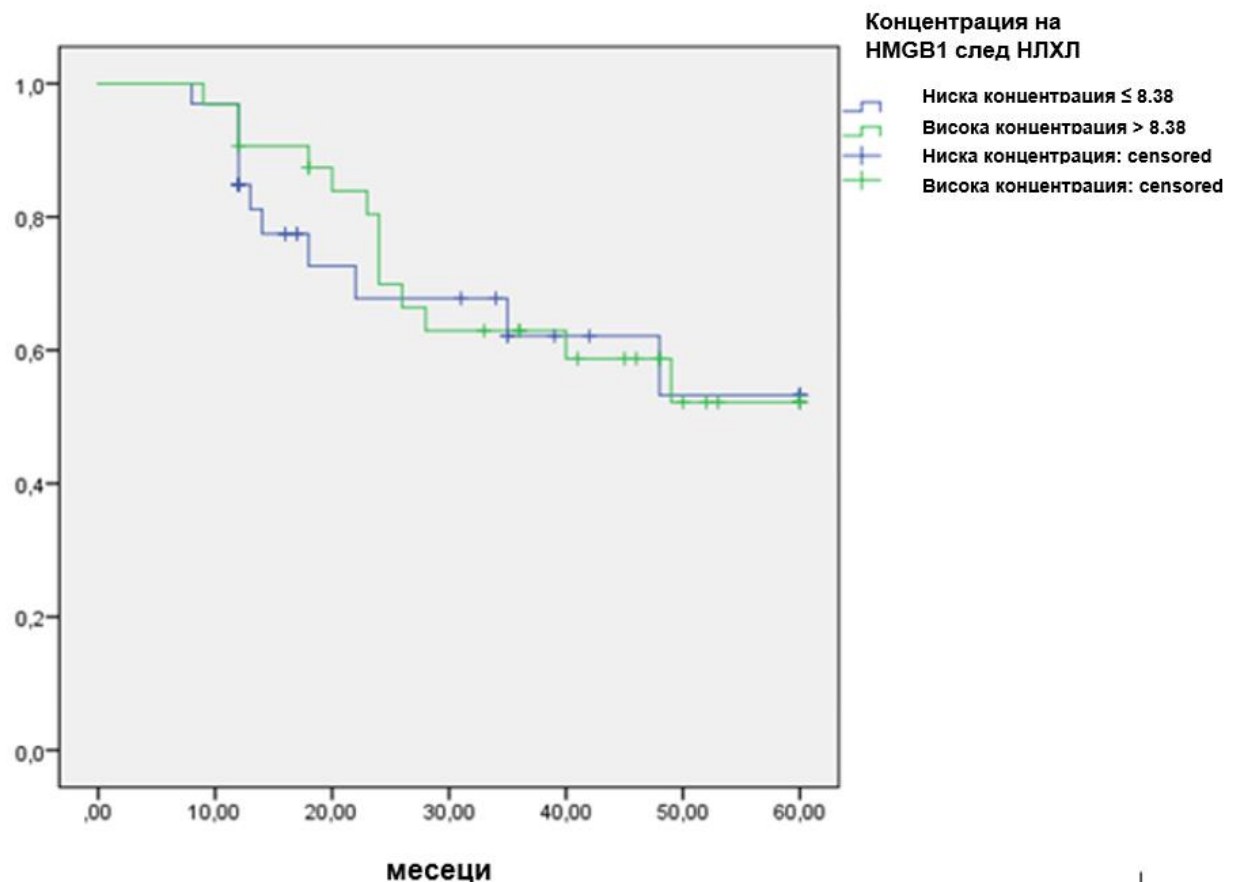
Средната ОП в месеци е 40,7 мес. (95% CI= 33,2-48,2) за случаите с ниска концентрация на HMGB1 (ниска концентрация $\leq 6,60$) преди стартиране на НЛХЛ и 45мес. (95% CI= 38,1-52,8) за случаите с висока концентрация на HMGB1 (висока концентрация $> 6,60$) преди НЛХЛ. Не се установи статистически значима разлика в ОП на пациентите в зависимост от концентрация на HMGB1 преди стартиране на НЛХЛ (log rank $p=0,328$) (фигура 26).



Фигура 26. Kaplan-Meier криви на разпределение на ОП на пациентите с ЛАКР в зависимост от серумната концентрация на HMGB1 преди стартиране на НЛХЛ.

4.7.2. Средна ОП в зависимост от концентрацията на HMGB1 след приключване на НЛХЛ.

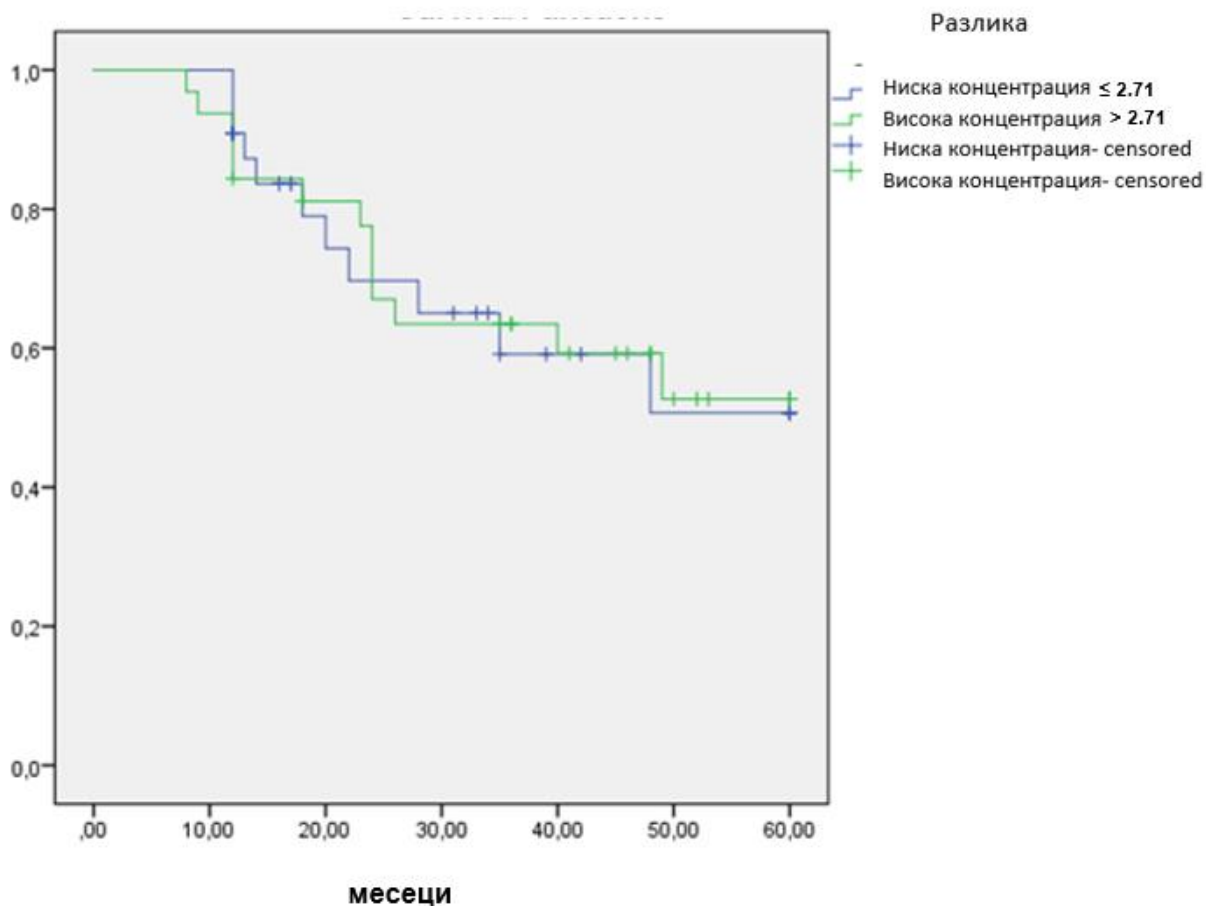
Средната ОП в месеци е 42,8 мес. (95% CI= 34,7-50,9) за случаите с ниска концентрация на HMGB1 (ниска концентрация $\leq 8,38$) след приключване на НЛХЛ и 43,7мес. (95%CI= 36,8-50,5) за случаите с висока концентрация на HMGB1 (висока концентрация $>8,38$) след приключване на НЛХЛ. Не се установи статистически значима разлика в ОП на пациентите в зависимост от концентрацията на HMGB1 след приключване на НЛХЛ (log rank $p=0,775$) (фигура 27).



Фигура 27. Kaplan-Meier криви на разпределение на ОП на пациентите с ЛАКР в зависимост от серумната концентрация на HMGB1 след приключване на НЛХЛ.

4.7.3. Средна ОП в зависимост от разликата в концентрациите на HMGB1 преди и след НЛХЛ.

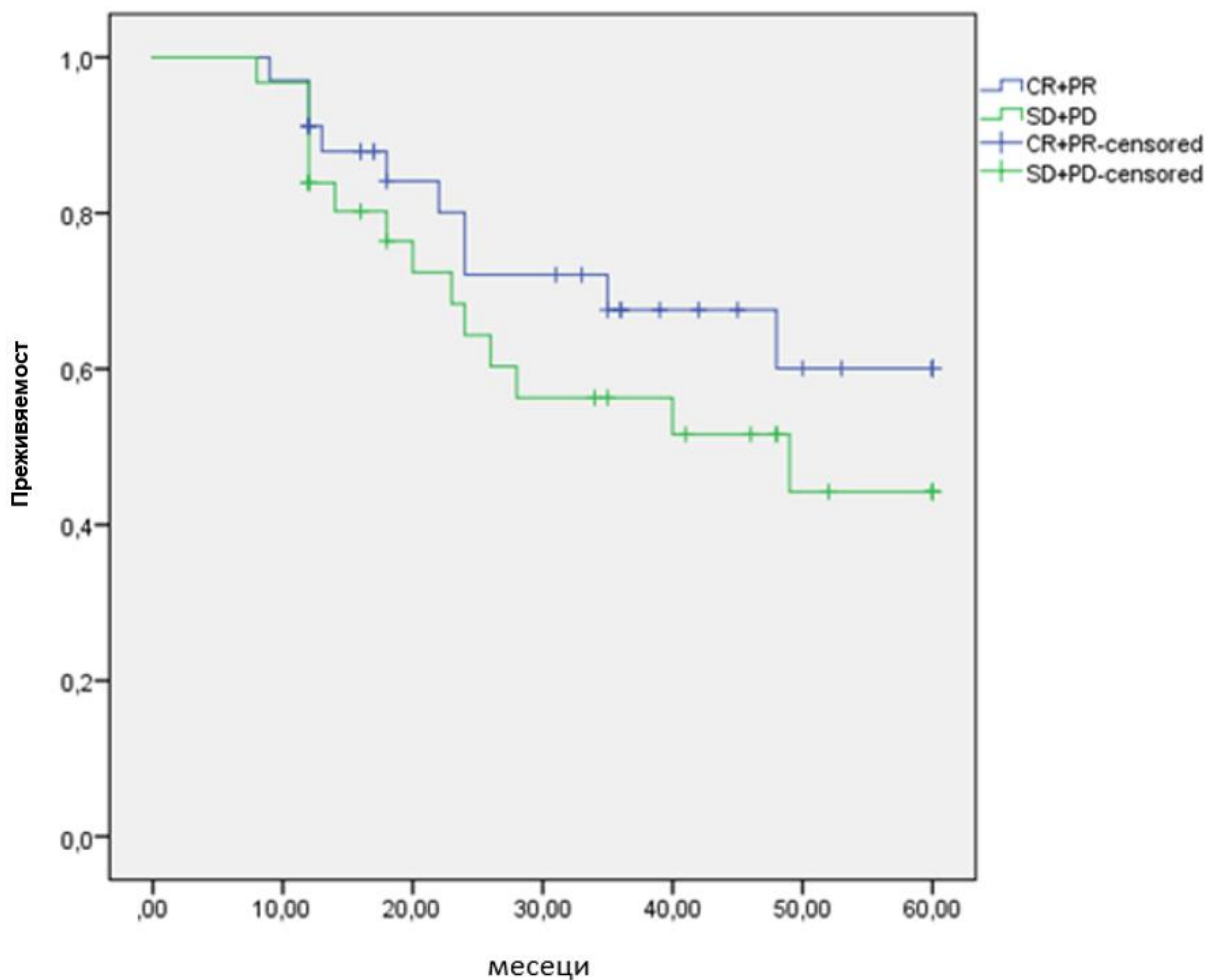
ОП на разликата в концентрациите на HMGB1 преди и след приключване на НЛХЛ в месеци е 42,7 мес. (95% CI= 34,7-50,6) към 43,0мес. (95% CI= 35,7-50,2), (log rank p=0,775) (фигура 28).



Фигура 28. Kaplan-Meier криви на разпределение на ОП на пациентите с ЛАКР в зависимост от разликата в серумната концентрация на HMGB1 преди и след приключване на НЛХЛ. Ниска концентрация $\leq 2,71$; Висока концентрация $> 2,71$

4.7.4. Средна ОП в зависимост от степента на отговор към проведеното НЛХЛ.

Средната ОП в месеци е 46,1 мес. (95% CI= 39,0-53,2) за случаите с пълен и частичен отговор към проведеното НЛХЛ и 39,9 мес. (95% CI= 32,1-47,6) за случаите със стабилна болест и прогресия. Не се установи статистически значима разлика в ОП на пациентите в зависимост от степента на отговора към проведеното НЛХЛ (log rank $p=0,26$) (фигура 29).



Фигура 29. Kaplan-Meier криви на разпределение на ОП на пациентите с ЛАКР в зависимост от степента на отговор след приключване на НЛХЛ.

4.8. Асоциация между стойностите на концентрация на HMGB1 и отговора към проведеното НЛХЛ.

По високите стойности на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ се асоциират с лош отговор към проведената терапия (odds ratio= 1.129, 95% CI= 1.006-1.267, p= 0.039), (таблица 12).

Таблица 12. Регресионен анализ, OR.

	p	OR	95% CI	
			lower	upper
След НЛХЛ	0,039	1.129	1.006	1.267

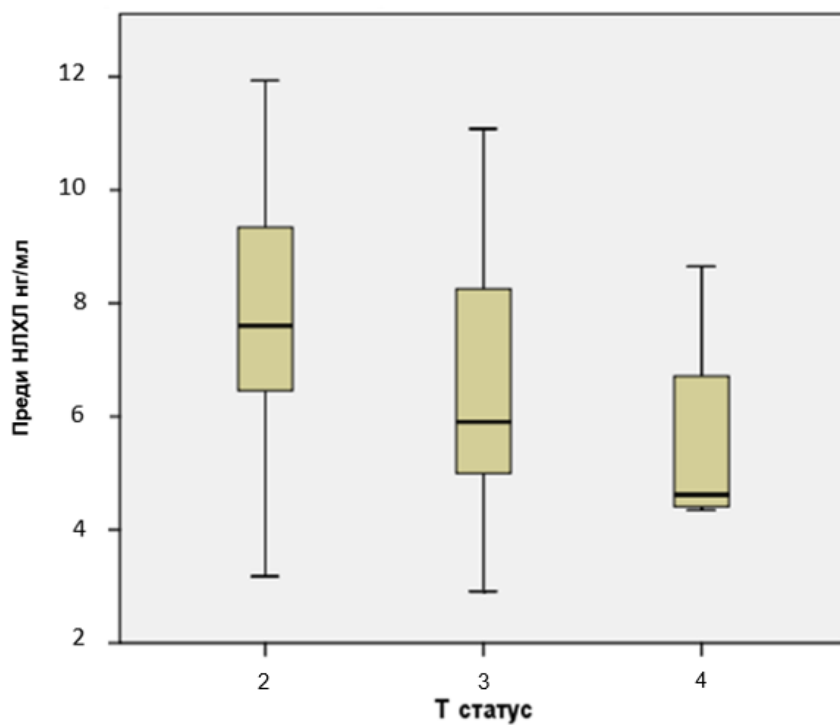
Нарастването на разликата в концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ също се асоциира с лош отговор към проведеното лечение (odds ratio= 1,254, 95% CI= 1.068-1.474, p= 0.006), (таблица 13).

Таблица 13. Асоциация между разликата в стойностите на HMGB1 след НЛХЛ и отговора към него.

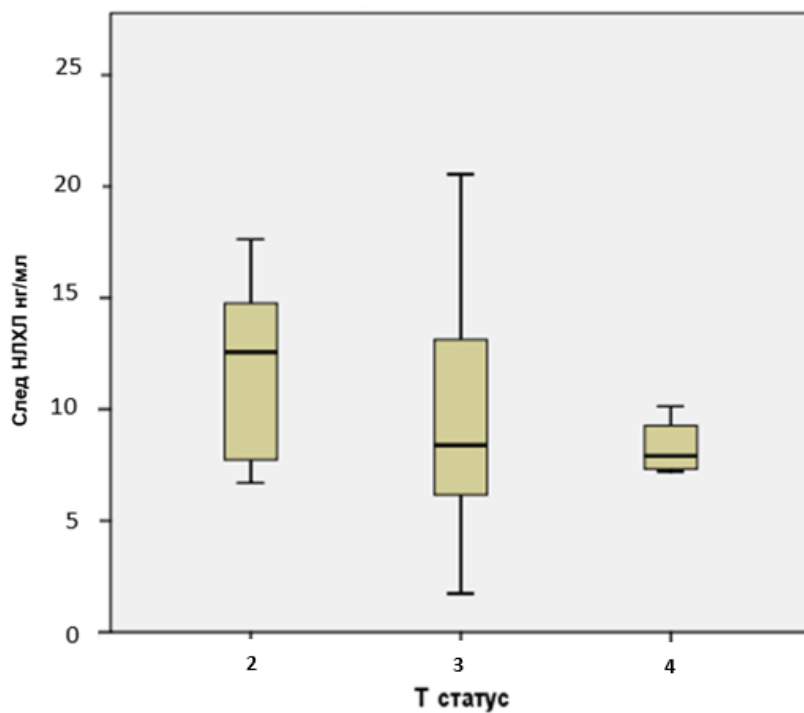
	p	OR	95% CI	
			lower	upper
разлика	0,006	1.254	1.068	1.474

4.9. Сравнение между стойностите на серумната концентрация на HMGB1 според Т и N категорията на пациентите преди и след НЛХЛ.

При анализ на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, беше направен по отношение на Т категорията на тумора преди НЛХЛ. Jonckheere-Terpstra тест не показва сигнификантна разлика (p= 0,061 p= 0, 204) (фигура 30, 31).

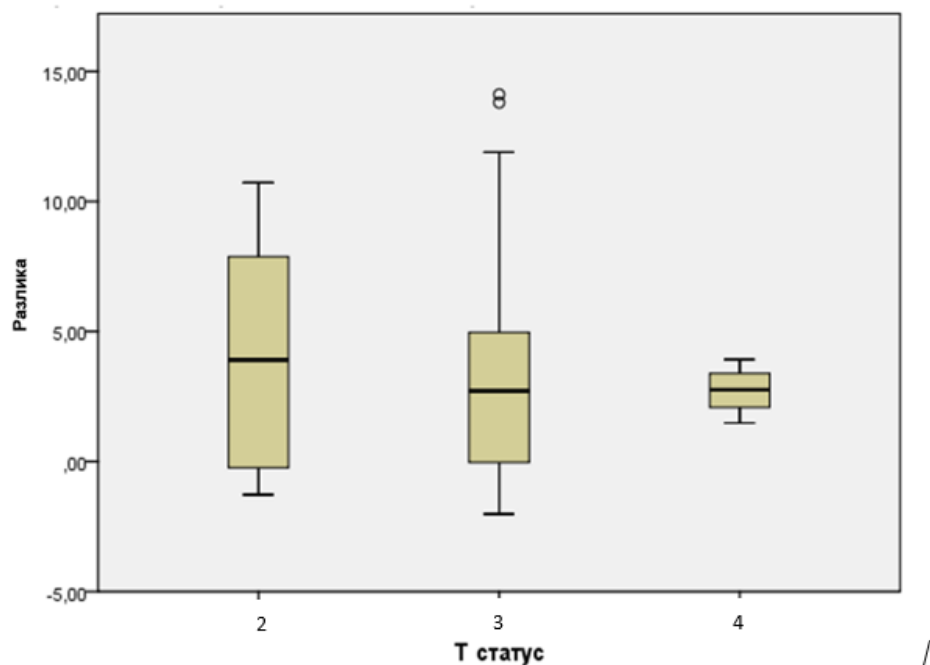


Фигура 30. Сравнение на стойностите на концентрацията HMGB1 преди НЛХЛ и T статуса преди НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.



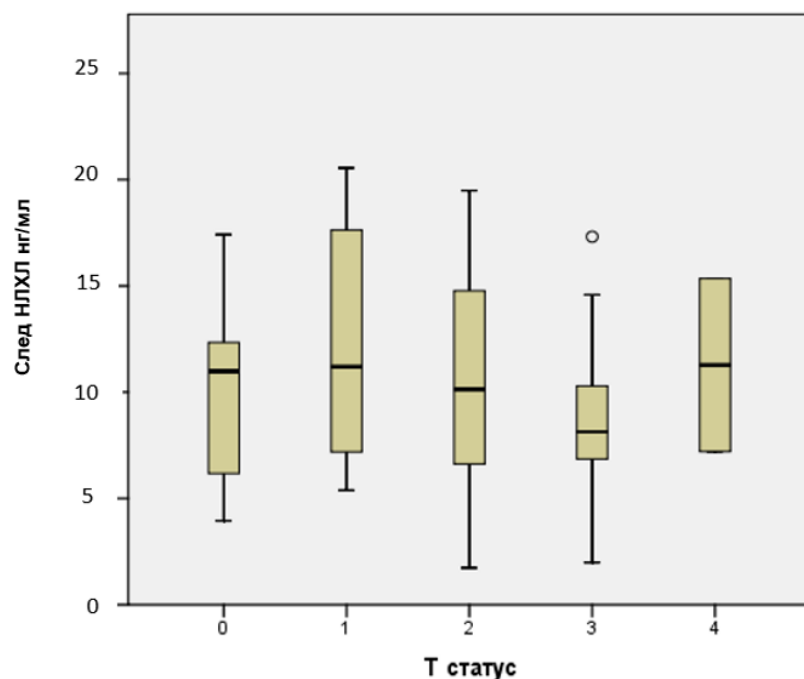
Фигура 31. Сравнение на стойностите на концентрацията HMGB1 след НЛХЛ и T статуса преди НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.

При анализа на разликата на серумните концентрации на HMGB1 преди и след НЛХЛ, спрямо Т статуса преди терапията, Jonckheere-Terpstra тест не показва сигнификантна разлика ($p=0,736$) (фигура 32).

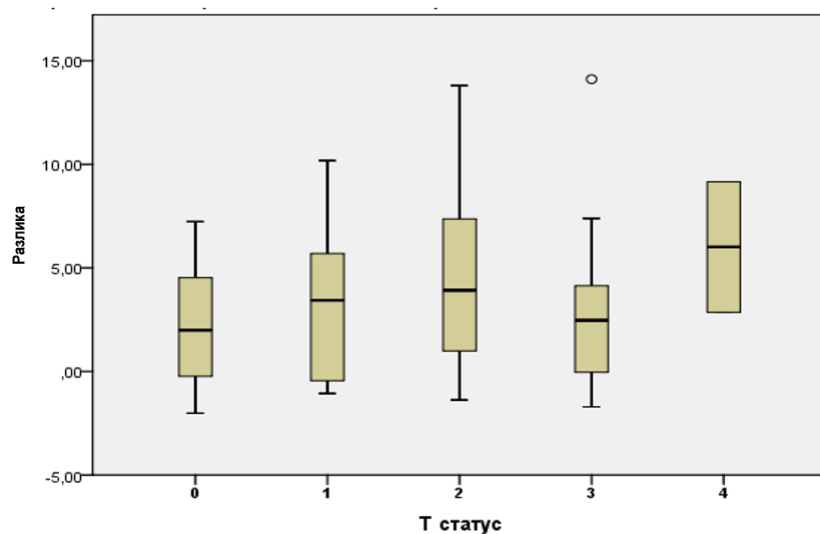


Фигура 32. Сравнение разликата на концентрацията HMGB1 преди и след НЛХЛ и Т статуса преди НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.

При анализа на стойностите на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, както и на тяхната разлика спрямо T категорията след приключване на терапията, Jonckheere-Terpstra тест не показва сигнификантна разлика ($p = 0,07$, $p = 0,515$, $p = 0,624$) (фигура 33, 34).

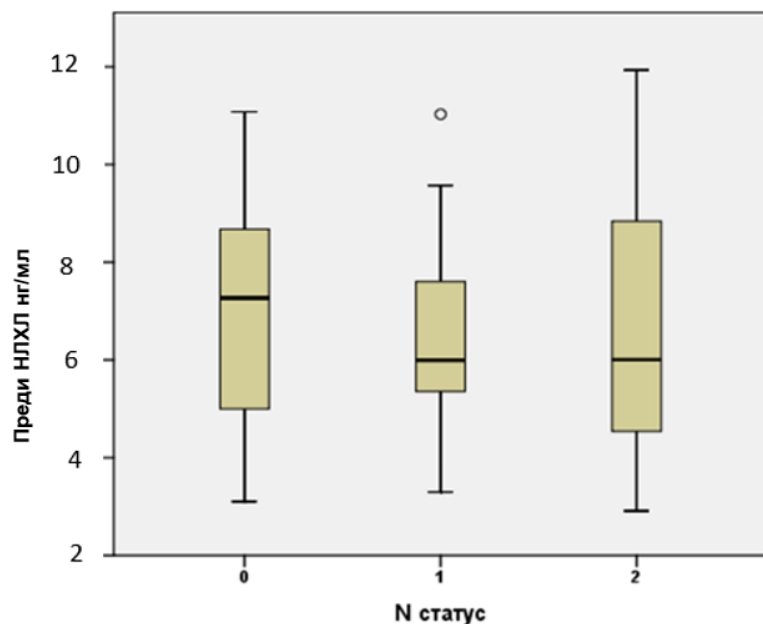


Фигура 33. Сравнение на стойностите на концентрацията HMGB1 след НЛХЛ и T статуса след НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.

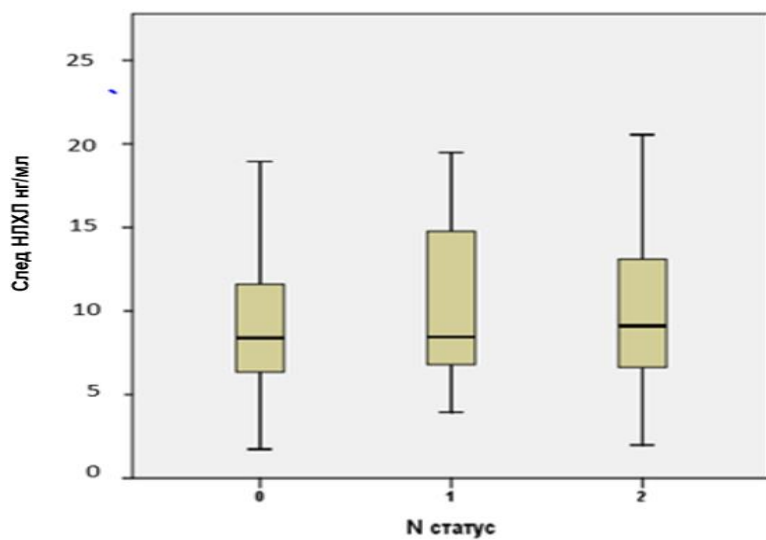


Фигура 34. Сравнение на стойностите на разликата на концентрацията HMGB1 преди и след НЛХЛ и T статуса след НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.

При анализа на стойностите на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, спрямо N категорията преди стартиране на терапията, Jonckheere-Terpstra тест не показва сигнификантна разлика ($p = 0,874$, $p = 0,942$) (Фигура 35, 36).

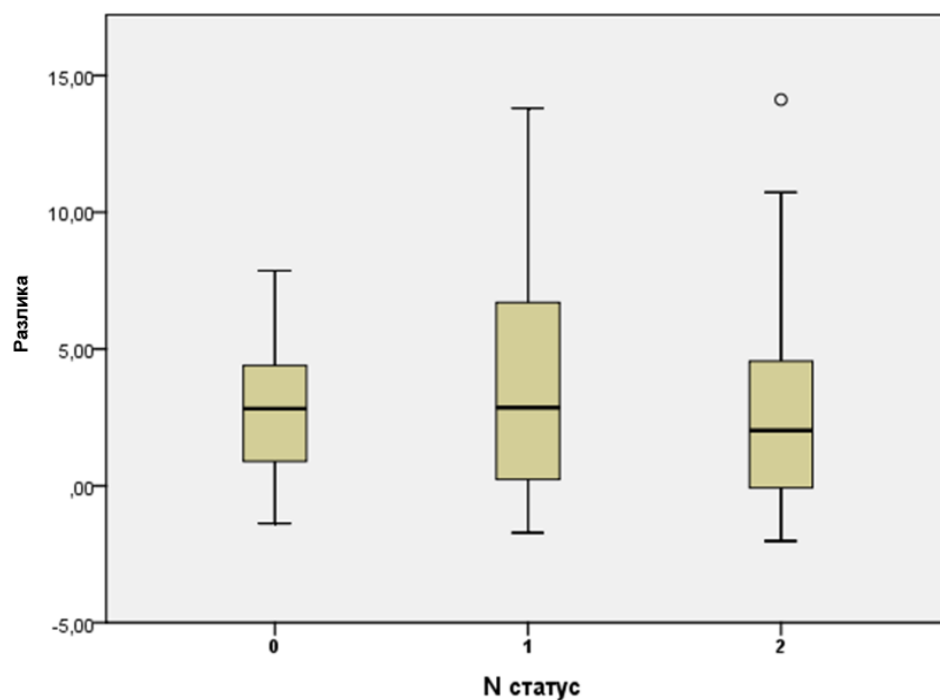


Фигура 35. Сравнение стойностите на концентрацията HMGB1 преди НЛХЛ и N статуса преди НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.



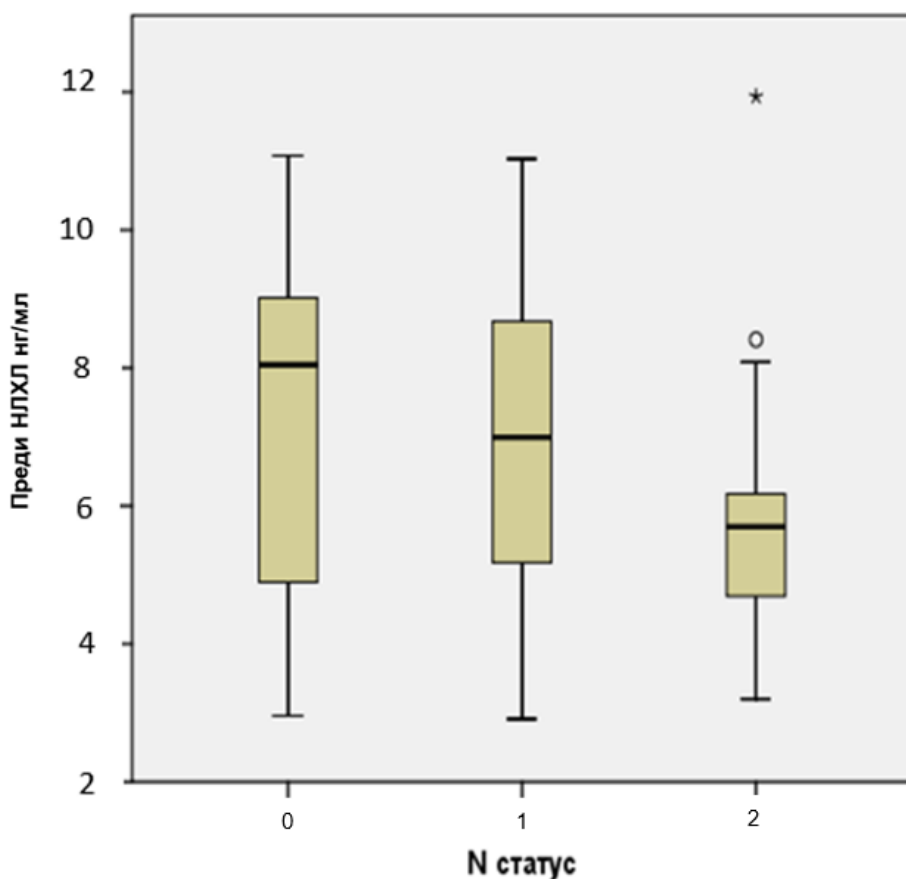
Фигура 36. Сравнение стойностите на концентрацията HMGB1 след НЛХЛ и N статуса преди НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.

При анализа на разликата в стойностите на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, спрямо N категорията преди стартиране на терапията, Jonckheere-Terpstra тест също не показва сигнификантна разлика ($p=0,642$) (Фигура 37).

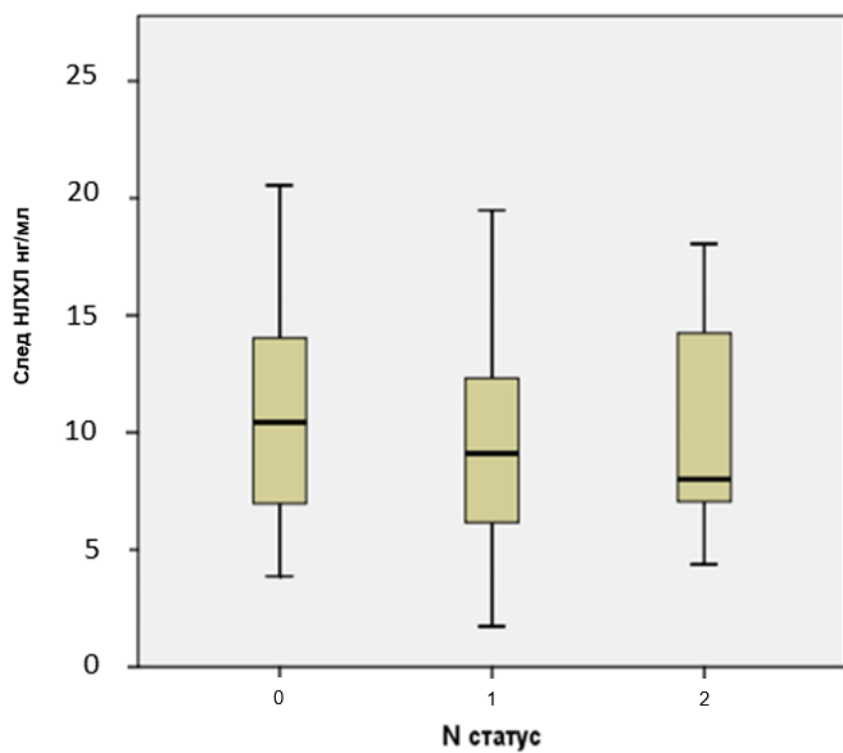


Фигура 37. Сравнение разликата на стойностите на концентрацията HMGB1 преди и след НЛХЛ и N статуса преди НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.

При анализа на стойностите на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, спрямо N категорията след приключване на терапията, Jonckheere-Terpstra тест не показва сигнификантна разлика ($p=0,107$, $p=0,633$) (Фигура 38, 39).

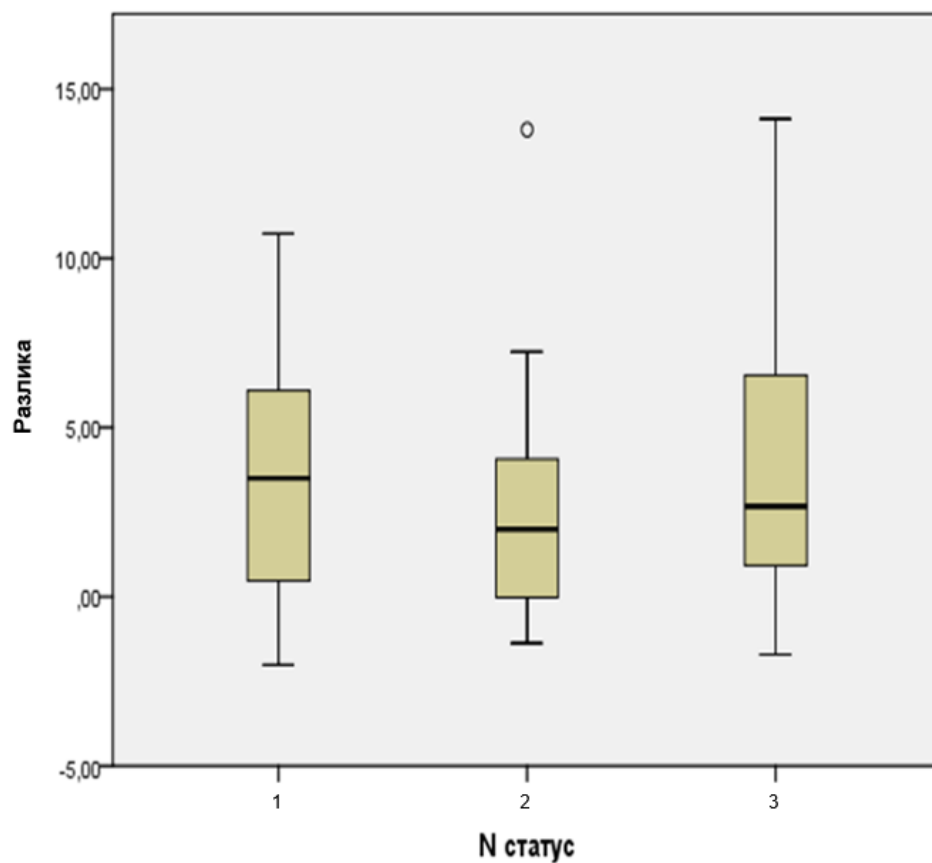


Фигура 38. Сравнение стойностите на концентрацията HMGB1 преди НЛХЛ и N статуса след НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.



Фигура 39. Сравнение стойностите на концентрацията HMGB1 след НЛХЛ и N статуса след НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.

При анализа на разликата на стойностите на концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ, спрямо N категорията след приключване на терапията, Jonckheere-Terpstra тест не показва сигнификантна разлика ($p=0,937$) (фигура 40).



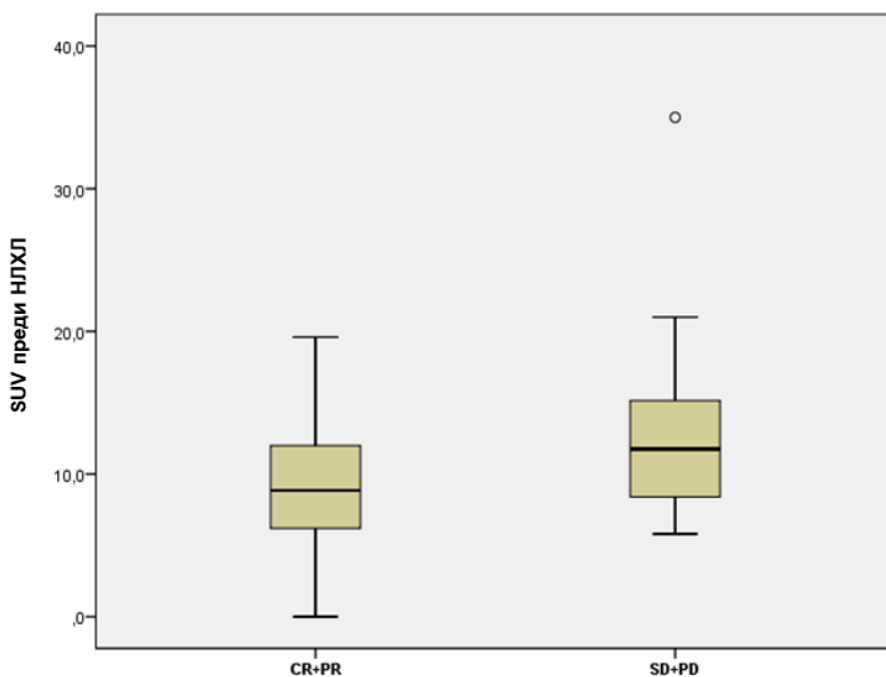
Фигура 40. Сравнение на разликата в стойностите на концентрацията HMGB1 преди и след НЛХЛ и N статуса след НЛХЛ, Jonckheere-Terpstra тест.

4.10. Връзка между стойностите на SUV преди НЛХЛ и отговора към проведеното лечение.

Информация относно стойностите SuV_{max} беше налична за 54 от пациентите. Извършен бе анализ на стойностите на SuV_{max} преди НЛХЛ, спрямо степента на отговора към проведената терапия при две групи пациенти. Mann-Whitney теста установи сигнификантна връзка ($p=0,034$) между двете групи пациенти и SUV. Пациентите в групата SD+PD имат сигнификантно по- високи стойности на SUV.(таблица 14, Фигура 41).

Таблица 14. Средни стойности на SuV_{max} преди неoadювантното лъчелечение, съчетано с химиотерапия, при две групи пациенти (CR+PR и SD+PD).

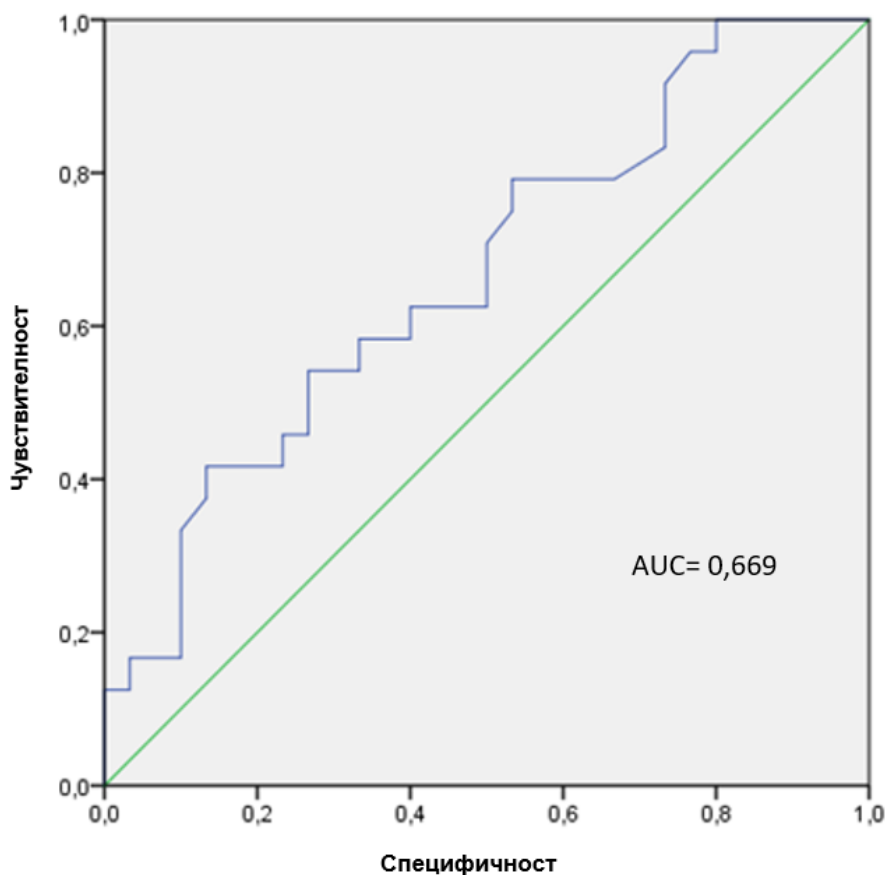
SUV	Групи	N	Mean	Std. dev.	P
Преди ЛЛ	CR+PR	30	9.32	4.41	0.034
	SD+PD	24	12.79	6.44	



Фигура 41. Сравнение на SUV преди лъчелечение и степента на отговор след лъчелечение при две групи пациенти (CR+PR и SD+PD).

4.11. Възможност стойностите на SUV max преди лъчелечение да предсказват отговора към проведеното НЛХЛ.

ROC анализът установи, че стойности на SUVmax над 8,7 потенциално могат да бъдат негативни предиктори за лош отговор към НЛХЛ (AUC= 0,669, 95% CI: 0. 524–0.813, $p = 0,03$) с чувствителност 70,8% и специфичност 50% (фигура 42).



Фигура 42. ROC крива; Диагностичната точност на SUVmax се определя чрез оценка на най-голямата площ под кривата (AUC=,669, 95% CI: 0. 524–0.813, $p = 0,034$).

V. ДИСКУСИЯ

ЛЛ е един от основните методи за лечение на онкологичните заболявания. Проучванията описват няколко вида клетъчна смърт след въздействие на ЙОЛ: апоптоза, некроза, програмирана некроза (236-238). Различните фази на клетъчния цикъл са с различна лъчечувствителност и съответно механизмите водещи до спиране на клетъчния цикъл, са различни (239). В днешно време изследванията за подобряване на резултатите от ЛЛ са фокусирани върху промените във фенотипа на туморните клетки и сложните биологични взаимодействия между туморните клетки и свързаните с тумора фактори в туморната микросреда (240). След като туморните клетки са увредени от ЙОЛ, те освобождават туморни антигени и свързани с увреждането молекулярни модели (DAMPs), те от своя страна водят до промяната в туморната микросреда и предизвикват противотуморен имунен отговор (241-243). Репопулацията на туморни клетки след ЛЛ е основна причина за лъчезистентност и рецидив на тумора. Един от ключовите отличителни белези на клетъчна смърт е освобождаването на нехистоновиот ДНК-свързващ протеин с висока подвижност група Б1 (HMGB1). В момента HMGB1 е най-обещаващият специфичен кандидат за детекция на некротична клетъчна смърт. Освобождаването на HMGB1 обикновено възниква, когато туморните клетки претърпят некроза или са подложени на хипоксия, лишаване от хранителни вещества, липса на основни растежни фактори или прилагане на конвенционална противотуморна терапия (244, 245). Като многофункционален протеин, HMGB1, притежава разнообразни биологични активности и точният механизъм и участието му в канцерогенезата все още е неясен (246). Като ядрен протеин, HMGB1 участва в множество процеси, включително транскрипция, репликация, възстановяване на ДНК. В цитоплазмата HMGB1 се свързва с клетъчна миграционна активност, антиапоптоза, автофагия и т.н. По-голяма част от HMGB1, който се секретира в извънклетъчната среда, играе роля в прогресията на тумора чрез RAGE рецептора (246). Освободеният HMGB1 задейства хроничен възпалителен отговор, насърчава оцеляването на туморните клетки, инвазията и неоангиогенезата чрез активиране на вътреклетъчно сигнализиране (247, 248). Следователно, серумният HMGB1 може да бъде потенциален мощен диагностичен и прогностичен биомаркер за пациенти с онкологични заболявания.

КР е силно хетерогенно заболяване и се характеризира с множество промени в различни молекулярни пътища по време на своето развитие. Очаква се случаите на КРК да

се увеличат с 60%, с 2,2 милиона нови случая и 1,1 милиона смъртни случая до 2030 г. (249). КР представлява приблизително 30% от колоректалните тумори и се свързва с по-лоши клинични резултати (250). Стандартното лечение на ректалния карцином е НЛХЛ и последваща тотална мезоректална ексцизия. Клиничните проучвания показват, че честотата на локалните рецидиви намалява при провеждането на НЛХЛ, докато общата преживяемост не се променя (251). Степента на отговор към проведеното неoadювантно лечение варира при пациентите. Докато ~40% от пациентите имат частичен отговор (PR) и 8%-20% от пациентите постигат pCR (пълнен патологичен отговор), подгрупа от тумори (~20%) проявяват резистентност към терапията, демонстрирайки или прогресия, или само минимална регресия към стабилна болест (252). Вариабилността в отговора на приложената терапия се дължи на комплекс от фактори: прилагане на различни дози на облъчване, различни интервали между НЛХЛ и операцията, различни химиотерапевтични режими, прилагане на различни образни методи за стадиране и за определяне на степента на отговор след лечение. Традиционно оценката на прогнозата при пациенти с рак се основава най-вече на вида на тумора, степента на диференциация и клиничния стадий (253). Доказано е обаче, че други фактори като молекулярни и клетъчни характеристики на първичния тумор могат да подобрят прогностичната оценка и след това да насочат клиницистите към разработването на подходяща стратегия за хирургично лечение, както и избора на следоперативно лечение (253). Пациенти, проявяващи резистентност към НЛХЛ, се нуждаят от биомаркери, предвиждащи отговора към проведената неoadювантна терапия в ранен момент. Това би позволило да се селектират пациенти с КР, които биха имали или не биха имали полза от ЛЛ, както и да ни насочат към последващ терапевтичен подход. Динамиката в изменението на серумната концентрация на HMGB1, в отговор на определен вид въздействие, се счита за предиктор на терапевтичния ефект. Важно е да се отбележи, че прогностичната стойност се отразява в разликата между изходните нива и нивата след лечението, а не само на база изходното ниво, което може да бъде повлияно от различни фактори (254).

Настоящото проучване имаше за цел да оцени предиктивните и прогностичните възможности на серумната концентрация на HMGB1, измерена преди и след края на НЛХЛ, при пациенти с ЛАКР, за оценка степента на отговор към проведената терапия. След проведено НЛХЛ се установи се, че 52,3% от изследваните пациенти, отговарят на

терапията като постигат пълен и частичен отговор (objective response rate- ORR), 47,3 % не отговарят на терапията (стабилна болест и прогресия на заболяването). Тези резултати съответстват на проучените данни в литературата.

Получените от нас резултати предполагат, че високите концентрации на HMGB1 и тяхната динамика след НЛХЛ, са важен маркер за лош отговор към проведената терапия. При анализ на пациентите с пълен и частичен отговор, и стабилна болест и прогресия на заболяването, установихме сигнификантна разлика в стойностите на концентрациите след приключване на НЛХЛ ($p = 0,030$). Стойностите на концентрацията при случаите със стабилна болест и прогресия на заболяването са сигнификантно по- високи. Nikolaus A. Handke и сътрудници също правят проучване на концентрациите на HMGB1 преди и по време на лечението на 96 пациенти с карцином на бял дроб. Изследват серумната концентрация чрез ELISA на HMGB1 преди стартиране на ХТ, както и преди 2 и 3- ти цикъл ХТ. Претерапевтичните концентрации не показват статистически значима предиктивна стойност. Стойностите на HMGB1 преди цикъл 2 и 3, както и разликата в концентрациите между цикъл 1 до 2 се различават значително при пациентите с добър отговор (пълен отговор и частичен отговор) и лош отговор (прогресия). Направеният от тях ROC анализ на концентрациите показва площи под кривата (AUCs) от 0,690 при цикъл 2 и 0,794 при цикъл 3, както и чувствителност от 34,4% и 37,5%, съответно, за прогресия при 90 % специфичност. Освен това високите концентрации на HMGB1 в цикли 2 и 3 са свързани с по-кратка обща преживяемост при изследваните от тях пациенти (255).

Направеният от нас ROC анализ установи, че стойности на концентрацията на HMGB1, след НЛХЛ, над 7,73 нг/мл потенциално могат да бъдат предиктор за лош отговор към проведеното лечение ($AUC = 0,657$, 95% CI: 0. 524–0.790, $p = 0,034$) с чувствителност 74% и специфичност 50%. Това дава възможност да допуснем, че оценката на биомаркери в хода на дадено лечение би могла да отдиференцира пациентите, които не отговарят на терапията. Това ще насочи клиницистите към промяна на терапевтичните стратегии и избор на друг подход за тази група пациенти.

Оценката на общата преживяемост е от решаващо значение за пациентите с онкологични заболявания. По- високата експресия на HMGB1 в хода на дадено лечение се асоциира с лоша прогностична стойност. За това свидетелства и мета анализ включващ 18

проучвания, обхващащи 11 различни вида тумори. Мета анализът изследва прогностичната стойност на HMGB1. Общо 17 проучвания включват данни за общата преживяемост при 10 вида рак. Свръхекспресията на HMGB1 е значително свързана с по-лоша обща преживяемост (HR: 1,99; 95% CI, 1,71-2,31). Освен това, статистическата значимост е постоянна, независимо от различните видове тумори, рак на стомаха (HR: 2,30; 95% CI, 1,16-4,57), колоректален рак (HR: 1,54; 95% CI, 1,17-2,04), хепатоцелуларен карцином (HR: 1,80; 95% CI, 1,35-2,40), рак на панкреаса (HR: 2,61; 95% CI, 1,48-4,59), назофарингеален карцином (HR: 2,80; 95% CI, 1,37-5,73), плоскоклетъчен карцином на главата и шията (HR: 2,13; 95% CI, 1,08-4,22), рак на хранопровода (HR: 2,28; 95% CI, 1,41-3,64), злокачествен плеврален мезотелиом (HR: 2,10; 95% CI, 1,00-4,40), рак на пикочния мехур (HR: 4,31; 95% CI, 2,21-8,41) и цервикален карцином (HR: 2,12; 95% CI, 1,09-4,53) (256). Седем проучвания при общо 6 вида рак, се анализират по отношение на свободната от болест преживяемост. Обобщената оценка показва значително по-кратка свободната от болест преживяемост при пациенти със свръхекспресия на HMGB1 (HR: 2,26; 95% CI, 1,65-3,10) (256). Нашето проучване не показва разлика в общата преживяемост в зависимост от концентрация на HMGB1. Установихме, че според степента на отговор след ЛЛ, средната обща преживяемост в месеци е 46,1 мес. (95% CI= 39,0-53,2) за случаите с пълен и частичен отговор към НЛХЛ и 39,9 мес. (95% CI= 32,1-47,6) за случаите със стабилна болест и прогресия, но тази разлика не е достигнала статистическа значимост (log rank P= 0.266).

Проучване на Dinç Süren et al включва 110 случая, които са били диагностицирани с КРК. Експресията на HMGB1 е изследвана чрез имунохистохимичен метод. Експресията на HMGB1 е оценена като отрицателна при 32 (44,4%) от пациентите и като положителна при 40 (55,6%) пациенти. Установили са, че няма връзка между експресията на HMGB1 и пола, възрастта, дълбочината на туморна инвазия и хистологичния тип. Откриват значителна връзка между експресията на HMGB1 и състоянието на лимфните възли, наличието на метастази и стадия ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, съответно). Подобни резултати са получени за връзките между HMGB1 и хистологична степен, перинеурална инвазия, лимфоваскуларна инвазия и лимфоцитен отговор ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$ и $p < 0,001$, съответно). Резултатите им показват, че свръх експресията на HMGB1 има значителна роля в прогресията на тумора (особено миграцията на туморни клетки) и способността на тумора да метастазира при колоректален рак (257). Малко

нерандомизирано проучване изследва 51 пациенти с локално авансирал карцином на гърдата, получаващи неoadювантна ХТ. Цел на проучването е да изследва как влияе концентрацията на HMGB1 върху отговора на проведената терапия. За целта изследват динамиката в концентрациите на HMGB1 в хода на провежданото лечение. Резултатите им показват, че девет от пациентите постигат пълен отговор, 29 постигат частичен отговор, докато 13 нямат промяна. Установяват, че пациентите със стабилна болест имат по-високи нива на HMGB1 преди началото на терапията ($p = 0,056$ и $p = 0,054$), както и че кинетиката на HMGB1 по време на терапията корелира с ефикасността на лечението ($p = 0,053$)(258). Въпреки че статистически нашето проучване е лимитирано от малкия брой пациенти, то потвърждава предиктивната стойност на серумните нива на концентрацията на HMGB1 след лъчевомо лечение и тяхната динамика за отговора към НЛХЛ. Нашите резултати показват, че високите нива на концентрация на HMGB1 след НЛХЛ могат да бъдат предиктивен маркер за лош отговор към терапията. Не се откри статистически значима връзка между нивата на HMGB1 и клиничко патологичните характеристики на пациентите с КР.

Тъй като HMGB1 е известен като маркер за клетъчна смърт, Sijia He et al анализират количеството HMGB1, освободено в клетъчни култури от туморни клетки в различни времеви точки след облъчването. В същото време, те анализират експресията на HMGB1 в ядрото и цитоплазмата на облъчени туморни клетки съответно в различна времева точка след облъчването. Те разкриват нов механизъм, чрез който HMGB1, освободен от умиращи клетки по време на лъчетерапия или химиотерапия, може да стимулира пролиферацията на живи туморни клетки, също така установяват, че инхибирането или генетичната аблация на HMGB1 подтиска пролиферацията на туморните клетки. Веднъж освободен, HMGB1 може да взаимодейства с множество рецептори на клетъчната повърхност и да упражнява серия от клетъчно регулиращи ефекти от оцеляването на клетките до клетъчната смърт. Тяхното проучване доказва критичната роля на HMGB1 в пролиферацията на туморни клетки след облъчване. Установяват, че HMGB1, освободен от облъчени туморни клетки, насърчава пролиферация на туморни клетки чрез сигнален път на HMGB1/RAGE/ERK (259). Друго проучване има за цел да анализира механизма на метастазиране при клетъчни култури от карцином на панкреаса, след ЛЛ. Установяват, че умиращите ракови клетки на панкреаса, под въздействие на ЙОЛ, значително насърчават инвазията на туморните клетки на

панкреаса *in vitro* и туморните метастази *in vivo*. ЛЛ предизвиква освобождаване на HMGB1 в извънклетъчното пространство. Блокирането на HMGB1 гена отслабва стимулиращия миграцията ефект на облъчени, умиращи клетки. HMGB1, получен от умиращи клетки, функционира по паракринен начин, за да повлияе на миграцията на ракови клетки и активиране на пътя PI3K/pAkt (вътреклетъчен път на сигнална трансдукция, който насърчава метаболизма, пролиферацията, клетъчното оцеляване, растежа и ангиогенезата в отговор на извънклетъчни сигнали) (200).

В днешно време ПЕТ/КТ е широко използван метод за образна диагностика със съществено значение при вземане на клинични решения. Нашите резултати предполагат предиктивната стойност SUV_{max} като по-високите стойности на SUV_{max} преди стартиране на лечението се асоциират с лош терапевтичен отговор. Yi-xin Yin et al правят ретроспективно проучване на 66 пациента с колоректален карцином и се опитват да установят клиничното значение на SUV_{max} при пациентите и връзката на SUV_{max} с KRAS мутация и индекса Ki-67. Проучването открива, че SUV_{max} на 18F-FDG ПЕТ/КТ е различен между тумори на дебелото черво и ректума и е свързан с KRAS мутация, но не и с индекса Ki-67; няма значима връзка между SUV_{max} и преживяемостта на пациентите с КРК (260). Qian Xia правят анализ на 867 пациента, с КРК и чернодробни метастази, от 15 проучвания. Те се опитват да установят прогностичната стойност на SUV_{max}. Техният анализ установява, че високият SUV_{max} се асоциира с по-лоша обща преживяемост HR, 1,24; (95 % CI, 1,06–1,45) (261). Повечето проучвания не откриват сигнификантна връзка между стойностите на SUV_{max} и свободната от болест преживяемост, общата преживяемост, локалните рецидиви, клинично-патологичните характеристики на пациентите. Противоречивите данни в тези проучвания могат да бъдат обусловени от няколко фактора, като технически разлики в отделните институции, хетерогенността на пациентите, разликите в техническите спецификации на различните скенери и техните протоколи.

Идентифицирането на прогностични и предиктивни фактори е от решаващо значение за разграничаване на високорисковите пациенти, които са добри кандидати за индивидуално лечение, от останалите (262).

Слабост на настоящото проучване е, че не при всички пациенти е проведена оперативна интервенция, не при всички има проведени образни изследвания, след приключване на НЛХЛ, което може да доведе до грешно интерпретирани резултати, т.к. пълният клиничен отговор на ФКС не винаги колерира с патологичния отговор. При някои от пациентите не е спазен стандартния протокол за ФКС 6-8 седмици след приключване на НЛХ, което също може да доведе до грешна интерпретация на постигнатия отговор. Предстои да се проследи в дългосрочен план, ефекта на проведеното лечение по отношение на общата преживяемост, свободната от болест преживяемост, както и ефекта на приложената при някои пациенти стратегия WW (watch and wait) стратегия. Предстои да се оцени и как влияе факторът време от края на НЛХЛ до ФКС и операция, на отчетения отговор.

В световен мащаб това е един от малкото налични доклади, които изследват и анализират ролята на HMGB1 при НЛХЛ на ЛАКР върху значителен брой пациенти. До момента има ограничен брой доклади, посветени на тази тема, което подчертава значимостта и актуалността на настоящата дисертация.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разкриването на нови биомаркери, играещи роля в лъчевата резистентност дава възможност за прилагане на нови таргетни терапии. Съчетаването им с ЛЛ ще допринесе за индивидуализирането и подобряването на комплексното лечение на туморните заболявания, ще позволи по-прецизен подбор на пациенти, които биха имали най-голяма полза от ЛЛ, ще защити пациентите от потенциално ненужно лечение и ще позволи идентифицирането на най-добрите кандидати за неоперативно лечение. Необходима е прецизна стратификация на риска и агресивността на тумора, за по-добър индивидуален план за лечение за всеки пациент и определяне на общата прогноза при пациенти с КР. Има спешна нужда от подходящи биомаркери, които предсказват отговора на терапията и още по-важно предсказват рецидивиращо заболяване. Ранното разпознаване на рискови пациенти би подобрило резултатите и потенциално би ни позволило да коригираме режимите на лечение. Необходими са по-големи проучвания, за да се определи прогностичната и предиктивната значимост на даден биомаркер, за да се достигне до реалното му прилагане в клиничната практика. Откриването на нови биомаркери ще доведе

до внедряването на терапевтични алгоритми според биологията на тумора. Несъмнено, ключът, който отваря вратата към успешната терапия на онкологичните заболявания, се крие в усъвършенстването на персонализираната медицина. HMGB1 би могъл да бъде надежден биомаркер предсказващ отговора на проведената терапията. Нашите резултати демонстрират, че HMGB1 може да се използва като потенциален биомаркер свързан с агресивност и прогресия на заболяването при пациенти с ЛАКР, провеждащи НЛХЛ. В настоящия труд се проведе измерване на концентрацията на HMGB1 в серумни проби на пациентите преди и след НЛХЛ и резултатите показаха, че концентрацията на HMGB1 е по-висока в серума на пациентите след НЛХЛ, които имат отчетена стабилна болест или прогресия на заболяването. По-високата концентрация на HMGB1 след НЛХЛ потенциално предсказва лош отговор към проведената терапия.

VIII. ИЗВОДИ

1. Анализът на база средните концентрации, показва, че средната концентрацията на HMGB1 в серума на пациенти след НЛХЛ, ($M = 9,94$, $SD = 4,60$) е сигнификантно по-висока, в сравнение с тази преди НЛХЛ, ($M = 6,61$, $SD = 2,25$), ($p < 0.0001$).
2. Установи се, че съществува сигнификантна разлика в стойностите на концентрациите на HMGB1 след приключване на терапията при случаи с пълен и частичен отговор (CR,PR), и стабилна болест и прогресия на заболяването (SD,PD), ($p = 0,030$). Стойностите на концентрацията при случаите със стабилна болест SD и прогресия на заболяването PD са сигнификантно по-високи.
3. Установи се, че покачването на концентрацията на HMGB1 с $2,02\text{ng/ml}$ потенциално може да бъде негативен предиктор за лош отговор към проведеното лечение ($AUC = 0,727$, $95\% \text{ CI: } 0.603\text{--}0.851$, $p = 0,02$) с чувствителност $77,4\%$ и специфичност $56,9\%$.
4. Установи се предиктивната стойност на серумните стойности на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ и тяхната динамика за отговора към проведеното лечение. По високите стойности на концентрацията на HMGB1 след НЛХЛ се асоциират с лош отговор към проведената терапия ($\text{odds ratio} = 1.129$, $95\% \text{ CI} = 1.006\text{--}1.267$, $p = 0.039$).

5. Нарастването на разликата в концентрацията на HMGB1 преди и след НЛХЛ също се асоциира с лош отговор към проведеното лечение (odds ratio= 1,254, 95% CI= 1.068-1.474, p= 0.006).
6. Не се откри връзка между серумните нива на концентрация на HMGB1, преди и след проведеното НЛХЛ и TN стадия на пациентите с КР.
7. Установи се предиктивната стойност на SUVmax преди НЛХЛ, като стойности над 8,7 потенциално могат да бъдат негативни предиктори за лош отговор към НЛХЛ (AUC=,669, 95% CI: 0. 524–0.813, p = 0,03) с чувствителност 70,8% и специфичност 50%. Пациентите с отчетена стабилна болест и прогресия на заболяването (SD, PD) имат сигнификантно по- високи стойности на SUV.
8. При всички пациенти се наблюдава отлична поносимост на проведеното НЛХЛ с прилагане на съвременните техники (IMRT, VMAT, IGRT) на облъчване и прием на перорален капецитабин.

IX. ПРИНОСИ

1. За първи път в България се изследва и проучва нивото на серумните нива на концентрация на HMGB1 при пациенти с ЛАКР.
2. За първи път в България се изследва нивото на серумните нива на концентрация на HMGB1 и тяхната динамика спрямо отговора към НЛХЛ.
3. За първи път в България се докладва за потенциала на серумните нива на концентрация на HMGB1 и тяхната динамика като предиктивен маркер, показващ ефекта на НЛХЛ.
4. За първи път в България се докладва потенциала на SUVmax за отговор към НЛХЛ при пациенти с КР.
5. За първи път в България се докладва стандартизирана група пациенти с ЛАКР, които са стадираны с модерни и високотехнологични образни методи (МРТ,ПЕТ/КТ), отговарящи на стандарта на лъчетерапевтичната практика в света.
6. За първи път в България се докладва прилагане на модерни техники на облъчване, (IMRT, VMAT, IGRT, SIB-едновременно интегриран буст) при НЛХЛ за ЛАКР.

7. За първи път в България се прилага стандартизиран протокол за контуриране използвайки данните от МРТ и ПЕТ/КТ
8. Пациентите са проследяване с контролни ендоскопии и образни методи с оглед определяне терапевтичното поведение след НЛХЛ
9. В Световен мащаб това е едно от малкото доклади проучващи ролята на HMGB1 при НЛХЛ на ЛАКР и върху значителен брой пациенти

Х. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **T Radeva-Petkova**, E Encheva, I Donev, Y Kashlov. Radiotherapy and cell death. Significance of cell death patterns in the radiotherapy of cancer patients. Varna Medical Forum 7 (1), 21-26.
2. **Радева Т.**, Енчева Е. Приложение на образните методи за стадиране и планиране на предоперативно лъчелечение при локално авансирал карцином на ректума. Рентгенология и радиология. 2018, брой 3;
3. М. Богданова, И. Донев, Н. Цонев, Е. Димитрова, Р. Манев, Др. Стоянов, Ч. Бъчваров, Г. Тодоров, **Т. Радева**, Н. Стефанова, К. Калчев, М. Таушанова. Некроптоза. Studia Oncologica. 2017, бр 1;

Участия в научни форуми

1. Конгрес на БАР 2019г. “Прогностични биомаркери предсказващи отговора към неoadjuvantното лъчелечение, съчетано с химиотерапия при колоректален карцином”.
2. ESMO, 2022, “Serum levels of HMGB1 might have a predictive role for neoadjuvant radiotherapy combined with chemotherapy in rectal cancer patients”.
3. Конгрес на БАР 2017г. “Предимства на ЯМР при стадиране на карцином на ректум и използването му в планирането на лъчелечението”.
4. Конгрес Хирургия, 2017 “Роля на лъчелечението при комбиниран подход на лечение на ректален рак – собствен опит”

XI. Благодарности

С огромна признателност изказвам искрените си благодарности към всички, които ме подкрепиха по време на разработването на този дисертационен труд.

На първо място искам да благодаря на моя научен ръководител, проф. Елица Енчева, д.м, за нейното безценно ръководство, критичност, подкрепа и търпение. Благодарност за безценните съвети и насоки.

Благодарна съм и на членовете на катедрата за предоставените знания, по време на моята работа.

Искрено оценявам подкрепата на моите колеги и приятели.

Благодаря на целия екип на Клиника по лъчелечение, УМБАЛ “Света Марина“, гр. Варна.

Благодаря на ръководството на УМБАЛ “Света Марина“, гр. Варна и на ръководството на Медицински Университет - Варна за предоставената възможност да осъществя и развия своя научен труд

Дълбока благодарност отправям към моето семейство, за тяхното безусловно разбиране, търпение и обич. Без вашата подкрепа този труд нямаше да бъде възможен.

На всички вас – благодаря от сърце!