



**Медицински университет -Варна
„Проф. Д-р Параскев Стоянов”**

Факултет „Медицина”

**Катедра по обща клинична патология, съдебна медицина и
деонтология**

Д-р Надежда Тодорова Стефанова

**ЕКСПРЕСИЯ НА МАРКЕРИ ЗА АВТОФАГИЯ И
НЕКРОПТОЗА ПРИ ДЕБЕЛОЧРЕВЕН КАРЦИНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен
„доктор“

Научна специалност: „Патологоанатомия и цитопатология“

Научен ръководител:

Доц. д-р Мария Цанева, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Христо Чучков, д.м.н.

Доц. д-р Веселин Беловеждов, д.м.

Варна 2017 г.

Дисертационният труд съдържа 187 стандартни страници и е онагледен с 25 таблици и 64 фигури. Литературната справка включва 324 литературни източника, от които 4 на кирилица и 320 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 14. 09.2017 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на..... отчаса в.....на открито заседание на Научното жури.

Съдържание

Въведение	5
Цел и задачи	6
Материал и методи	7
Резултати и обсъждане	13
Заклучение	60
Изводи	61
Приноси	63
Публикации и участия в научни конгреси, свързани с дисертационния труд	64

Използвани съкращения на кирилица

КРК	колоректален карцином
ХЕ	хематоксилин-еозин
ПНИ	периневрална инвазия

Използвани съкращения на латиница

CI	confidential interval
cIAP1	cellular inhibitor of apoptosis protein 1
cIAP2	cellular inhibitor of apoptosis protein 2
CIN	chromosomal instability
FADD	fas-associated death domain
FAP	familial adenomatous polyposis
IBD	inflammatory bowel disease
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
HR	hazard ratio
LOH	loss of heterozygosity
MLH1	mutl homolog 1
MMR	mismatch repair
MSI	microsatellite instability
MSI-H	microsatellite instability -high
MSI-L	microsatellite instability- low
MSH2	mut s homolog 2
MSH6	muts homolog 6
MSS	microsatellite stable
OR	odds ratio
OS	overall survival
PMS2	postmeiotic segregation increased 2
RIP 1	receptor-interacting protein 1
RR	relative risk
TNF-α	tumour necrosis factor α

Въведение

Колоректалният карцином (КРК) е злокачествено заболяване, чиято честота в последните години непрекъснато нараства. Всяка година от него заболяват приблизително един милион души в света. КРК е на трето място по честота сред злокачествените заболявания и на второ място като причина за смърт (Parkin D et al., 2005).

КРК възниква в резултат на прогресивно натрупване на мутации в протоонкогени и тумор-супресорни гени. През последните години бяха разработени редица обещаващи туморни маркери, допринасящи за ранното диагностициране, прогностична оценка и мониториране на заболяването (Ivanov K, Donev I, 2017).

Лечението на КРК е комплексно и включва оперативна интервенция, лъче- и химиотерапия, както и таргетна терапия (Иванов К и др., 2011). Химио- и лъчетерапията стимулират естествените процеси на клетъчна смърт, известна като апоптоза, която се регулира от тумор-супресорния ген p53. При пациенти с КРК мутациите на p53 са едни от най-честите нарушения, отговорни за придобитата лекарствена резистентност. При блокиране на апоптозата в туморните клетки се активират други алтернативни форми на клетъчна смърт: автофагия и некроптоза.

Автофагията е общобиологичен процес на разграждане и рециклиране на клетъчните компоненти с цел запазване на жизнено необходимите градивни елементи (Rosenfeldt M et al., 2011). Тя функционира постоянно при сравнително ниски нива в клетките на бозайници (White E et al., 2012). Индуцира се при гладуване и клетъчен стрес (He C et al., 2009). Блокирането на автофагията иницира развитието на туморен процес чрез натрупване в клетките на нефункционални белтъчни агрегати и/или чрез предизвикване на хронично възпаление (Wang G et al., 2010).

Ролята на автофагията в колоректалната канцерогенеза все още е обект на дискусия. Според някои автори свръхекспресията на Beclin-1, основния индуктор на автофагията, е свързана с лоша прогноза и метастази при пациенти с КРК (Han Y et al., 2014). Според други, блокирането на автофагията води до неблагоприятно клинично протичане и лоша преживяемост на пациентите (Choi J et al., 2014). Има, макар и оскъдни данни, че нивото на експресия на Beclin-1 в туморната тъкан определя отговора на КРК на химиотерапия и лъчелечение (Zaanan A et al., 2015). Познаването на точните механизми на автофагията дава възможност за прилагането на нови терапевтични стратегии при лечение на злокачествените тумори.

Некроптозата е вид алтернативна клетъчна смърт, която се наблюдава при екстрацелуларна апоптотична стимулация в клетки с потисната апоптоза (Han Y et al., 2011; Galluzzi L et al., 2012). Тя се иницира от RIP3 (рецептор взаимодействащата серин/треонин-протеин киназа 3 (Galluzzi L et al., 2012)). Некроптозата е важен и специфичен за гръбначните животни механизъм, възникнал, най-вероятно като допълнителна защита срещу имунни клетки и патогени, устойчиви на апоптоза (Osborn S et al., 2010). Неотдава бяха публикувани данни относно важната роля, която

некроптозата играе в туморогенезата (Meng M et al., 2016). Все още, обаче, не е изяснена ролята на некроптозата при развитието на КРК. По-детайлното проучване на сигналните пътища на некроптозата е от важно значение за определяне на таргетите ѝ за създаването на нови противотуморни средства.

Взаимодействието между различните видове клетъчна смърт може да бъде изключително сложно. Автофагията, апоптозата или некроптозата могат да съществуват съвместно, да взаимодействат помежду си, но в крайна сметка, един от механизмите на клетъчна смърт може да доминира над останалите. Неопластичните клетки в процеса на туморната прогресия могат да избегнат апоптозата, но останалите два пътя на клетъчна смърт – автофагия или некроптоза не могат да бъдат избегнати.

Липсата на еднопосочни резултати в достъпната литература и недостатъчният брой клинично-морфологични проучвания посветени на ролята на автофагията и некроптозата при КРК, обуславят необходимостта от допълнителен анализ на експресията на маркерите за автофагия и некроптоза при пациенти с КРК.

Все още няма изследвания, изясняващи влиянието на клинично-морфологични характеристики, наблюдавани при КРК като: локализация на тумора, тип на туморен растеж, съдова и периневрална инвазия, стромна и десмопластична реакция върху процесите на автофагия и некроптоза. Досега не е осъществявано комплексно изследване, изясняващо взаимодействието между двата вида клетъчна смърт – автофагия и некроптоза при пациенти с КРК.

Ето защо, с цел по-детайлно изясняване на молекулните механизми на автофагията и некроптозата и ролята им в неопластичния процес при КРК, е необходимо провеждане на повече изследвания. Това би допринесло за изграждане на по-добри терапевтични стратегии за лечение на пациентите с КРК.

Цел и задачи на дисертационния труд

Цел

Цел на настоящата работа е да се изследва ролята на експресията на маркера за автофагия – Beclin-1 и за некроптоза – RIP3 във връзка с клинично-патологичните показатели и общата преживяемост при пациенти с КРК.

Задачи

- 1) Да се анализират клинично-морфологичните характеристики на селектираните пациенти с КРК и да се изследва влиянието им върху общата преживяемост.
- 2) Да се проучи експресията на Beclin-1 (маркер за автофагия) в туморната и околната нетуморна тъкан, и връзката ѝ с клинично-патологичните и молекулярно-генетични характеристики и общата преживяемост при пациенти с КРК.

- 3) Да се анализира цитоплазмената и ядрена експресия на RIP3 (маркер за некроптоза) в туморната и околната нетуморна тъкан и асоциацията ѝ с клиничко-патологичните и молекулярно-генетични характеристики и общата преживяемост при пациенти с КРК.
- 4) Да се изследва прогностичната стойност на експресията на маркерите за автофагия и некроптоза за по-ниска преживяемост при пациенти с КРК.
- 5) Да се направи сравнителен анализ на експресията на Beclin-1 и RIP3 в туморна тъкан във връзка с клиничко-патологични характеристики и смъртността при пациенти с КРК.
- 6) Да се разработи клиничко-морфологичен и имунохистохимичен профил на пациентите с КРК, които имат висок риск за настъпване на смърт.

Материал и методи

Бази за реализиране на дисертационния труд

- Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология – МУ – Варна
- Клиника по медицинска онкология – Университетска болница „Св.Марина“ – Варна
- Национална генетична лаборатория – София

Пациенти и характеристика на проучваните групи

В настоящото проучване са включени общо 107 пациенти с диагноза аденокарцином на дебело черво. Диагнозата и стадият на тумора са потвърдени според 7-мо издание на AJCC (American Joint Committee on Cancer) на базата на хистологичното и образно изследване (Sobin and Compton, 2010). При всички изследвани пациенти е проведено радикално хирургично отстраняване на първичния тумор в дебело черво с последващо провеждане на 5-FU-базирана системна химиотерапия. Системното лечение е проведено в УМБАЛ „Св.Марина“ – Варна. На всички пациенти е определено нивото на клетъчна експресия на Beclin-1, а на 81 от тях – нивото на експресия на RIP3.

Рутинни изследвания

Инцизионна биопсия на чревен резектат за хистологичен анализ: средно по три-четири блокчета са изследвани от най-дълбоката туморна инфилтрация в чревната стена. Взети са материали от проксималния и дисталния резекционен ръб. Изследвани са всички налични лимфни възли, а не само задължителните по стандарт 12 лимфни възела. 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 парафиново блокче. Срези с дебелина 5µm са стандартно оцветени с хематоксилин-еозин за оценка на хистологичните промени в тумора и извънтуморната,

околна тъкан. При описанието и изследването на всички тумори са определени: локализация, хистологичен тип на тумора, туморен растеж, стромна реакция, десмопластична реакция, TILs (tumor infiltrating lymphocytes), tumor budding, степен на инфилтрация на чревната стена, засягане на лимфни възли, далечни метастази, степен на диференциация на тумора, наличие на съдова и периневрална инвазия, площ на некрози, определяне на RAS–мутационен статус.

Критерии за категоризиране на всеки параметър

- **Локализация на тумора.** Туморите бяха разпределени според локализацията им по хода на дебелото черво по два начина с цел по- адекватно сравняване с резултати от други проучвания. Първото разпределение на туморите е на разположени в десен и ляв колон. В десен колон се включват локализация на тумори, засягащи цекум, колон асценденс, флексура хепатика, колон трансверзум и флексура лиеналис. Към ляв колон се причисляват тумори с локализация колон десценденс, сигма и ректум. Второто разделение бе направено в три категории: колон, сигма и ректум.
- **Хистологичен тип на тумора.** Диагнозата е поставена чрез използване на СЗО класификацията на туморите на колон и ректум от 2010 година. Базирайки се на тази класификация бяха определени T-, N -, M- стадия както и степента на туморна диференциация – G.
- **Туморен растеж.** Туморите бяха разделени в две категории: с предимно експанзивен и предимно инфилтративен растеж според класификацията на Jass (Jass J et al., 1986). Определянето на типа туморен растеж бе осъществено на малко учеличение (x5). За предимно инфилтративен растеж се приема този, при който няма ясна граница между туморната и нетуморната тъкан. Предимно експанзивен или избутващ тип туморен растеж се дефинира като растеж, при който има ясно очертана граница между туморната и околната тъкан (Jass J et al., 1986; Jass J et al. 1987; Jass J et al., 1996).
- **Стромна или имунна реакция.** Наличието на възпалителни клетки в туморната строма бе определено чрез използване на 4-степенна скала: липсваща, слабо изразена, умерено изразена и изразена стромна реакция. Липсващата и слабо изразена имунна реакция бяха обединени в ниска степен на изразеност или **low grade**, а умерено изразената и изразена имунна реакция – във висока степен на изразеност или **high grade**.
- **Десмопластична реакция.** Степента на фиброзиране предизикано от тумора бе категоризирано посредством 4-степенна скала: липсваща, слабо изразена, умерено изразена и изразена десмопластична реакция.
- **TILs (tumor infiltrating lymphocytes)** бяха определени според критериите на Klintrup и сътр. Туморите се оценяват чрез използване на 4-степенна скала в зоната с най-голяма инфилтрация на инвазивния рѐб. (Klintrup K et al., 2005).

Оценка 0 се поставя, когато липсват възпалителните клетки;

1 – обозначава леко изразено и неравномерно увеличение във възпалителните клетки;

2 – показва умерено изразен и лентовиден възпалителен инфилтрат с частична деструкция на острови от туморни клетки;

3 – обозначава подчертано и изобилно гнездно разположение на възпалителен инфилтрат с често разрушаване на острови от туморни клетки;

Тези резултати бяха впоследствие обединени в **low grade** (скор 0 и 1) и **high grade** (скор 2 и 3).

- **Tumor budding** – наличието на малки и дискретни групички от туморни клетки ≤ 5 клетки в инвазивния ръб бе оценено в две категории: липсващо и налично.
- **Наличието на съдова и периневрална инвазия** беше оценено също в две категории: налична и липсваща.
- **Площ на некрози.** Степента на некрозата в туморната тъкан беше определено полуколичествено въз основа на тристепенна скала:
 - липсващи некрози – не се откриват некротични полета;
 - огнищни или умерено изразени – некротични зони, обхващащи $< 30\%$ от туморната тъкан на един тъканен срез;
 - обширни или силно изразени – участъци с некроза, които обхващат $\geq 30\%$ от туморната тъкан в един тъканен срез.

Специфични методи на изследване

Имунохистохимични методи. Използван бе индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024.

Антителата, реактивите за оцветяване и използваните работни концентрации са представени в таблица 1 и 2.

Използвани са следните антитела: Anti-Beclin 1 кат. № ab62557 и Anti-RIPK3 кат. № ab56164. Антителата са производство на *ABCAM's RabMab technology*.

Негативни контроли:

При негативните контроли, вместо първичното антитяло, срези от използваните парафинови блокчета се инкубират с нормален неимунен серум.

За позитивни контроли са е използвана тъкан от малък мозък – клетки на Пуркиние за Anti-Beclin 1 и тъкани от черен дроб за Anti-RIPK3.

Таблица 1. Използвани реагенти

Антитяло	Разреждане	Позитивна контрола	Маркер за:	Фирма производител
Anti-Beclin 1(ab62557) Rabbit polyclonal to Beclin 1	1:400	Малък мозък, клетки на Пуркиние	Автофагия	ABCAM's RabMab technology
Анти RIPK3(ab56164) Rabbit polyclonal to RIP3	1:100	Черен дроб	Некроптоза	ABCAM's RabMab technology

Таблица 2. Системи за оцветяване и други реактиви

HRP- DAB System	Оригинална оцветяваща система	Dako
Mayer's hematoxilin	Counterstaining	Dako

Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимия

- Биопсичните материали (фиксираны в неутрален формалин и включени в парафинови блокчета) бяха нарязани на срези с дебелина 5µm и поставени върху силанизираны стъкла.
- Депарафинизацията се осъществи в низходяща редица от алкохоли, както следва: Ethanol 100% 3 мин., Ethanol 90% 3 мин., Ethanol 80% 3 мин., Ethanol 70% 3 мин., Xylol 3 x 10 мин. След това срезите се измиха с течаща вода и се поставиха в дестилирана вода.
- Антигенно разкриване: разкриването на антигените се осъществи с предварително загрят до 65°C En Vision FLEX Target Retrieval Solution (работен разтвор) в PT Link контейнер, като срезите бяха инкубирани за 20 мин при температура 97°C и pH=9. След охлаждане пробите бяха промити на стайна температура с измиващ буфер FLEX Wash Buffer (20x) за 1-5 минути

Нива на експресия на *Veclin-1* и интерпретация на резултатите.

Оценка на имунохистохимичното изследване е направена, като са изследвани 10 полета на най-голямо увеличение (x400) за всеки отделен случай. Направени са дигитални снимки на случаите с помощта на сканиращия апарат - Leica Aperio Scan Scope AT2 device (Aperio Technologies, Vista, CA) с последващи анализи на сканираните образи с ImageScope V12.1.0.5029 (Aperio). Интерпретацията е осъществена чрез полуколичествен метод според пропорцията и интензитета на цитоплазмената кафява оцветка. Процентът на *Veclin-1* позитивни клетки (P) бе оценен като 0 (по-малко от 10% позитивни клетки), 1 (10-49% позитивни клетки), 2 (50-74% позитивни клетки) или 3 (повече от 75% позитивни клетки). Интензивността (I) бе оценена по следния начин: 0 (безцветно), 1 (светложълто до кафяво), 2 (кафяво), 3 (тъмнокафяво).

Получените резултати за процента оцветени клетки (P) и интензивността на тяхното оцветяване (I) бяха сумирани в общ скор. Общата сума на P и I бе оценена за всеки отделен случай и крайният скор на биомаркерните нива беше дихотомно разделен според cut-off стойността на пробите. Случаи над cut-off стойността бяха определени като високи експресионни нива, а тези под cut-off стойността – като ниски експресионни нива.

С цел по-задълбочено сравняване на получените резултати с тези от други проучвания и изследвания, експресията на *Veclin-1* беше оценена и като:

- „-“ – стойности на оцветяването=0
- „+“ – стойности на оцветяването=1-2
- „++“ – стойности на оцветяването=3-5

- „+++” – стойности на оцветяването=6-9

Използвахме скалата за положителна и отрицателна експресия, като:

- „-“ – стойности на оцветяването=0
- „+“ – стойности на оцветяването \geq 1

Нива на експресия на RIPK3 и интерпретация на резултатите.

Имунохистохимичната експресия на RIPK3 бе оценена полуколичествено чрез използване на **H-score** (histo-score) върху тъканните проби. Първо, за всяка клетка в различни полета се определи мембранната 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:

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

H-score бе използван и за оценка на ядрената експресия на RIPK3. Резултатът бе получен по формулата:

[1x (% на слабо позитивни ядра 1+) + 2x (% умерено оцветени ядра 2+) + 3x (% на силно позитивни ядра 3+)], в диапазон от 0 до 300.

С цел по-задълбочено сравняване на получените резултати с тези от други проучвания и изследвания, експресията на RIP3 беше оценена и като:

- „-“ – негативно оцветяване на клетките
- „+“ – слабо оцветяване на клетките
- „+++“ – интензивно оцветяване на клетките

Определяне на RAS-мутационен статус

За определяне на RAS-мутационния статус на изследваните проби бяха използвани срези с дебелина 5 μ m от парафинови блокчета, съдържащи КРК тъкан с туморно съдържание най-малко 10%, които бяха подложени на депарафинизация по същата методиката, както при ИХХ изследването. След депарафинизацията от туморната тъкан бе изолирана ДНК, чрез използване на търговски кит (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit cat No. 56404, Qiagen, USA). За определяне количеството и качеството на ДНК беше използван спектрофотометър ThermoFisher NanoDrop 1000/2000. Изолираната ДНК беше изследвана за мутации във 2, 3 и 4 екзони на KRAS гена чрез търговски кит (AmoyDx® KRAS Seven Mutations Detection Kit, Amoy Diagnostics Co., China) с помощта на апарат за количествен PCR в реално време – Real-Time qPCR System (7500 ABI PRISM, Applied Biosystems, USA) в Национална генетична лаборатория – София.

Статистически методи

- Дисперсионен анализ (ANOVA)
- Вариационен анализ
- Корелационен анализ
- Регресионен анализ
- ROC curve анализ

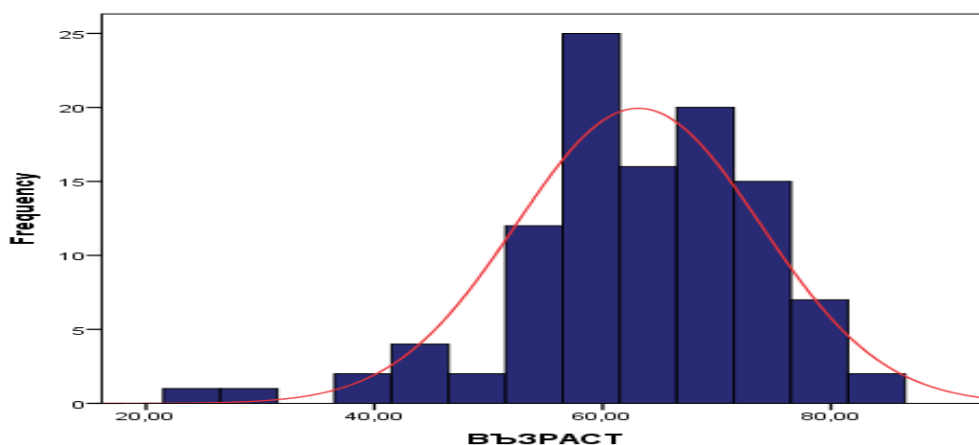
- Анализ на преживяемостта – Kaplan-Meier, Cox regression
- Прогностичен анализ – prognostic value
- Сравнителен анализ (оценка на хипотези)
- Графичен и табличен метод на изобразяване на получените резултати

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0,05$ при доверителен интервал 95%.

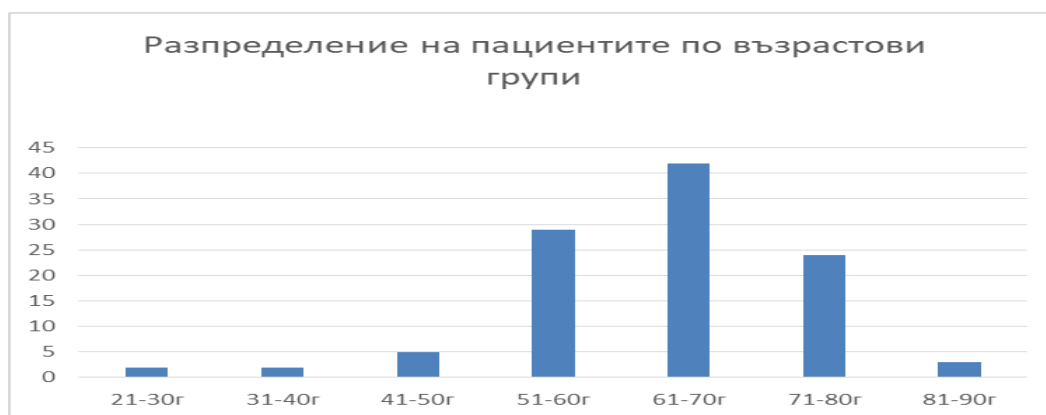
Резултати и обсъждане

1. Клинико-морфологични характеристики и молекулярен анализ на пациентите с колоректален карцином

Проучени са 107 пациенти с диагноза колоректален карцином, оперирани в УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД за период от 9 години (2007 г.-2015 г.). Средната възраст на болните е 63,13 г. \pm 10,7 г., минимална възраст е 24 г., максималната – 83 г. (фиг. 1)



Фигура 1. Честота на възрастовото разпределение на пациенти с КРК



Фигура 2. Разпределение на пациентите по възрастови групи

Получените от нас резултатите (фиг. 2) показват, че най-голям брой пациенти с КРК са във възрастовата група – 61-70г. Тези данни не се различават от резултатите, получени от други изследвания на пациенти с този карцином (Brenner H et al., 2014).

На таблица 3 са представени клинико-морфологичните характеристики на изследваните пациенти. Ние установихме, че КРК се среща по-често при мъже – 61 пациенти (57,0%), докато жените са 46 пациенти (43,0%). Нашите резултати съвпадат с резултатите от други изследвания, които също показват, че при пациентите с КРК преобладава мъжкият пол (Murphy G et al., 2011; Torre L et al., 2012; Siegel R et al., 2014).

Таблица 3. Клинико-морфологични показатели и RAS-мутационен статус на пациентите

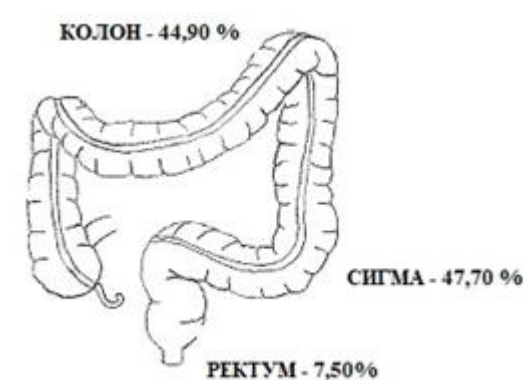
Показател		Брой пациенти	%
Пол	Мъже	65	60,70
	Жени	42	39,30
Локализация	Лява	66	61,70
	Дясна	41	38,30
	Колон	48	44,90
	Сигма	51	47,70
	Ректум	8	7,50
Т стадий	T1	3	2,80
	T2	19	17,80
	T3	77	72,00
	T4	8	7,50
N стадий	N0	23	21,50
	N1	23	21,50
	N2	13	12,10
	Неизвестен - Nx	48	44,90
Диференциация	Ниска (G3)	18	16,80
	Умерена (G2)	88	82,20
	Висока (G1)	1	0,90
Туморен растеж	Експанзивен	31	29,00
	Инфилтративен	76	71,00
Площ на некроза	Огнищни	66	61,70
	Обширни	26	24,30
	Без некроза	15	14,00
Тумор инфилтриращи Лимфоцити (TILs)	Липсват	4	3,70
	Леко изразени	41	40,20
	Умерено изразени	34	31,80
	Изразени	26	24,30
Tumor budding	Липсва	48	44,90
	Присъства	59	55,10
Съдова инвазия	Липсва	40	37,40
	Присъства	67	62,60
Периневрална инвазия (ПНИ)	Липсва	61	57,00
	Присъства	46	43,00
Имунна реакция (стромна реакция)	Липсва	7	6,50
	Слабо изразена	51	47,70
	Умерено изразена	26	24,30
	Изразена	23	21,50
Десмопластична реакция	Липсва	18	16,80
	Слабо изразена	33	30,80
	Умерено изразена	25	23,40
	Изразена	31	29,00
RAS-Мутационен статус	С мутация (M+)	36	33,60
	Без мутация (WT)	62	57,90
	Неизследвани	9	8,40

Локализацията на туморите е по-често в лявата половина на колона в 66 случая (61,70%), като в 51 случая (47,70% от неоплазмите) са в сигмата (Фиг. 3).

В повечето от случаите КРК е открит в авансирал, Т3 стадий в 77 неоплазми (72% от случаите). КРК в Т1 стадий, Т2 стадий и Т4 стадий са установени съответно в 3 случая (2,80%), 19 случая (17,80%), 8 случая (7,50%).

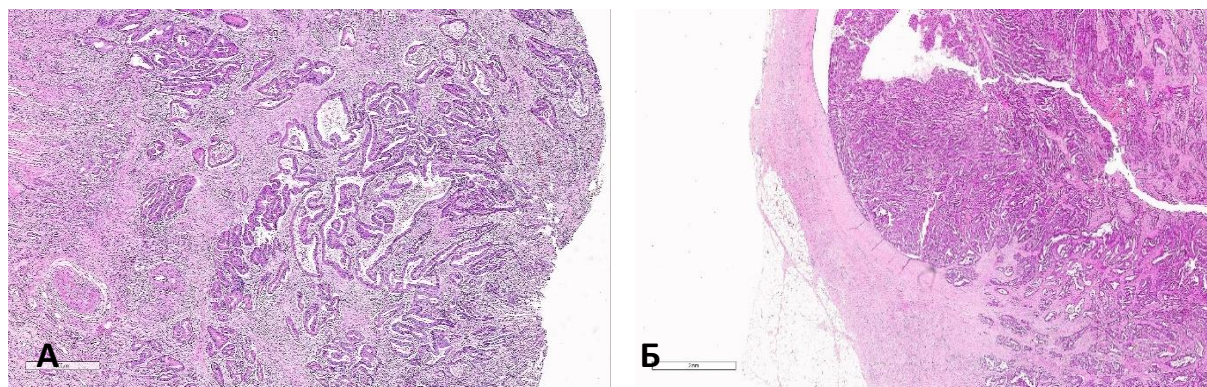
В 23 от случаите на КРК (21,50%) не бяха открити метастази в регионалните лимфни възли. Честотата на туморите с N1 стадий също е 21,50% (23 карцинома). При 13 от пациентите установихме N2 стадий (12,10%). В болшинството от случаите липсват морфологични данни за статуса на лимфните възли, но определянето на N-стадия е извършено на базата на образно изследване.

При хистологичното изследване на туморната тъкан се установи преобладаване на умерената степен на диференциация (G2) – 88 от случаите (82,20%), докато високо диференцираните (G1) и ниско диференцираните тумори (G3) са съответно - 1 случай (0,90 %) и (18 случая (16,80 %)).



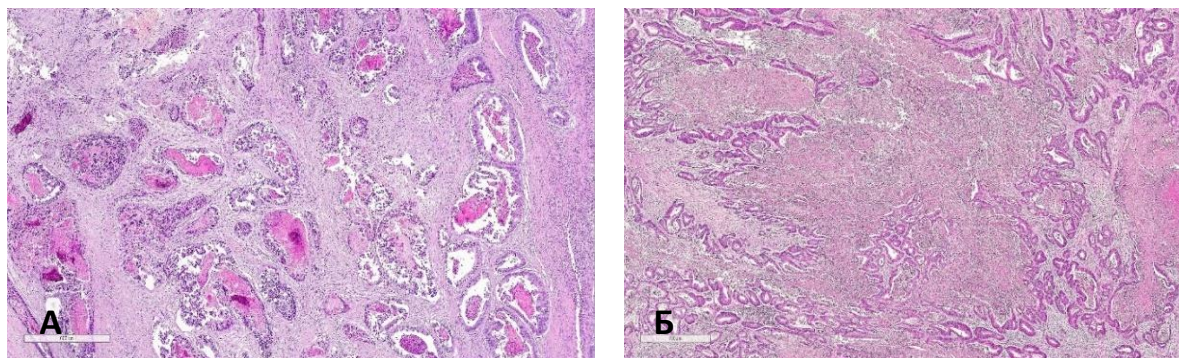
Фигура 3. Честота на разпределение на колоректалния карцином в различните отдели по хода на дебелото черво

Във фронта на туморния растеж в 76 случая (71%) от неоплазмите установихме предимно инфилтративен растеж (фиг.4А) По-рядко туморното разрастване е предимно експанзивно – 29% (31 случая) (фиг. 4Б).

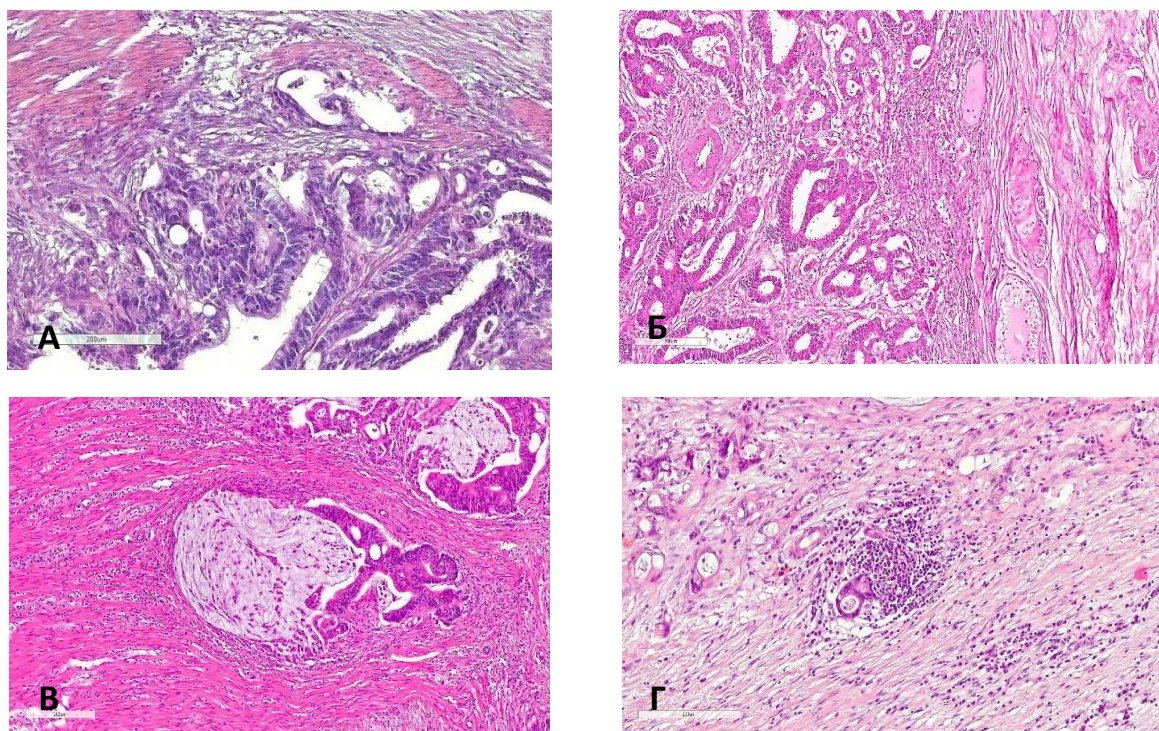


Фигура 4. Форми на туморен растеж на колоректалния карцином: А – предимно инфилтративен; Б – предимно експанзивен туморен растеж. Оцветяване с ХЕ, увеличение x50

Некрози в туморната тъкан на КРК се установиха в 92 от неоплазмите (86,00%), като преобладаваха случаите с огнищни некрози (Фиг. 5А). Те бяха намерени в 66 случая (61,70% от неоплазмите). Обширни некрози бяха наблюдавани в 26 случая (24,30%) (Фиг 5Б). Не се откриха некрози в 15 случая (4,00%).



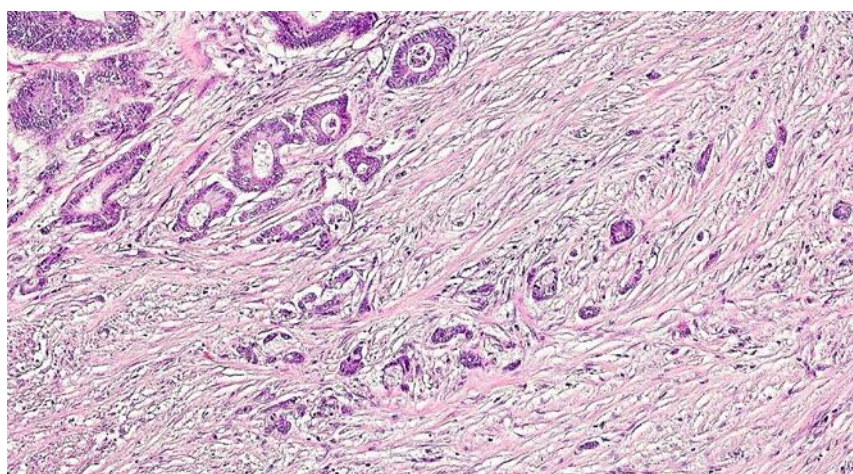
Фигура 5. Видове некрози в туморна тъкан при колоректален карцином: А – огнищни, Б – обширни. Оцветяване с ХЕ, увеличение x 50



Фигура 6. Интензивност и разпределение на TILs в туморната тъкан на колоректален карцином. А. TILs=0 липсват, оцветяване с ХЕ, увеличение x 100; Б. TILs=1, леко изразен и неравномерно разпределен инфилтрат, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; В. TILs=2, умерено изразен с лентовиден характер, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; Г. TILs=3, силно изразен инфилтрат с подчертано гнездно разположение, оцветяване с ХЕ, увеличение x 200

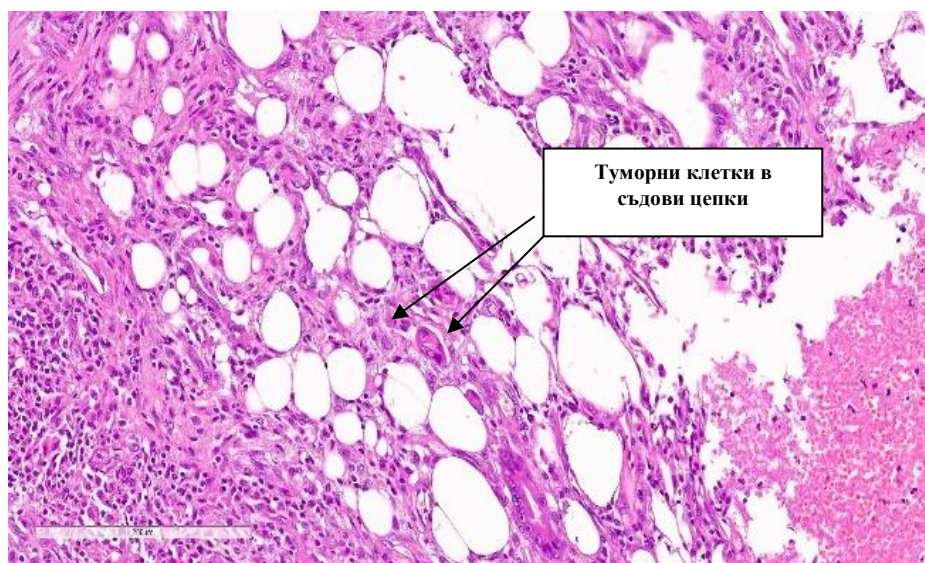
В туморната тъкан във фронта на туморния растеж в 103 (96,30%) от случаите се откриха тумор инфилтриращи лимфоцити (TILs). В болшинството от случаите интензитета на тумор инфилтриращите лимфоцити е леко изразен и неравномерно разпределен – 41 случая (40,20%). Умерено изразен с лентовиден характер туморен инфилтрат с частична деструкция на групи от туморните клетки се установи в 34 случая (31,80%). Силно изразен възпалителен инфилтрат с подчертано гнездно разположение с разрушаване на острови от туморни клетки имаше при 26 пациенти (24,30%). Само при 4 пациенти (3,70%) във фронта на туморния растеж не бяха открити TILs (фиг.6).

Туморно пъпкуване под форма на множество малки и дискретни групички от туморни клетки в инвазивния ръб на КРК се откри в 59 от случаите (55,10%)(Фиг.7).



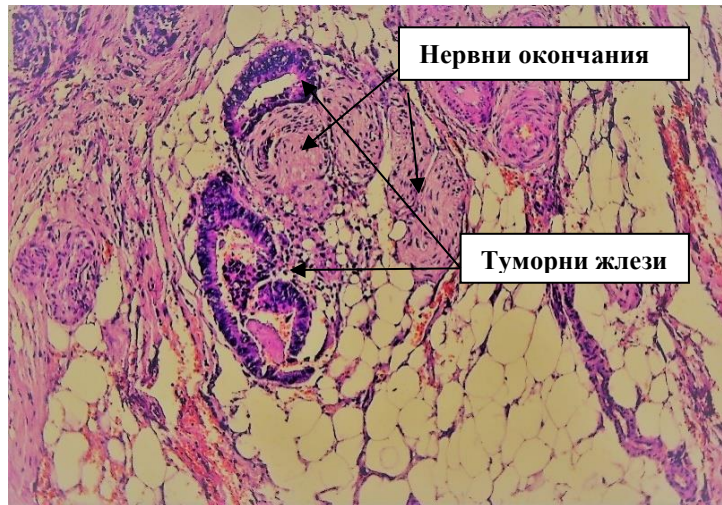
Фигура 7. Туморно пъпкуване (*Tumor budding*) в инвазивния ръб (фронта на растеж) на колоректален карцином. Оцветяване с ХЕ, увеличение x 100

В около 2/3 (62,60%) от изследваните пациенти бяха установени туморни емболи (лимфни и венозни)(фиг.8).



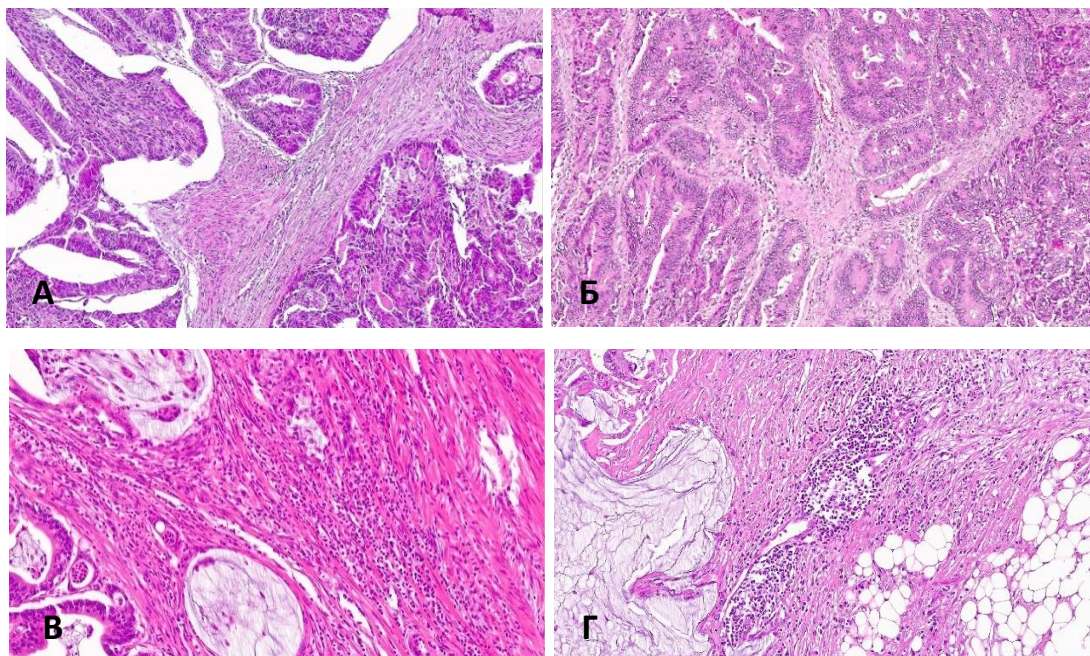
Фигура 8. Туморни емболи в съдови цепки при колоректален карцином. Оцветяване с ХЕ, увеличение x100

Периневрална инвазия беше установена при 46 пациенти (43%) от случаите.

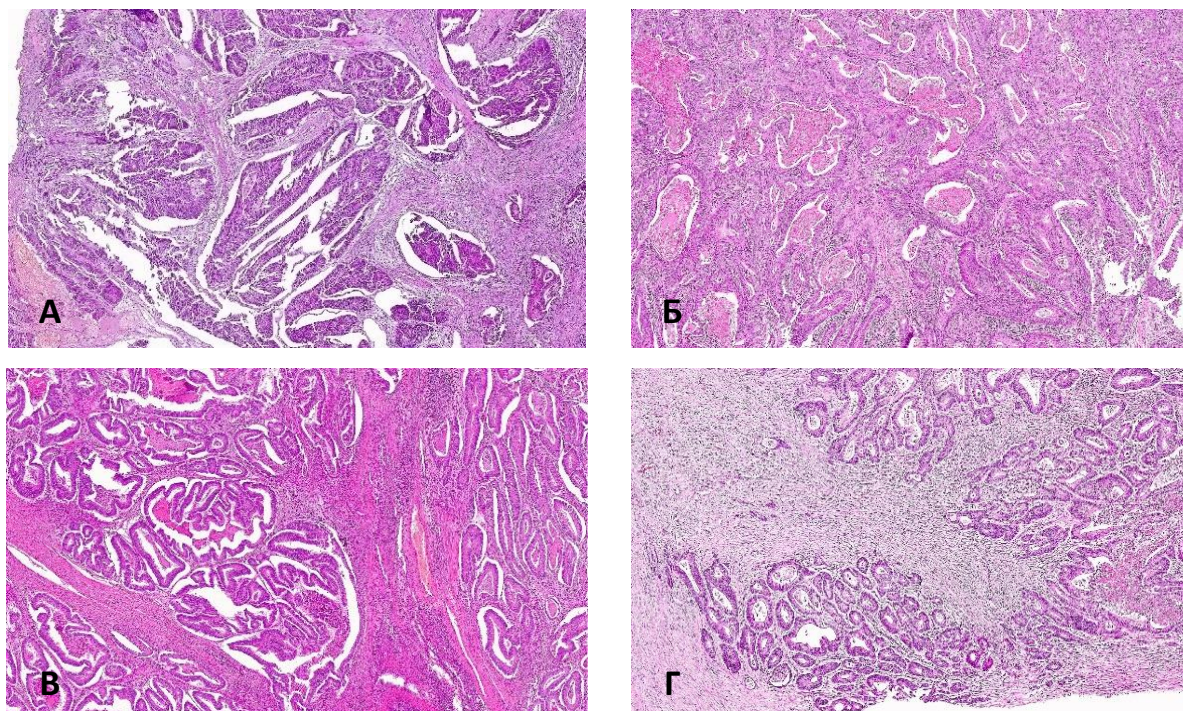


Фигура 9. Периневрална инвазия в периколична мастна тъкан при колоректален карцином. Оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$

Имунна реакция или стромна реакция се откри при 100 случая (93,50%) от неоплазмите (фиг.10). В почти половината от КРК (47,70%) имунната реакция в стромата е слабо изразена, докато умерено и силно изразена е съответно в 26 случая (24,30%) и 23 случая (21,50%). При 7 пациенти (6,50%) липсва имунна реакция в стромата.



Фигура 10. Степен на изразеност на стромната реакция при колоректален карцином; А. Липсваща стромна реакция, оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$; Б. Слабо изразена стромна реакция, оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$; В. Умерено изразена стромна реакция, оцветяване с ХЕ, $\times 200$; Г. Изразена имунна реакция, оцветяване с ХЕ, $\times 200$



Фигура 11. Степен на изразеност на десмопластична реакция в туморната тъкан на колоректален карцином. А. Липсваща реакция; Б. Слабо изразена реакция; В. Умерено изразена реакция; Г. Изразена десмопластична реакция. Оцветяване с ХЕ, x50

Десмопластична реакция бе установена в 89 от неоплазмите (83,20%) (фиг.11). Слабо изразена десмопластична реакция беше наблюдавана при 33 неоплазми (30,80%), докато тя е силно изразена в 31 от случаите (29,00%). В 25 от случаите (23,40%) от изследваните тумори десмопластичната реакция е умерено изразена, а при 18 пациента (16,80%) подобни промени липсват.

Молекулярният анализ показва наличие на мутации при 36 пациента (33,60%). В болшинството от случаите на КРК липсва KRAS мутация. Една малка част от пациентите с КРК (9 случая) не бяха изследвани.

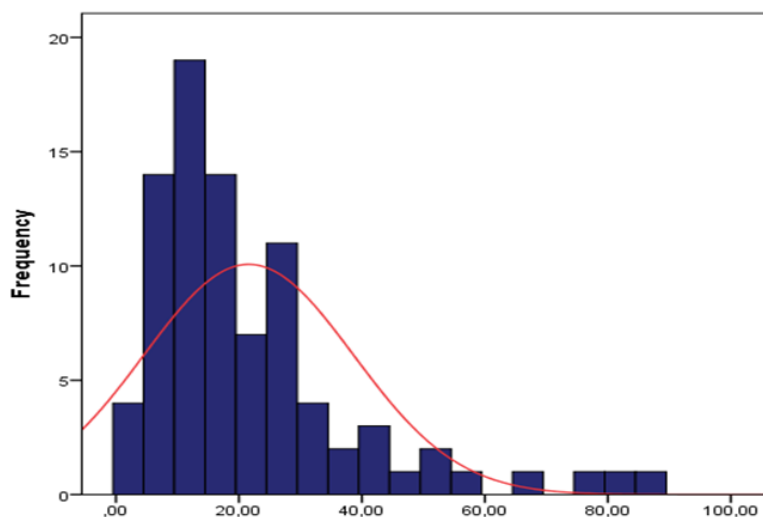
2. Сравнителен анализ на клиничко-морфологичните параметри и общата преживяемост (OS) при пациенти с колоректален карцином.

Осемдесет и шест от пациентите (80,40%) с КРК към датата на проведеното проучване са починали. Средната обща преживяемост е $21,59 \pm 17,03$ месеца, като минималната е 2 мес., а максималната преживяемост е 86 месеца. (фиг. 12).

Средната обща преживяемост при жените с КРК е $20,9 \pm 15,95$ месеца, докато при мъжете е $22,00 \pm 17,77$ месеца. Не беше намерена съществена зависимост между пола и преживяемостта на пациентите, но неблагоприятният изход при женския пол е по-изразен (OR 1,28 (0,756-2,165)). Получените от нас резултати се различават от тези на McArdle и Hole, които намират статистически значима разлика в OS между двата пола. Те установяват, че пациентите от женски пол имат по-голяма OS в сравнение с пациентите от мъжки пол ($p < 0,001$) (McArdle C, Hole D, 2002). Независимо че не

установихме съществена разлика между преживяемостта и пола на пациентите с КРК, резултатите от настоящето изследване показаха, че женският пол е по-рисков за неблагоприятен изход.

Статистическа зависимост не беше установена и между възрастта на пациентите и общата им преживяемост.



Фигура 12. Честота на преживяемостта на пациентите с колоректален карцином в месеци

Зависимост между локализацията на тумора и преживяемостта на пациентите не беше установена, но ние открихме, че пациентите с тумори, локализиращи в дясната половина на дебелото черво, живеят по-малко ($19,48 \pm 15,72$ месеца), отколкото тези с лявостранна локализация, при които средната преживяемост е $22,91 \pm 17,82$ месеца.

Рискът от настъпване на летален край при пациентите с КРК е по-висок при локализация в дясната половина, отколкото при лявостранно разположение (OR 1,01 (0,379-2,702)). Подобни резултати са съобщени и в публикуван неотдавна (2016 г.) мета-анализ, който включва 66 клинични проучвания, които сравняват OS при пациенти с КРК с десностранна локализация на тумора, спрямо тези с лявостранна локализация (Petrelli F et al., 2016). Според данните от този мета-анализ, пациентите с лявостранна локализация на първичния тумор имат 20% по-нисък риск от настъпване на смърт в сравнение с тези с десностранна локализация, независимо от етническата им принадлежност, стадия на заболяването и дизайна на проучването.

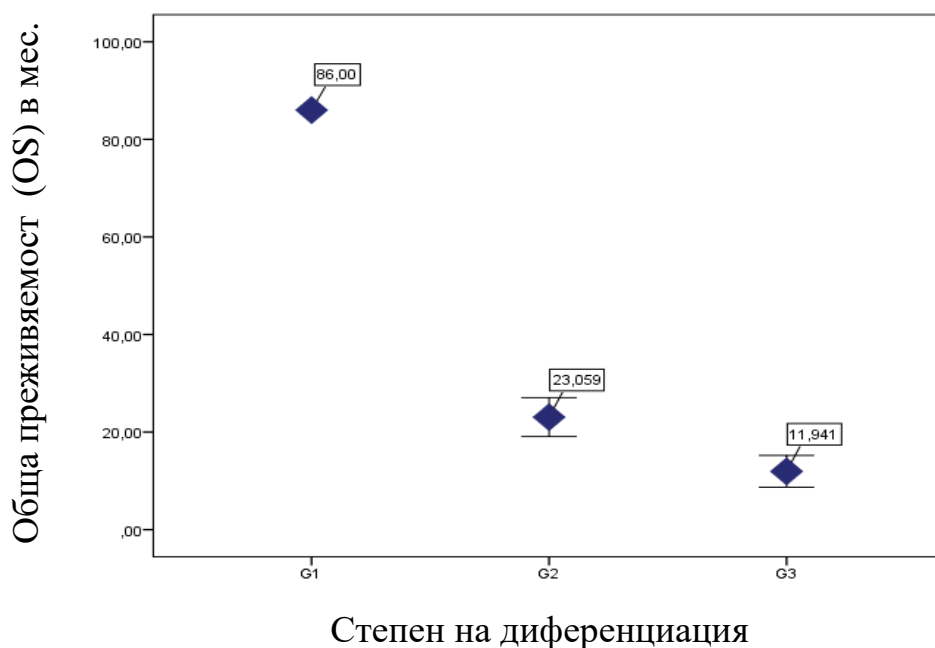
Най-малка обща преживяемост имат пациентите с КРК, развил се в колона – $20,92 \pm 17,74$ месеца, последвани от тези в сигмата – $21,93 \pm 17,35$ месеца, а най-голяма преживяемост имат пациентите, чийто тумор е локализиран в ректума – $23,66 \pm 11,00$ месеца.

Най-много са починалите пациенти с КРК, които по време на поставяне на диагнозата са били в стадий T3 – 62 случая (72,10%). Независимо от високата честота на починалите пациенти, последните имат най-висока обща преживяемост – $23,19 \pm 18,81$ месеца. Най-ниска е общата преживяемост при пациентите в стадий T4 –

12,83±8,21 месеца, докато при стадий T1 е 16,50±0,71 месеца, а в стадий T2 – 19,31±11,47 месеца.

Анализът на преживяемостта на пациентите с КРК показва, че общата преживяемост на пациентите в стадий N0 е 20,33±11,30 месеца. Най-голяма OS имат пациентите със стадий N1 – 23,59±18,42 месеца, а пациентите със стадий N2 (21,00±22,71 мес.).

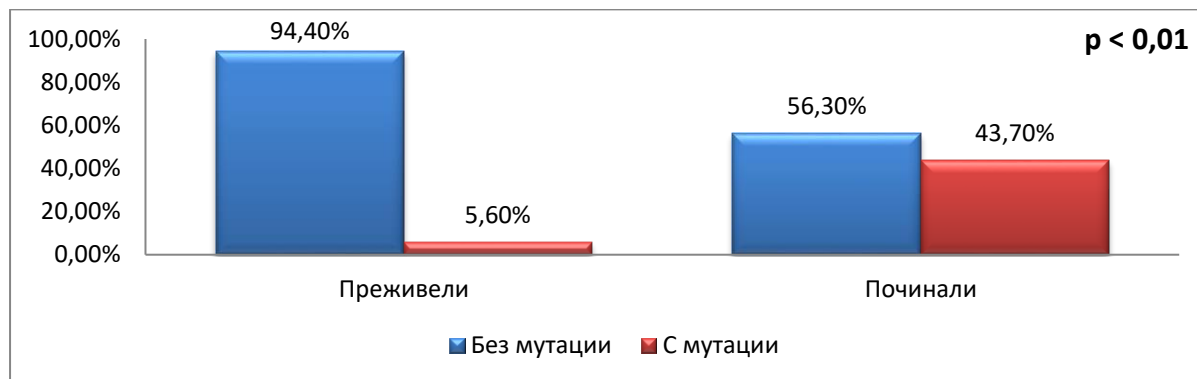
В зависимост от степента на диференциация най-много са починалите пациенти от КРК с умерена степен на диференциация (G2) – 68 неоплазми (79,10%) от случаите. Те имат най-ниска преживяемост – 11,94±6,35 месеца. При извършения сравнителен анализ между преживяемостта на пациентите и степените на диференциация (G2 и G3) се установи статистически значима разлика ($t=2,73$, $p<0,01$). Пациентите с диференциация G3 на КРК имат значително по-висока преживяемост-23,06±16,45 месеца в сравнение с тези с G2 (фиг. 13). Получените от нас резултати относно зависимостта между туморната диференциация и OS могат да се обяснят с факта, че в нашата извадка преобладават пациентите с диференциация G2, докато тези с G3 са значително по-малко – 18 случая. Със степен диференциация G1 има само един пациент.



Фигура 13. Сравнителен анализ на преживяемостта на пациентите с колоректален карцином в зависимост от степента на диференциация ($p<0,01$)

Сравнителният анализ между преживяемостта на пациентите и молекулярния статус – KRAS (със и без мутация) показва съществена разлика в относителния дял на преживелите и починали пациенти ($\chi^2=9,94$ $p<0,01$). Починалите пациенти с диагностицирана мутация са значително повече от преживелите, докато тези без

мутация имат по-голям шанс да оцелеят (фиг. 14). Въпреки високата честота на смъртност сред пациентите с мутации, не се доказва сигнификантна разлика в преживяемостта, като пациентите с мутации преживяват средно $21,94 \pm 14,18$ месеца, а тези без – $23,04 \pm 19,40$ месеца.



Фигура 14. Относителен дял на преживелите и починали пациенти от колоректален карцином в зависимост от KRAS статуса

Тези резултати са в съответствие с данните от други изследвания, които установяват, че при мутация – KRAS колоректалните карциноми протичат по-агресивно и по-често дават метастази (Bazan V et al., 2005; Oliveira C et al., 2007). Не всички автори намират сигнификантна разлика в OS при пациентите с и без мутация (Kim H et al., 2016).

Статистическа значима разлика между общата преживяемост на пациентите и начина на туморен растеж, предимно инфилтративен или предимно експанзивен растеж, не се откри. Ние установихме, че инфилтративният туморен растеж (72,10% от починалите пациенти) носи по-висок риск от летален край в сравнение с експанзивния растеж OR 1,19 (0,597-2,390). Статистически значима разлика бе установена между преживяемостта на пациентите и типа на туморния растеж. Пациентите, при които преобладава инфилтративния туморен растеж имат по-малка преживяемост – $20,85 \pm 17,04$ месеца, докато при тези с предимно експанзивен туморен растеж – $23,5 \pm 17,22$ месеца. Тези данни не се различават от резултатите на други автори, които установяват, че инфилтративният туморен растеж е характерен за силно агресивни тумори, и е определен като независим и неблагоприятен прогностичен фактор (Jass J, 2007; Compton C et al., 2000; Halvorsen T et al., 1989; Kubota Y et al., 1992; Quirke P et al., 1987; Shepherd N et al., 1989; Fisher E et al., 1989).

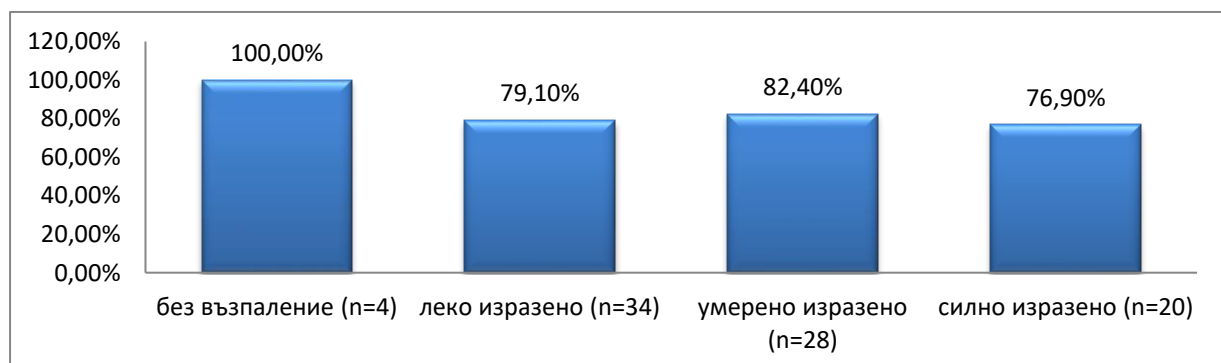
Независимо от факта, че не бе намерена съществена разлика между относителния дял на починалите пациенти и склонността към формиране на tumor budding, може да твърдим, че пациентите, при които има туморно пъпкуване, т.е. поява на туморни клетки отделни от основния тумор с инфилтрация в околните тъкани умират по-често (54,70%) от тези, при които не се откриват подобни промени. Пациентите, при които се наблюдава tumor budding имат по-висок риск за настъпване

на смърт (OR 1,05 (0,689–1,587)) и по-малка обща преживяемост $20,57 \pm 16,44$ месеца в сравнение с тези, при които липсва туморно пъпкуване. За сравнение пациентите с липса на tumor budding преживяват средно $22,82 \pm 17,85$ месеца. Няколко проучвания констатираат, че появата на tumor budding в инвазивния ръб на тумора е свързвано с влошаване на преживяемостта на пациентите с КРК (Ueno H et al., 2004; Guzinska-Ustymowicz K, 2005; Kanazawa H et al., 2008; Wang LM et al., 2009; Nakamura T et al., 2008). Други автори съобщават, че tumor budding се среща по-често при MSS-тумори и в авансирал стадий на КРК (Jass J et al., 2003; Mitrovic B et al., 2012; Zlobec I et al., 2012).

По отношение на некрозите в тумора, ние установихме, че най-много са починалите пациенти от КРК, когато в туморната тъкан има огнищни некрози – 54(62,80%). Средната обща преживяемост на тези пациенти е сравнително висока – $23,26 \pm 16,55$ месеца. С най-малка обща преживяемост са пациентите с обширни некрози – $15,30 \pm 7,80$ месеца, а с най-висока тези, при които липсват некрози – $24,58 \pm 26,85$ месеца. При проведения сравнителен анализ между OS на пациентите с КРК и некрозата в туморната тъкан се откри сигнификантна разлика ($t=2,06$ $p<0,05$).

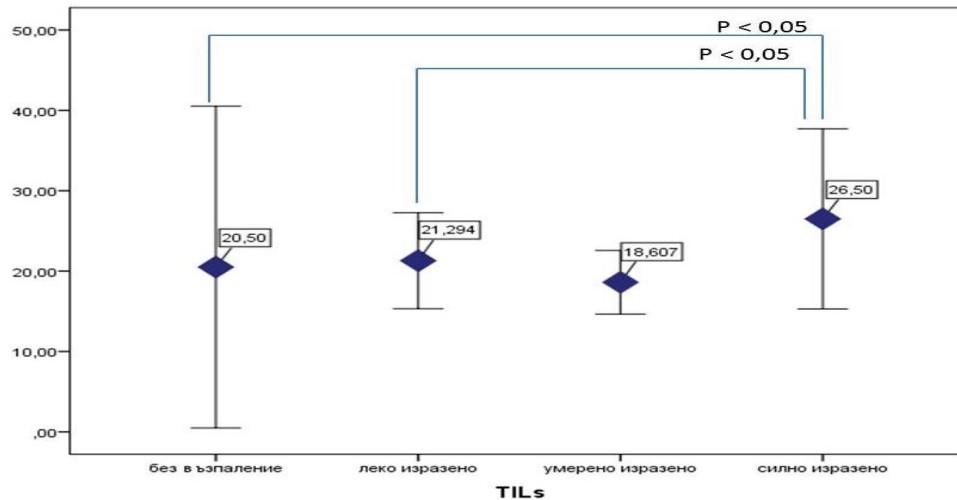
Получените от нас резултати потвърждават данните на Komori и съавтори (2013), които установяват подобна зависимост между OS и степента на изразеност на некрозите. В своето изследване на група пациенти с КРК в IV клиничен стадий, те установяват, че тежко изразените и обширни некрози се свързват с по-лоша OS в сравнение с групата пациенти без или с леко изразена некроза (Komori K et al., 2013). Има данни, които показват, че туморната некроза, освен с OS, корелира с местния и системен възпалителен отговор, особено с този индуциран от IL-6, с апоптозата и микросателитната нестабилност (Gao J et al., 2005; Guthrie G et al., 2013).

Разпределението на починалите пациенти според степента на TILs показва, че всички пациенти с КРК, в туморната тъкан, на които липсва възпалителна реакция са починали, като висок относителен дял имат и пациентите с лека и умерена степен на TILs (фиг. 15).



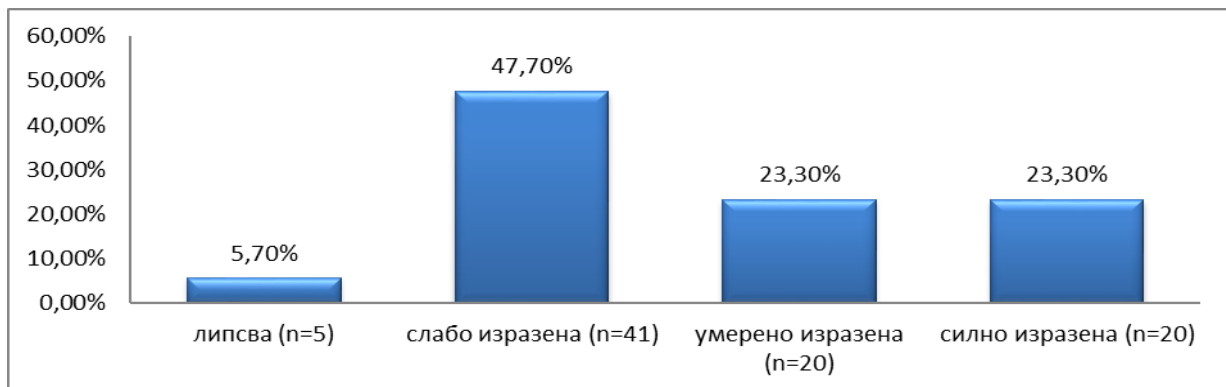
Фигура 15. Разпределение на починалите пациенти с колоректален карцином според степента на изразеност на TILs

Лицата със силно изразен TILs имат най-голяма OS в сравнение с пациентите, при които липсва TILs (съответно 26,50 мес. и 20,50 мес). Съществена разлика се откри и между OS при пациентите със силно изразен антитуморен възпалителен отговор и тези с леко изразен отговор, при които OS е най-ниска (съответно 26,50 мес. и 21,29 мес.) (фиг.16).



Фигура 16. Средна обща преживяемост (в месеци) при пациенти с колоректален карцином в зависимост от степента на TILs

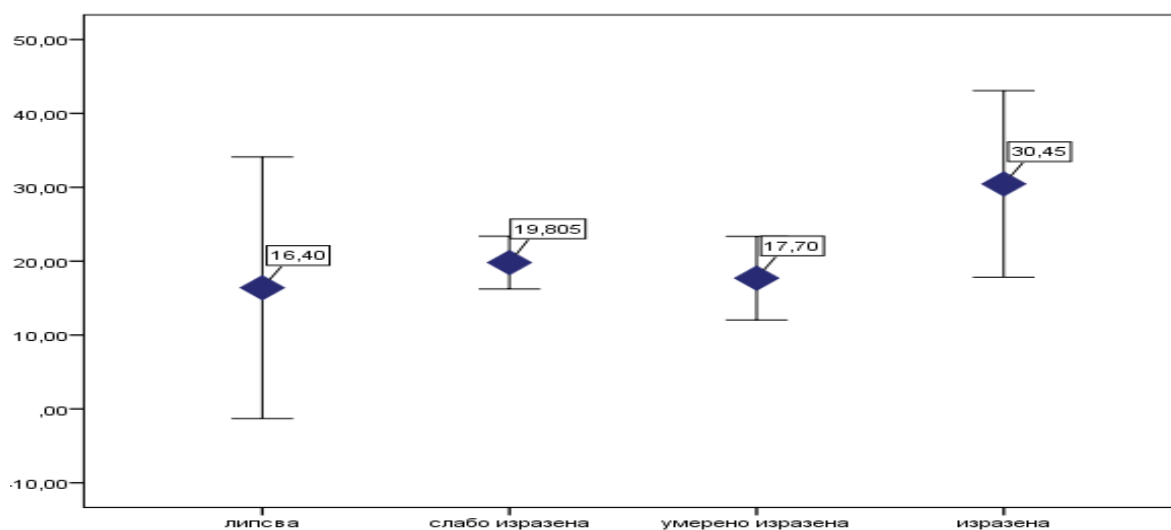
Връзката между смъртността на пациентите с диагноза колоректален карцином и имунната реакция в нашето проучване показва, че най-висока е смъртността при пациентите със слабо изразена имунна (стромна) реакция (47,70%) (фиг. 17).



Фигура 17. Относителен дял на починалите пациенти с колоректален карцином в зависимост от степента на изразеност на стромната реакция

Сравнителният анализ между преживяемостта и стромната реакция установи наличието на статистически значима разлика ($F=2,59$ $p<0,05$). Пациентите, при които липсва стромна реакция или тя е слабо и умерено изразена, имат по-малка

преживяемост (съответно 16,40 мес., 19,81 мес. и 17,70 мес.), отколкото пациентите със силно изразена стромна реакция, чиято преживяемост е 30,45 месеца (фиг. 18).



Фигура 18. Средна обща преживяемост на пациентите с колоректален карцином в зависимост от степента на стромна реакция (в месеци)

Получените от нас резултати показват, че както TILs, така и стромната реакция имат благоприятен ефект върху OS. Подобни са резултатите на Roxburgh (2011), получени от 104 клинични проучвания, посветени на връзката между възпалителния отговор и преживяемостта при КРК. От тези данни става ясно, че при по-голямата част от проучванията (n=77) се установява сигнификантна зависимост между преживяемостта и наличието на възпалителен отговор (перитуморен – TILs и интратуморен – имунна (стромна) реакция (Roxburgh C, Campbell S, 2011). Други изследвания също установяват по-добра преживяемост при пациентите с изявен имунен отговор (Dalerba P et al., 2003; Galon J et al., 2007; Camus M et al., 2009). Според някои проучвания, микросателитната нестабилност (MSI) има отношение към противотуморната възпалителна реакция (Linnebacher M et al., 2011). MSI води до производството и натрупването на увредени белтъчни молекули и пептиди, които могат да действат като антигени и да индуцират адаптивен възпалителен отговор, ограничавайки туморния растеж и разпространение (Linnebacher M et al., 2011; Diederichsen A et al., 2003; Drescher K et al., 2009). Последни изследвания показват, че типа, локализацията и специфичното имунотипизиране на лимфоцитния инфилтрат („immunoscore“) може да имат допълнителна прогностична стойност при пациенти с КРК (Galon J et al., 2006; Gallon J et al., 2014).

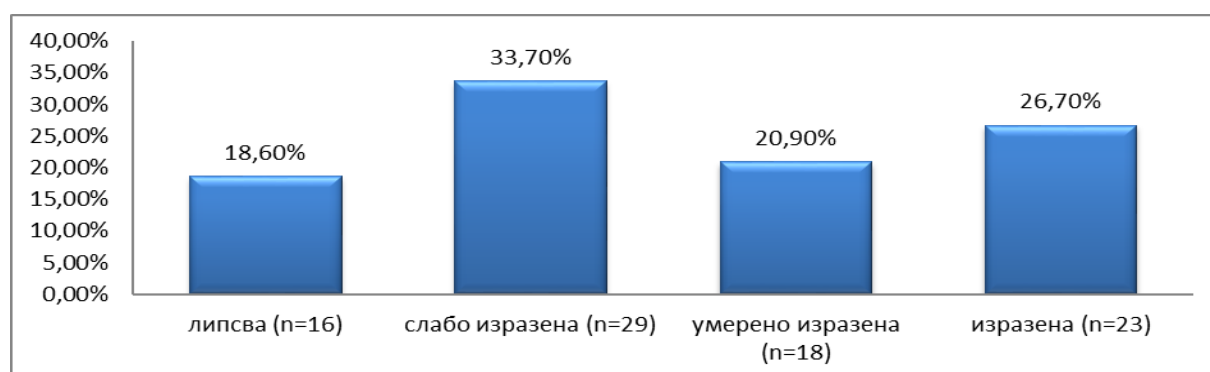
От пациенти, починали от КРК, по-висок относителен дял имат тези със съдова инвазия (59,30%). Присъствието на туморни емболи носи по-висок риск (OR 1,29 (0,955–1,728)) за летален край и води до по-малка обща преживяемост (20,19±17,25мес.). Пациентите без съдови емболи имат средна преживяемост

23,63±16,75 месеца. Тези наши данни не се различават от данните в други изследвания, които посочват съдовата инвазия като независим прогностичен фактор, свързан с по-лоша преживяемост (van Wyk H et al., 2014; Roxburgh C et al., 2011; Roxburgh C et al., 2010). Подобно на други изследователи се обединяваме около идеята за по-прецизно определяне на съдовата инвазия, чрез използване на оцветяване за еластични и колагенни влакна (ван Гизон) или чрез имунохистохимично изследване със CD31 (Dawson H et al., 2005; Howlett C et al., 2009; van Wyk H et al., 2014; Barresi V et al., 2012).

Анализирайки връзката между смъртността и перинеуралната инвазия се установи, че пациентите, при които липсва инвазия, имат по-висока честота на смъртност (55,80%), но имат по-голяма преживяемост 23,66±19,74 месеца в сравнение с пациентите с перинеурална инвазия, които живеят значително по-малко (18,97±12,59 месеца).

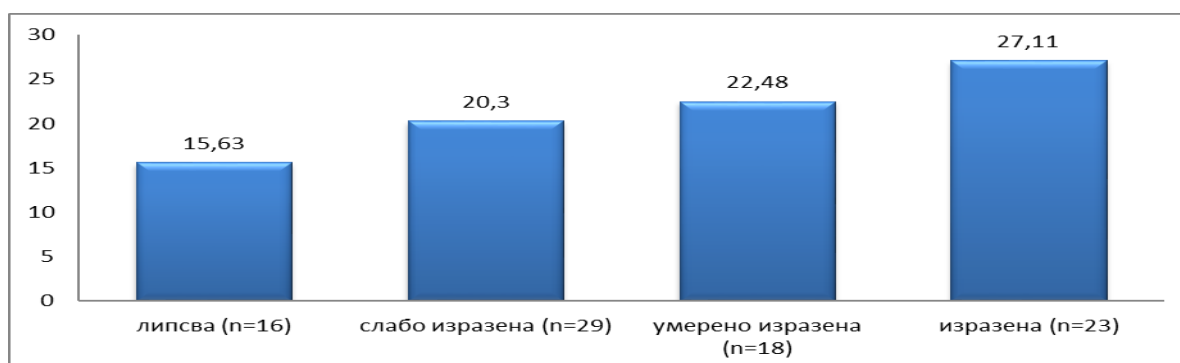
Неотдавна, Knijn et al. (2016 г.) съобщиха резултатите, получени от мета-анализ за прогностичната стойност на перинеуралната инвазия при дебелочревен карцином. На базата на тези данни, те стигат до заключението, че перинеуралната инвазия трябва да бъде включена към задължителните за отчитане при КРК клиничко-морфологични черти, защото инвазията се отнася към високорисковите му характеристики (Knijn N et al., 2016). Присъствието на ПНИ според повечето изследвания се свързва с по-лоша преживяемост (Ueno H et al., 2013; Ueno H et al., 2014; Suzuki T et al., 2015; Liebig C et al., 2009), и само при едно проучване подобна зависимост не е установена (Mulcahy H et al., 1997). Получените от нас резултати, въпреки че не са статистически значими, са в подкрепа на данните, че ПНИ е асоциирана с по-лоша прогноза (Knijn N et al., 2016; Ueno H et al., 2013; Ueno H et al., 2014; Suzuki T et al., 2015; Liebig C et al., 2009). Според някои от изследователите, ПНИ трябва да се определя по-прецизно чрез полуколичествена „score“ система и да се визуализира чрез прилагане на специални оцветителни техники като имунохистохимично изследване със S-100 protein (Bellis D et al., 1993; Ueno H et al., 2013).

Приблизително 1/3 (33,70%) от починалите пациенти с КРК са имали слабо изразена десмопластичната реакция (фиг. 19).



Фигура 19. Относителен дял на смъртността на пациентите с колоректален карцином в зависимост от степента на десмопластичната реакция

Анализът на преживяемостта при пациентите с КРК показва тенденция към нарастване ѝ с увеличаване степента на изразеност на десмопластичната реакция ($p < 0,05$). Най-малка обща преживяемост имат пациентите, при които липсва реакция (15,63 мес.). При слабо изразена реакция OS нараства (20,30 мес.). Най-голяма преживяемост имат пациентите със силно изразената десмопластичната реакция (27,11 мес.) (фиг. 20).



Фигура 20. Средна обща преживяемост (в месеци) на пациентите с колоректален карцином в зависимост от степента на изразеност на десмопластичната реакция

Подобно на други автори ние установихме, че изразената фибропластична реакция корелира с по-добра преживяемост (Zirpi M et al., 2017). Присъединяваме се към мнението на редица други изследователи, че присъствието на плътна съединителна тъкан сред тумора и в инвазивния ръб, ограничава разпространението на туморните клетки (Lunevicius R et al., 2001; Caporale A et al., 2005; Nishimura R et al., 1998; Shurlch W et al., 1997). От друга страна е известно, че при по-различен миксоиден състав на стромата, тя се явява бариера за възпалителните имунни клетки, стимулирайки неоваскуларизацията и в крайна сметка води до нарастване на туморната маса. Миксоматозните промени в стромата стимулират де-диференциацията на туморните клетки, които по-късно могат да образуват съдови емболи (Nishimura R et al., 1998; Shurlch W et al., 1997; Gabbiani G et al., 1971).

На таблица 5 са представени данните от сравнителния анализ между настоящето изследване и данните от литературата, относно показателите като: пол, възраст, локализация, степен на диференциация, T и N стадия (Yang Z et al., 2015). Ние, подобно на други автори (Yang Z et al., 2015) установихме, че общата преживяемост корелира с диференциацията на тумора, когато високата и умерена степен са обединени (G1 и G2) и сравнени с ниската степен на диференциация (G3) ($p < 0,01$). Z. Yang et al. (2015) установяват, че преживяемостта на пациентите с КРК освен от диференциацията, зависи и от локализацията и метастази в регионалните лимфни възли. Преживяемостта на пациентите с тумор, локализиран в колона е по-добра, отколкото при локализация в ректума. Ние установихме, че преживяемостта на

пациентите с КРК е по-голяма, когато пациентите са мъже, възрастта е под 60 години и карциномите са локализирани в ректума. Вероятно тези различия са асоциирани с начина на хранене и с фактори на околната среда на фона на генетично обусловена предразположеност.

Таблица 5. Обща преживяемост – унивариантен анализ

Показател		Собствено проучване, 2017, (n=107)			Z. Yang et al., 2015 (n=363)		
		N	Средна преживяемост (месеци)	p	N	Средна преживяемост (месеци)	p
Пол	Мъже	54	22,0	0,775	199	90,1	0,934
	Жени	32	20,9		164	94,1	
Възраст	≤ 60 г.	31	24,3	0,279	163	95,3	0,078
	> 60 г.	55	20,1		200	89,6	
Локализация	Колон	39	20,9	0,716	173	95,6	0,024
	Ректум	6	236		190	88,0	
Диференциация	G1-G2	69	23,9	0,008	320	64,3	0,001
	G3	17	11,9		43	96,4	
Т стадий	T1-T2	18	19,0	0,471	66	93,4	0,646
	T3-T4	68	22,3		297	92,8	
N стадий	N0	18	20,3	0,674	216	100,2	0,001
	N1-N2	29	22,5		147	77,3	

На табл. 6 е представена оценката на риска на клинично-патологични показатели и преживяемостта на пациентите с КРК, като резултатите са сравнени с тези на други автори.

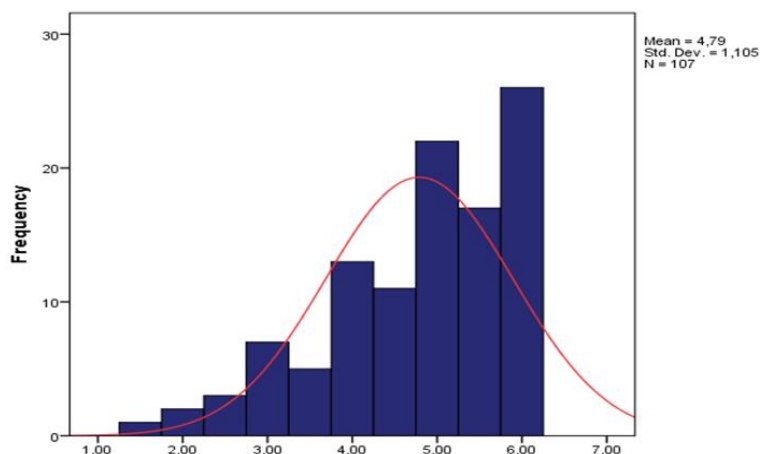
Таблица 6. Оценка на риска на клинично-патологичните показатели за преживяемостта на пациентите с КРК

	Собствено проучване, 2017 (n=86)		MY. Zhang et al., 2014 (n=382)	
	RR (95%CI)	p	RR (95%CI)	p
Възраст (≥ 65 г.)	1,257 (0,753-2,098)	0,250	0,823 (0,480-1,411)	0,478
Пол (жена)	1,090 (0,616-1,928)	0,474	0,870 (0,535-1,412)	0,572
Т стадий (Т3-Т4)	0,934 (0,547-1,159)	0,373	7,086 (2,122-23,657)	0,001
Съдова инвазия (+)	1,199 (0,821-1,750)	0,227	1,187 (0,671-2,100)	0,603
N стадий (+)	1,140 (0,719-1,820)	0,391	1,434 (0,415-4,953)	0,569
Метастази в черен дроб (+)	1,041 (0,843-1,287)	0,456	0,360 (0,069-1,867)	0,224
Диференциация (G3)	10,462 (1,454-75,279)	0,001	1,221 (0,820-1,819)	0,325

От представените данни става ясно, че в настоящето изследване най-висок риск за намалена преживяемост от изследваните показатели има ниската диференциация на тумора, докато в проучването на MY. Zhang et al., 2014 най-висок риск за преживяемостта има по-изразената инвазия в стената на дебелото черво (Т3-Т4).

3. Интензивност на експресия на *Veclin-1* в туморната и в съседната на тумора тъкан при пациенти с колоректален карцином

В настоящето изследване, чрез използване на имунохистохимични методи се установи, че експресията на *Veclin-1* е предимно в цитоплазмата на туморните клетки при КРК, в епителните клетки на криптите в съседната на тумора тъкан, както и в цитоплазмата на гладкомускулни и ендотелни клетки, фибробласти, адипоцити и лимфоцити в стената на дебелото черво.



Фигура 21. Честота на разпределение на пациентите с колоректален карцином в зависимост от средната стойност на експресия на *Veclin-1* в туморната тъкан

Средната експресия на *Veclin-1* в туморната тъкан на КРК на всички изследвани пациенти ($n=107$) е $4,78 \pm 1,105$, като минимума е 1,50, а максимума е 6,00 (фиг. 21).

3.1 Оценка на корелацията между средните стойности на експресия на *Veclin-1* в туморна тъкан и клинично-патологични показатели при колоректален карцином

На таблица 7 са представени средните стойности на експресията на *Veclin-1* в туморната тъкан и клинично-патологичните характеристики на КРК. Получените от нас резултати показват, че клинично-патологичните параметри, сигнификантно свързани с експресията на *Veclin-1* при КРК са: локализацията на тумора, диференциацията му, както и наличието на KRAS мутация.

Ние установихме, че десностранната локализация на КРК е свързана с по-висока експресия ($5,06 \pm 0,86$) на *Veclin-1* в сравнение със случаите с левостранна локализация ($4,62 \pm 1,21$) и разликата е статистически значима ($p < 0,05$).

Резултатите от Post Hoc анализ между диференциацията на тумора и експресията на *Veclin-1* показва сигнификантна разлика ($p < 0,05$). Експресията на анти тялото в по-диференцираните карциноми (G1 и G2) е по-висока в сравнение с пониско диференцираните карциноми - G3 (съответно $4,89 \pm 1,05$ и $4,25 \pm 1,12$).

Данните от нашето изследване показват, че експресията на *Veclin-1* е сигнификантно по-висока при пациенти, при които се установява наличието на KRAS мутация ($4,69 \pm 1,14$) в сравнение с тези без ($4,95 \pm 1,91$) и неизследваните ($4,06 \pm 1,81$) ($p < 0,05$).

Таблица 7. Средни стойности на експресията на *Veclin-1* в туморната тъкан при изследваните клинично-патологични параметри при колоректален карцином

Показател		Mean ± SD	p
Пол	Мъже	4,79 ± 1,08	> 0,05
	Жени	4,78 ± 1,14	
Локализация	Лява	4,62 ± 1,21	< 0,05
	Дясна	5,06 ± 0,86	
	Колон	5,02 ± 0,93	> 0,05
	Сигма	4,62 ± 1,18	
	Ректум	4,50 ± 1,39	
Т стадий	T1	4,83 ± 2,02	> 0,05
	T2	4,74 ± 0,90	
	T3	4,82 ± 1,11	
	T4	4,63 ± 1,38	
N стадий	N0	4,95 ± 1,05	> 0,05
	N1	4,65 ± 0,88	
	N2	4,96 ± 1,41	
	Неизвестен	4,73 ± 1,15	
Диференциация	Ниска (G3)	4,25 ± 1,23	< 0,05
	Умерена (G2)	4,90 ± 1,06	
	Висока (G1)	4,50	
Мутация	С мутация (M+)	4,69 ± 1,14	< 0,05
	Без мутация (WT)	4,95 ± 1,91	
	Неизследвани	4,06 ± 1,81	
Туморен растеж	Експанзивен	4,61 ± 1,18	> 0,05
	Инфилтративен	4,86 ± 1,07	
Площ на некроза	Огнищни	4,66 ± 1,23	> 0,05
	Обширни	4,81 ± 0,93	
	Без некроза	5,33 ± 1,19	

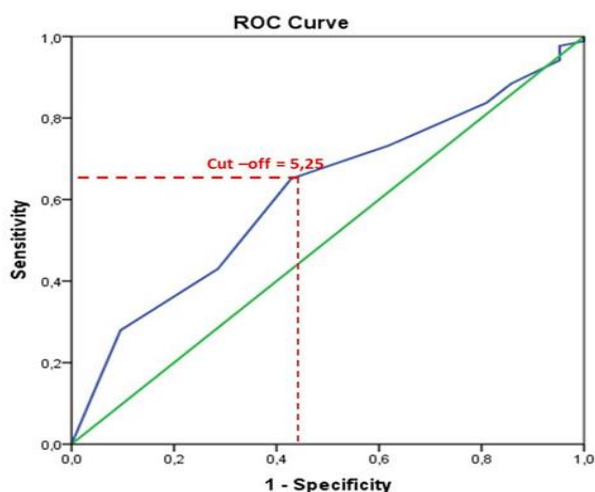
С помощта на Post Hoc анализ се установи, че при липса на некрози експресията на *Veclin-1* в туморната тъкан на КРК е значително по-висока (5,33±1,19), отколкото при тяхното присъствие (4,70±1,07) (p<0,05).

Не се откри зависимост между експресията на *Veclin-1* и пола и възрастта на пациентите с КРК.

При анализа на останалите клинично-патологични показатели също не се установи съществена разлика. Прави впечатление, че експресията на *Veclin-1* е по-висока при силно изразени TILs (5,06±1,94), липса на tumor budding (4,94±1,06), липса на съдова (4,97±1,98) и периневрална (4,81±1,12) инвазия, изразена стромна реакция (5,06±0,74) и липсваща десмопластична реакция (5,05±1,019).

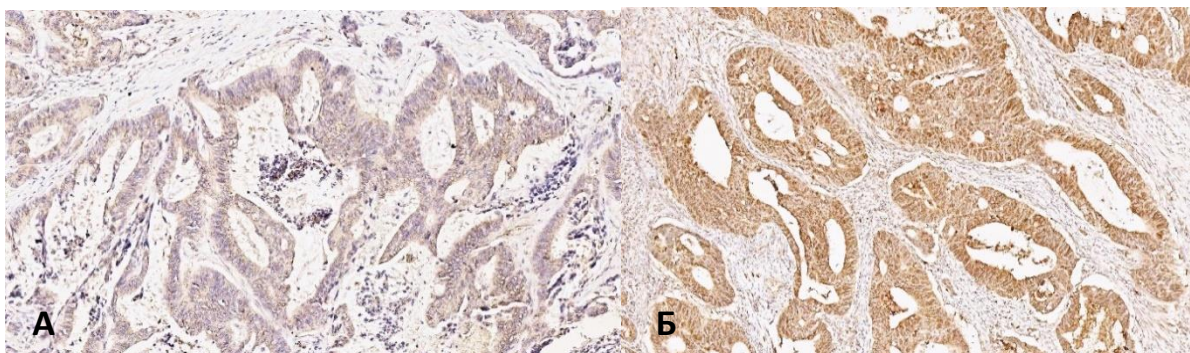
3.2 Оценка на корелацията между експресия на *Veclin-1* (според *cut-off* стойността) в туморна тъкан и клинично-патологичните характеристики при колоректален карцином

С помощта на ROC curve анализ определихме *cut-off* стойността, която ни помогна да разделим експресията на *Veclin-1* в туморната тъкан на ниска и висока. Това допринесе за по-детайлно изследване на нашите пациенти и за сравняването на получените от нас резултати с тези на други автори. За *cut-off* стойност на *Veclin-1* в туморната тъкан установихме 5,25 (фиг. 22).



Фигура 22. ROC curve анализ и определяне на *cut-off* стойността за *Veclin-1* ($AUC=0,614$ ($0,489-0,740$) $p<0,05$)

На фиг.23 е представена експресията на антитялото - *Veclin-1*, определена според *cut-off* стойността. На фиг. 23А е представена ниската експресия, а на фиг. 23Б е представена високата експресия на антитялото в туморна тъкан.



Фигура 23. Експресия на *Veclin-1*; А – ниска експресия; Б – висока експресия.

Имунохистохимично изследване с анти-Veclin-1. Увеличение x 100

На табл. 8 е представена експресията на *Veclin-1* в туморна тъкан, разделена чрез *cut-off* стойността на ниска и висока, като резултатите са сравнени с тези на други автори, използващи същата методика за оценка на експресията на антитялото (Yang Z et al., 2015).

Таблица 8. Характеристика на експресията на *Beclin-1*

Показател		Собствено проучване, 2017, (n=107)			Z. Yang et al., 2015 (n=363)		
		Ниска експресия	Висока експресия	p	Ниска експресия	Висока експресия	p
Пол	Мъже	38 (60,3%)	27 (61,4%)	0,538	107 (60,8%)	92 (49,2%)	0,027
	Жени	25 (39,7%)	17 (38,6%)		69 (39,20%)	95 (50,8%)	
Възраст	≤ 60 г.	23 (36,5%)	14 (31,8%)	0,385	85 (48,3%)	78 (41,7%)	0,246
	> 60 г.	40 (63,5%)	30 (68,2%)		91 (51,7%)	109 (58,3%)	
Локализация	Колон	57 (92,1%)	41 (93,2%)	0,433	83 (47,7%)	90(45,5%)	0,404
	Ректум	5 (7,9%)	3 (6,8%)		93(52,3%)	97(54,5%)	
Диференциация	G1	1 (1,6%)	-	0,044	16 (9,1%)	15 (8,0%)	0,003
	G2	47 (74,6%)	41 (93,2%)		129 (73,3%)	160 (85,6%)	
	G3	15 (23,8%)	3 (6,8%)		31 (17,6%)	12 (6,4%)	
T стадий	T1	1 (1,6%)	2 (4,5%)	0,801	4 (2,3%)	4 (2,3%)	0,853
	T2	12 (19,0%)	7 (15,9%)		27 (15,3%)	31 (16,6%)	
	T3	45 (71,4%)	32 (72,7%)		121 (68,8%)	132 (70,6%)	
	T4	5 (7,9%)	3 (6,8%)		24 (13,6%)	20 (10,7%)	
N стадий	N0	11 (32,4%)	12 (48,0%)	0,238	102 (58,0%)	114 (61,0%)	0,374
	N1	17 (50,0%)	6 (24,0%)		43 (24,4%)	50 (26,7%)	
	N2	6 (17,6%)	7 (28,0%)		31 (17,6%)	23 (12,3%)	

От изследваните клинично-патологичните показатели като пол, възраст, локализация, степен на диференциация, T- и N-стадий, експресията на *Beclin-1* (определена чрез cut-off стойността в туморната тъкан), показва зависимост от степента на диференциация на тумора. Получените от нас резултати са в съответствие с данните на други автори, които подобно на нас установяват, че с намаляване степента на диференциация на тумора, експресията на *Beclin-1* също намалява. Може да предположим, че де-диференциацията на КРК е свързвана с понижаване на нивото на автофагия.

За разлика от нас, Z. Yang et al. (2015) установяват, че експресията на *Beclin-1* зависи от пола на пациентите. Ниската степен на експресия се среща по-често при женския пол.

Резултатите от проведения сравнителен анализ между настоящото проучване и това на Z. Yang et al. показаха сигнификантна разлика както при ниската, така и при високата експресия на *Beclin-1* по отношение локализацията на КРК ($p < 0,01$). При нашите пациенти локализацията на КРК е предимно в колона, докато в изследването на Z. Yang et al. е предимно в ректума.

Друга съществена разлика, открита при сравнителния анализ между двете проучвания е по отношение на N-стадия в ниската експресия на *Beclin-1* ($p < 0,01$). В нашата извадка преобладават пациентите с ниска експресия на антитялото и стадий N1 (50,00%), докато в изследването на Z. Yang et al. преобладават пациентите със стадий N0 (58,00%).

Експресията на *Veclin-1* в настоящето изследване не се различава съществено по отношение на *RAS*-мутационния статус на пациентите. Относителният дял е еднакво висок както за ниската, така и за високата степен на експресия при липсата на мутации, съответно 58,70% за ниска експресия и 56,80 % за висока експресия.

Анализът на експресията на *Veclin-1* по отношение некрозата в туморната тъкан показва съществени различия в ниската и висока експресия в зависимост от присъствието и липсата на некрози. Когато липсват некрози, преобладават пациентите с висока степен на експресия на антицялото (86,70%), а когато присъстват преобладава ниската експресия (66,30%), като разликата е статистически значима ($p < 0,001$). Беше установена и обратнопропорционална умерена зависимост ($r = -0,374$ $p < 0,001$), която показва, че с появата на некрози експресията на *Veclin-1* намалява.

Въпреки че не се откри съществена разлика в експресията на *Veclin-1* във връзка с имунната и десмопластична реакция, високата експресия на антицялото преобладава при пациентите с липсваща имунна и десмопластична реакция, докато ниската експресия се наблюдава, когато те присъстват в тумора, независимо от степента на тяхната изразеност.

Между *TILs* и *tumor budding* от една страна и степента на експресия на *Veclin-1* в туморната тъкан не бе открита статистически значима разлика.

Съществени различия бяха установени между присъствието на съдова инвазия и степента на експресия на антицялото. Ниската експресия е с по-висока честота при пациенти със съдова инвазия (68,60%), докато високата експресия по-често присъства при пациенти с липса на инвазия (57,50%) ($p < 0,01$). Обратнопропорционална, слаба клоняща към умерена зависимост ($r = -0,257$, $p < 0,01$) бе установена между експресията на *Veclin-1* и съдовата инвазия. Получените от нас резултати показват, че с появата на съдови емболи нивото на автофагия в туморните клетки намалява.

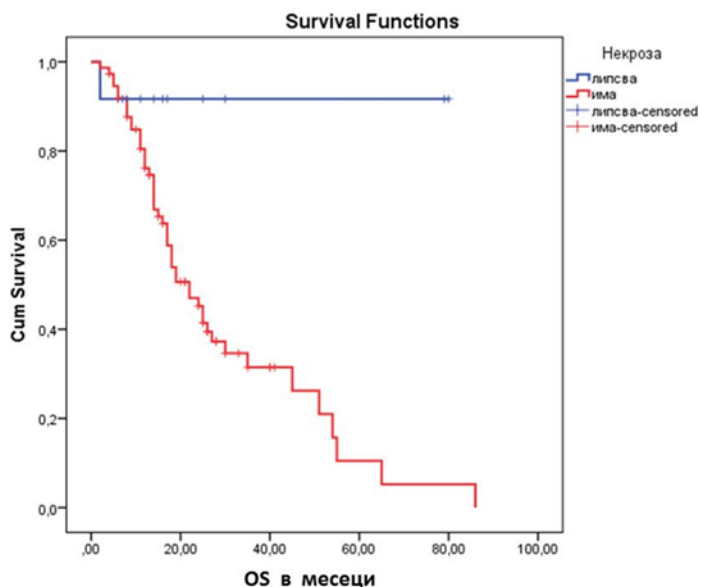
Експресията на *Veclin-1* в туморната тъкан не показва съществена зависимост от присъствието и липсата на перинеурална инвазия.

3.3. Оценка на влиянието на експресията на *Veclin-1* в туморна тъкан върху OS на пациентите с колоректален карцином според клинично-патологичните характеристики

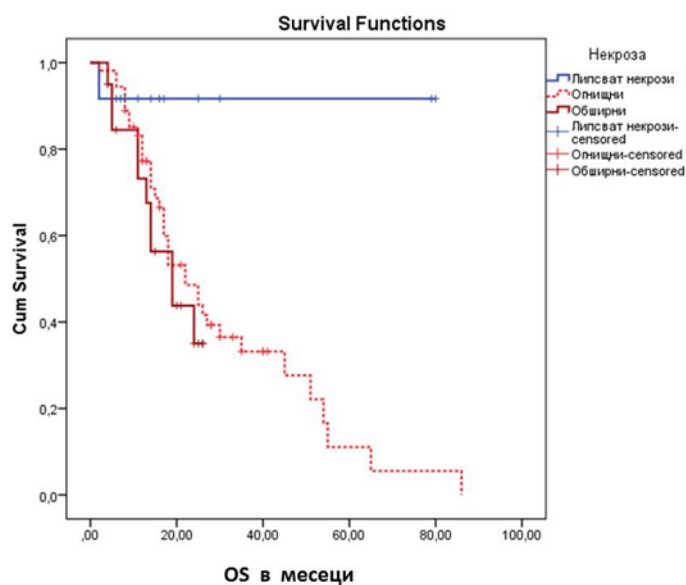
За да изследваме влиянието на експресията на *Veclin-1* в туморна тъкан върху OS според разглежданите клинично-патологични показатели, използвахме *Kaplan-Maier test*. Първо разгледахме промените в преживяемостта на пациентите при ниска експресия на *Veclin-1* в туморна тъкан. Съществени разлики бяха установени по отношение присъствието на некрози, съдова инвазия и диференциация на тумора.

Изследването на OS при ниска експресия на антицялото показва, че когато има некрози преживяемостта на пациентите е приблизително 2,5 пъти по-ниска (съответно 73,5 мес. средна преживяемост при пациенти без некроза към 29,9 мес. при пациенти с некрози; *long rank* $p = 0,01$), като HR е 8,74 (1,19-64,16; $p < 0,05$). Можем да приемем, че

при ниска експресия на *Veclin-1* присъствието на некрози носи висок риск за ниска OS (фиг. 24).



Фигура 24. *Kaplan-Meier* криви на разпределение на общата преживяемост на пациентите с колоректален карцином при ниска експресия на *Veclin-1* в туморна тъкан и наличието на некроза



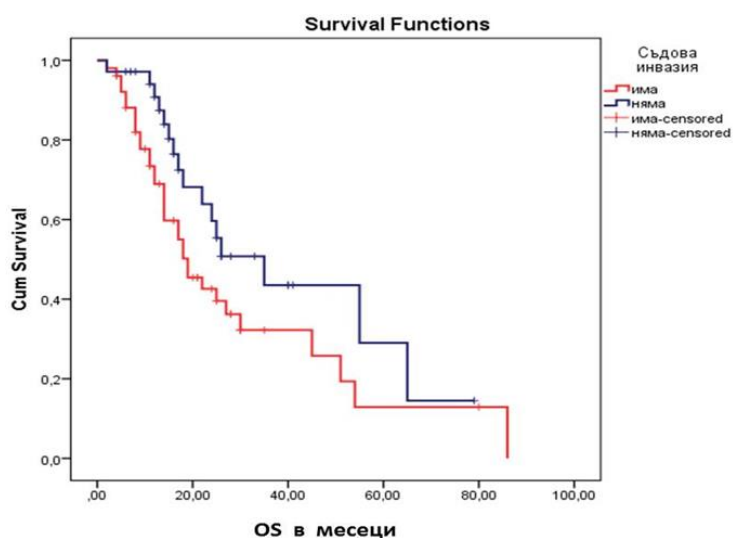
Фигура 25. *Kaplan-Meier* криви на разпределение на общата преживяемост при пациентите с колоректален карцином при ниска експресия на *Veclin-1* в туморна тъкан според присъствието и площта на некрозите

Анализирайки площта на некрозите се установи, че най-малка преживяемост имат пациентите с ниска експресия на *Veclin-1* и с наличие на обширни некрози. Те имат 4 пъти по-ниска преживяемост в сравнение с пациентите, при които липсват некрози (17,8 мес.). При присъствие на огнищни некрози средната преживяемост е 30,9 мес. или тя е с приблизително 2,4 пъти по-ниска в сравнение с тази при пациенти без некроза и 1,7 пъти по-висока в сравнение с пациентите с обширни некрози (long rank $p=0,027$)(фиг. 25).

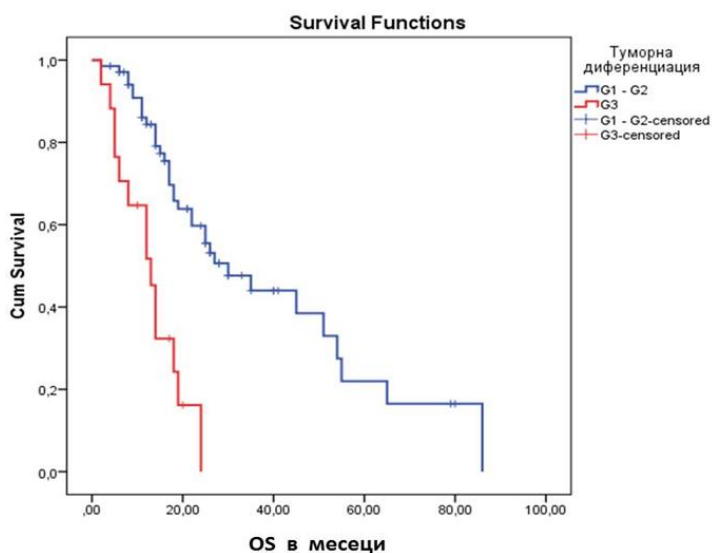
Общата преживяемост при пациенти с ниска експресия на *Veclin-1* се различава съществено при пациентите със и без съдова инвазия (long rank $p=0,045$). Пациентите

без съдова инвазия имат средна преживяемост 39,9 мес., а тези със съдова инвазия - 30,5 мес., като HR на съдовата инвазия е 1,41 (0,33-1,09; $p < 0,05$) (фиг. 26).

Изследването на преживяемостта при ниска експресия на *Beclin-1* в зависимост от степента на туморната диференциация показва, че има съществена разлика в OS при пациентите с висока и умерена диференциация (G1 и G2) и тези с ниска диференциация (G3) (long rank $p < 0,001$). Пациентите с G3 диференциация имат около 3 пъти по-лоша преживяемост в сравнение с пациентите с диференциация - G1 и G2 (съответно 12,8 мес. за G3 и 39,2 мес. за G1 и G2), като HR е 4,16 (2,11-8,21; $p < 0,001$) (фиг. 27).



Фигура 26. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост на пациентите с колоректален карцином при ниска експресия на *Beclin-1* в туморна тъкан и присъствието на съдова инвазия

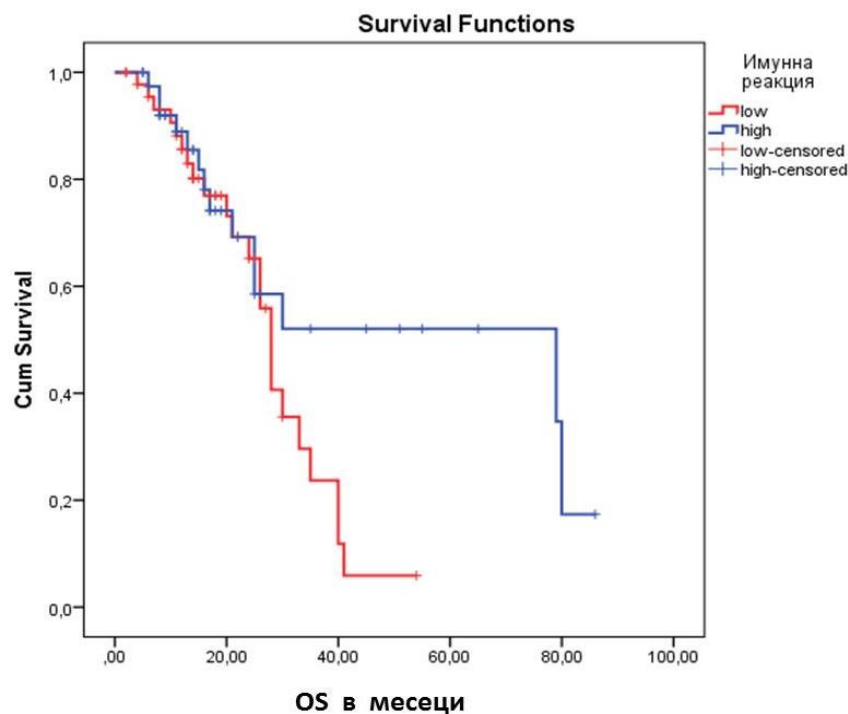


Фигура 27. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост при пациенти с колоректален карцином с ниска експресия на *Beclin-1* в туморна тъкан и степента на туморна диференциация (G)

При високата експресия на *Beclin-1* в туморната тъкан съществена разлика в общата преживяемост на пациентите с КРК беше намерена само по отношение на имунната реакция и RAS мутационния статус.

При пациентите със слабо изразена имунна реакция и висока експресия на *Beclin-1* се установи значително по-ниска средна преживяемост (27,6 мес), която е

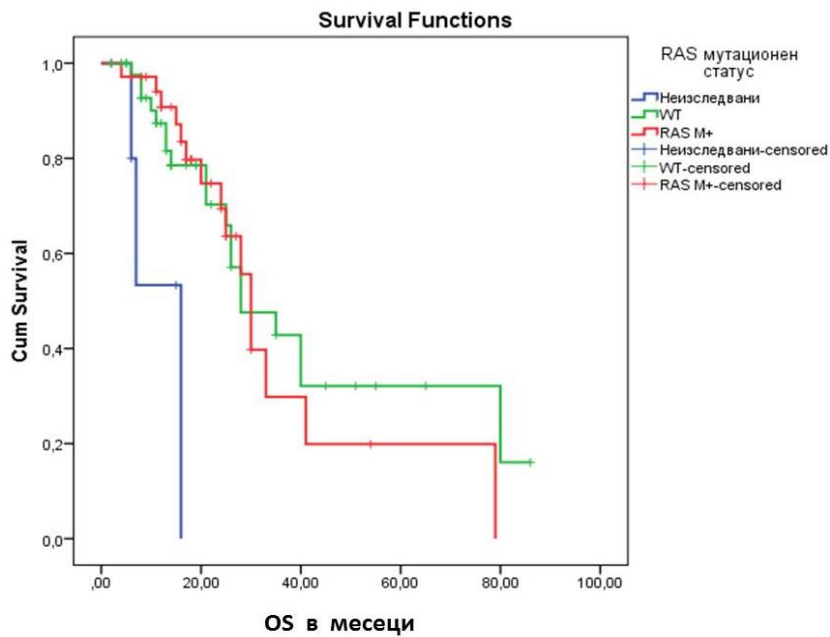
приблизително 2 пъти по-ниска в сравнение с пациентите със силно изразена реакция (51,3 мес.) (long rank $p < 0,05$). Това означава, че силно изразената имунна реакция има протективна роля и увеличава преживяемостта при пациенти с КРК (HR=0,54 (0,27-1,10) $p < 0,05$) (фиг. 28).



Фигура 28. *Kaplan-Meier* криви на разпределение на общата преживяемост при пациентите с колоректален карцином при висока експресия на *Veclin-1* в туморна тъкан и стромната (имунна) реакция

При високата експресия на *Veclin-1* беше установена съществена разлика в общата преживяемост на пациентите и *RAS*-мутационния им статус (long rank $p < 0,01$). Пациентите, които не са изследвани за мутации имат най-ниска преживяемост (11,6 мес.). При доказана мутация пациентите с КРК се характеризират с по-ниска преживяемост (36,4 мес.) в сравнение с тези, при които тя липсва (42,7 мес.) (фиг. 29).

Изследването на прогностичната стойност на експресията на *Veclin-1* в туморната тъкан за преживяемостта на пациентите с КРК показва, че при висока експресия на антитялото вероятността пациентите да преживеят по-малко е 84,10%, докато при ниска експресия на *Veclin-1* има 77,80% вероятност да преживеят по-дълго.

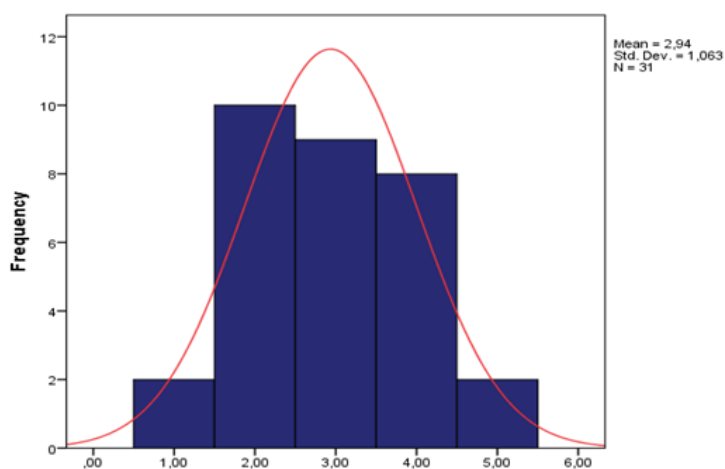


Фигура 29. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост при пациентите с колоректален карцином при висока експресия на Vclln-1 в туморна тъкан и RAS-мутационния статус

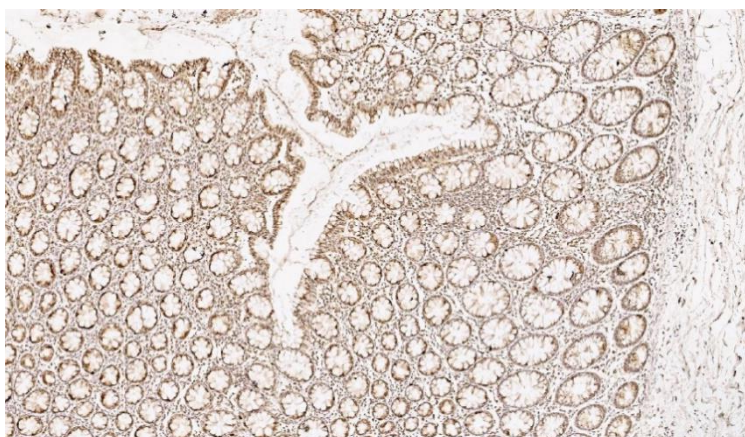
3.4. Експресия на Vclln-1 в съседната на тумора тъкан и оценка на корелацията между експресията на анти тялото в туморна тъкан и в околната тъкан при пациенти с колоректален карцином

Средната стойност на експресията на Vclln-1 в нетуморната (околна) тъкан е $2,94 \pm 1,06$, като минималната е 1,00, а максималната е 5,00 (фиг. 30).

При сравнителното изследване на експресията на Vclln-1 в нетуморната и туморна тъкан не се доказва сигнификантна разлика, въпреки че в туморната тъкан средните стойности на експресия на анти тялото са по-високи (4,78).



Фигура 30. Честота на разпределение на пациентите според експресията на Vclln-1 в нетуморната тъкан



Фигура 31. *Експресия на Beclin-1 в цитоплазмата на клетките от нетуморната дебелочревна мукоза. Имунохистохимично изследване с анти-Beclin-1. Увеличение x 50*

Wu Sh et al., изследвайки експресията на Beclin-1 при пациенти с КРК, установяват сигнификантно по-високи стойности на експресията на Beclin-1 в туморна тъкан в сравнение със нормалната дебелочревна мукоза (Ahn C et al., 2007; Yang Z et al., 2015; Li B et al., 2009; Wu Sh et al., 2015). Не при всички изследвания са намерени повишени стойности на Beclin-1 в сравнение с околната туморна тъкан. При плоскоклетъчен карцином на кожата и дуктален аденокарцином на панкреас, експресията на Beclin-1 е понижена в сравнение с околната нетуморна тъкан (Okura R, 2011; Kim H et al., 2011). Liang et al. (1999) посочват, че експресията на Beclin-1 е относително по-ниска в туморна тъкан при карцином на млечна жлеза, в сравнение с експресията в съседната на тумора тъкан (Liang et al., 1999).

Според нас повишената експресия на Beclin-1 в туморната тъкан на КРК може да се дължи на метаболитен стрес, свързан с дефицит на нутриенти и кислород, поради засилената клетъчна пролиферация и недостатъчната васкуларизация на тумора. Експресията на Beclin-1 в неопластичната тъкан на КРК може да индуцира процеса на автофагия, с което да се подсигури по-добрата преживяемост на туморните клетки, чрез стимулиране на неоваскуларизацията.

3.5. Обобщение на данните относно експресията на Beclin-1 в туморната тъкан

Оценявайки експресията на Beclin-1 и клинично-морфологичните показатели, установихме, че корелационната зависимост между изследваните показатели зависи от скалата за оценяване на експресията. Използването на повече статистически методи при анализиране влиянието на хистологичните параметри на тумора върху експресията на антитялото допринася за по-детайлно изясняване на връзката помежду им.

Резултатите от настоящото изследване показват, че експресията на Beclin-1 зависи от локализацията на тумора, неговата диференциация и съдовата инвазия. Останалите параметри като пол, възраст, T- и N-стадий, туморен растеж, степен на изразеност на некрозите и RAS мутационния статус, според нашите резултати не повлияват автофагията в тумора. По-висока е експресията на Beclin-1 при локализация на КРК в дясната половина, при висока и умерена степен на диференциация и при

липса на некрози. С намаляване на диференциацията на тумора, експресията на Beclin-1 също намалява. Високата експресия се среща по-често при липса на туморни емболи и некрози.

В литературата не е голям броят на изследванията, в които се търси зависимост между морфологичните промени и тъканната експресия на Beclin-1 (Koukourakis et al., 2010; Yang et al. 2015; Schmitz et al., 2016). В тези изследвания се акцентира главно на влиянието на диференциацията, некротата и съдовата инвазия върху експресията на антицялото. Липсват изследвания, посветени на автофагията и туморната локализация.

В настоящото изследване бяха проучени и някои други морфологични показатели при КРК и връзката им с маркера на автофагия.

Ние определихме влиянието на експресията на Beclin-1 върху общата преживяемост на пациентите, съвместно с пато-морфологичните характеристики на КРК. Пациентите с КРК с ниска експресия на антицялото и с присъствие на некрози имат 2 пъти по-ниска OS, отколкото тези без некрози. Ниска OS имат пациентите с ниска експресия на антицялото и съдова инвазия или с ниска диференциация (G3). Високата експресия на антицялото и липсата на имунна реакция в туморната строма води до по-ниска OS при пациентите с КРК. По-ниска OS има също при KRAS мутация и висока експресия на антицялото.

Анализирайки прогностичната стойност на експресията на Beclin-1 в туморната тъкан на КРК, се установи, че при високата експресия на антицялото, вероятността пациентите да преживеят по-малко е 84,10%, докато при ниската експресия на Beclin-1 има 77,80% вероятност да преживеят по-дълго.

Все още е спорен въпросът дали ниската или висока експресия на Beclin-1 влияе благоприятно върху OS. Според някои автори, свръх-експресията на Beclin-1 в туморна тъкан се свързва с по-лоша OS (Park J et al., 2013). Според други автори, по-високата експресия на Beclin-1 в туморната тъкан се свързва с по-добра прогноза при пациенти с КРК (Li B, 2009; Yang Z et al., 2015). Подобни резултати са получени и при проучване на други злокачествени неоплазми като: панкреатичен дуктален карцином, езофагеален адено- и плоскоклетъчен карцином, хепатоцелуларен карцином, карциноми на стомаха и яйчника (Lin H et al., 2013; Kim H et al., 2011; Roesly H et al., 2012; Chen Y et al., 2009; Ding Z et al., 2008; Geng Q et al., 2012).

Получените от нас резултати показват, че както ниската, така и високата експресия на маркера за автофагия, Beclin-1 могат да са асоциирани с по-добра или с по-лоша прогноза. Това зависи не само от експресията на антицялото, но и от морфологичните промени в туморната тъкан. Ние считаме, че оценката на експресия на Beclin-1 трябва да бъде определена в съчетание с клинично-морфологичните параметри.

Резултатите ни показват, че процесът на автофагия при злокачествените заболявания, може да има тумор-супресиращ или тумор-промотиращ ефект в зависимост от редица фактори, като хистологичен тип на тумора, туморен стадий, присъствие на онкогенните мутации, наличие на некроза, съдова инвазия, имунна реакция и др. Следователно, не е изненадващо, че резултатите относно влиянието на

имунохистохимичната експресия на маркера за автофагия върху прогнозата на пациентите са доста противоречиви.

На базата на резултати от настоящото изследване и на данните от литературата предполагаме, че съществуват два различни сигнални пътя за активиране на Beclin-1, и двата свързани с туморна агресивност. По-ниската или липсваща експресия на Beclin-1 може да се дължи на алелна делеция в гена за Beclin-1 (Aita V et al., 1999). Известен е фактът, че Beclin-1 може да взаимодейства с Bcl-2 фамилията протеини и по този начин да действа като тумор-супресор ген (Сао Yet al., 2007). Следователно, ниската или липсваща експресия на Beclin-1 вероятно блокира процеса на апоптоза в туморните клетки, с което може да се обясни неблагоприятната прогноза при пациентите.

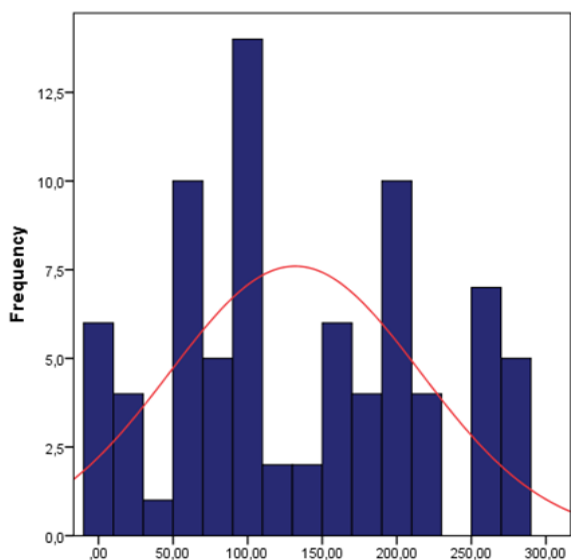
Високата експресия на антиятлото може да бъде свързана също с лоша прогноза. Според данните от изследването на Koukourakis (2010), високата експресия на Beclin-1 се свързва с повишена експресия на HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1, α) и LDH5 (lactate dehydrogenase 5), които са маркери за хипоксия и висока киселинност в туморната тъкан (Koukourakis M et al., 2010). Chen et al. (2009) също откриват директна връзка между експресията на Beclin-1 и тази на HIF1 α в езофагеален карцином (Chen Yet al., 2009). Следователно, повишената експресия на Beclin-1 може да е в отговор на неблагоприятни за туморните клетки условия, като хипоксия и повишена киселинност. Поддържайки по-високо ниво на автофагия, туморните клетки се стремят да рециклират увредени органели и протеини с цел оцеляване.

Beclin-1 играе важна роля в инвазивния растеж на тумора и метастазирането при пациенти с КРК. Потиснатата експресия на Beclin-1, дължаща се на алелна загуба на гена или ниска микроРНК-регулаторна активност, както се предполага в литературата, определят по-лоша преживяемост, чрез стимулиране на анти-апоптични пътища. От друга страна, високата Beclin-1 експресия, явяваща се в отговор на неблагоприятни за туморните клетки условия, определя подгрупи от тумори с агресивно клинично поведение.

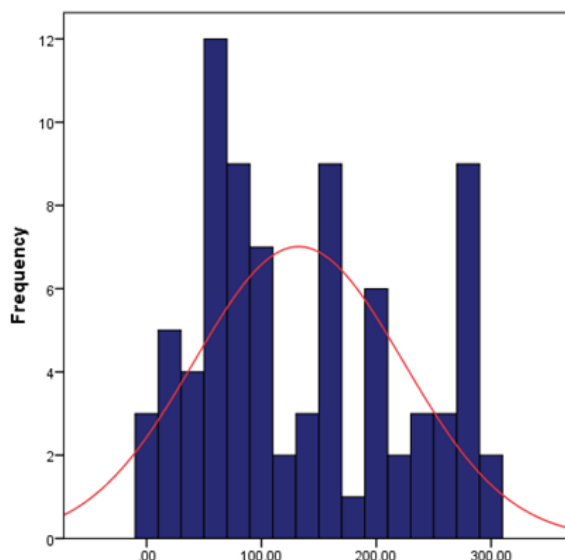
Beclin-1 може да бъде обещаващ маркер за бъдеща таргетна терапия при пациенти с КРК, лекувани с химиотерапия и в напреднал клиничен стадий. Изясняването на механизмите на автофагията при КРК е важно и необходимо условие за разработването на бъдещи терапевтични стратегии.

4. Интензивност на експресия на RIP3 в туморната тъкан и в съседната на тумора лигавица при пациенти с колоректален карцином

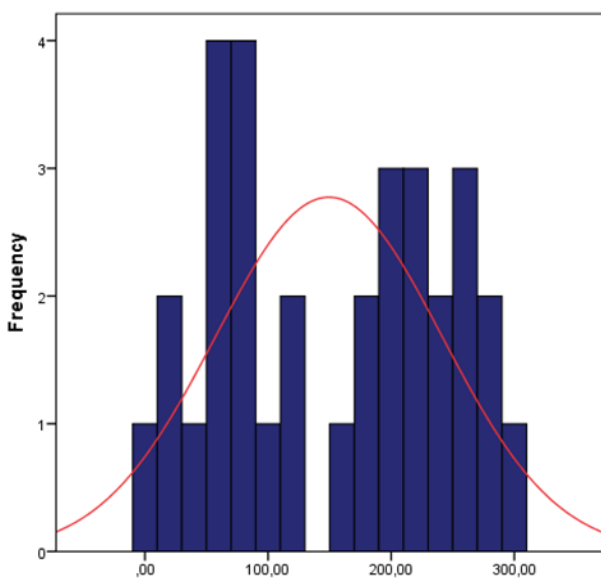
Цитоплазмената и ядрена експресия на RIP3 беше изследвана в туморната тъкан на 81 пациенти. Средната стойност на цитоплазмена експресия на RIP3, определена чрез H-score е $131,88 \pm 84,00$, като минималната е 0, а максималната е 280 (фиг.32). Средната стойност на ядрената експресия на RIP3 е $132,37 \pm 91,05$, като минималната е 0, а максималната е 300 (фиг. 33)



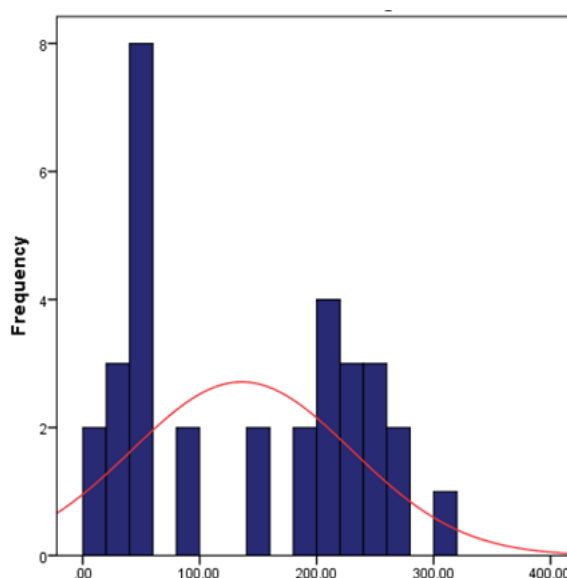
Фигура 32. Цитоплазмена експресия на RIP3 в туморна тъкан на колоректален карцином



Фигура 33. Ядрена експресия на RIP3 в туморна тъкан на колоректален карцином



Фигура 34. Цитоплазмена експресия на RIP3 в съседната на тумора тъкан



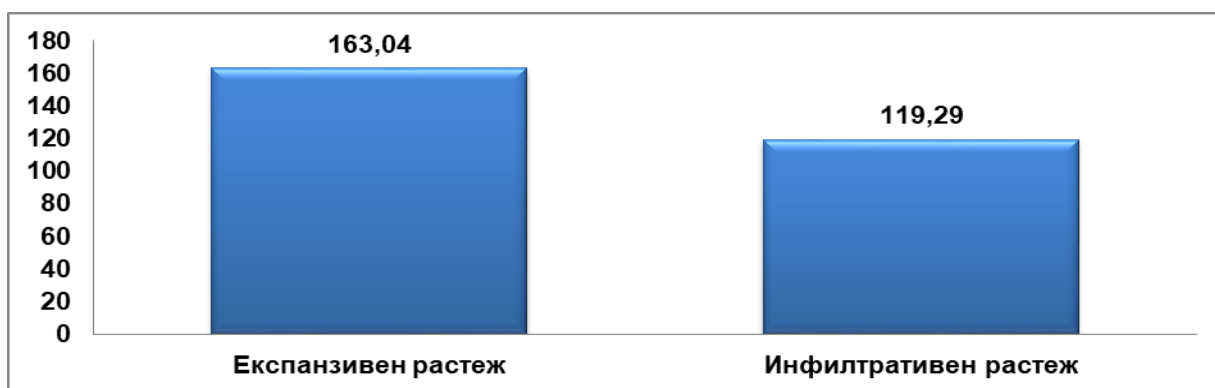
Фигура 35. Ядрена експресия на RIP3 в съседната на тумора тъкан

При 33 пациенти беше изследвана цитоплазмената и ядрена експресия на RIP3 в съседната на тумора тъкан. Средната стойност на цитоплазмена експресия на RIP3 е $149,38 \pm 92,00$, като минималната е 0, а максималната е 300 (фиг. 34). Средната стойност на ядрената експресия на RIP3 е $135,94 \pm 94,15$, като минималната е 10, а максималната е 300 (фиг. 35).

4.1. Оценка на корелацията между експресия на RIP3 (според средните стойности) в туморната и околната, нетуморна тъкан и клинично-патологичните характеристики

При изследване на средната стойност на цитоплазмената и ядрена експресия на RIP3 и клинично-патологични показатели съществена разлика установихме само за цитоплазмената експресия в зависимост от туморния растеж ($p < 0,05$), за цитоплазмената и ядрена експресия по отношение на имунната реакция (съответно $p < 0,001$ и $p < 0,05$) и за ядрената експресия във връзка с десмопластичната реакция ($p < 0,05$).

4.1.1 Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIP3 в зависимост от туморния растеж



Фигура 36. Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIP3 (определена според H-score) в зависимост от туморния растеж

От представените резултати на фиг. 36 се вижда, че по отношение на цитоплазмената експресия на анти тялото се наблюдава значително по-висока експресия при тумори, предимно с експанзивен растеж (163,04).

4.1.2. Сравнителен анализ на цитоплазмената и ядрена експресия на RIP3 в зависимост от имунната реакция

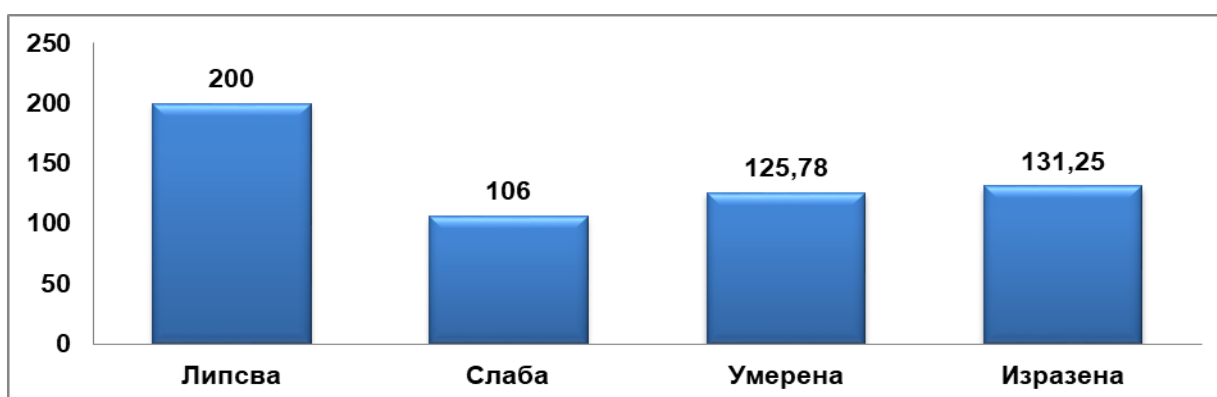
На фиг. 37 е представен сравнителният анализ на експресията на RIP3 в зависимост от имунната реакция. При цитоплазмената експресия на анти тялото се наблюдава статистически значителна разлика в средната стойност при липса и присъствие на реакция ($p < 0,01$). Стойностите на експресията на анти тялото намаляват с повишаване интензитета на имунната реакция. В ядрената експресия също се установява разлика, но зависимост между експресията и степента на изразеност на имунната реакция не се открива.



Фигура 37. Сравнителен анализ на експресията на RIP3 (определена чрез H-score) при имунна реакция

4.1.3. Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIP3 в зависимост от десмопластичната реакция

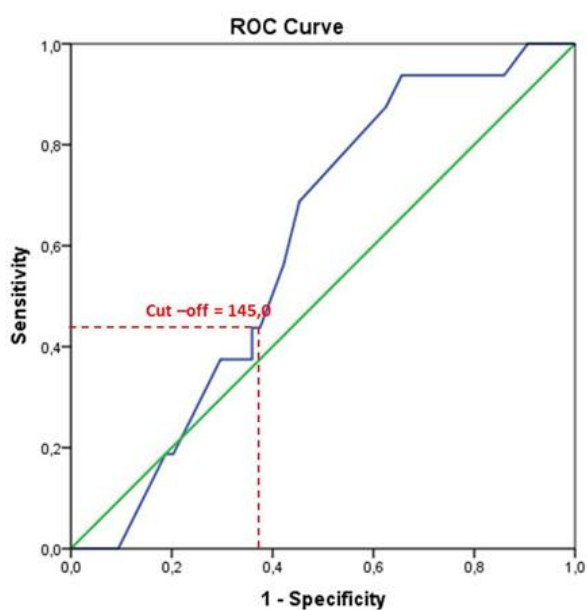
От резултатите, представени на фиг. 38 се вижда, че ядрената експресия на RIP3 съществено се различава, когато липсва или присъства десмопластична реакция ($p < 0,01$). Наблюдава се тенденция към нарастване на степента на експресия с увеличаване степента на изразеност на реакцията.



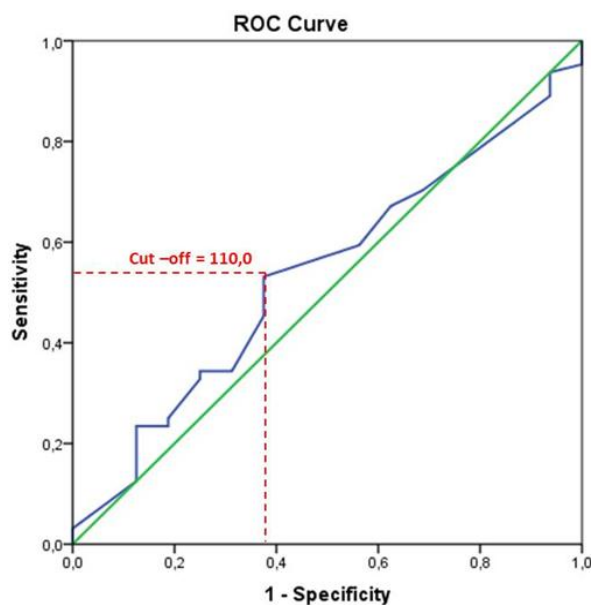
Фигура 38. Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIP3 (H-score) в зависимост от десмопластичната реакция

4.2. Оценка на корелацията между експресията на RIP3 в туморната тъкан (определена чрез cut-off стойността) и клинично-патологичните характеристики

За провеждането на допълнителни изследвания и оценка на риска определихме cut-off на RIP3 за цитоплазмената и ядрената експресия. С ниска цитоплазмена експресия са 55,0% от изследваните лица, а с висока 45,0% (фиг. 39). Разпределението при ядрената експресия се получи равномерно за ниската и висока експресия (по 50%)(фиг. 40)

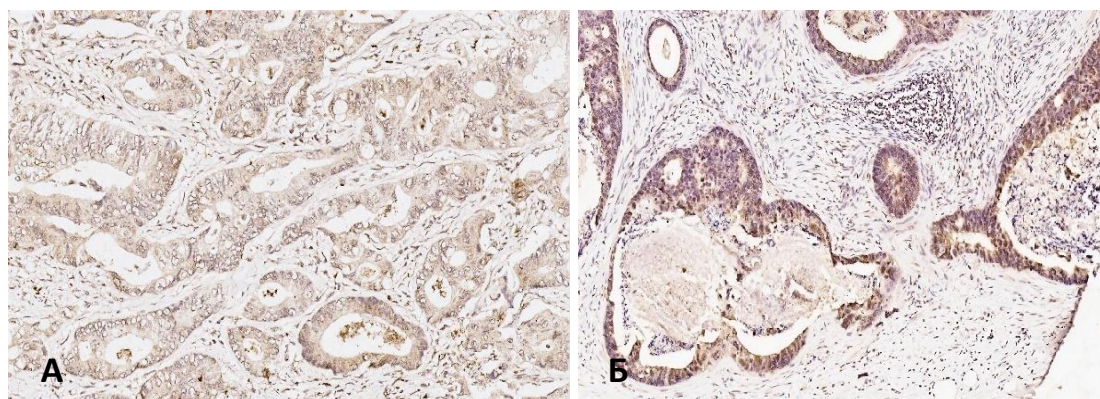


Фигура 39. ROC curve анализ и определяне на cut-off на RIP3 за цитоплазмената експресия ($AUC=0,604 (0,471-0,736)$
 $p<0,05$)

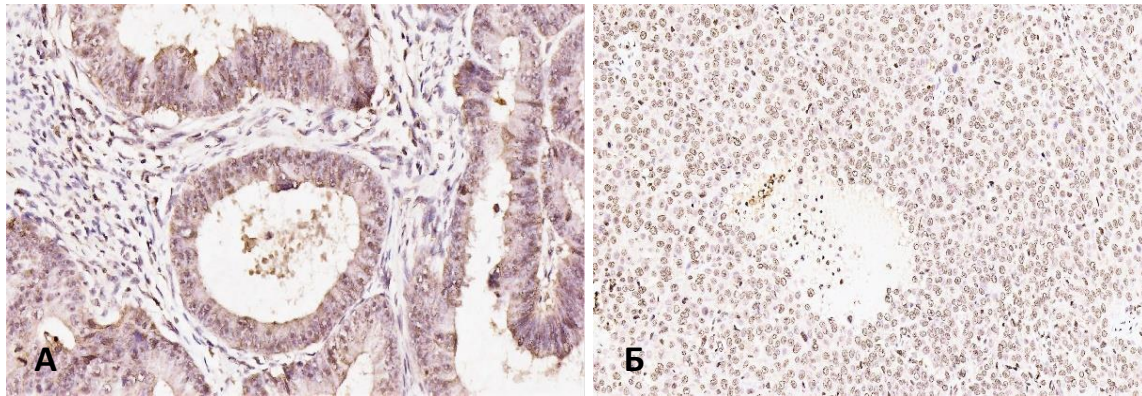


Фигура 40. ROC curve анализ и определяне на cut-off на RIP3 за ядрената експресия ($AUC=0,535 (0,384-0,687)$
 $p<0,05$)

На фиг. 41 са представени високата и ниска цитоплазмена експресия на RIP3, а на фиг.42 – висока и ниска ядрена експресия на RIP3.



Фигура 41. Цитоплазмена експресия на RIP3 в туморна тъкан. А – ниска експресия, оцветяване с anti-RIP3, увеличение x 100; Б – висока експресия, оцветяване с anti-RIP3, увеличение x 100



Фигура 42. Ядрена експресия на RIP3 в туморна тъкан. А – ниска експресия, оцветяване с anti-RIP3, увеличение x 200; Б – висока експресия, оцветяване с anti-RIP3, увеличение x 200

Таблица 17. Сравнителен анализ на експресията на RIP3 в туморна тъкан във връзка с клинично-патологични показатели

		Цитоплазмена		P	Ядрена		P
		Експресия на RIP3			Експресия на RIP3		
		Ниска	Висока		Ниска	Висока	
Възраст	≤ 65 г.	24	20	0,554	24	20	0,250
	> 65 г.	20	16		16	20	
Пол	Мъже	29	20	0,237	27	22	0,179
	Жени	15	16		13	18	
Локализация	Дясно	22	9	0,019	19	12	0,084
	Ляво	22	27		21	28	
T стадий	T1-T2	11	5	0,170	7	9	0,390
	T3-T4	33	31		33	31	
N стадий	N0	6	10	0,174	7	9	0,467
	N1-N2	16	12		14	14	
Стадий	T3-N0	4	6	0,205	6	4	0,440
	T3-N1, N2	15	9		12	12	
Съдова инвазия	-	15	10	0,359	12	13	0,500
	+	29	26		28	27	
Диференциация	G1-G2	34	32	0,143	34	32	0,385
	G3	10	4		6	8	
	+	16	13		14	15	
TIL's	Low	21	16	0,473	17	20	0,327
	High	23	20		23	20	
Некрози	-	5	2	0,307	3	4	0,500
	+	39	34		37	36	
Tumor budding	-	22	15	0,302	17	20	0,327
	+	22	21		23	20	
ПНИ	-	28	19	0,226	24	23	0,500
	+	16	17		16	17	
Туморен растеж	Експанзивен	8	15	0,020	12	11	0,500
	Инфилтративен	36	21		28	29	
Стромна реакция	Липса	4	-	0,002	2	2	0,029
	Лека	13	25		14	24	
	Умерена	12	7		15	4	
	Изразена	15	4		9	10	
Десмопластична реакция	Липса	8	4	0,211	1	11	0,013
	Лека	16	9		16	9	
	Умерена	11	8		11	8	
	Изразена	9	15		12	12	
Мутации	WT (-)	25	22	0,702	23	24	0,590
	M (+)	16	13		14	15	

От направения анализ между високата и ниска експресия на RIP3 и изследваните клинично-патологични показатели бяха намерени три съществени разлики при цитоплазмената експресия и две при ядрената (табл. 17).

4.2.1. Оценка на корелацията между цитоплазмената експресия на RIP3 и клинично-патологични показатели

Първият показател, при който се установи сигнификантна разлика е свързан с локализацията на тумора. За пациентите с десностранна локализация на тумора (22 пациента) е характерна ниската експресия на антитялото, а при тези с левостранна локализация (27 пациента) се наблюдава по-голяма честота на високата експресия ($p < 0,05$). При оценка на риска се установи, че десностранната локализация има по-висока предиктивна стойност при експресията на цитоплазмения RIP3 ($RR=2,0$ (1,06-3,79)).

Вторият показател, показващ съществена разлика в цитоплазмената експресия, е туморният растеж. При пациентите с висока експресия преобладава предимно експанзивният растеж, докато при тези с ниска - инфилтративният ($p < 0,01$). Оценката на риска доказва, че инфилтративният растеж има по-голямо значение за ниската експресия на антитялото ($RR=1,4$ (1,03-1,91)).

При анализа на имунната реакция се установи съществена разлика в цитоплазмената експресия на RIP3 ($p < 0,01$). При умерената и изразена реакция преобладават пациентите с ниска експресия, докато в групата с леко изразена имунна реакция преобладават случаите с висока експресия на антитялото.

4.2.3. Оценка на корелацията между ядрената експресия на RIP3 и клинично-патологичните показатели

При ядрената експресия на RIP3 също бе установена сигнификантна разлика между степента на експресия на антитялото и изразеността на имунната реакция ($p < 0,05$). Пациентите с леко и силно изразена имунна реакция показват по-висока експресия, докато при тези с умерена имунна реакция преобладават лицата с ниска експресия.

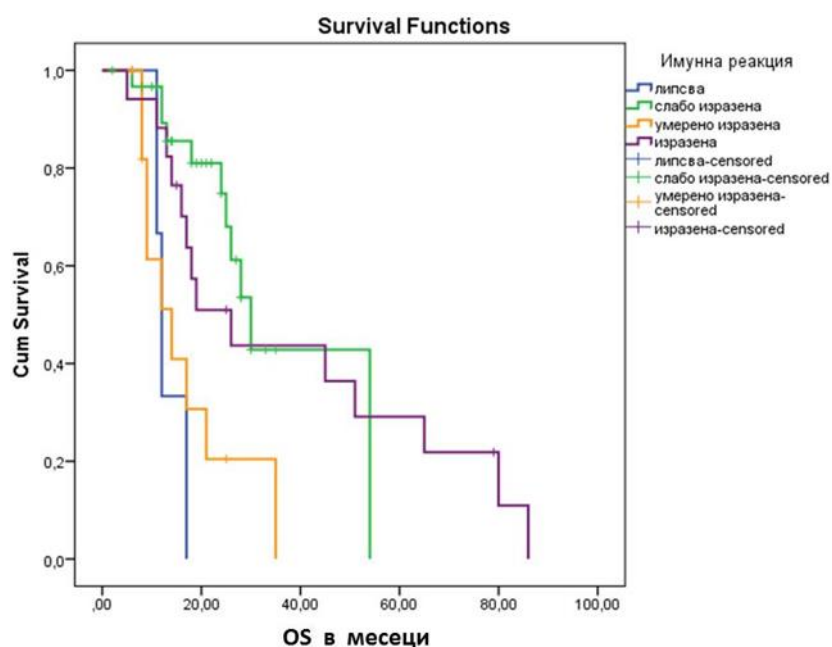
Втората съществена разлика беше установена при изследването на ядрената експресия на RIP3 и десмопластичната реакция ($p < 0,05$). Високата експресия на антитялото преобладава при пациентите с липсваща десмопластична реакция, докато при тези с леко изразена и умерена реакция по-висока честота имат лицата с ниска експресия.

4.3. Оценка на корелацията между експресията на RIP3 в туморна тъкан (определена чрез cut-off стойността) и OS във връзка с изследваните клинично-патологични показатели

4.3.1 Анализ на корелацията при ниската цитоплазмена експресия на RIP3

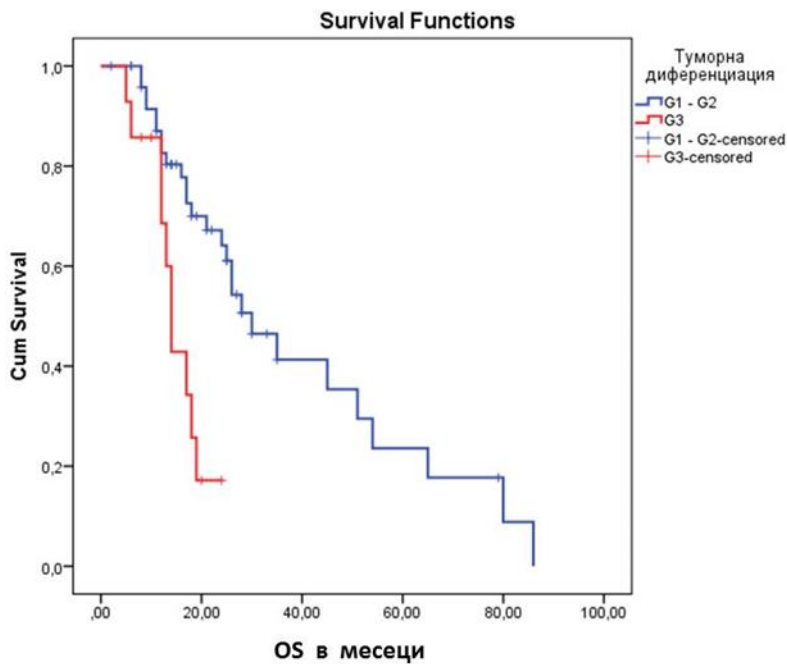
При изследване на общата преживяемост на пациентите при ниска цитоплазмена експресия на RIP3 намерихме съществена разлика в преживяемостта във връзка с имунната реакция и туморната диференциация.

Според проведенния анализ за преживяемостта, пациентите с ниска цитоплазмена експресия имат значително по-малка преживяемост, когато липсва имунна реакция (13,3 мес.), както и когато тя е умерено изразена (17 мес.). Прави впечатление, че лицата със силно изразена имунна реакция преживяват най-дълго (38,7 мес.), но висока преживяемост се установява и при пациентите със слабо изразена реакция (35,8 мес.) (long rank $p=0,001$) (фиг. 43).



Фигура 43. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост при ниска цитоплазмена експресия на RIP3 в туморна тъкан във връзка със степента на изразеност на имунната реакция

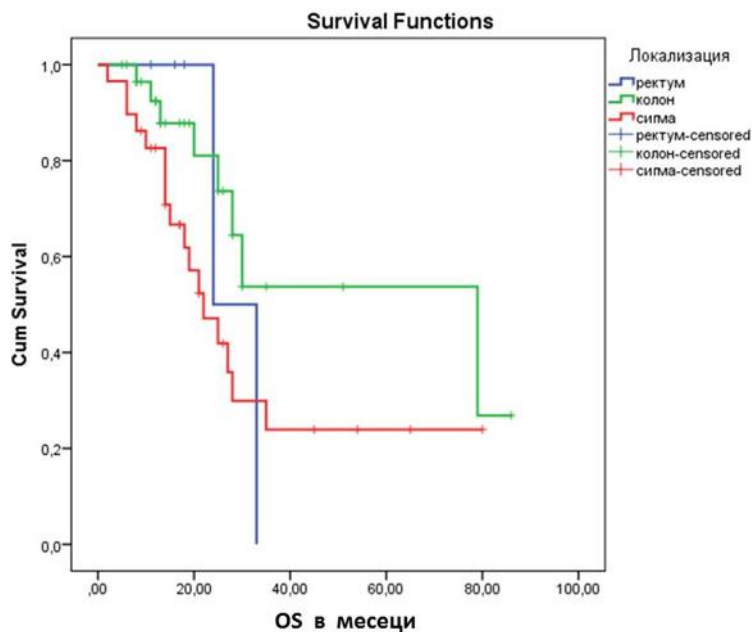
Пациентите с туморна диференциация G3 се характеризират с приблизително 2,6 пъти по-малка преживяемост (15,1 мес.), отколкото пациентите с диференциация G1 и G2 (39,1 мес.) (long rank $p=0,001$). Ниската степен на диференциация носи значително по-висок риск за по-малка преживяемост при пациентите с КРК (HR=3,48 (1,54-7,88) $p<0,01$) (фиг. 44).



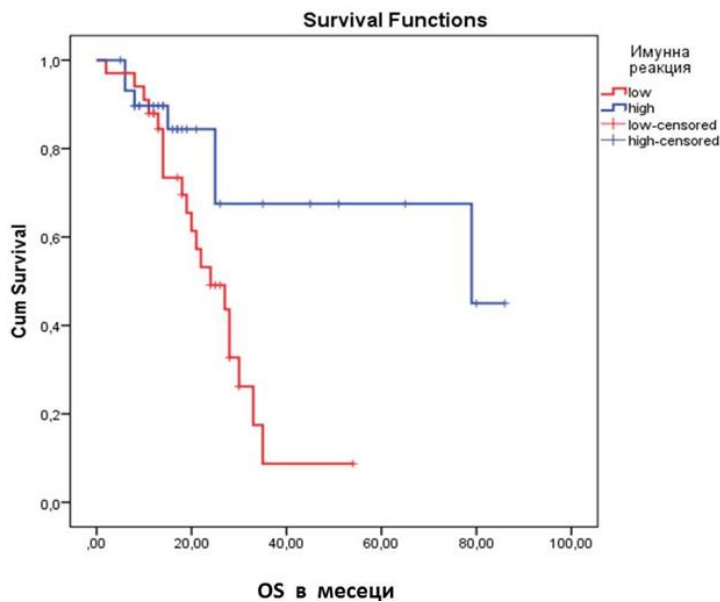
Фигура 44. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост при ниска цитоплазмена експресия на RIP3 в туморна тъкан във връзка със степента на туморна диференциация

4.3.2. Анализ на корелацията при висока цитоплазмена експресия на RIP3

При пациентите с висока цитоплазмена експресия на RIP3 най-малка преживяемост имат пациентите с локализация на тумора в ректума (28,5 мес.), следвани от тези с локализация в сигмата (33,2 мес.). Най-висока преживяемост имат пациентите с локализация на тумора в колона (54,6 мес.) (long rank $p < 0,05$) (фиг. 45).



Фигура 45. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост при висока цитоплазмена експресия на RIP3 в туморна тъкан в зависимост от локализацията



Фигура 46. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост при висока цитоплазматична експресия на RIP3 в туморна тъкан във връзка със степента на изразеност на имунната реакция

При изследването на преживяемостта в зависимост от имунната реакция и високата цитоплазматична експресия на RIP3 се установи значителна разлика (long rank $p < 0,01$). Пациентите със слабо изразена имунна реакция преживяват 2,5 пъти по-малко, отколкото пациентите с високо изразена реакция (съответно 25,1 мес. към 62,2 мес.). От друга страна, високата изразеност на имунната реакция при висока цитоплазматична експресия на антиялото оказва протективна роля спрямо общата преживяемост (HR=0,32 (0,13-0,81) $p < 0,05$) (фиг. 46).

4.3.3. Изследване на позитивната и негативна прогностична стойност на цитоплазматичната експресия на RIP3 при КРК

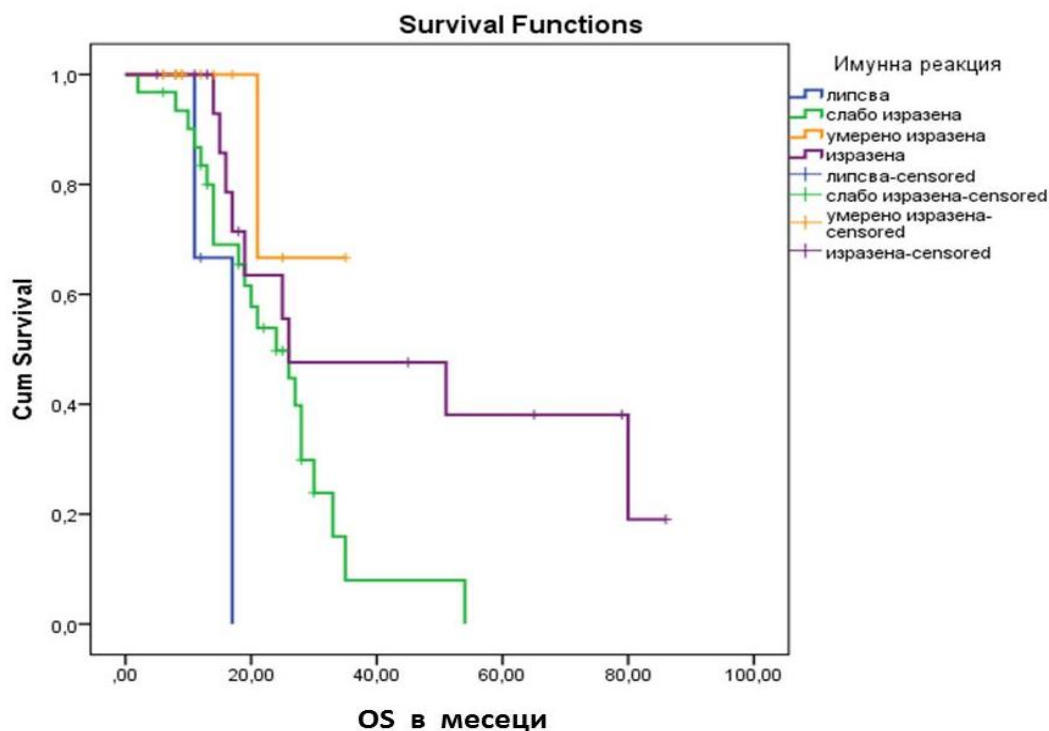
Прогностичната стойност на ниската цитоплазматична експресия на RIP3 в туморната тъкан за ниска преживяемост на пациентите с КРК е 84,10%, а високата експресия носи 75,00% вероятност за по-голяма OS.

4.3.4. Анализ на корелацията при ниската ядрена експресия на RIP3

Анализът на ниската ядрена експресия на RIP3 в туморна тъкан и OS при пациенти с КРК не показва съществена разлика при нито един от проучваните клиничко-патологични показатели.

4.3.5. Анализ на корелацията при висока ядрена експресия на RIP3

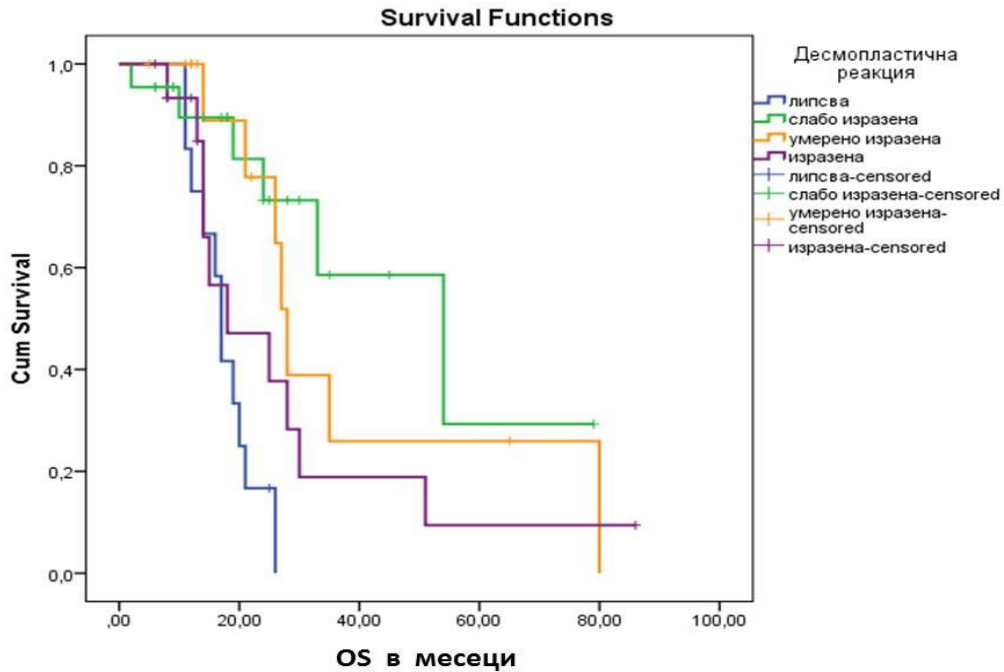
При изследване на общата преживяемост на пациентите според високата ядрена експресия на RIP3 установихме значителна разлика по отношение на имунната и десмопластичната реакция и туморната диференциация.



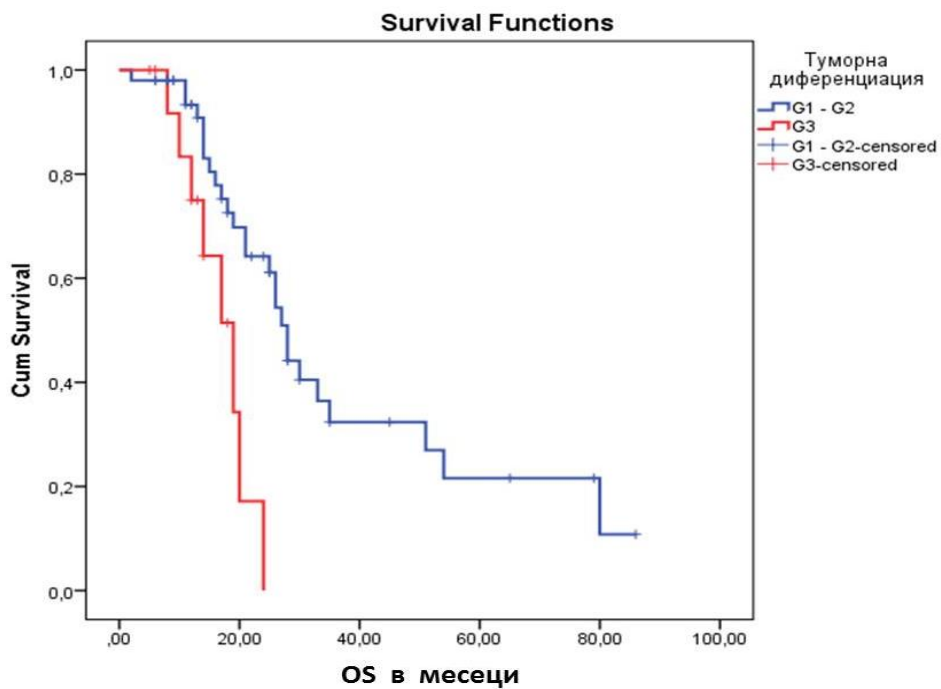
Фигура 47. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост при висока ядрена експресия на RIP3 в туморна тъкан във връзка със степента на изразеност на имунната реакция

При пациентите с висока ядрена експресия на RIP3 се наблюдава сигнификантна разлика в преживяемостта на пациентите с КРК в зависимост от степента на имунна реакция (long rank $p < 0,05$). Пациентите, при които липсва реакция, имат най-малка преживяемост (15,0 мес.), след които се нареждат тези със слабо изразена имунна реакция (24,3 мес.). Лицата с умерено изразена реакция имат средна обща преживяемост 30,3 мес., т.е. 2 пъти по-висока от пациентите без имунна реакция. С най-висока преживяемост се характеризират пациентите с изразена имунна реакция (46,5 мес.). Анализът за оценка на риска показва, че наличието на имунна реакция има протективна роля по отношение на преживяемостта на пациентите с КРК (HR=0,37 (0,17-0,83) $p < 0,05$) (фиг. 47).

Изследването на преживяемостта при висока ядрена експресия в зависимост от наличието на десмопластична реакция показва съществена разлика (long rank $p = 0,001$). При липсата на десмопластична реакция, пациентите преживяват най-малко (17,5 мес.). Интерес представлява промяната на преживяемостта във връзка с изразеността на десмопластичната реакция. Най-добра преживяемост имат пациентите със слабо изразена десмопластична реакция (47,9 мес.). При умерено изразената и изразена десмопластична реакция преживяемостта започва да намалява прогресивно (съответно 39,6 мес. и 28,1 мес.) (фиг. 48).



Фигура 48. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост при висока ядрена експресия на RIP3 в туморна тъкан във връзка със степента на изразеност на десмопластичната реакция



Фигура 49. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост при висока ядрена експресия на RIP3 в туморна тъкан във връзка със степента на туморна диференциация

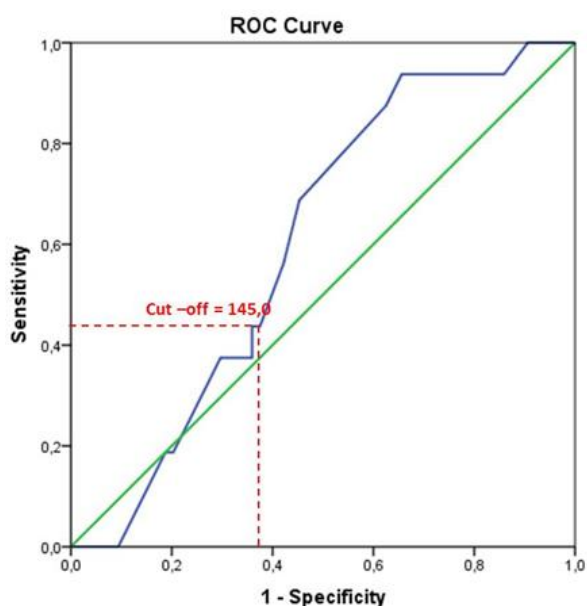
Преживяемостта на пациентите с ниска туморна диференциация при висока ядрена експресия на RIP3 се различава сигнификантно спрямо тази при пациентите с диференциация G1 и G2 (съответно 16,9 мес. към 38,2 мес.) (long rank $p=0,002$). Ниската туморна диференциация носи висок риск за ниска преживяемост при висока ядрена експресия на анти тялото (HR=3,59 (1,47-8,80) $p<0,01$) (фиг. 49).

4.3.6. Изследване на позитивната и негативна прогностична стойност на ядрената експресия на RIP3 при КРК

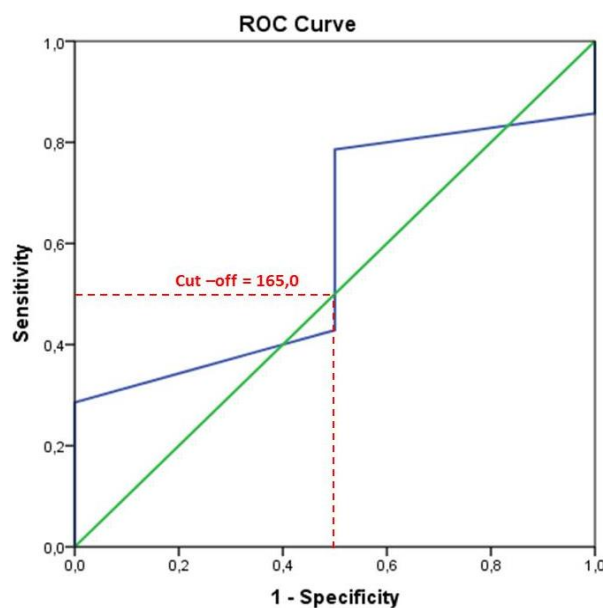
Анализът на позитивната и негативна прогностична стойност на експресия на RIP3 при КРК показва, че при висока ядрена експресия на RIP3 има 85% вероятност за ниска OS, докато при ниска ядрена експресия има 75% вероятност за по-висока преживяемост при пациенти с КРК.

4.4. Оценка на корелацията между експресията на RIP3 (определена според cut-off стойността) в туморната и околната тъкан при пациенти с КРК.

На фиг. 50 и фиг. 51 са представени cut-off стойностите на цитоплазмената RIP3 експресия в туморна и съседната нетуморна тъкан. Резултатите показват, че има разлика в стойностите, но тя не е сигнификантна при пациентите с КРК.



Фигура 50. ROC curve анализ и определяне на cut-off за цитоплазмена експресия на RIP3 в туморна тъкан (AUC=0,604 (0,471–0,736) $p<0,05$)



Фигура 51. ROC curve анализ и определяне на cut-off за цитоплазмена експресия на RIP3 в нетуморната тъкан (AUC=0,589 (0,322–0,856) $p<0,05$)

4.5. Обобщение на данните относно експресията на RIP3 в туморната тъкан:

Получените от нас резултати показват, че високата средна цитоплазмена експресия на маркера за некроптоза - RIP3 е асоциирана предимно с експанзивен туморен растеж. При човешки *in vitro* колоректални карциномни клетки, Feng et al. (2015) установяват, че свръхекспресията на RIP3 инхибира туморната пролиферация, миграция и инвазия. Според нас, нивото на некроптоза може поне отчасти да определи начина на туморния растеж: предимно инфилтративен или предимно инвазивен растеж.

Ние установихме, че високото ниво на цитоплазмения RIP3 в туморната тъкан е свързано със слабо изразена имунна реакция. Идеята, че клетъчната смърт може да предшества, да предизвиква или да усилва имунитета, придобива все по-голямо значение. Подобно на апоптотичните клетки, туморни клетки в състояние на некроптоза могат да индуцират антитуморен имунитет (Meng M et al., 2016). Те могат да бъдат елиминирани от клетките на вродения (имунна реакция) или придобит имунитет (TILs) и да бъдат фагирани от макрофаги, дендритни клетки и неутрофили, които освобождават провъзпалителни цитокини и хемокини.

Данните, относно ролята на имунната реакция в туморната тъкан са твърде противоречиви. Според някои автори, бързото и масивно освобождаване на молекули, свързани с клетъчното увреждане (например IL-1, нуклеинови киселини, рибонуклеопротеини, хистонови белтъци, членове на семейството на HMGB, топлинно-шокови протеини) на туморни клетки, претърпели некроптоза, може да индуцира силен възпалителен отговор срещу КРК и да инхибира туморния растеж (Su Z et al., 2016; Pasparakis M et al., 2015). Според други изследвания, възпалителната микросреда в туморната тъкан може да стимулира туморния растеж чрез индуциране на ангиогенеза, метастазирание, намаляване на адаптивния имуен отговор и повишаване на лекарствената резистентност (Mantovani A et al., 2008). Това поставя въпроса дали индуцираната в резултат на проведеното лечение некроптоза и последвалата я възпалителна реакция имат протективна или стимулираща роля при злокачествени заболявания. Известно е, че некроптозата участва в патогенезата при редица възпалителни заболявания, като IBD (inflammatory bowel disease), възпалителни заболявания на кожата и др. (Pasparakis M et al., 2015).

Данните от настоящото проучване показват, че цитоплазмената експресия на RIP3 в туморната тъкан инхибира имунната реакция. Анализирайки ядрената експресия на RIP3 се установи, че високата експресия корелира със силно изразена имунна реакция. Според нас, локализираният в ядрото RIP3 активира вродения имунитет, докато цитоплазменият RIP3 има точно обратен ефект – инхибира имунната реакция. Освен върху стромната реакция, високото ядрено ниво на RIP3 влияе и на десмопластичните процеси в туморната строма, като ги потиска.

Комплексната оценка на цитоплазмената експресия на RIP3 върху OS във връзка с клинично-морфологичните параметри установи, че високата цитоплазмена експресия на RIP3 се съчетава със слабо изразена имунна реакция и ниска степен на

диференциация и води до ниска преживяемост на пациентите с КРК. Получените от нас резултати се различават от данните на Feng et al. (2015), според които високата експресия инхибира туморния растеж. Ние, подобно на други автори (Su Z et al., 2016; Pasparakis M et al., 2015) считаме, че имунната реакция има протективна роля по отношение на туморния растеж. Според нас, слабата имунна реакция влияе негативно върху OS. Считаме, че не само процесът на некроптоза и имунната реакция, но и други клиничко-морфологични параметри, свързани с тумора влияят на OS.

5. Сравнителен анализ между експресията на Beclin-1 и RIP3 в туморна тъкан на пациенти с КРК

За да анализираме връзката между автофагията и некроптозата в туморната тъкан на пациенти с КРК, групирахме пациентите в четири групи в зависимост от cut-off стойността на двете антитела - като ниска и висока:

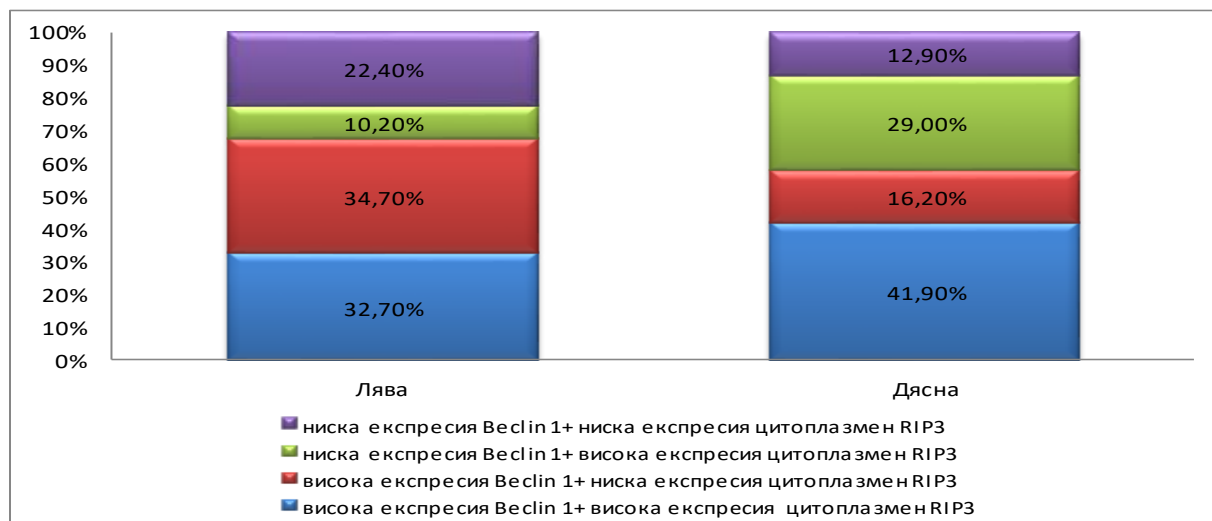
- 1) Пациенти с висока експресия на Beclin-1 и висока експресия на RIP3 (↑Beclin1+↑RIP3)
- 2) Пациенти с висока експресия на Beclin-1 и ниска експресия на RIP3 (↑Beclin1+↓RIP3)
- 3) Пациенти с ниска експресия на Beclin-1 и висока експресия на RIP3 (↓Beclin1+↑RIP3)
- 4) Пациенти с ниска експресия на Beclin-1 и ниска експресия на RIP3 (↓Beclin-1+↓RIP3)

На фиг. 52 са представени резултатите от сравнителния анализ между експресията на изследваните антитела и изхода от заболяването при пациенти с КРК. Резултатите показват наличие на сигнификантна разлика между преживелите и починали пациенти в зависимост от експресията на двата маркера ($p < 0,05$).



Фигура 52. Изход от заболяването според експресията на Beclin-1 и цитоплазмен RIP3

Резултатите при живите пациенти показват, че най-висок относителен дял имат пациентите с противоположна експресия на двете антитела (съответно 50% и 25%). От друга страна, при починалите пациенти прави впечатление, че висок относителен дял имат лицата с висока експресия едновременно на двете антитела (40,60%).



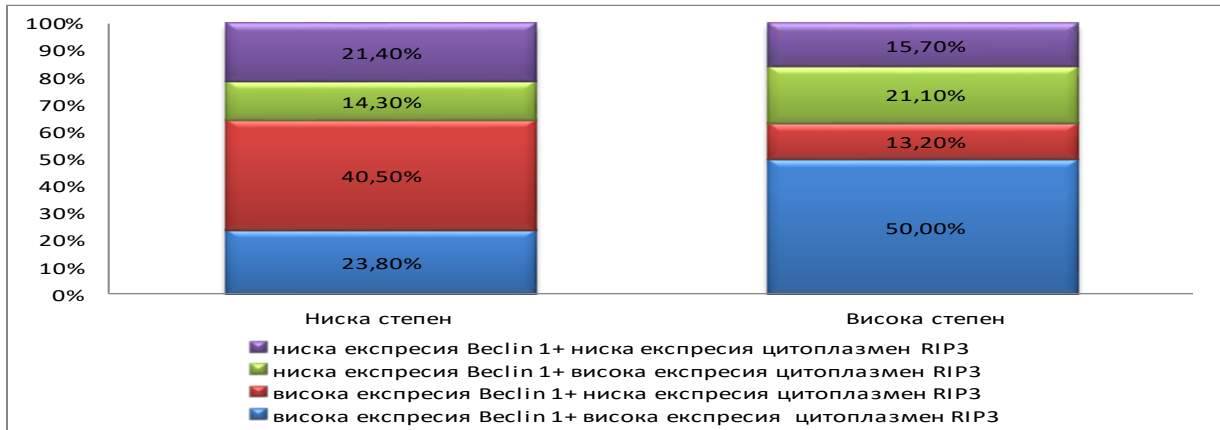
Фигура 53. Локализация на КРК и експресия на Beclin-1 и цитоплазмен RIP3

На фиг. 53 е представен сравнителния анализ на експресията на Beclin-1 и цитоплазмения RIP3, според локализацията на КРК. Резултатите показват съществена разлика в локализацията според експресията на антителата ($p < 0,05$). При висока експресия на Beclin-1, независимо от експресията на цитоплазмения RIP3, пациентите с КРК имат предимно левостранна локализация на тумора (32,7% и 34,70%), докато при пациентите с висока експресия на цитоплазмения RIP3, независимо от експресията на Beclin-1 преобладава десностранната локализация на тумора (41,90% и 29%). Прави впечатление, че високата експресия едновременно на двете антитела по-често се среща при пациентите с десностранна локализация на КРК.

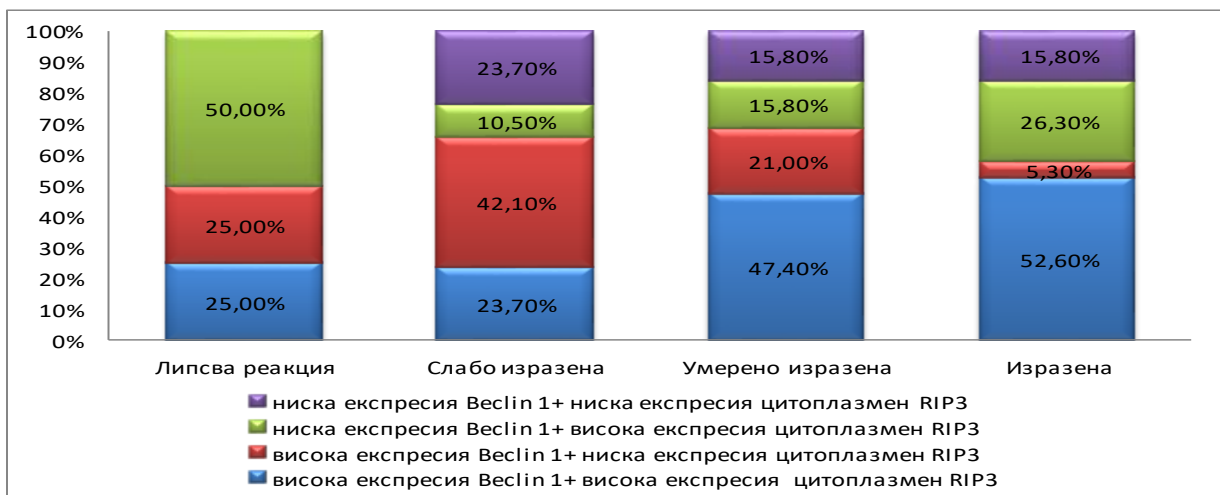
Съществена разлика в експресията на антителата бе установена по отношение на ниската и висока степен на имунна реакция ($p < 0,05$). При пациентите с ниска имунна реакция преобладава относителният дял на лицата с висока експресия на Beclin-1 и ниска цитоплазмена експресия на RIP3 (40,50%). При високата степен на имунна реакция, половината от пациентите са с изразена висока експресия едновременно на двете антитела (50,0%) (фиг. 54).

От направения сравнителен анализ между експресията на Beclin-1 и цитоплазмен RIP3 в зависимост от степента на изразеност на имунната реакция намерихме значима разлика ($p < 0,05$). Резултатите показват, че при 50% от изследваните лица, при които липсва имунна реакция, се наблюдава ниска експресия на Beclin-1 и висока експресия на цитоплазмен RIP3. От друга страна, при слабо изразената имунна реакция преобладават пациентите с висока експресия на Beclin-1 и ниска експресия на цитоплазмен RIP3. В групата на пациентите с умерена и изразена

имунна реакция преобладават лицата с висока експресия на двете антитела (съответно 47,40 % за групата на умерената имунна реакция и 52,60% за лицата с изразена имунна реакция) (фиг. 55).

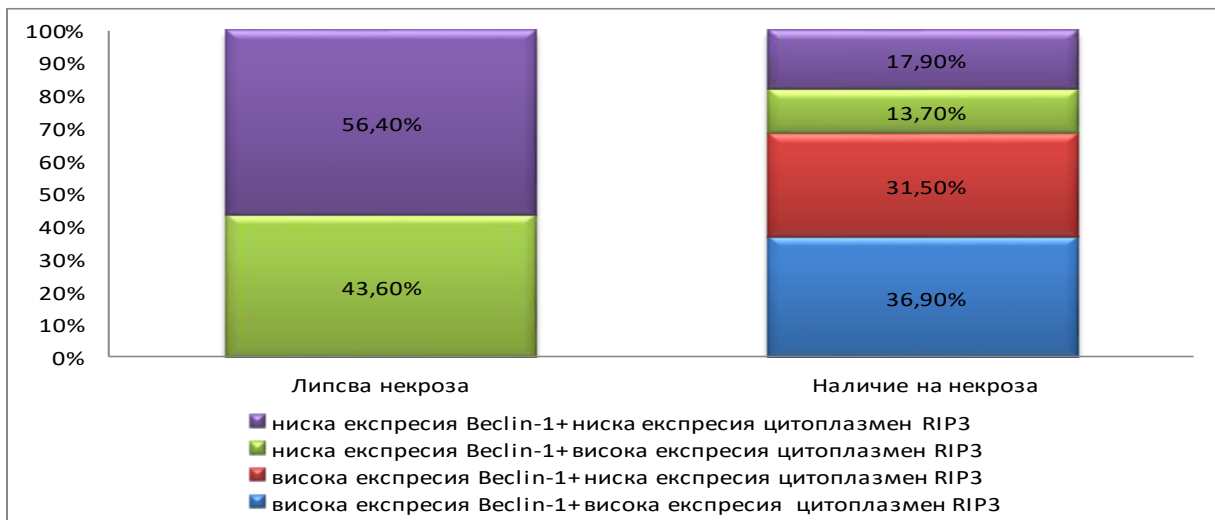


Фигура 54. Степен на изразеност (ниска степен-low grade/висока степен-high grade) на имунната реакция и експресия на Beclin-1 и цитоплазмен RIP3



Фигура 55. Степен на изразеност на имунната реакция и експресия на Beclin-1 и цитоплазмен RIP3

На фиг. 56 е показан сравнителният анализ на пациентите без и с некрози в зависимост от експресията на двете антитела. Резултатите показват наличието на статистически значима разлика между показателите ($p=0,005$). Липсата на некрози е характерна предимно за пациенти с ниска експресия на Beclin-1, а най-висок относителен дял се наблюдава при пациентите с ниска експресия едновременно на двете антитела (56,40%).

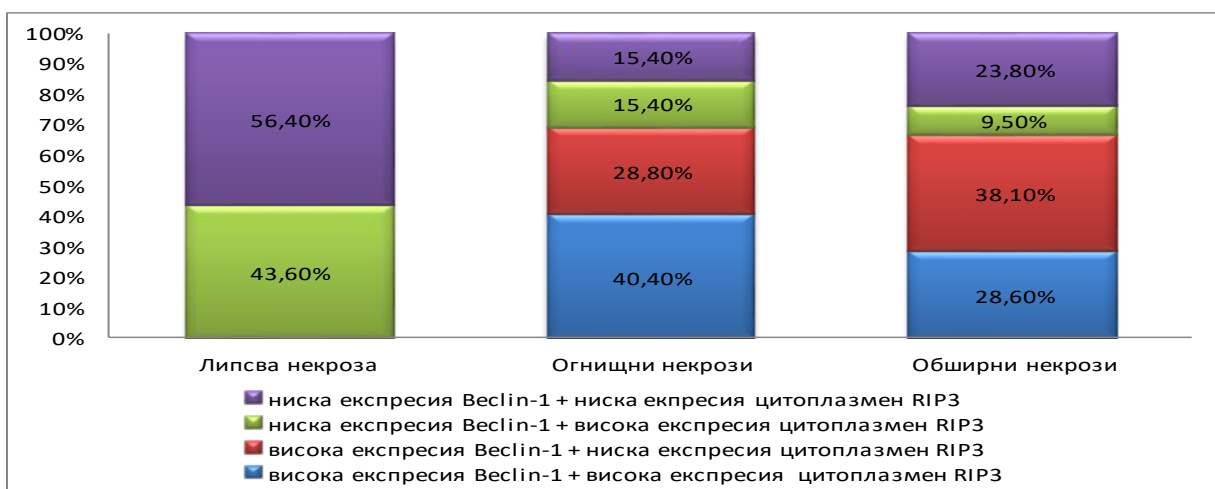


Фигура 56. Некроза и експресия на Beclin-1 и цитоплазмен RIP3

Ние установихме, че некрозите са характерни за пациенти с висока експресия на Beclin-1, като най-висок относителен дял имат пациентите с висока експресия едновременно на двете антитела (36,90%).

Между експресията на антителата и появата на некрози бе установена умерена зависимост ($r=0,361$, $p=0,001$). Колкото по-висока е експресията на антителата, толкова появата на некроза е по-изразена. В настоящето изследване при 13,0% от случаите с висока експресия на антителата се установява и присъствие на некрози.

На фиг. 57 е представен сравнителният анализ между площта на некрозите и експресията на антителата. Резултатите показват, че има съществена разлика между площта на некрозите и експресията на антителата ($p<0,05$). В групата от пациенти с огнищни некрози най-висок относителен дял имат лицата с висока експресия на двете антитела (40,40%), докато в групата с обширни некрози преобладават лицата с висока експресия на Beclin-1 и ниска експресия на цитоплазмен RIP3 (38,10%).



Фигура 57. Видове некроза и експресия на Beclin-1 и цитоплазмен RIP3

На фигура 58 е представена съдовата инвазия в зависимост от експресията на двете антитела. Резултатите показват, че при липса на съдова инвазия преобладават пациенти с ниска експресия на *Veclin-1* и висока експресия на цитоплазмен RIP3 (32,00%). От друга страна, липса на съдова инвазия се установява и при ниска експресия на *Veclin-1*, независимо от експресията на цитоплазмен RIP3 (60,00%), а при 72,70% от пациентите със съдова инвазия се наблюдава висока експресия на *Veclin-1* ($p < 0,05$).

В групата пациенти със съдова инвазия преобладават тези с висока експресия на двете антитела (41,80%), следвани от пациентите с висока експресия на *Veclin-1* и ниска експресия на цитоплазмен RIP3 (30,90%).



Фигура 58. Съдова инвазия и експресия на *Veclin-1* и цитоплазмен RIP3

Установена бе слаба, клоняща към умерена зависимост между наличието на съдова инвазия и експресията на антителата ($r = 0,289$ $p = 0,009$). При 8,40% от случаите на съдова инвазия се наблюдава и висока експресия и на двете антитела.

Таблица 18. Унивариантен анализ за оценка на риска за преживяемостта

	Собствено проучване, 2017 (n=64)		X. Feng et al., 2015 (n=112)	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Възраст	4,75 (0,597-37,786)	< 0,01	1,64 (0,57-2,74)	0,52
Пол	1,48 (0,305-7,196)	0,48	1,22 (0,75-2,57)	0,69
Локализация	1,55 (0,320-7,566)	0,45	1,03 (0,96-1,43)	0,71
T стадий	1,40 (0,470-4,174)	0,037	1,98 (1,02-3,64)	0,025
N стадий	1,21 (0,641-2,276)	0,397	5,92 (3,92-10,33)	< 0,001
Съдова инвазия	1,54 (0,641-3,717)	0,023	13,82 (4,27-52,44)	< 0,001
Диференциация	8,13 (1,195-55,311)	0,001	3,84 (2,40-6,23)	< 0,001
Експресия на RIP3	3,65 (0,452-29,468)	0,018	2,02 (1,31-5,94)	< 0,001

На базата на извършения унивариантен Cox регресионен анализ в настоящето изследване се установи, че OS е свързана с възрастта, T-стадия, съдовата инвазия, диференциацията и експресията на RIP3 в настоящето изследване (табл. 18).

Някои от нашите резултати са в съответствие с тези на X. Feng et al. (2015), които намират, че OS се асоциира с T стадий, N стадий, съдовата инвазия, туморната диференциация и експресията на RIP3.

Резултатите на HR в нашето изследване показват, че най-висок риск за по-ниска преживяемост в нашето изследване носи туморната диференциация (HR=8,13 (1,195-55,311)), докато при другото изследване носи съдовата инвазия (HR=13,82 (4,27-52,44)).

Другата съществена разлика между двете проучвания се отнася за N – стадия. При настоящето проучване в българската извадка N-стадия не се доказва като рисков фактор за общата преживяемост при пациентите с КРК. Според изследването на X. Feng et al., в китайската извадка N-стадия се характеризира с висок риск за OS при пациентите с КРК. Получените от нас резултати показват, че възрастовият показател е рисков фактор за OS, находка която не е установена от X. Feng et al. (2015). Според авторите, възрастта не носи риск за OS.

Сравнявайки данните от двете изследвания, прави впечатление, че с изключение на съдовата инвазия и T-стадия, където коефициентът е значително по-висок в проучването на X. Feng et al.(2015), при всички други рискови фактори преобладава високият коефициент в българската извадка. Получените от нас резултати показват, че силата на рисковите фактори за OS при пациентите с КРК е различна и зависи от националността на изследваната популация.

Заклучение

На базата на комплексния анализ на експресията на Beclin-1 и RIP3 и влиянието им върху общата преживяемост във връзка с клинично-патологичните показатели определихме рисковия профил на пациентите с КРК. Пациентите с повишен риск за ниска преживяемост (под 24 мес.) имат следните клинично-морфологични и имунохистохимични характеристики:

- Възраст > 60 г.
- Локализация – в лявата половина на колона
- Туморен растеж – предимно инфилтративен
- Иmunна реакция – слабо изразена
- Десмопластична реакция – слабо изразена
- Присъствие на tumor budding
- Присъствие на съдова инвазия
- Експресия на Beclin-1 – висока, над cut-off стойност 5,25
- Експресия на цитоплазмен RIP3 – ниска, под cut-off стойност 145,0

Връзката между автофагията, некроптозата и апоптозата на този етап на научните изследвания изглежда доста сложна и противоречива. Изследванията са относително малко на брой, поради което са необходими по-голям брой проучвания с цел изясняване на точните молекулни механизми на взаимодействие между различните видове клетъчна смърт и тяхната роля в неопластичния процес. Това би предоставило информация за изграждане на по-добри терапевтични стратегии за лечение на пациентите със злокачествени заболявания и в частност на тези с КРК. Едновременно с разработването на новите терапевтични схеми е необходимо да се определят ясно клинично-морфологичните прогностични маркери, скалите им за оценяване и влиянието им върху формите на клетъчна смърт.

Изводи

- 1) **Рисковите фактори за общата преживяемост** на пациентите с КРК са: възрастта, Т-стадия, съдовата инвазия и степента на туморна диференциация.
- 2) **Експресията на Beclin-1** е висока при пациенти на възраст над 65 г., при наличие на некрози и съдова инвазия в туморната тъкан, и KRAS мутация.
 - **Високото ниво на автофагия** се свързва с липсваща имунна и десмопластична реакция в туморната тъкан, ниска общата преживяемост на пациентите – под 2 г. Силно изразената имунна реакция има протективна роля и увеличава преживяемостта при пациенти с КРК.
 - **Ниското ниво на автофагия** се асоциира с ниска степен на диференциация на тумора, с имунна и десмопластична реакция, независимо от степента на тяхната изразеност и с поява на туморни емболи. При ниска експресия на Beclin-1 присъствието на некрози и ниската степен на диференциация на тумора носят висок риск за ниска OS.
 - **Ниската и висока експресия** на Beclin-1 (маркер за автофагия) може да е асоциирана с по-добра или с по-лоша прогноза, която зависи не само от експресията на антиялото, но и от морфологичните промени в туморната тъкан. Експресията на Beclin-1 трябва да бъде оценявана в съчетание с клинично-морфологичните параметри.
- 3) **Цитоплазмената експресия на RIP3** се асоциира с туморния растеж и имунната реакция, а **ядрената експресия** с имунната и десмопластичната реакция.
 - **Високо ниво на цитоплазмена експресия на RIP3** има при експанзивен туморен растеж, слабо изразена имунна реакция и ниска степен на диференциация на тумора и те водят до ниска преживяемост на пациентите с КРК.
 - **Ядрената експресия на RIP3** е висока при силно изразена имунна реакция и липсваща десмопластична строма.
 - **Общата преживяемост** е ниска при висока цитоплазмена RIP3 експресия, съчетана със слабо изразена имунна реакция и ниска степен на диференциация
- 4) **Високата експресия на Beclin-1** в туморна тъкан прогнозира 84,10% вероятност пациентите с КРК да преживеят по-малко. Ниската цитоплазмена и високата ядрена експресия на RIP3 са прогностични маркери за ниска преживяемост на пациенти с КРК (съответно 84,10% и 85%).
- 5) **Високата цитоплазмена експресия** на двата маркера за автофагия и некроптоза се свързва с десностранна локализация на тумора, присъствие на огнищни некрози, висока степен на изразеност на имунната реакция, съдова инвазия и висока смъртност.
- 6) **Профилът на пациентите с КРК** се различава в зависимост от нивото на изразеност на автофагията и некроптозата и показва зависимост от клинично-морфологичните параметри:

- **При живите пациенти** преобладава изразената автофагия, съчетана със слабо изразена некроптоза. Този профил е характерен за КРК, локализирани в лявата половина на колона, с обширни некрози в туморната тъкан и със слабо изразена имунната реакция.
- **При починалите пациенти** автофагията и некроптозата са силно изразени; туморите са локализирани предимно в дясната половина на колона, присъстват огнищни некрози и съдова инвазия, а имунната реакция е силно изразена.
- При **ниско** ниво на **автофагия** и **високо** на **некроптоза** в КРК липсват некрози, имунна реакция и съдова инвазия.

Приноси

Научни приноси с оригинален характер:

- Осъществена е комплексна клиничко-морфологична, молекулно-генетична и имунохистохимична характеристика на автофагията и некроптозата при пациенти с КРК.
- Извършен е анализ на имунохистохимичната експресия на Beclin-1 и RIP3 с оглед изясняване на връзката на автофагията и некроптозата с клиничко-морфологичните параметри посредством няколко скали за оценка.

Научни приноси с практическо-приложен характер:

- За първи път у нас е определена потенциалната прогностична стойност на високата експресия на Beclin-1 за ниска обща преживяемост при пациенти с колоректален карцином.
- За първи път е оценена потенциалната прогностична стойност на ниската цитоплазмена и високата ядрена експресия на RIP3, маркер за некроптоза, за ниската обща преживяемост при пациенти с КРК.
- Едновременно е анализирана експресията на автофагията и некроптозата във връзка с клиничко-патологичните показатели и общата преживяемост при пациенти с КРК.
- Определен е профилът на пациентите с повишен риск за смърт от КРК на базата на клиничко-морфологичните характеристики, имунохистохимичната експресия на Beclin-1 и RIP3, маркери за автофагия и некроптоза.

Публикации, свързани с дисертационния труд

1. **Н. Стефанова**, М. Цанева, А. Хачмериян, И. Донеv. Автофагия – молекулни механизми и ролята ѝ в неопластичния процес. Варненски медицински форум, т. 6, бр.2, 2017, стр. 99-106
2. **Н. Стефанова**, М. Цанева, К. Калчев, М. Богданова, И. Донеv. Некроптоза – молекулярни механизми и ролята ѝ при злокачествени тумори. Варненски медицински форум, т.6, бр.2, 2017, стр.107-113
3. Eleonora G. Dimitrova, Borislav G. Chaushev, Nikolay V. Conev, Javor K. Kashlov, Aleksandar K. Zlatarov, Dilyan P. Petrov, Hristo B. Popov, **Nadezhda T. Stefanova**, Anelia D. Klisarova, Kameliya Z. Bratoeva, Ivan S. Donev. Role of pretreatment F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography maximal standardized uptake value in predicting outcomes of colon liver metastases and that values association with Beclin-1 expression, Bioscience Trends.Vol.11(2017)№2, p.221-228 DOI:10.5582/bst.2016.02105

С БЛАГОДАРНОСТ

- *На научния ми ръководител доц. д-р Мария Цанева д.м., за ценните идеи, напътствията и помощта*
- *На доц. д-р Иван Щерев Донеv д.м., ръководител на Клиника по медицинска онкология, благодаря за предложената идея за тема, информацията и помощта, която ми оказа*
- *На колегите ми лекари и лаборанти от Клиниката по обща и клинична патология, които ми съдействаха при изготвянето на препаратите*
- *На доц. д-р Петър Генеv д.м., ръководител на Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология, който ме спечели за патологията още в студентските години*
- *На доц. д-р Екатерина Софтова д.м, на която дължа дълбока благодарност за знанията и подкрепата, която винаги съм получавала*
- *На г-жа Валентина Великова за помощта при обработката на данните*
- *На семейството ми, за разбирането, подкрепата и обичта*