



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“-ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ОБЩА КЛИНИЧНА ПАТОЛОГИЯ, СЪДЕБНА
МЕДИЦИНА И ДЕОНТОЛОГИЯ**

д-р Христо Бойчев Попов

**ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ
МОРФОЛОГИЧНИ ФАКТОРИ ПРИ УРОТЕЛЕН
КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“,
научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“.

Шифър 03.01.03

Научен ръководител: проф. д-р Петър Иванов Генов, д. м.

Варна

Настоящият дисертационен труд е разработен в Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Медицинския факултет на Медицинския университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна.

Дисертационният труд съдържа 119 машинописни страници и е онагледен с 22 таблици и 31 цветни фигури. Списъкът на цитираната литература включва 256 заглавия, от които 1 на кирилица и 255 на латиница.

Състав на научно жури:

Външни членове:

доц. д-р Екатерина Боянова Софтова-Златарова, д. м.
доц. д-р Веселин Тодоров Беловеждов д.м.
проф. д-р Радина Стефанова Иванова-Боянова, д.м.н.

Вътрешни членове:

проф. д-р Петър Иванов Генов, д.м.
проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д. м.

Резервен външен член:

доц. д-р Илия Петров Биволарски, д.м.

Резервен вътрешен член:

доц. д-р Вилиам Викторов Доков, д.м.

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицински университет ”Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна и са на разположение в Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Медицински университет ”Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 07.08.2020 год. от 15:00 часа на открито заседание на Научното жури.

СЪДЪРЖАНИЕ:

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	10
2.1 ЦЕЛ	10
2.2 ЗАДАЧИ	10
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО	11
3.1 МАТЕРИАЛИ, ИЗПОЛЗВАНИ В ИЗСЛЕДВАНЕТО	11
3.1.1 МАТЕРИАЛНА БАЗА ЗА РЕАЛИЗИРАНЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	11
3.1.2 СУБЕКТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО	11
3.2 МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО	12
3.2.1 ХИСТОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ	12
3.2.2 ХИСТОХИМИЧНА ОЦЕНКА НА ТУМОР-АСОЦИИРАНИТЕ ТЪКАНИ МАСТОЦИТИ (ТАТМ)	14
3.3 ИМУНОХИСТОХИМИЧНИ МЕТОДИ	15
3.3.3 МЕТОДИ ЗА ОТЧИТАНЕ НА ИМУНОХИСТОХИМИЧНАТА ЕКСПРЕСИЯ	16
3.4 СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ	18
IV. РЕЗУЛТАТИ	20
4.1 КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПАЦИЕНТИТЕ С УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР	20
4.1.1 РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ С УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР ПО ВЪЗРАСТ	20
4.1.2 РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ С УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР ПО ПОЛ	20
4.1.3 РТ СТАДИЙ НА УРОТЕЛНИЯ КАРЦИНОМ – ИНВАЗИЯ В СТЕНАТА	21
4.1.4 СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА УРОТЕЛНИЯ КАРЦИНОМ – GRADE (G)	23
4.2 КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТИ С РЕЦИДИВИРАЩ И НЕРЕЦИДИВИРАЩ УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР	27
4.2.1 ВЪЗРАСТ НА ПАЦИЕНТИТЕ С РЕЦИДИВИРАЩ И НЕРЕЦИДИВИРАЩ УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ	27
4.2.2 ПОЛ НА ПАЦИЕНТИТЕ С РЕЦИДИВИРАЩ И НЕРЕЦИДИВИРАЩ УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ	28

4.2.3 РТ-СТАДИЙ (STAGE) ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С РЕЦИДИВИРАЩ И НЕРЕЦИДИВИРАЩ УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ	29
4.2.4 СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ (GRADE) ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С РЕЦИДИВИРАЩ И НЕРЕЦИДИВИРАЩ УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ	31
4.2.5 АНАЛИЗ МЕЖДУ ПРОМЕНЛИВИТЕ „ВЪЗРАСТ“ И „СТАДИЙ/РТ“	33
4.2.6 АНАЛИЗ МЕЖДУ ПРОМЕНЛИВИТЕ „ВЪЗРАСТ“ И „ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ“	34
4.2.7 АНАЛИЗ МЕЖДУ ПРОМЕНЛИВИТЕ „СТАДИЙ“ И „ПОЛ“	35
4.2.8 АНАЛИЗ МЕЖДУ ПРОМЕНЛИВИТЕ „ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ“ И „ПОЛ“	36
4.2.9 АНАЛИЗ МЕЖДУ ПРОМЕНЛИВИТЕ „СТАДИЙ“ И „ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ“	37
4.2.10 РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ПАЦИЕНТИТЕ ПО КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ И МЕСЕЦИТЕ ДО НАСТЪПВАНЕ НА РЕЦИДИВ	38
4.3 АНАЛИЗ И ОЦЕНКА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ, ПРОИЗЛИЗАЩИ ОТ ТУМОРНАТА СТРОМА	39
4.3.1 ТУМОР-АСОЦИИРАНА ТЪКАННА ЕОЗИНОФИЛИЯ - ТАТЕ	39
4.3.2 ТУМОР-АСОЦИИРАНИ ТЪКАННИ МАСТОЦИТИ – ТАТМ	44
4.3.3 ФИБРОБЛАСТЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР 2 - FGF2	49
4.3.4 АНАЛИЗ И ОЦЕНКА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ, ПРОИЗЛИЗАЩИ ОТ ТУМОРНАТА СТРОМА	52
4.3.4.1 GATA 3	52
4.3.4.2 СУТОКЕРАТИН 20 - CK20	55
4.3.4.3 GLYCOPROTEIN 130 - GP130	57
V. ОБСЪЖДАНЕ	60
VI. ИЗВОДИ	72
VII. ПРИНОСИ	73
VIII. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	74

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

На латиница:

CD10 – Cluster of differentiation 10

CK20 – цитокератин 20

DAB – диаминобензидин

FGF – фибробластен растежен фактор

FGF2 – фибробластен растежен фактор 2

FGFR3 – рецептор за фибробластен растежен фактор 3

GATA3 – гуанин-аденин-тимин-аденин 3 нуклеотидна последователност

gp130 – гликопротеин 130

HRP – horseradish peroxidase

ISUP – the International Society of Urological Pathologists

ROC Curve – receiver operating characteristic

TATE – тумор-асоциирани тъканни еозинофили

TATM – тумор-асоциирани тъканни мастоцити

WHO – World Health Organization

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Злокачествените тумори са заболявания, които със своята характеристика и биологично поведение, включително и неблагоприятен завършек на болестта, представляват сериозен социално–икономически и психологически проблем не само в медицината, но и за значителна част от населението в света и у нас. Независимо от това, през последните години се наблюдава тенденция към намаляване на леталитета при пациенти, засегнати от определен туморен вид, благодарение на подобрените диагностика и лечение. Леталният изход най-често е свързан с рецидив или туморни метастази.

Карциномът на пикочния мехур е изключително коварно неопластично заболяване, протичащо дълго без оплаквания. Сред хетерогенната група на злокачествените тумори той е деветият най-често срещан рак в света.

Над 90-95% от всички тумори на пикочния мехур са с уротелен произход, като той е доминиращият хистологичен тип при този вид карциноми сред населението в Северна Америка, Северна Африка и Западна Европа. През последните 10-15 години честотата на уротелния карцином в световен мащаб непрекъснато нараства, като най-уязвими са мъже със светъл цвят на кожата и индивиди във възрастовата група 65-80 години. По данни на Националния онкологичен институт в България се наблюдава тенденция за нарастване на заболяемостта от уротелен карцином, като през 2015 год. от общата онкологична заболяемост 8,2% са мъжете и 2,7% при жените.

С диагностична цел и на базата на определените задължителни морфологични прогностични и предиктивни параметри все по-често вниманието е насочено към търсене на нови маркери, участващи в процеса на ангиогенеза, клетъчна пролиферация и диференциация, които биха могли да помогнат при разгадаването на туморната биология. Тези маркери са обект на интерес при различните типове карциноми, включително и на

уротелния карцином, който, макар в ранните стадии от развитието си да протича благоприятно, крие риск от развитие на рецидиви и прогресия. Смята се, че определянето и прилагането на маркери за прогнозиране на биологичното поведение на тумора в ранните стадии от неговото развитие, когато все още не са настъпили рецидиви, съчетани с приложено адекватно лечение, могат да увеличат шансовете за благоприятен изход.

Идентифицирането и използването в практиката на по-прецизни молекулярни маркери при уротелния карцином, в комбинация с морфологичните характеристики на тумора и стадирането на раковия процес, дава възможност за прецизиране на диагнозата и по възможност определяне на прогнозата при болните. В някои случаи се налага прилагането на маркери, използвани по принцип при тумори с различна от тази на изследвания тумор хистогенеза. Те биха могли да послужат като предиктори на заболяването.

Такива маркери, като например CK20, GATA3, FGF2 и gp130, са изследвани в настоящия дисертационен труд.

Около 70-80% от всички новодиагностицирани уротелни карциноми, определени като неинвазираци мускулатурата, често, въпреки слабата агресия, дават рецидив или прогресия към инвазивен растеж. В същото време 20-30% от авансиралите карциноми имат склонност към развитие на метастази. Въпреки радикалната цистектомия, лъчелечение и химиотерапия, в много от случаите петгодишната преживяемост на пациентите е под 50%. Всичко това налага търсенето на нови подходи при определяне на терапевтичното поведение при уротелния карцином.

Понастоящем развитието на познанията в съвременната медицинска наука е достигнало до идеята и признаването на необходимостта от индивидуален лекарски подход при лечението на всеки отделен пациент. Това намира израз в концепцията за персонализираната медицина - област, към която са насочени надеждите относно възможността за постигане на

напредък в диагностиката и лечението на злокачествените заболявания. Индивидуалният подход, изграден на базата на прецизираната морфологична диагностика и определения молекулярен профил на тумора, дава възможност за осъществяване на лечението при всеки отделен пациент. При една голяма част от злокачествените тумори се наблюдава напредък в областта на персонализираната медицина, където определеният и вече известен имунохистохимичен и молекулярен профил дава възможност за терапевтичен подход към съответния пациент. При уротелния карцином все още има изоставане в тази насока. А персонализираната терапия при пациенти с авансирал и метастатичен уротелен карцином към момента на поставянето на диагнозата е от изключително голямо значение за изхода на болестта.

Процесът на диагностициране при карцинома на пикочния мехур изисква познаване както на специфичните морфологични особености на всеки хистологичен вид, така и на критериите за поставяне на точна диагноза. Комбинацията от морфологични характеристики и включването на нови молекулярни биомаркери при този тумор би подобрила прецизирането на диагнозата и оттам – определяне на прогнозата и лечението при конкретните пациенти.

Литературните данни относно корелацията между резултатите от морфологичните изследвания и прогностичните/предиктивните параметри са все още противоречиви и недостатъчно аргументирани. Изясняването на тази връзка би било полезно с оглед осъвременяване на концепцията за биологията на уротелния карцином, която би дала възможност за прецизиране на морфологичния резултат чрез имунохистохимично изследване с прилагани в рутинната практика антитела.

От изложеното дотук произлиза заключението, че подобно на всяко едно от онкологичните заболявания, уротелният карцином на пикочния мехур се нуждае от по-задълбочено проучване, отнасящо се до прогнозиране на

поведението му с оглед на профилактиката, а там, където рецидивите и метастатичната болест са факт - с цел повишаване на преживяемостта на пациентите. Ролята на посочените маркери, използвани при уротелните карциноми, все още не е напълно изяснена, поради което понастоящем усилията са насочени към изясняване на значението им като фактори за прогресия на заболяването и мишена за нови терапевтични стратегии. Липсата в литературата на достатъчно убедителни данни и еднопосочно мнение за резултатите от морфологичните изследвания, посветени на някои от тези молекули, обуславят необходимостта от анализ на експресията им при уротелния карцином. Анализът би помогнал за определяне на терапевтично поведение, а и дава основание за провеждане на настоящото проучване.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1 Цел

Да се анализират и съпоставят клинико-морфологични, хистохимични, имунохистохимични характеристики на уротелния карцином на пикочния мехур с оглед откриването на критерии и белези с прогностично и предиктивно значение.

2.2 Задачи

1. Да се проучат и анализират уротелните карциноми в стадий pTа и pT1 за петгодишен период във връзка с клинико-морфологичните характеристики (възраст, пол, преживяемост до настъпване на локален рецидив, диференциация и стадий).
2. Да се проучат и съпоставят клинико-морфологичните показатели между рецидивиращите и нерцидивиращи уротелни карциноми на пикочния мехур.
3. Да се анализират полуколичествено и количествено: тумор-асоциираните еозинофили и мастоцити във връзка с клинико-морфологичните показатели на рецидивиращите и нерцидивиращите уротелни карциноми.
4. Да се оцени и сравни имунохистохимичната експресия на FGF2 в туморната строма при инвазивни и неинвазивни уротелни папиларни карциноми.
5. Да се изследва имунохистохимичната експресия на цитоскелетния протеин СК20, транскрипционния фактор GATA3 и сигнал-индуциращ рецепторен протеин gp130 в туморния паренхим.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

3.1 Материали, използвани в изследването

3.1.1 Материална база за реализиране на дисертационния труд

- „Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ – Медицински университет – Варна
- Използвана е информация от електронна база данни „MultiLab“ и архивна база данни „Microsoft Access Database“ на УМБАЛ „Света Марина“ – Варна

3.1.2 Субекти на изследването

В различните етапи на изследването са включени групи хора, биопсирани в Клиниката по урология (КУ) и обработени в Клиниката по обща и клинична патология (КОКП) при УМБАЛ „Света Марина“. Обект на настоящото проучване са 163 пациенти с папиларен уротелен карцином на пикочния мехур в стадий pTа и pT1, разпределени в две групи:

1. **Първата група** се състои от 95 пациенти (n=95) с диагноза уротелен карцином на пикочния мехур за периода 2007 – 2011 год. При тези пациенти **не са открити хистологично или чрез ендоскопски изследвания данни за настъпил рецидив** (контролна група) и са проследени за период от 5 год., считано от 2011 год. до 2016 год. Изследвани са хистологични препарати от първичните тумори и са оценени следните хистологични показатели: хистологичен тип, степен на диференциация, стадий.
2. **Втората група** се състои от 68 пациенти (n=68) с диагноза уротелен карцином на пикочния мехур за периода 2007-2011 год. с **хистологично верифициран локален**

рецидив. За тази група също са определени хистологичният тип, степента на диференциация, стадият на тумора. По тези показатели е извършен сравнителен анализ на двете групи.

Всички пациенти са проследявани с цистоскопия, лекувани са с трансуретрална резекция и последваща интравезикална терапия.

На двете групи пациенти е определена полуколичествено и количествено тумор-асоцираната тъканна еозинофилия и тумор-асоцираните тъканни мастоцити.

Имунохистохимично при всички пациенти е оценена експресията на следните антитела: FGF2, GATA3, CK20 и gp130.

3.2 Методи на изследването

3.2.1 Хистологични изследвания

Проучването е извършено върху рутинни ендоскопски биопсични материали, изпратени в КОКП от КУ при УМБАЛ „Света Марина“. Материалите са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин за 18-24 часа, след това пуснати за изработване по стандарт без резерва и включени в парафин с точка на топене 52-54°C с цел изготвяне на парафинови блокчета. Срези с дебелина 4 микрона са оцветени стандартно с хематоксилин-еозин за оценка на хистологичните промени в туморната строма и туморния паренхим.

За изява на мастоцитите са приложени оцветявания по Гимза и с 0,5% р-р на Toluidine blue (с рН 2,5).

Всички наблюдения са извършени с помощта на светлинен микроскоп Olympus BX50 (на Olympus Optical Co, LTD). Препаратите са сканирани с апарат Leica Aperio ScanScope AT2 (Aperio Technologies, Vista, CA) и визуализирани със софтуер ImageScope V12.1.0.5029 (Aperio).

➤ Показатели и критерии, оценени на H&E:

- Хистологичен тип на тумора. Диагнозата е поставена чрез прилагане на класификацията на WHO/ISUP за туморите на пикочния мехур от 2004 година. Базирайки се на 8-мо издание на AJCC (2018), е определен pT стадия – pTa и pT1.
- Степен на диференциация. Определянето на степента на диференциация на уротелния карцином на пикочния мехур е извършено съгласно приетата от C3O/ ISUP през 2004 год. класификационна система, разделяща уротелния карцином на low-grade тумори и high-grade тумори. За low grade папиларен уротелен карцином приехме тумори със следната характеристика: папиларни лезии с известна степен на цитоархитектурни промени и ясно изразен нискостепенен клетъчен атипизъм (без изразен полиморфизъм, без наличие на митози към повърхността и без наличие на проминентни нуклеоли). За high grade папиларен уротелен карцином приехме тумори със следната характеристика: папиларни лезии с изразена степен на цитоархитектурните промени и изразен клетъчен и ядрен атипизъм (изразен полиморфизъм, наличие на митози към повърхността и наличие на проминентни нуклеоли).
- **Критерии за оценка на тумор-асоцирана тъканна еозинофилия (TATE)**

Еозинофилните левкоцити са клетки, имащи делчесто ядро, приличащо на телефонна слушалка, и цитоплазма, изпълнена с едри, оранжево-червено оцветени от еозина гранули. За тумор-асоцирана тъканна еозинофилия

приехме инфилтрацията от еозинофилни левкоцити в пери- и интратуморната строма.

- **За определянето на ТАТЕ използвахме следните методи:**

➤ **Полуколичествен метод:**

За преценяването на ТАТЕ въз основа на разпределението и броя на еозинофилите бе приложена следната схема:

- 0 – липсват еозинофилни левкоцити в стромата
- <5 1+
- 5-10 2+
- >10 3+

➤ **Количествен метод (плътност на инфилтрацията):**

Отчитането на броя на еозинофилите в тумор-асоцираната строма осъществихме върху препарати, изготвени от материали, фиксирани в 10% неутрален формалин и оцветени с хематоксилин-еозин. Броенето на еозинофилните левкоцити извършихме на сканирани препарати с апарат Leica Aperio ScanScope AT2 (Aperio Technologies, Vista, CA) и визуализирани със софтуер ImageScope V12.1.0.5029 (Aperio). Броят на еозинофилните левкоцити в интра- и перитуморната строма бе изброяван на мм² при най-високо увеличение (400x).

3.2.2 Хистохимична оценка на тумор-асоцираните тъканни мастоцити (ТАТМ)

Мастоцитите са клетки, имащи метахроматични свойства, като се багрят във виолетов цвят при оцветяване по Гимза и с Toluidine blue (pH 2.5). За тумор-асоцирана тъканна мастоцитоза приехме инфилтрацията от мастоцити в пери- и интратуморната строма.

➤ **Полуколичествен метод:**

За преценяването на тумор-асоциираните мастоцити, тяхното разпределение и брой бе приложена следната схема:

- 0- липсват мастоцити в туморната строма
- <2 1+
- 2-5 2+
- >5 3+

➤ **Количествен метод (плътност):**

Отчитането на броя на тумор-асоциираните мастоцити в стромата осъществихме върху препарати от материали, фиксирани в 10% неутрален формалин, оцветени с Гимза и Toluidine blue (pH 2.5). Броенето на мастоцитите извършихме на сканирани препарати с апарат Leica Aperio ScanScope AT2 (Aperio Technologies, Vista, CA) и визуализирани със софтуер ImageScore V12.1.0.5029 (Aperio). Броя на мастоцитите в интра- и перитуморната строма изброихме на мм² при най-високо увеличение (400x).

3.3 Имунохистохимични методи

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

- Cytokeratin 20 – Dako, кат. №IS777, Clone Ks20.8, Ready-to-Use, моноклонално мише антитяло, експресира се в нормален и неопластично променен стомашен, интестинален и уротелен епител; за позитивна контрола бе използвана тъкан от стомашна лигавица.
- GATA3 (HG3-31) - кат. № sc-268, моноклонално мише антитяло, в разреждане 1:250, транскрипционен фактор,

участващ в диференциацията на епитела на млечната жлеза, уротела и трофилбласта; за позитивна контрола бе използвана тъкан от млечна жлеза.

- FGF2 (C-2) – кат. № sc-74412, моноклонално мише антитяло, в разреждане 1:500, растежен фактор, стимулиращ клетъчната пролиферация от мезенхимен, епителен и невроектодермален произход; за позитивна контрола бе използван ендотела на съдовите стени.
- gp130 (E-8) – кат. № sc-376280, моноклонално мише антитяло, в разреждане 1:250, той е сигнал, индуциращ рецепторен протеин, който формира част от рецепторните комплекси на някои цитокини и се експресира от много епителни туморни клетки; за позитивна контрола бе използвана експресия в тъкан от надбъбречна жлеза.

Нивата на експресия на антителата са определени чрез използване на детекционна система анти-поливалентен HRP/DAB, като реакцията е визуализирана чрез подходящ субстратен хромоген (DAB/Diaminobenzidine) реагент.

3.3.3 Методи за отчитане на имунохистохимичната експресия

Оценката на имунохистохимичното изследване е направена, като са изследвани 10 полета на най-голямо увеличение (x400) за всеки отделен случай. Направени са сканирани изображения на случаите с помощта на сканиращия апарат - Leica Aperio Scan Scope AT2 device (Aperio 50 Technologies, Vista, CA), с последващи анализи на сканираните образи с ImageScope V12.1.0.5029 (Aperio).

Имунохистохимичната експресия оценихме с помощта на H-score (histo-score) върху тъканните проби. Първо, за всяка клетка в различни полета бе

определена интензивността (I) на реакцията (0, 1+, 2+, или 3+). Броят на позитивните 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), 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

Крайният скор беше дихотомно разделен според медианата (определяне на cut-off стойност) и всички случаи над медианата бяха отразявани като високи експресионни нива, а тези под медианата – като ниски експресионни нива.

1. **Отчитане ИХХ експресията на СК20** - Имунохистохимичната цитоплазмена експресия на СК20 бе оценена полуколичествено чрез използване на H-score (histo-score) върху тъканните проби и изчислен по горепосочената формула.
2. **Отчитане ИХХ експресията на GATA3** - Интерпретацията е осъществена посредством полуколичествен метод според процента на GATA3 позитивни клетъчни ядра. Изчисленията бяха извършени чрез H-score.
3. **Отчитане ИХХ експресията на FGF2** - Имунохистохимичната цитоплазмена експресия на FGF2 бе оценена полуколичествено чрез използване на H-score.
4. **Отчитане ИХХ експресията на gp130** - Интерпретацията е осъществена посредством полуколичествен метод според пропорцията и интензитета на цитоплазмената оцветка. Процентът на gp130 бе оценен според горепосочения метод и изчислени по формулата за H-score.

3.4 Статистически методи

Статистическият анализ е осъществен чрез програмен продукт MS Excel 2016 и статистическа програма IBM SPSS Version 25 за Windows и включва следните методи:

- Дескриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност ($\mu(X)$) стандартно отклонение (SD), минимална (min) и максимална стойност (max).
- Кростабулация и Хи-квадрат (χ^2) при търсене на значими разлики в честотното представяне на категорийни стойности. Статистическа значимост при Хи-квадрат тестове бе приемана при $p \leq 0.05$.
- Корелационен анализ за оценка на зависимостта между изследваните показатели и установяване на силата на тяхното взаимодействие. Оценката на силата на зависимостта между променливите се базира на резултатите от коефициента на Пирсън (Pearson r). Степента на асоциация между променливите е определяна като значителна при $r > 0.5$; голяма при $0.5 < r = 0.7$; голяма при $0.7 < r = 0.9$ и изключително голяма при $r > 0.9$ при $p \leq 0.05$.
- Анализ на преживяемостта до настъпване на рецидив – Kaplan-Meier test, за изследване на преживяемостта на пациентите с уротелен карцином според влиянието на ниската и високата експресия на антителата и изследваните клиничко-морфологични показатели.
- Сравнителен анализ (оценка на хипотези) – t-test Student's за сравняване на количествени и качествени показатели и изследване на разликата между тях. Получените данни са представени като средна

аритметична величина и стандартно отклонение за отделните изследвани групи. Използван е 95% интервали на доверителност (CI).

- ROC графичен анализ – за определяне ролята на точността и специфичността на предвидимостта на определени показатели. Стойността на площта под кривата се движи между 0.5 и 1.0. Пълно разделяне на стойностите чрез даден показател да се извърши при резултат над 0.75 или 75%. Статистически значими бяха разликите между групите при $p \leq 0.05$.
- При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0.05$ при доверителен интервал 95% CI.
- Графичното и таблично изобразяване на статистическите данни е осъществено с помощта на Microsoft Office 2016.

IV. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Клинико-морфологична характеристика на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур

4.1.1 Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур по възраст

В настоящото изследване са включени общо 163 пациенти с уротелен карцином на пикочния мехур в стадий pTa и pT1, средната възраст на които е 65.92 ± 11.06 години, като най-младият пациент е на 31, а най-възрастният на 89 години (Табл. 1).

Таблица 1. Разпределение на пациентите с уротелен карцином по възрастови групи (n=163)

Възраст	Брой/n	%
31-40 години	3	1.8
41-50 години	11	6.7
51-60 години	28	17.2
61-70 години	63	38.7
71-80 години	46	28.2
81-90 години	12	7.4
Общо	163	100.0

Пациентите са разделени в шест възрастови интервални групи, като най-голям е процентът на групата 61-70 години (63%) и най-малък е този на групата 31-40 години (1,8%).

4.1.2 Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур по пол

В изследваната група подчертано доминират пациентите от мъжки пол – 119 от случаите (73%), докато жените са почти три пъти по-малко на брой - 44 (27%), (Табл. 2).

Таблица 2. Разпределение на пациентите с уротелен карцином по пол (n=163)

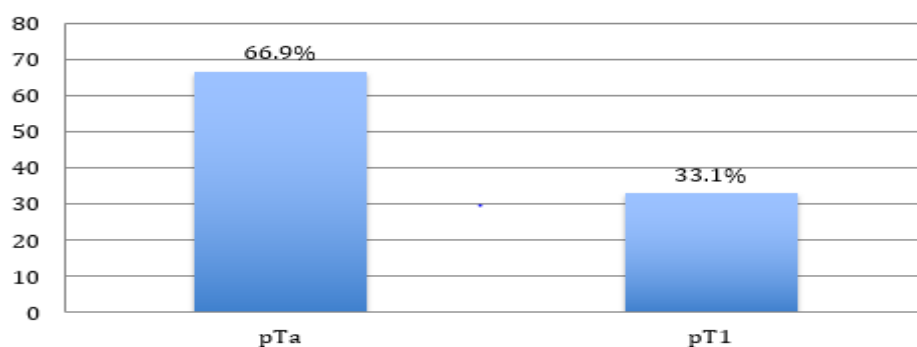
	Брой/n	%
жени	44	27.0
мъже	119	73.0
Общо	163	100.0

4.1.3 pT стадий на уротелния карцином – инвазия в стената

В зависимост от степента на инвазия в стената на пикочния мехур в изследваната група са подбрани пациенти в стадий pTa и pT1, които подлежат на интравезикална локална терапия и проследяване чрез цистоскопии. Прави впечатление, че в групата подчертано доминират уротелни карциноми в стадий pTa – 109 от случаите (66,9%), докато пациентите с уротелен карцином в стадий pT1 са два пъти по-малко на брой - 54 (33,1%), (Табл. 3), (Фиг. 1).

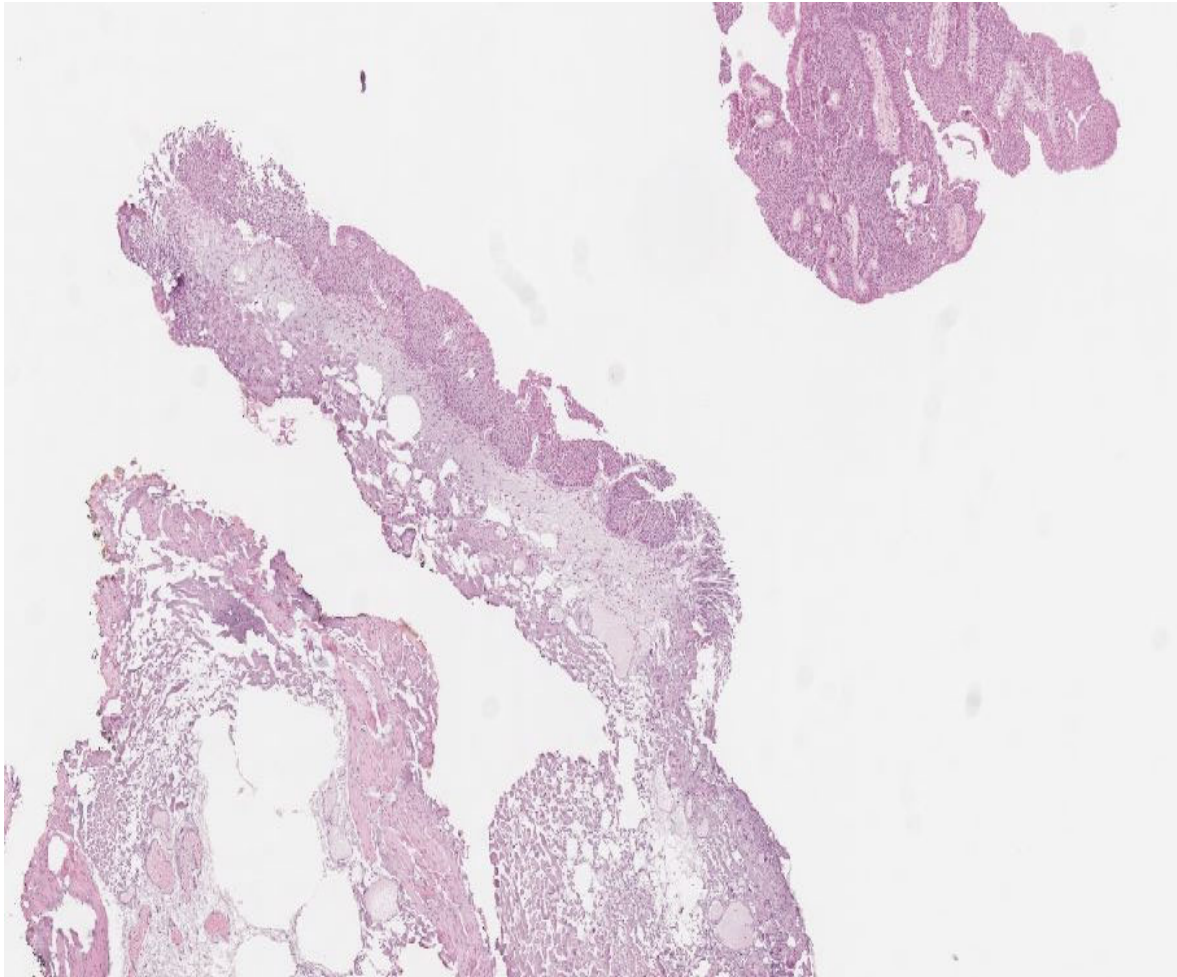
Таблица 3. Разпределение на пациентите с уротелен карцином в зависимост от стадия (n=163)

Стадий	Брой/n	%
pTa	109	66.9
pT1	54	33.1
Total	163	100.0



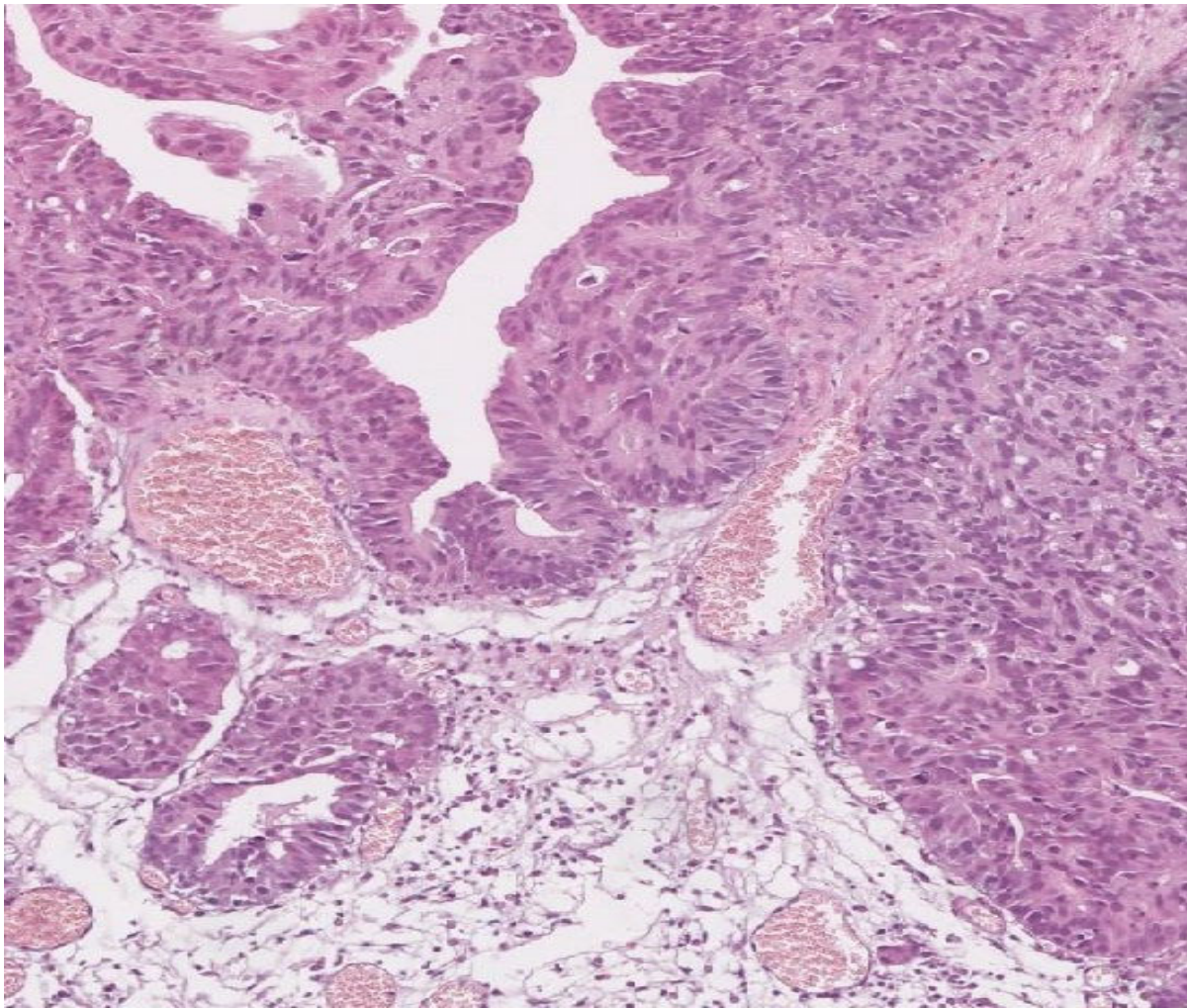
Фигура 1. Графично представяне на пациентите с уротелен карцином, разпределени в зависимост от стадия

За папиларни уротелни карциноми в стадий pTa приехме туморите, при които не се открива субмукозна инвазия (Фиг.2).



Фигура 2. Папиларен уротелен карцином в стадий pTa – липсва инвазия в субмукозата и подлежащата гладка мускулатура; оцветяване с ХЕ, увеличение x20

За папиларни уротелни карциноми в стадий pT1 приехме туморите, при които се откри субмукозна инвазия (Фиг. 3).



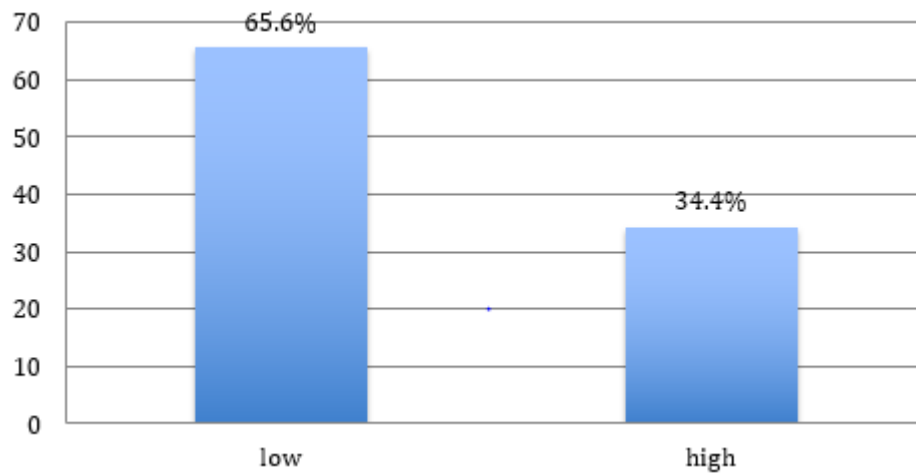
Фигура 3. Папиларен уротелен карцином в стадий pT1 – налична субмукозна инвазия, оцветяване с ХЕ, увеличение x80

4.1.4 Степен на диференциация на уротелния карцином – grade (G)

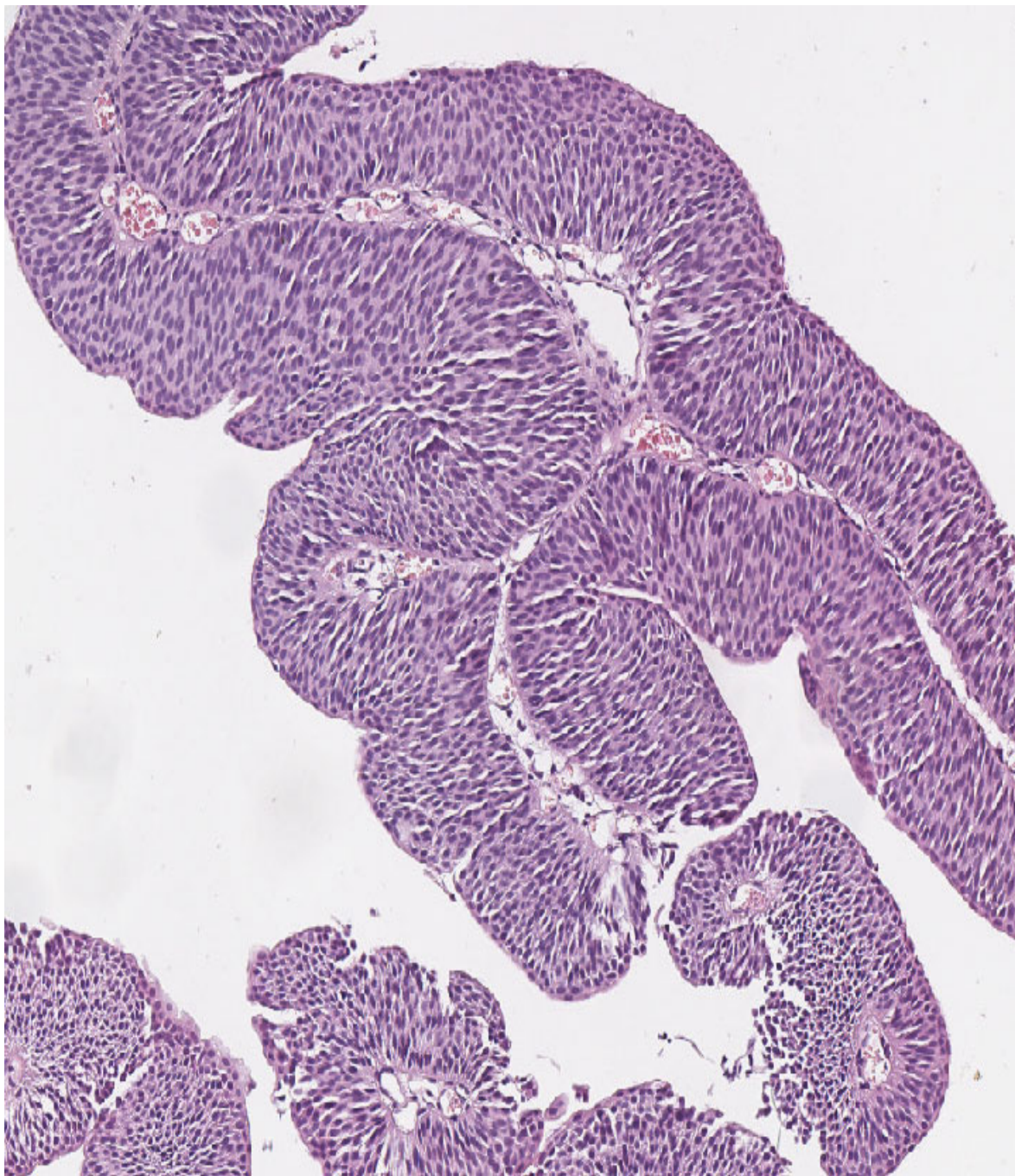
Степента на диференциация на уротелния карцином на пикочния мехур определихме по класификацията на C3O и ISUP от 2004 год. Според нея уротелните карциноми в изследваната група се разделят в две подгрупи: low grade и high grade карциноми. По-голямата част от пациентите са оценени като low grade – 107 (65,6%) (Фиг. 5), докато пациентите с high grade тумори (Фиг. 6) са приблизително два пъти по-малко – 56 (34,4%) (Табл. 4), (Фиг.4).

Таблица 4. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур в зависимост от диференциацията (n=163)

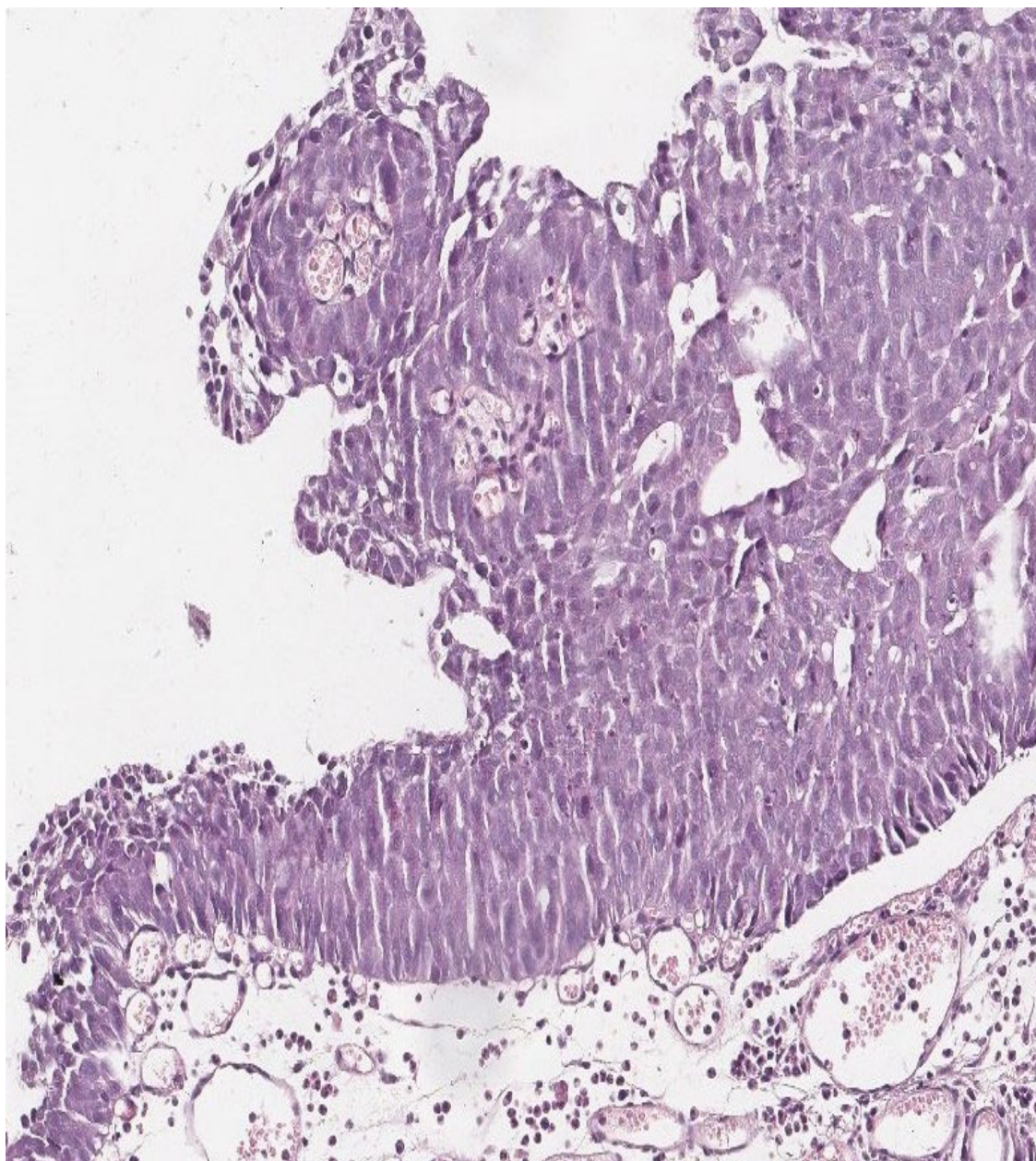
Диференциация	Брой/n	%
low	107	65.6
high	56	34.4
Total	163	100.0



Фигура 4. Графично представяне на пациентите с уротелен карцином, разпределени в зависимост от степента на диференциация



Фигура 5. Уротелен карцином със степен на диференциация low grade – ясно изразен архитектурен и нискостепенен клетъчен атипизъм, оцветяване с ХЕ, увеличение x80



Фигура 6. Уротелен карцином със степен на диференциация *high grade* – изразен архитектурен и клетъчен атипизъм, оцветяване с ХЕ, увеличение *x80*

Биологичното поведение на уротелния карцином на пикочния мехур в стадий pTa и pT1 се изразява в това, че дава по-често локален рецидив и рядко инвазия в детрузора на мехурната стена. Изследваните материали са от трансуретрални резекции и в голям процент от случаите не може категорично да се определи дали се касае за тумор в стадий pTa, или в pT1. Поради това в настоящото изследване разделихме пациентите на две групи

с инвазивни и с неинвазивни тумори, а според биологичното им поведение – на рецидивиращи и нерещидивиращи тумори.

4.2 Клинико-морфологични характеристики на пациенти с рецидивиращ и нерещидивиращ уротелен карцином на пикочния мехур

4.2.1 Възраст на пациентите с рецидивиращ и нерещидивиращ уротелен карцином

В проучването на 163 пациенти с уротелен карцином на пикочния мехур, проследени за петгодишен период, се установи, че 68 от пациентите са с настъпил локален рецидив и са на средна възраст 47.09 ± 11.31 години, като най-младият пациент е на 35 години, а най-възрастният - на 87 години. От същата група пациенти с уротелен карцином на пикочния мехур, проследени за петгодишен период, се установи, че 95 от тях са без настъпил локален рецидив. Те са на средна възраст 66.01 ± 10.96 години, като най-младият пациент е на 35 години, а най-възрастният - на 89 години (Табл. 5).

Таблица 5. Разпределение на пациентите с уротелен карцином по възрастови групи

Възраст	Случаи на уротелен карцином с рецидив		Случаи на уротелен карцином без рецидив	
	брой	%	брой	%
31-40	1	1.5	2	2.1
41-50	6	8.8	5	5.3
51-60	14	20.6	14	14.7
61-70	24	35.3	39	41.1
71-80	15	22.1	31	32.6
81-90	8	11.8	4	4.2
ОБЩО	68	100.00	95	100.00

Пациентите са разделени в шест възрастови интервални групи, като процентът на тези без настъпил рецидив е най-голям във възрастовата група 61-70 години (41.1%), докато при пациентите от същата група, но с настъпил рецидив, този процент е по-малък - съответно 35.3%. При пациентите без настъпил рецидив най-малък е процентът на засегнатите от възрастовата група 31-40 години (2.10%), и съответно 1.5% при пациентите от същата група с настъпил рецидив. Прави впечатление, че липсват съществени различия в двете групи пациенти (с рецидив и без рецидив) по отношение на възрастовото им разпределение (Табл. 5).

Проведеният статистически корелативен анализ по Спирман (ρ) доказва, че няма връзка между възрастта на пациентите и настъпването на локален рецидив ($\rho=0.053$, $p=0.504$).

4.2.2 Пол на пациентите с рецидивиращ и нерцидивиращ уротелен карцином

В изследваната група от 163 пациенти с уротелен карцином на пикочния мехур подчертано доминира мъжкият пол - 53 от случаите (77.9%) са с настъпил рецидив и 66 от случаите (69.5%) са без настъпил рецидив. Заболелите пациенти от групата на женския пол са почти три пъти по-малко на брой - 15 от случаите (22.1%) са с настъпил рецидив и 29 от случаите (30.5%) са без настъпил рецидив (Табл. 6).

Таблица 6. Разпределение на пациентите с рецидив от уротелен карцином по пол

Пол	Случаи на уротелен карцином с рецидив		Случаи на уротелен карцином без рецидив	
	брой	%	брой	%
жени	15	22.1	29	30.5
мъже	53	77.9	66	69.5
ОБЩО	68	100.00	95	100.00

Проведеният статистически корелативен анализ по Спирман (ρ) доказва, че няма връзка между пола и настъпването на локален рецидив ($\rho=0.094$, $p=0.232$).

4.2.3 pT-стадий (stage) при пациентите с рецидивиращ и нерцидивиращ уротелен карцином

В зависимост от инвазията в стената на пикочния мехур в групата от пациенти с развил се рецидив на тумора се установява, че преобладават тези с тумор, определен като pTa – 43 случая (63,2%), и приблизително два пъти по-малко са тези в стадий pT1 – 25 пациенти (36,8%). При групата от пациенти, при които туморът е без настъпил рецидив, се установи, че най-много са тези с тумор, класифициран като pTa – 66 пациенти (69,5%), и близо два пъти по-малко от тях са тези в pT стадий T1 – 29 пациенти (30,5%), (Табл. 7).

Таблица 7. Разпределение на пациентите от уротелен карцином по стадий – pT

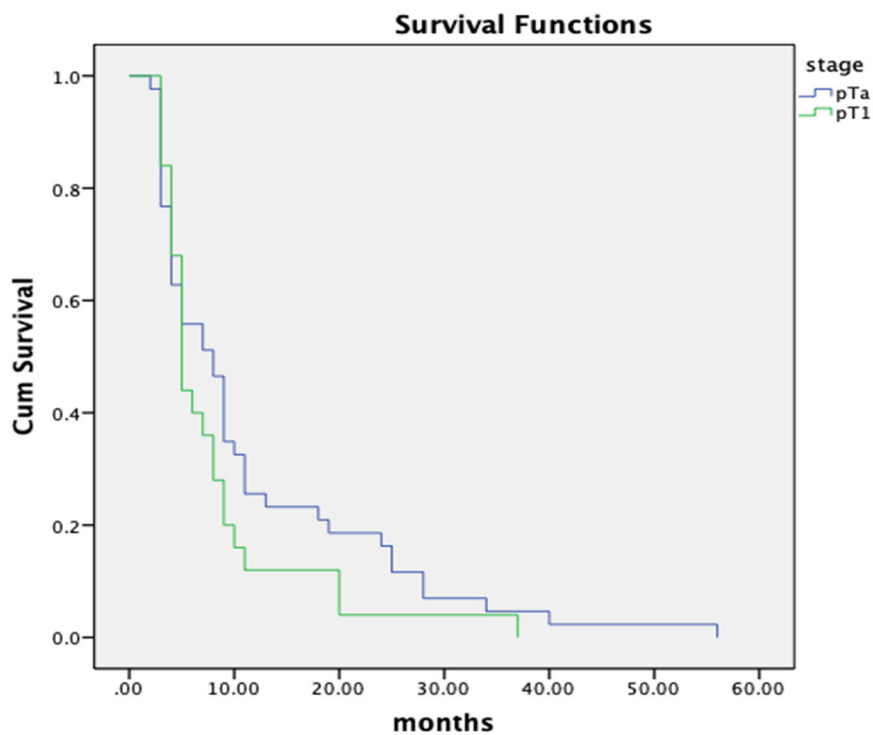
Стадий	Случаи на уротелен карцином с рецидив		Случаи на уротелен карцином без рецидив	
	брой	%	брой	%
pTa	43	63.2	66	69.5
pT1	25	36.8	29	30.5
ОБЩО	68	100.00	95	100.00

По отношение на настъпването на рецидив в изследваната група при използване на статистически анализ за преживяемост (Kaplan-Meier тест) с оглед на преценяване на прогностичното значение на стадия на тумора (pT-стадий) се доказва, че инвазивните уротелни карциноми (pT1) имат категорично прогностично значение по отношение на настъпването на локален рецидив (Фиг. 7). Налице е достоверна разлика в общата преживяемост без настъпване на локален рецидив при различния стадий (Табл. 7). Настъпването на локален рецидив в групата от пациенти с

уротелен карцином в стадий pT1 (8.12 месеца, (95%CI, 5.16-11.07) е много по-ранно в сравнение с групата от пациенти с тумори в стадий pTa (11.53 месеца, (95%CI, 8.03-15.03) (Табл. 8).

Таблица 8. Средна стойност на времето (месеците) до настъпване на рецидив на уротелните карциноми в стадий pTa и pT1; 95%CI, $p < 0,01$

Стадий	Средна стойност	Стандартно отклонение
pTa	11.535	1.787
pT1	8.120	1.509
Общо	10.279	1.268



Фигура 7. Kaplan-Meier криви на месеците до настъпване на рецидив според стадия (T-стадий), ($p=0,01$)

Проведеният статистически корелативен анализ по Спирман (ρ) доказва, че няма връзка между стадия на тумора (Stage) и настъпването на локален рецидив ($\rho=0.065$, $p=0.407$). Вероятността за локален рецидив не може да се предвиди според на стадия pT категорията.

4.2.4 Степен на диференциация (grade) при пациентите с рецидивиращ и неречидивиращ уротелен карцином

В изследваната група на пациентите с уротелен карцином с настъпил локален рецидив, степента на диференциация определихме по класификацията на C3O и ISUP (2004), като по-голямата част от пациентите са определени като low grade 38 (55,9%) и по-малката са high grade – 30 (44,1%). В групата от карциноми без настъпил локален рецидив повечето от пациентите са определени като low grade 69 (72,6%) и приблизително три пъти по-малко са тези с high grade карцином – 26 (27,4%) (Табл. 9).

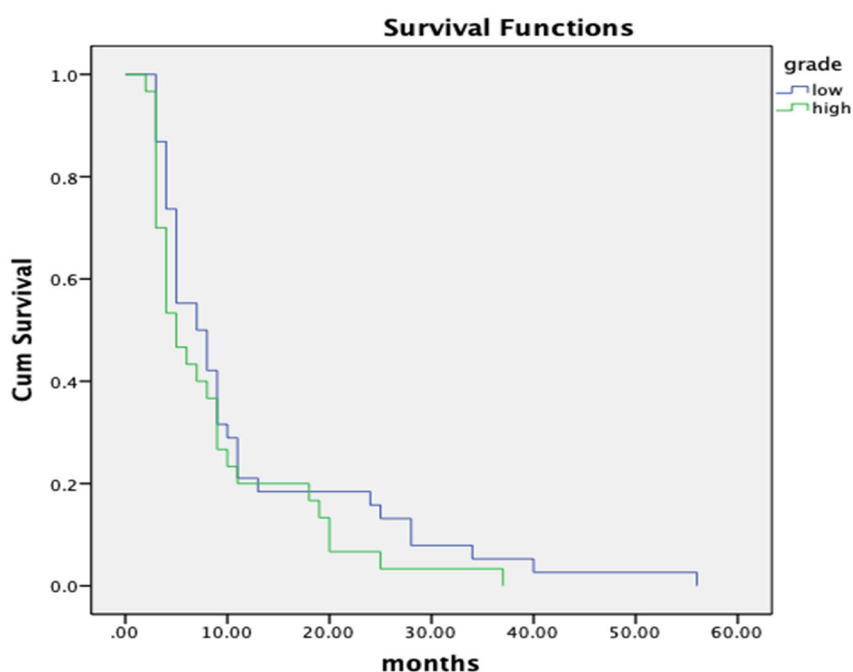
Таблица 9. Разпределение на пациентите с уротелен карцином в зависимост от степента на диференциация

Диференциация	Случаи на уротелен карцином с рецидив		Случаи на уротелен карцином без рецидив	
	брой	%	брой	%
low	38	55.9	69	72.6
high	30	44.1	26	27.4
ОБЩО	68	100.00	95	100.00

По отношение на настъпването на рецидив в изследваната група с Kaplan-Meier тест (Фиг. 8). става ясно, че групата от уротелни карциноми с low grade на диференциация имат по-продължителен период на преживяване без локален рецидив (11.44 месеца, 95%CI, 7.66-15.22), докато пациентите от групата на уротелни карциноми с high grade диференциация са с по-ниска преживяемост до настъпването на локален рецидив (8,8 месеца, 95%CI, 5.84-11.75), (Табл. 10).

Таблица 10. Средна стойност на времето (месеците) до настъпване на рецидив при low grade и high grade на диференциация на уротелните карциноми; 95%CI, $p < 0,01$

Диференциация	Средна стойност	Стандартно отклонение
low	11.447	1.928
high	8.800	1.507
Overall	10.279	1.268



Фигура 8. Kaplan-Meier криви на месеците до настъпване на рецидив според диференциацията на тумора (Grade), ($p=0,01$)

Проведеният статистически корелативен анализ по Спирман (ρ) доказва, че има връзка между диференциацията (Grade) и настъпването на локален рецидив ($\rho=0.174$, $p=0.026$). Вероятността за локален рецидив е по-голяма при уротелните карциноми със степен на диференциация high grade, отколкото при тези със степен на диференциация low grade на тумора.

4.2.5 Анализ между променливите „възраст“ и „стадий/рТ“

χ^2 анализ при комбинация на променливите „възраст“ и „стадий“ показва, че няма процентна разлика между променливите при пациенти с настъпил рецидив ($p=0.755$) и пациенти без настъпил рецидив ($p=0.728$), (Табл. 11).

Таблица 11. Връзка между променливите „възраст“ и „стадий“ без статистически значима разлика $p=0.755$ при пациенти с рецидив и $p=0.728$ при пациенти без рецидив

$\chi^2=0,097, p=0.755$ – с рецидив $\chi^2=2.81, p=0.728$ – без рецидив		Случаи на уротелен карцином с рецидив			Случаи на уротелен карцином без рецидив			
		Стадий		Общо	Стадий		Общо	
		рТа	рТ1		рТа	рТ1		
31-40 години	Брой	1	0	1	1	1	2	
	%	1,5%	0.0%	1,5%	1.1%	1.1%	2.1%	
41-50 години	Брой	4	2	6	2	3	5	
	%	5.9%	2.9%	8.8%	2.1%	3.2%	5.3%	
51-60 години	Брой	8	6	14	10	4	14	
	%	11.8%	8.8%	20.6%	10.5%	4.2%	14.7%	
61-70 години	Брой	15	9	24	27	12	39	
	%	22.1%	13.2%	35.3%	28.4%	12.6%	41.1%	
71-80 години	Брой	11	4	15	23	8	31	
	%	16.2%	5.9%	22.1%	24.2%	8.4%	32,6%	
81-90 години	Брой	4	4	8	3	1	4	
	%	5.9%	5.9%	11.8%	3.2%	1.1%	4.2%	
Общо		Брой	43	25	68	66	29	95
		%	63.2%	36.8%	100%	69.5%	30.5 %	100%

От таблицата се вижда, че липсва статистически значима разлика между променливите „възраст“ и „стадий“ при пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур без настъпил рецидив, като по-голям е процентът на пациентите от възрастовата група 61-70 години в стадий рТа

(22.1%) и pT1 (13.2%). Най-малък е процентът на пациентите от възрастовата група 31-40 години в стадий pTa (1.5%) и pT1 (0.0%).

В групата на пациенти без настъпил рецидив най-голям е процентът на пациентите от възрастовата група 61-70 години в стадий pTa (28.4%) и pT1 (12.6%), а най-малък - на болелите от възрастовата група 31-40 години в стадий pTa (1.1%) и pT1 (1.1%).

4.2.6 Анализ между променливите „възраст“ и „диференциация“

χ^2 анализ при комбинация на променливите „възраст“ и „диференциация“ показва, че няма процентна разлика между променливите ($p=0.805$), (Табл. 12).

Таблица 12. Връзка между променливите „възраст“ и „диференциация“ без статистически значима разлика $p=0.805$ при пациенти с рецидив и $p=0.363$ при пациенти без рецидив

$\chi^2=2.31, p=0.805$ – с рецидив $\chi^2=5.45, p=0.363$ – без рецидив			Случаи на уротелен карцином с рецидив			Случаи на уротелен карцином без рецидив		
			Диференциация		Общо	Диференциация		Общо
			low	high		low	high	
31-40 години	Брой	1	0	1	2	0	2	
	%	1,5%	0.0%	1,5%	2.1%	0.0 %	2.1%	
41-50 години	Брой	4	2	6	3	2	5	
	%	5.9%	2.9%	8.8%	3.2%	2.1%	5.3%	
51-60 години	Брой	6	8	14	13	1	14	
	%	8.8%	11.8%	20.6%	13.7%	1.1%	14.7%	
61-70 години	Брой	14	10	24	28	11	39	
	%	20.6%	14.7%	35.3%	29.5%	11.6%	41.1%	
71-80 години	Брой	9	6	15	21	10	31	
	%	13.2%	8.8%	22.1%	22.1%	10.5%	32,6%	
81-90 години	Брой	4	4	8	2	2	4	
	%	5.9%	5.9%	11.8%	2.1%	2.1%	4.2%	
Общо		Брой	38	30	68	69	26	95
		%	55.9%	44.1%	100%	69.5%	30.5 %	100%

От таблицата проличава липсата на статистически значима разлика между променливите „възраст“ и „диференциация“ при пациентите с настъпил рецидив, като обаче по-голям е процентът на засегнатите във възрастовата група 61-70 години с low grade на диференциация (20,6%), следвани от тези с high grade на диференциация (14,7%). Най-малък е броят на пациентите от възрастовата група 31-40 години с low grade на диференциация (1,5%).

В групата от пациенти без настъпил рецидив също няма статистически значима разлика, като най-големият процент се пада на пациентите от възрастовата група 61-70 години с low grade на диференциация (29,5%), следвани от тези с high grade на диференциация (11,6%). Най-малък е броят на пациентите от възрастовата група 31-40 години с low grade на диференциация (2,1%).

4.2.7 Анализ между променливите “стадий” и „пол“

χ^2 анализ при комбинация на променливите „стадий“ и „пол“ показва, че няма процентна разлика между променливите при пациенти с настъпил рецидив ($p=0.755$) и при пациентите без настъпил рецидив ($p=0.579$), (Табл. 13).

Таблица 13. Връзка между променливите „стадий“ и „диференциация“ без статистически значима разлика $p=0.308$ при пациенти с рецидив и $p=0.579$ при пациенти без рецидив

$\chi^2=0,097$, $p=0.755$ – с рецидив			Случаи на уротелен карцином с рецидив			Случаи на уротелен карцином без рецидив		
			Стадий		Общо	Стадий		Общо
			pTа	pT1		pTа	pT1	
Пол	Жени	Брой	10	5	15	19	10	29
		%	14.7%	7.4%	22.1%	20.0%	10.5%	30.5%
	Мъже	Брой	33	20	53	47	19	66
		%	13.2%	23.5%	36.8%	49.5%	20.0%	69.5%
Общо		Брой	43	25	68	69	26	95
		%	63.2%	36.8%	100%	72,6%	27,4%	100%

Статистически значима разлика между променливите „стадий“ и „пол“ при пациентите с рецидив от уротелен карцином на пикочния мехур не се установи. По-голям е делът на пациентите от мъжки пол в стадий pTa (48,5%), а по-малък е този на пациентите от женски пол в стадий pT1 (7,4%). В групата на пациенти без рецидив на тумора също не се установява статистически значима разлика между променливите, като най-голям е процентът на пациентите от мъжки пол в стадий pTa (49,5%), а по-малък - този на пациентите от женски пол в стадий pT1 (10,5%).

4.2.8 Анализ между променливите „диференциация“ и „пол“

χ^2 анализ при комбинация на променливите „диференциация“ и „пол“ показва, че няма процентна разлика между променливите при пациенти с настъпил рецидив ($p=0.755$) и пациенти без настъпил рецидив ($p=0.716$), (Табл. 14).

Таблица 14. Връзка между променливите „диференциация“ и „пол“ без статистически значима разлика $p=0.755$ при пациенти с рецидив и $p=0.716$ при пациенти без рецидив

$\chi^2=0,097, p=0.755$ – с рецидив $\chi^2=0,132, p=0.716$ – без рецидив			Случаи на уротелен карцином с рецидив			Случаи на уротелен карцином без рецидив		
			Диференциация		Общо	Диференциация		Общо
			low	high		low	high	
Пол	Жени	Брой	9	6	15	21	8	29
		%	13.2%	8.8%	22.1%	22.1%	8.4%	30.5%
	Мъже	Брой	29	24	53	48	18	66
		%	42.6%	35.3%	77.9%	50.5%	18.9%	69.5%
Общо		Брой	38	30	68	69	26	95
		%	55.9%	44.1%	100%	72,6%	27,4%	100%

От таблицата е видно, че няма статистически значима разлика между променливите „диференциация“ и „пол“ при пациентите с рецидив от уротелен карцином на пикочния мехур. Най-големият процент се пада на

пациентите от мъжки пол с low grade на диференциация (42,6%), а най-малък е този на пациентите от женски пол с high grade на диференциация (8,8%). В групата на пациенти без рецидив също няма статистически значима разлика между променливите, като най-голям е процентът на пациентите от мъжки пол с low grade на диференциация (50,5%), а най-малък – този на пациентите от женски пол с high grade диференциация (8,4%).

4.2.9 Анализ между променливите „стадий“ и „диференциация“

По-долу е представен χ^2 анализ комбинация на променливите „стадий“ и „диференциация“. Статистически значимият χ^2 -квадрат анализ ($p < 0.05$) показва, че процентната разлика в двете групи от пациенти с локален рецидив и тези без рецидив не е случайна, а значима (т.е. би показала сходно разпределение и в бъдеще), (Табл. 15).

Таблица 15. Анализ на променливите „стадий“ и „диференциация“ при статистически значимо $p=0.012$ при групата с рецидив и $p=0.0001$ при пациентите без настъпил рецидив

$\chi^2=6.33, p=0.012$ – с рецидив $\chi^2=12.45, p=0.0001$ – без рецидив			Случаи на уротелен карцином с рецидив			Случаи на уротелен карцином без рецидив		
			Диференциация		Общо	Диференциация		Общо
			low	high		low	high	
Стадий	pTa	Брой	29	14	43	55	11	66
		%	42,6%	20,6%	63,2%	57,9%	11,6%	69,5%
	pT1	Брой	9	16	25	14	15	29
		%	13,2%	23,5%	36,8%	14,7%	15,8%	30,5%
Общо		Брой	38	30	68	69	26	95
		%	55,9%	44,1%	100%	72,6%	27,4%	100%

Между променливите „стадий“ и „диференциация“ в двете групи се установи статистически значима права корелационна зависимост при рецидивиращите и нерцидивиращите тумори. При двете групи

преобладават туморите в стадий pTa и степен на диференциация low grade. Съответно за рецидивиращите уротелни карциноми този процент е 42,6% при p=0.012, а за групата на нерцидивиращите е 57,9% при p=0.0001.

4.2.10 Разпределение на пациентите по клиничко-морфологични показатели и месеците до настъпване на рецидив

На Таблица 16 е представено разпределението на пациентите с рецидивиращ уротелен карцином по отношение на тяхната възраст, пол, стадий и диференциация спрямо месеците до настъпване на локален рецидив.

Таблица 16. Разпределение на пациентите по възраст, пол, стадий и диференциация спрямо месеците до настъпване на рецидив

Време до настъпване на рецидив	<6 месеца	6-12 месеца	>12 месеца	Общо
Брой пациенти/%	33/48.53%	21/30.88%	14/20.59%	68/100%
31-40 – години	0/00.00%	0/00.00%	1/1.47%	1/1.47%
41-50 – години	3/4.41%	1/1.47%	2/2.94%	6/8.82%
51-60 – години	7/10.29%	6/8.82%	1/1.47%	14/20.59%
61-70 – години	11/16.18%	9/13.24%	4/5.88%	24/35.29%
71-80 – години	8/11.76%	3/4.41%	4/5.88%	15/22.06%
81-90 – години	4/5.88%	2/2.94%	2/2.94%	8/11.76%
Жени	6/8.82%	6/8.82%	3/4.41%	15/22.06%
Мъже	27/39.71%	15/22.06%	11/16.18%	53/77.94%
pTa	19/27.94%	13/19.12%	11/16.18%	43/63.24%
pT1	14/20.59%	8/11.76%	3/4.41%	25/36.76%
Low grade	17/25.00%	13/19.12%	8/11.76%	38/55.88%
High grade	16/23.53%	8/11.76%	6/8.82%	30/44.12%

Най-голям е броят (33) на пациентите с настъпил локален рецидив до шест месеца, а най-малък е броят (14) на пациентите с развил се рецидив след повече от 12 месеца от появата на първичния тумор.

4.3 Анализ и оценка на изследваните прогностични и предиктивни фактори, произлизащи от туморната строма

4.3.1 Тумор-асоциирана тъканна еозинофилия - ТАТЕ

Броят на еозинофилните левкоцити в интра- и перитуморната строма варира при уротелните карциноми с и без настъпил рецидив. Те са разпределени под формата на единични клетки, в малки групи и големи кластери. На Таблица 17 се вижда, че при уротелните карциноми без настъпил рецидив броят на еозинофилните левкоцити варира от 0 до 18,63/мм².

Таблица 17. Брой на еозинофилните левкоцити в интра- и перитуморната строма при уротелни карциноми без настъпил рецидив (n=95)

	брой	Мин.	Максим.	Ср.аритм.	Станд.откл.
Ео/мм ²	95	0.00	18.63	1.9285	3.80937

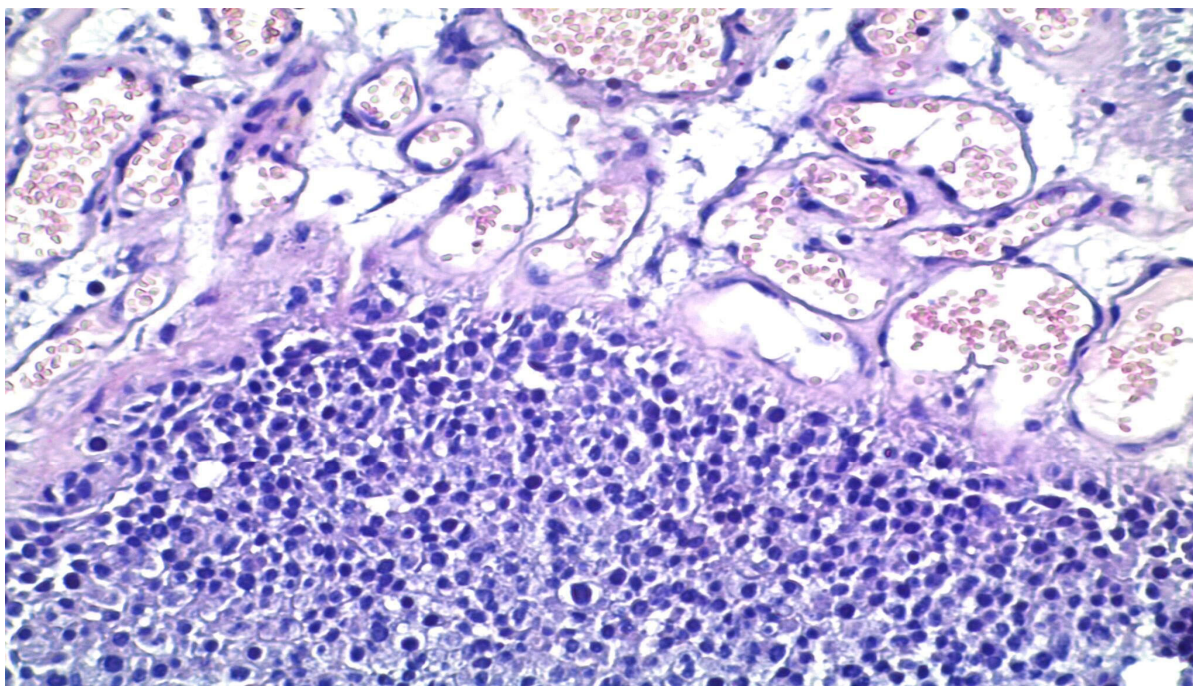
На Таблица 18 е представено разпределението на еозинофилните левкоцити при рецидивиращите уротелни карциноми с вариращ брой от 0 до 37,69/мм². Показани са и месеците до настъпването на рецидив, като най-рано той е след 1 месец, а най-късно настъпилият е след 48 месеца.

Таблица 18. Брой на еозинофилните левкоцити в интра- и перитуморната строма при уротелни карциноми с настъпил рецидив и месеците до настъпването му (n=68)

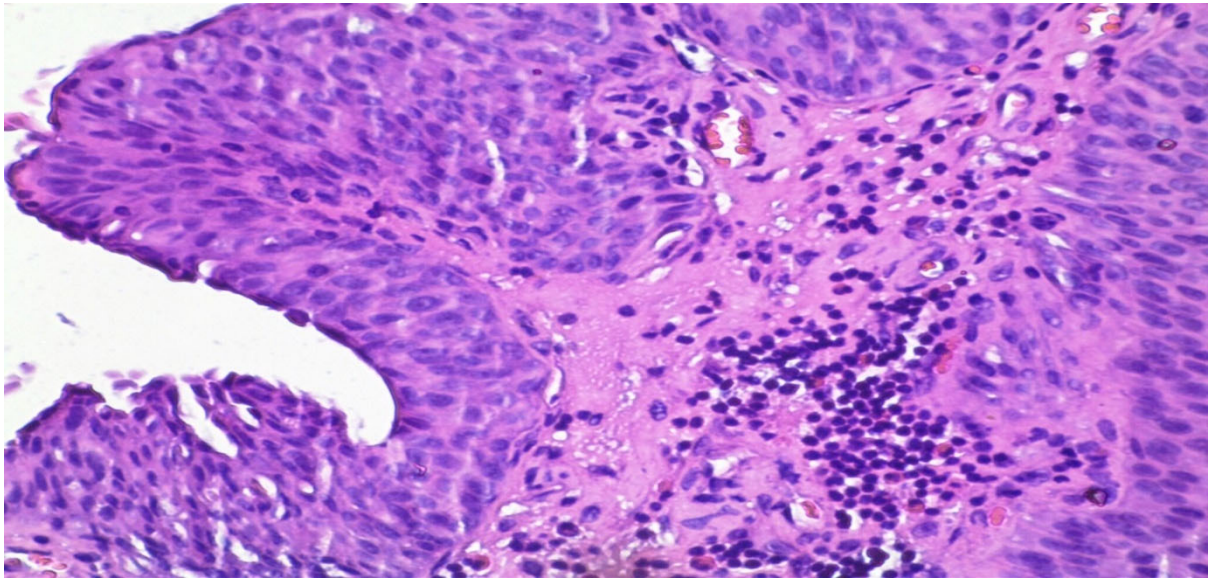
	брой	Миним.	Максм.	Ср.аритм.	Станд.откл.
Ео/мм ²	68	.00	37.69	9.7028	9.03043
Месеци до настъпване на рецидив	68	1.00	48.00	11.9	15.69916

Полуколичественият анализ на интра- и перитуморно разположените еозинофилни левкоцити показва, че има значима разлика в броя им при рецидивиращите и нередидивиращи уротелни карциноми ($\chi^2=11.52$, $p=0.0001$)

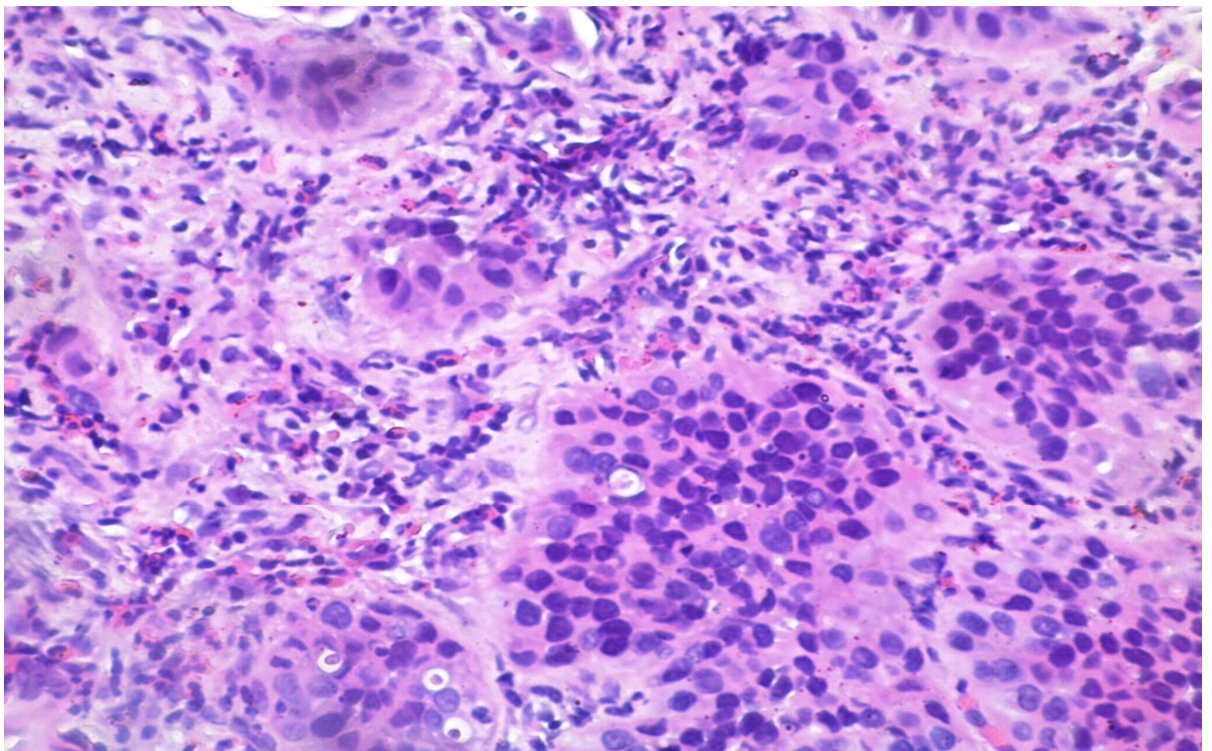
Количественият анализ с Mann–Whitney test показва, че има значителна разлика в броя на еозинофилните левкоцити в стромата на първичните тумори при пациенти с рецидивиращи и нередидивиращи карциноми в стадий pTa и pT1. ГАТЕ варира от напълно липсващи еозинофилни левкоцити (Фиг. 9), с умерено изразена плътност (Фиг.10) до еозинофилни левкоцити с висока плътност (Фиг. 11).



Фигура 9. High grade уротелен карцином, с оточна строма и дилатирани съдове с хиперемия, оцветяване с ХЕ, увеличение x200

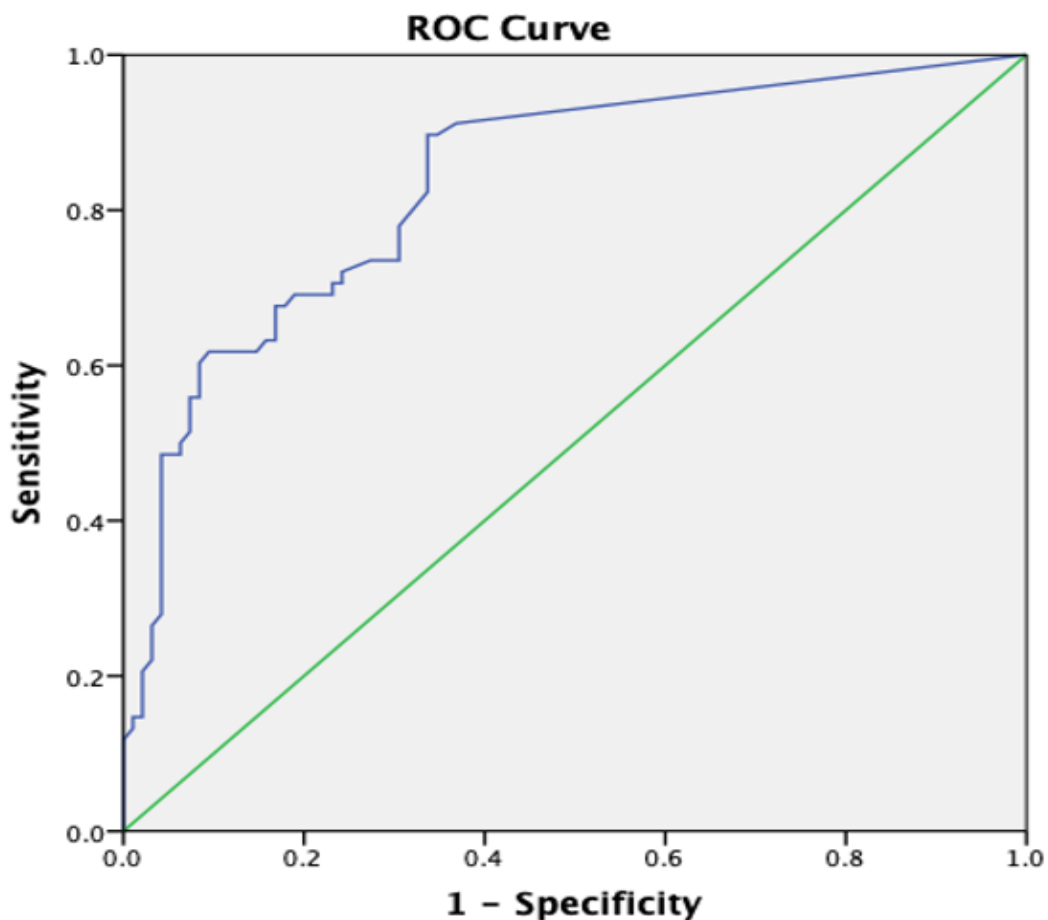


Фигура 10. High grade уротелен карцином, с лимфоиден инфилтрат в стромата, примесен с умерено изразен брой еозинофилни левкоцити, оцветяване с ХЕ, увеличение x200



Фигура 11. High grade уротелен карцином, с лимфоплазматичен инфилтрат в стромата, примесен с множество плътно разположени еозинофилни левкоцити, оцветяване с ХЕ, увеличение x200

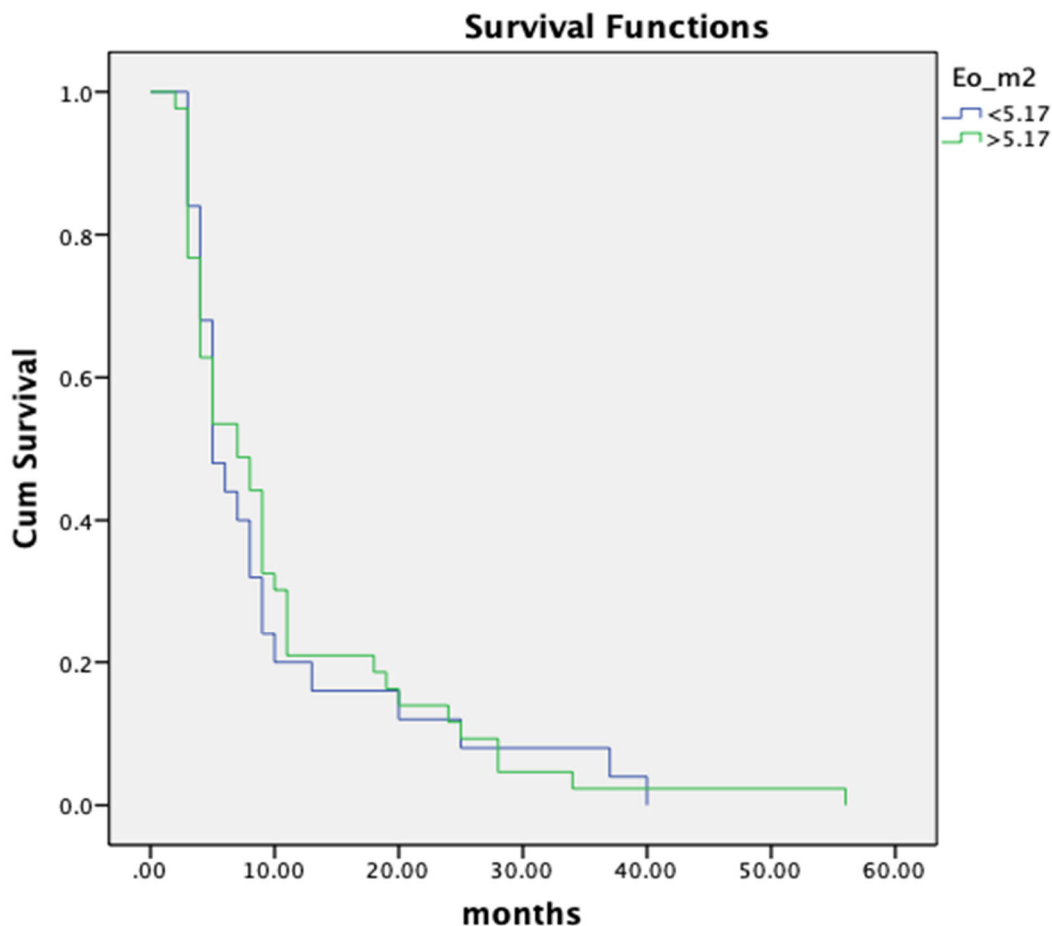
Плътноста на еозинофилните левкоцити в стромата се различава в двете групи на рецидивиращите и нерцидивиращи уротелни карциноми. С помощта на ROC Curve анализ определихме cut-off стойността, която ни помогна да разделим броя на еозинофилните левкоцити в туморната строма на нисък и висок. Това допринесе за по-детайлно изследване на нашите пациенти и за сравняването на получените от нас резултати с тези на други автори. За cut-off стойност приехме $5.17/\text{mm}^2$ на еозинофилните левкоцити в туморната строма. Анализът показва, че при оптимални гранични стойности на броя на еозинофилните левкоцити в туморната строма чувствителността е 75,4%, а специфичността е 78,9% ($\text{AUC} = 0.853$, 95% CI: 0.783-0.924, $p < 0.001$), (Фиг. 12).



Фигура 12. ROC Curve анализ и определяне на cut-off стойността за броя на еозинофилни левкоцити ($\text{AUC} = 0.853$, 95% CI: 0.783–0,924, $p < 0.001$)

Количествената оценка на TATE в туморната строма и направения ROC Curve анализ показват, че има статистически значимо по-изразена TATE в първичното огнище на уротелните карциноми, при които има тенденция да рецидивират.

Преживяемостта без настъпил локален рецидив се изчислява, като се взема предвид времето от датата на операцията на първичния тумор до датата на документирувания настъпил локален рецидив. От кривите на Kaplan-Meier личи, че няма съществена разлика между броя на еозинофилите в стромата и преживяемостта на пациентите без настъпил локален рецидив (Фиг. 13).



Фигура 13. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост на пациентите с и без настъпил рецидив от уротелен карцином според TATE в туморната строма

От ROC Curve анализа проличава наличието на статистическа значимост ($p < 0.0001$) между броя на еозинофилите и вероятността от настъпване на рецидив, докато Kaplan-Meier кривите показват, че липсва статистически значима разлика между броя на еозинофилните левкоцити и месеците до настъпване на локалния рецидив.

4.3.2 Тумор-асоциирани тъканни мастоцити – ТАТМ

Броят на тумор-асоциираните мастоцити на мм^2 в интра- и перитуморната строма варира при уротелните карциноми с и без настъпил рецидив. Те са разпределени под формата на единични пръснати клетки и в малки групи. На Таблица 19 се вижда, че при уротелните карциноми без настъпил рецидив броят на тумор-асоциираните мастоцити варира от 0 до $9.00/\text{мм}^2$.

Таблица 19. Брой на мастоцитите в интра- и перитуморната строма при уротелни карциноми без настъпил рецидив ($n=95$)

	Брой пациенти	Мин.	Максим.	Ср.аритм.	Станд.откл.
Мастоцити/ мм^2	95	.00	9.00	1.2547	2.08708

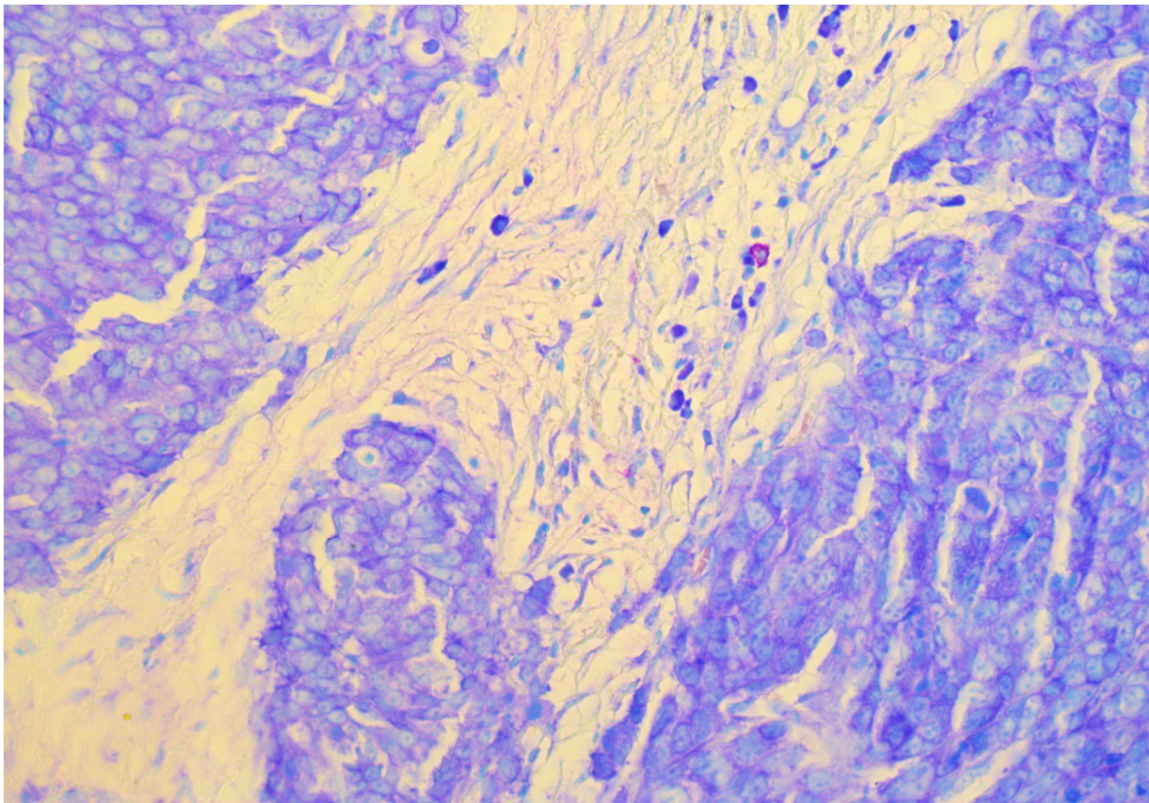
На Таблица 20 са показани разпределението на тумор-асоциираните мастоцити при рецидивиращите уротелни карциноми с вариращ брой (0 до $30,70/\text{мм}^2$), и месеците до настъпването на рецидив. Най-рано настъпилият рецидив е след един месец от диагностицирането, а най-късно настъпилият е след 48 месеца.

Полуколичественият анализ на интра- и перитуморните еозинофилни левкоцити показва, че има значима разлика в броя им при рецидивиращите и нерцидивиращи папиларни уротелни карциноми ($\chi^2=13.49$, $p=0.0001$)

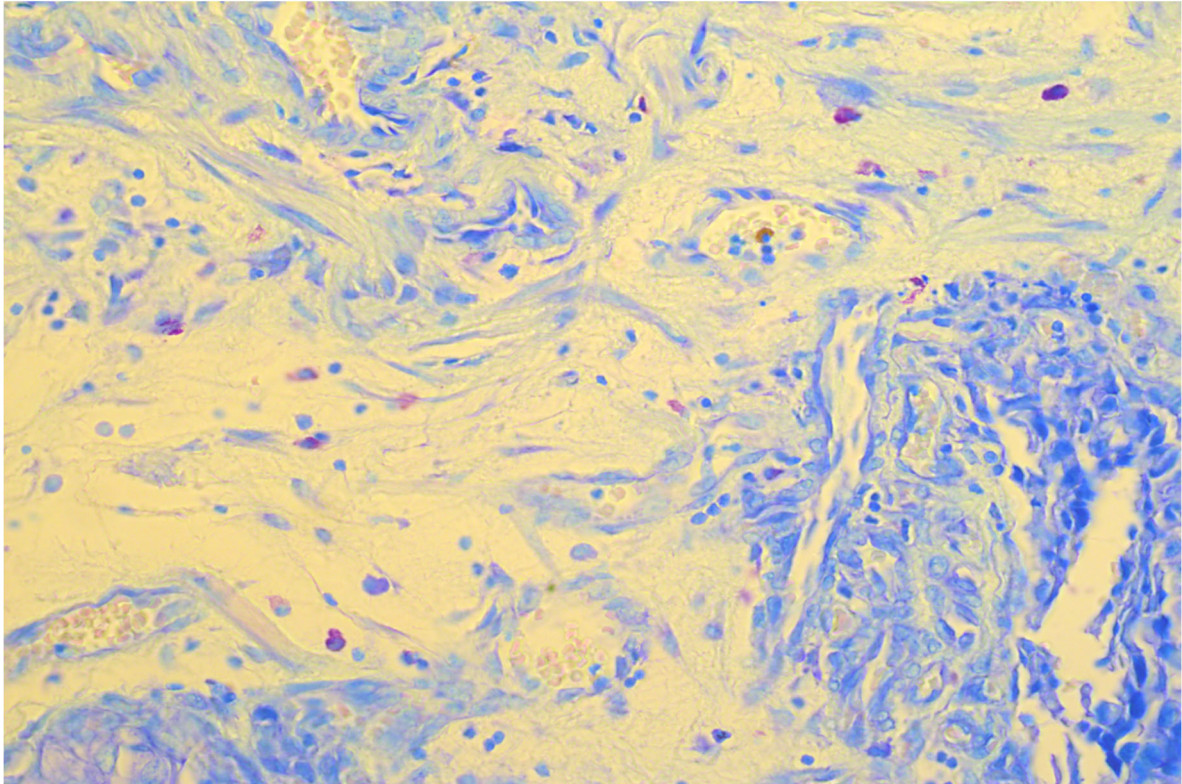
Таблица 20. Брой на на мастоцитите в интра- и перитуморната строма при уротелни карциноми с настъпил рецидив и месеците до настъпването му (n=68)

	Брой пациенти	Миним.	Макс.	Ср. аритм.	Станд. откл.
Мастоцити/мм ²	68	.00	30.70	8.7647	6.48442
Месеци до настъпване на рецидив	68	1.00	48.00	11.8824	15.69916

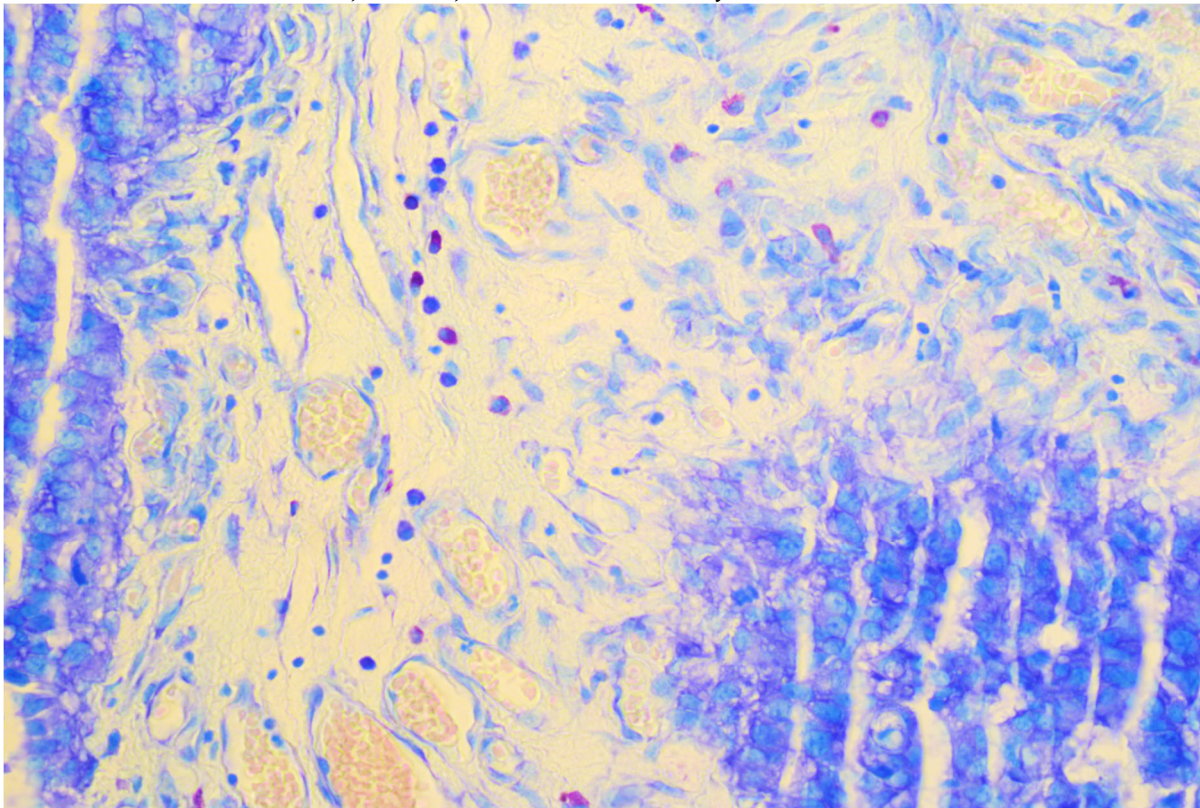
Количественият анализ с Mann–Whitney test показва, че има значителна разлика в броя на тумор-асоциираните мастоцити в стромата на първичните тумори при пациенти с рецидивиращ и нерцидивиращ карцином в стадий pTa и pT1. Мастоцитите варират от единични (Фиг. 14), пръснати поединично (Фиг. 15) и разположени в малки групи (Фиг. 16).



Фигура 14. High grade уротелен карцином с оточна строма и единични мастоцити в стромата, оцветяване с Гимза, увеличение x400

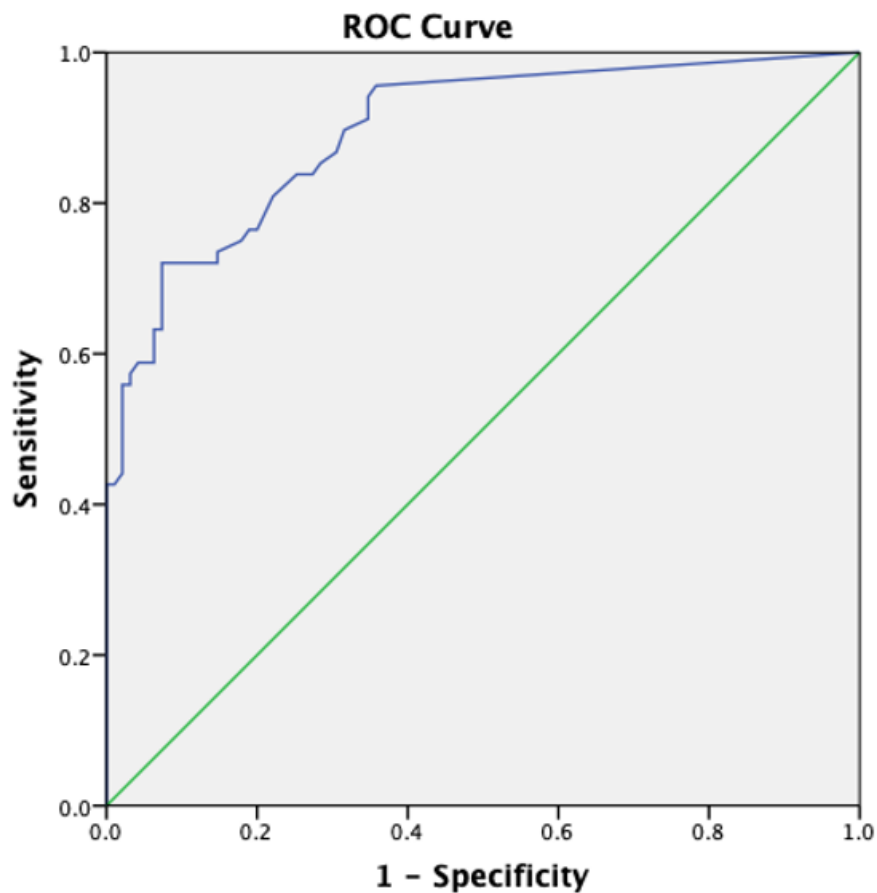


Фигура 15. Low grade уротелен карцином с оточна строма и пръснати поединично мастоцити, оцветяване с Гимза, увеличение x400



Фигура 16. High grade уротелен карцином с оточна строма и мастоцити под формата на трабекули, оцветяване с Гимза, увеличение x400

С оглед на по-детайлното разграничаване на пациентите и сравняване на получените резултати с помощта на ROC Curve анализа определихме cut-off стойността, което ни помогна да разделим броя на мастоцитите в туморната строма на нисък и висок. Установената cut-off стойност на броя на мастоцитите е 4.38/мм². Анализът показва, че при оптимални гранични стойности на броя на мастоцитите в туморната строма чувствителността е 75,4%, а специфичността е 78,9% (AUC = 0.853, 95% CI: 0.783-0.924, p <0.001), (Фиг. 17).

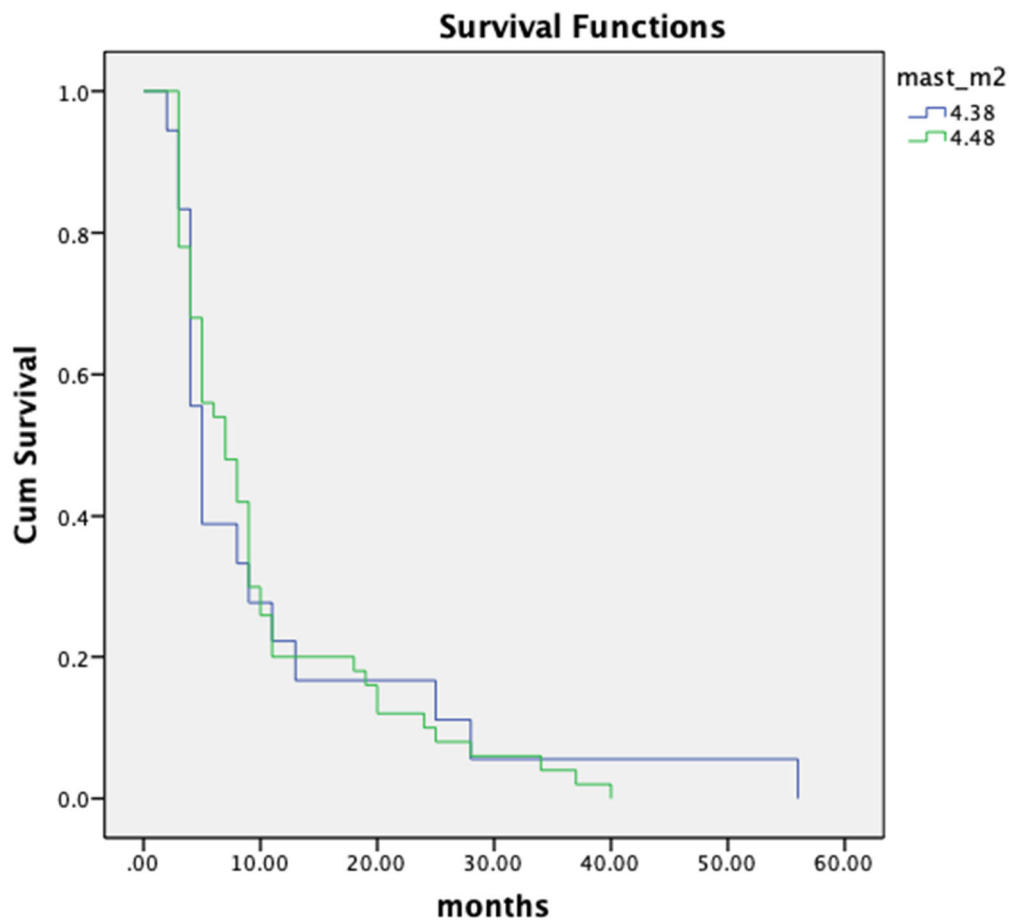


Фигура 17. ROC Curve анализ и определяне на cut-off стойността за броя на еозинофилни левкоцити (AUC = 0.853, 95% CI: 0.783-0.924, p <0.001)

Количествената оценка на ТАТМ и направеният ROC Curve анализ показват, че има по-висок брой мастоцити в първичното огнище на

уротелните карциноми, които са с тенденция да рецидивират при статистически значимо $p < 0.0001$.

От кривите на Kaplan-Meier личи, че пациентите с висок брой мастоцити в стромата нямат значителни разлики в преживяемостта без настъпил локален рецидив в сравнение с тези с нисък брой мастоцити в туморната строма (Фиг. 18).



Фигура 18. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост на пациентите с и без настъпил рецидив от уротелен карцином според мастоцитите в туморната строма

От ROC Curve анализа личи, че има статистическа значимост ($p < 0.0001$) между броя на ТАТМ и вероятността от настъпване на рецидив. Kaplan-Meier кривите показват, че няма статистически значима разлика между броя на ТАТМ и месеците до настъпване на локалния рецидив.

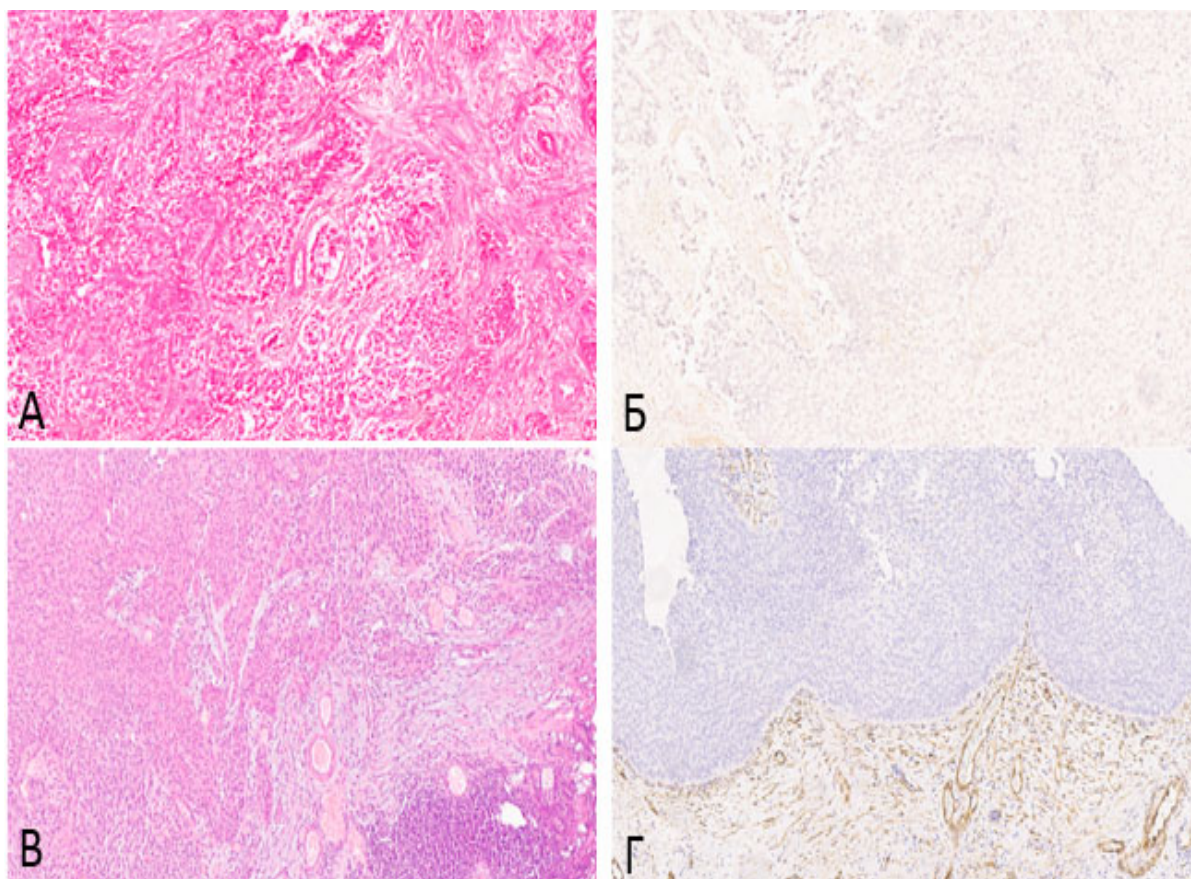
Установи се още, че има положителна слаба корелация от Spearman's rho теста, изразяваща се в увеличен брой мастоцити при пациентите от мъжки пол ($\rho=0.166$, $p=0.034$), (Табл. 21).

*Таблица 21. Зависимост между броя на мастоцитите и пола на пациентите
(n=163)*

Spearman's rho		Мастоцити/мм ²
	Correlation Coefficient	0.166*
Пол	Sig. (2-tailed)	0.034
	n	163

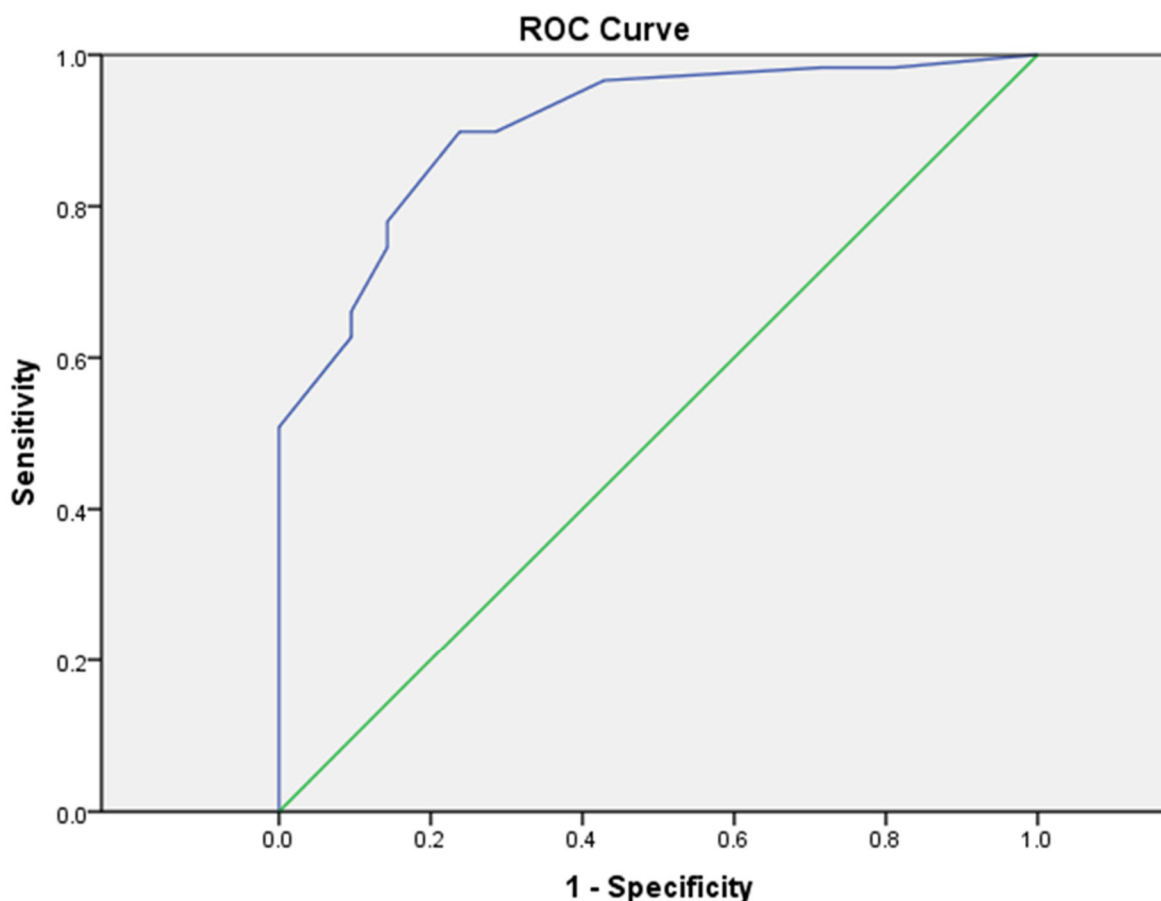
4.3.3 Фибробластен растежен фактор 2 - FGF2

В настоящото изследване чрез използване на имунохистохимични методи се установи цитоплазмена експресия на FGF2 в пери- и интратуморните фибробласти в стромата и ендотелните клетки на кръвоносните съдове. Имунохистохимичните нива на експресия оценихме с h-score скалата, като те варират от 0 до 300. На Фигура 19 е показана експресията на FGF2 при инвазивни и неинвазивни уротелни карциноми.



Фигура 19. Експресия на FGF2 при инвазивни и неинвазивни уротелни карциноми. А. High grade инвазивен уротелен карцином, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; Б. Липсва експресия на FGF2 при high grade инвазивен уротелен карцином, увеличение x100; В. High grade неинвазивен уротелен карцином, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; Г. Умерено изразена цитоплазмена експресия на FGF2 при high grade неинвазивен уротелен карцином, увеличение x100

Нивата на експресия в стромните фибробласти се различават между двете групи на уротелни карциноми в стадий pTa и pT1. С помощта на ROC Curve анализ определихме cut-off стойността, която ни помогна да разделим експресионните нива на FGF2 на такива с ниска и висока експресия. За cut-off стойност на експресия на FGF2 установихме 110. Анализът показва, че при оптимални гранични стойности на цитоплазмена експресия във фибробластите на туморната строма чувствителността е 75,4%, а специфичността е 78,9% (AUC = 0.904, 95% CI: 0.834-0.975 p <0.001), (Фиг. 20).



Diagonal segments are produced by ties.

Фигура 20. ROC Curve анализ и определяне на cut-off стойността за FGF2 (AUC = 0.904, 95% CI: 0.834-0.975, $p < 0.001$)

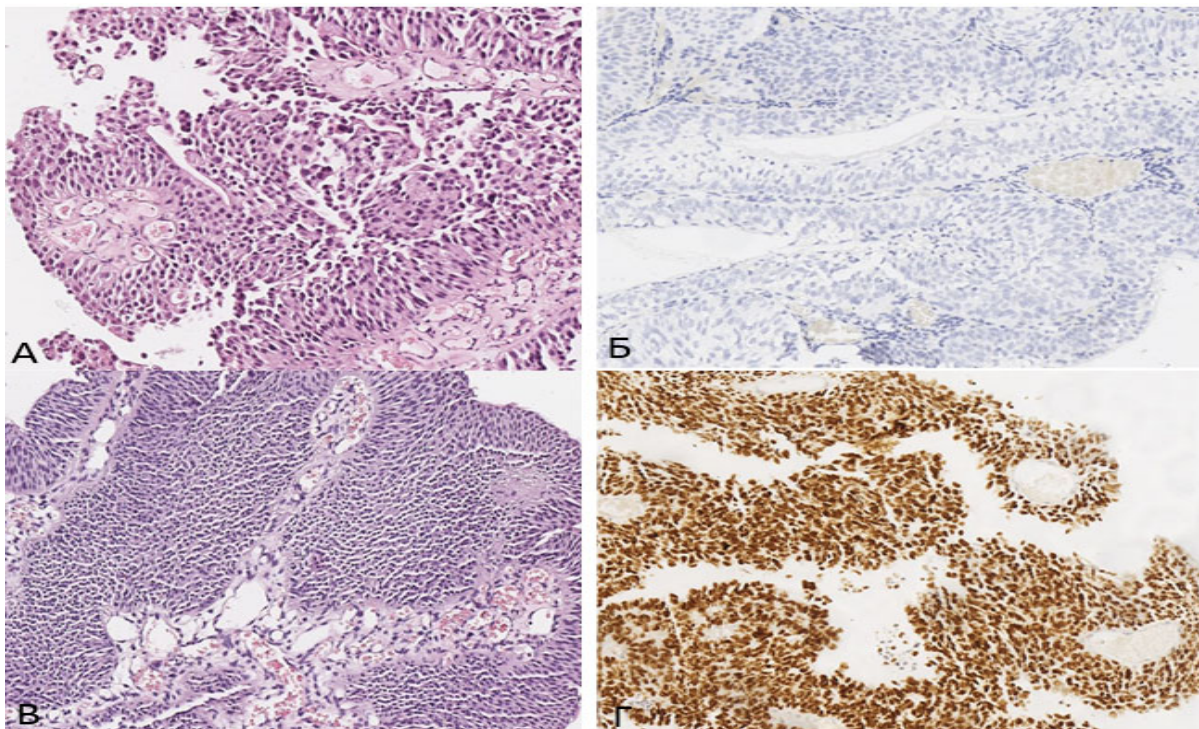
ROC Curve анализът показва, че високите нива на експресия на FGF2 в стромата се свързват с нисък потенциал на уротелните карциноми за инфилтрация в субмукозата ($p < 0.0001$).

От извършените статистически анализи не се установи връзка между FGF2 и клинико-патологичните показатели (пол, възраст, диференциация и настъпване на локален рецидив) при статистически значимо $p < 0.05$.

4.3.4 Анализ и оценка на изследваните прогностични и предиктивни фактори, произлизащи от туморната строма

4.3.4.1 GATA 3

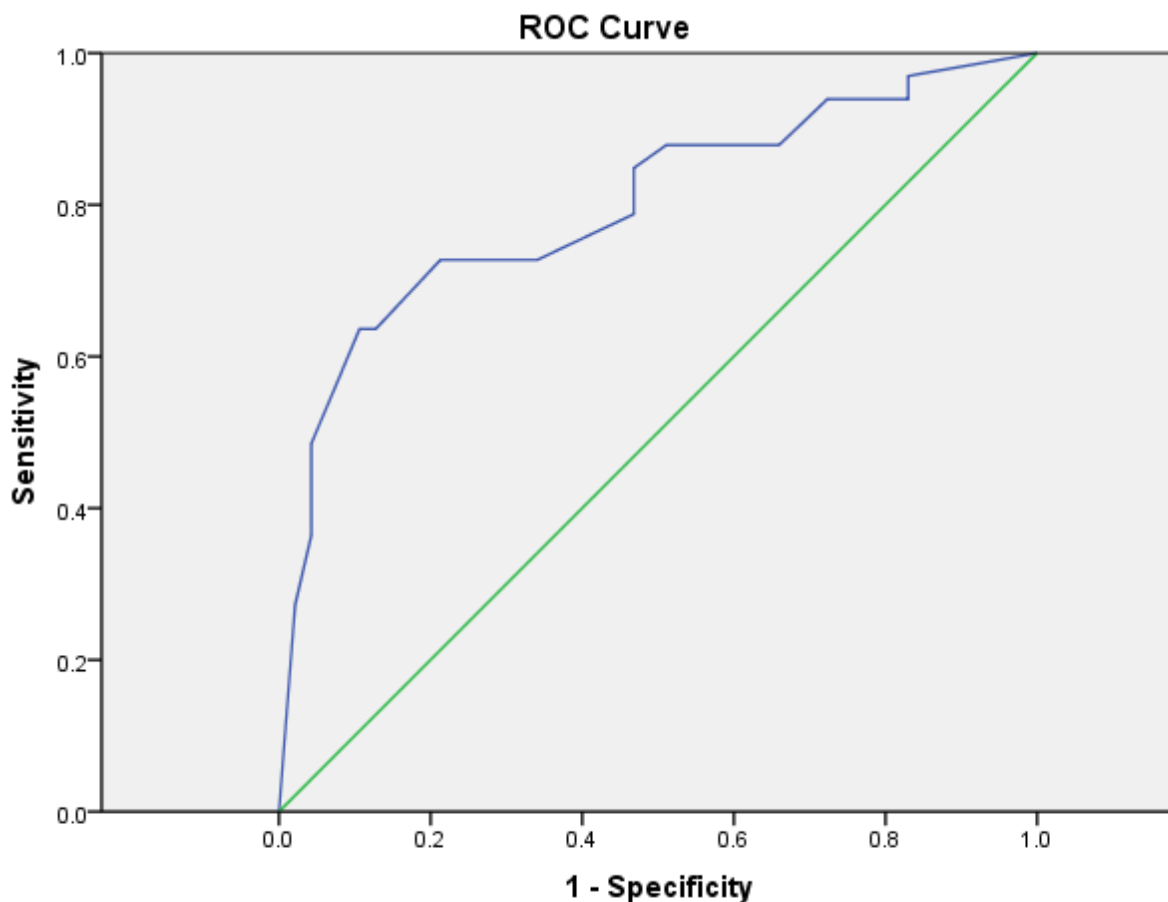
Проведеното имунохистохимично изследване показва експресия на GATA3 в ядрата на туморните клетки. Имунохистохимичните нива на експресия оценихме с h-score скалата, като те варират от 0 до 300. На Фигура 21 е показана експресията на GATA3 при рецидивиращи и нередицидивиращи уротелни карциноми.



Фигура 21. Експресия на GATA3 при рецидивиращи и нередицидивиращи уротелни карциноми. А. Low grade нередицидивиращ уротелен карцином, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; Б. Липсва експресия на GATA3 при low grade нередицидивиращ уротелен карцином, увеличение x100; В. Low grade рецидивиращ уротелен карцином, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; Г. Интензивна ядрена експресия на GATA3 при low grade нередицидивиращ уротелен карцином, увеличение x100

Установяват се различия в нивата на експресия между групите на рецидивиращи и нередицидивиращи уротелни карциноми. С помощта на ROC Curve анализ определихме cut-off стойността, която ни помогна да разделим експресионните нива на GATA3 на такива с ниска и с висока експресия. За

cut-off стойност на експресия на GATA3 установихме 155. Анализът показва, че при оптимални гранични стойности на ядрена експресия в туморните клетки чувствителността е 72,7%, а специфичността е 78,7% (AUC = 0.800, 95% CI: 0.696-0.904, $p < 0.001$), (Фиг. 22).



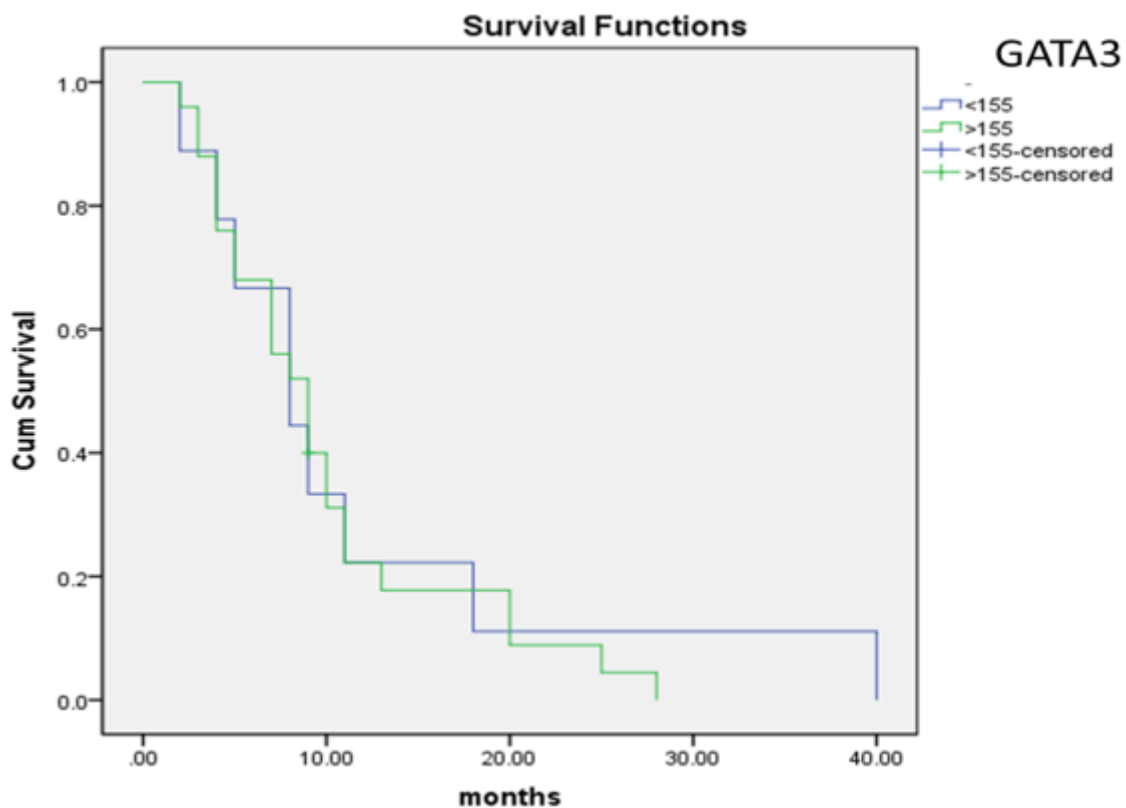
Diagonal segments are produced by ties.

Фигура 22. ROC Curve анализ и определяне на cut-off стойността за GATA 3 (AUC = 0.800, 95% CI: 0.696-0.904, $p < 0.001$)

ROC Curve анализът показва, че има връзка между високите нива на ядрена експресия на GATA3 с вероятност за по-висок риск от настъпване на локален рецидив при уротелните карциноми ($p < 0.0001$).

От кривите на Kaplan-Meier личи, че пациентите с нива на експресия над cut off 155 за GATA3 нямат значителни разлики в преживяемостта без настъпил локален рецидив в сравнение с тези с ниски нива на експресия

(Фиг. 23). От получените резултати става ясно, че липсва статистически значима разлика в преживяемостта ($\chi^2=0,45$, $p=0,83$). Въпреки това от графиката се вижда, че има по-голяма, но статистически незначима разлика в преживяемостта при пациенти с експресия на GATA3 с експресионни нива под cut off 155.

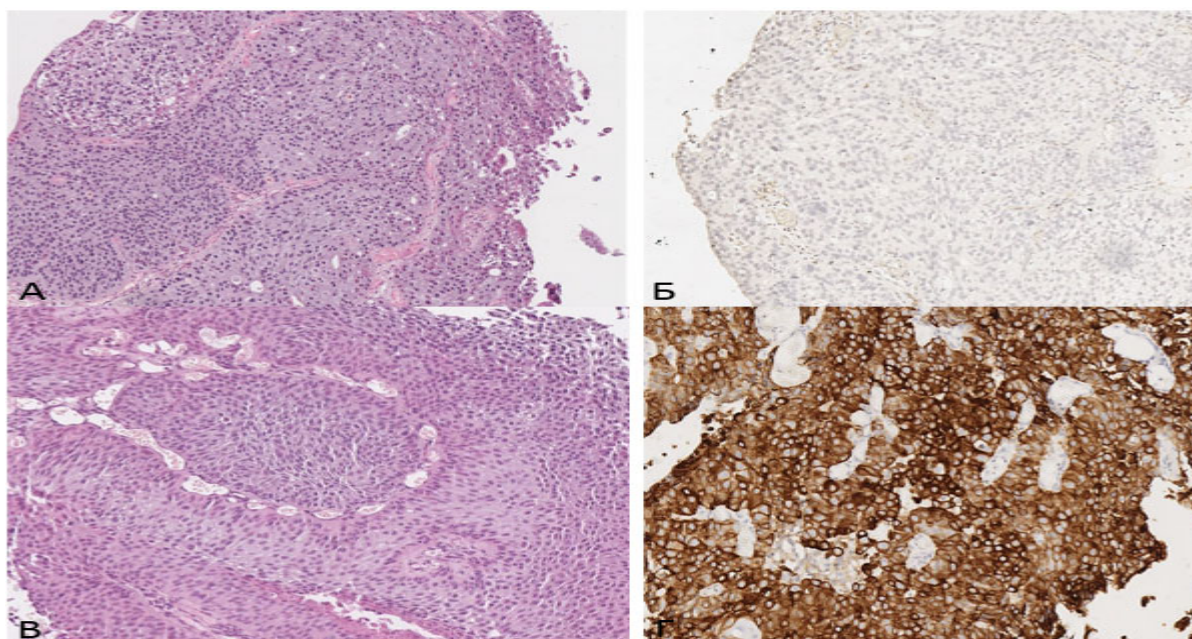


Фигура 23. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост на пациентите с и без настъпил рецидив от уротелен карцином според експресионните нива на GATA3

От извършените статистически анализи не се установи връзка между GATA3 и клинично-патологичните показатели (пол, възраст, диференциация и стадий) при статистически значимо $p<0.05$.

4.3.4.2 Cytokeratin 20 - CK20

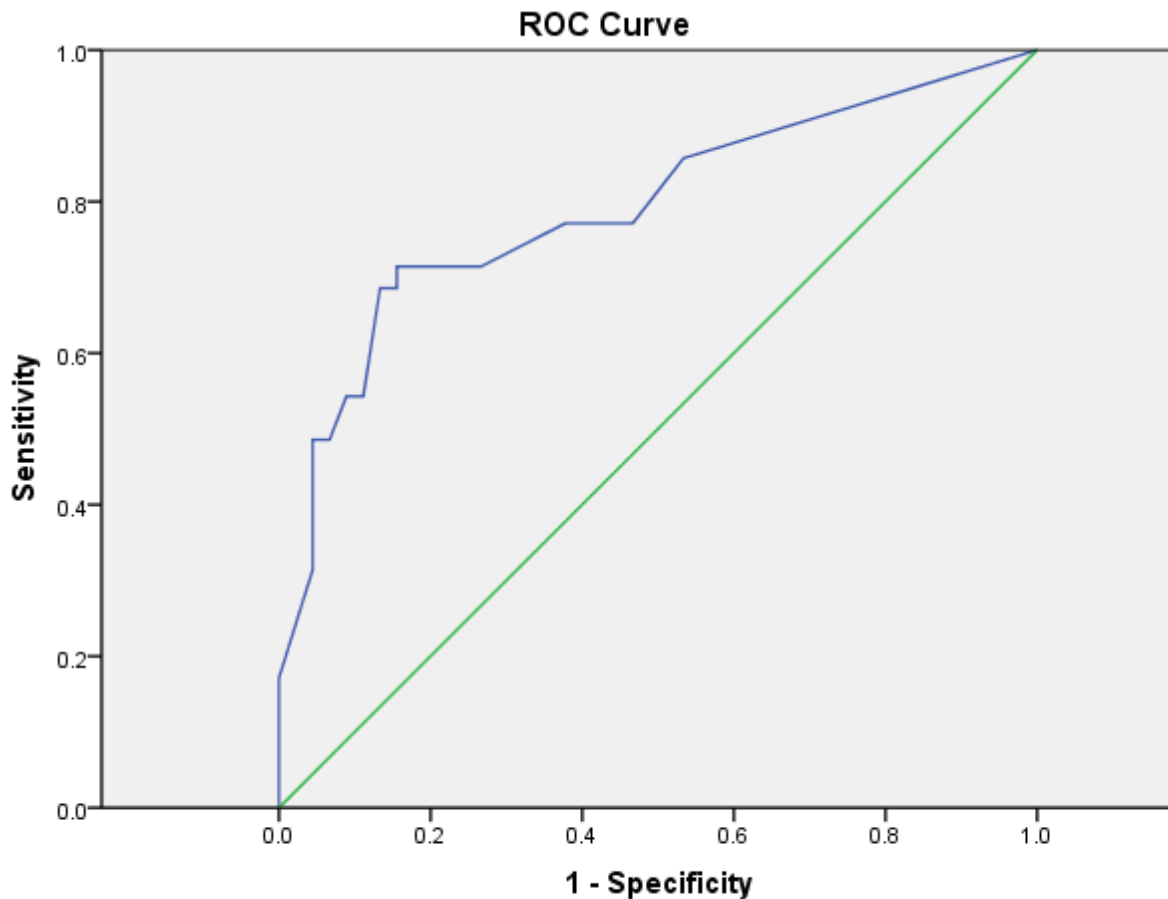
В настоящото изследване чрез използване на имунохистохимични методи се установи, че експресията на CK20 е в цитоплазмата на туморните клетки. Имунохистохимичните нива оценихме с h-score скалата, като те варират от 0 до 300. На Фигура 24 е показана експресията на CK20 при low и high grade на диференциация на уротелни карциноми.



Фигура 24. Експресия на CK20 при low и high grade уротелни карциноми. А. High grade уротелен карцином, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; Б. Липсва експресия на CK20 при high grade уротелен карцином, увеличение x100; В. Low grade уротелен карцином, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; Г. Интензивна цитоплазмена експресия на CK20 при low grade уротелен карцином, увеличение x100

Нивата на експресия се различават между двете групи уротелни карциноми с различна степен на диференциация – low и high grade на диференциация. С помощта на ROC Curve анализ определихме cut-off стойността, която ни помогна да разделим експресионните нива на CK20 на такива с ниска и с висока степен на експресия. За cut-off стойност на експресия на CK20 установихме 135. Анализът показва, че при оптимални гранични стойности на цитоплазмена експресия CK20 от туморните клетки

чувствителността е 72,7%, а специфичността е 78,7% (AUC = 0.792, 95% CI: 0.688-0.896, $p < 0.001$), (Фиг. 25).



Diagonal segments are produced by ties.

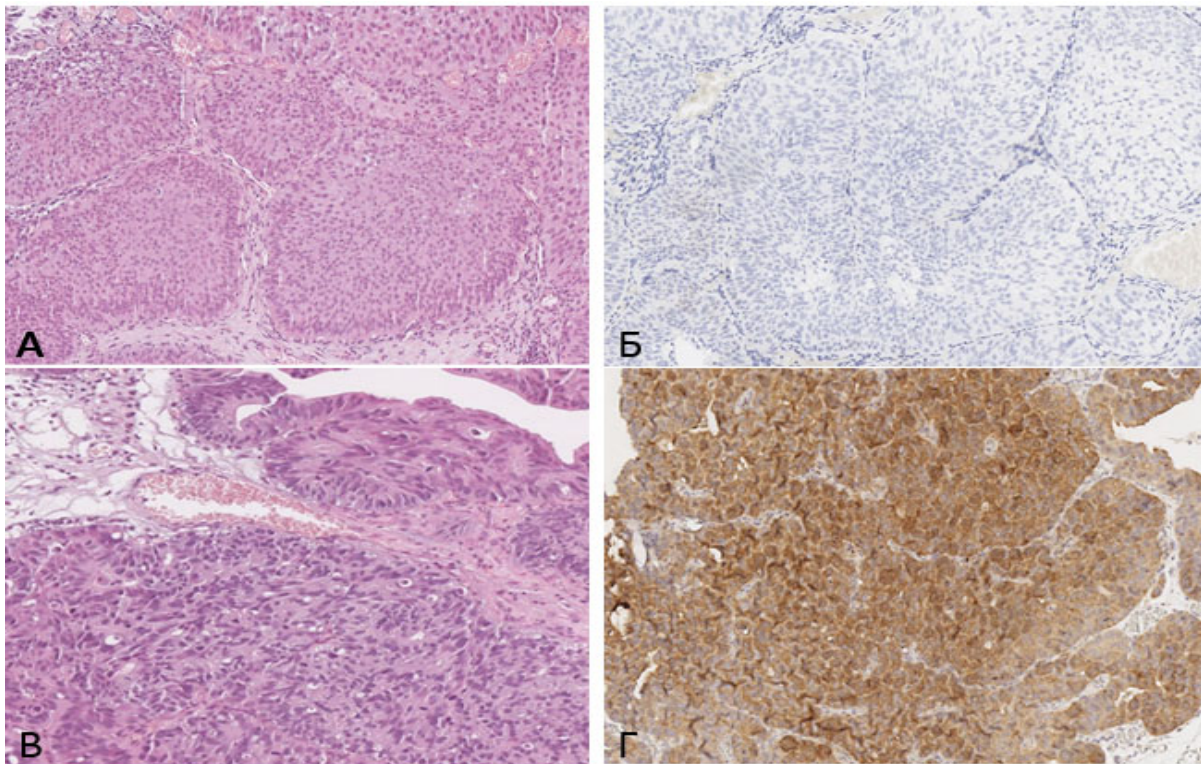
Фигура 25. ROC Curve анализ и определяне на cut-off стойността за СК20 (AUC = 0.792, 95% CI: 0.688-0.896, $p < 0.001$)

ROC Curve анализът показва, че високите нива на цитоплазмена експресия на СК20 се свързват с туморите, имащи low grade на диференциация, докато уротелните карциноми с high grade на диференциация губят експресията си за СК20 (cut-off стойности под 135) ($p < 0.0001$).

От извършените статистически анализи не се установи зависимост между СК20 и клинично-морфологичните показатели (пол, възраст, стадий и настъпване на локален рецидив) при статистически значимо $p < 0.05$.

4.3.4.3 Glycoprotein 130 - gp130

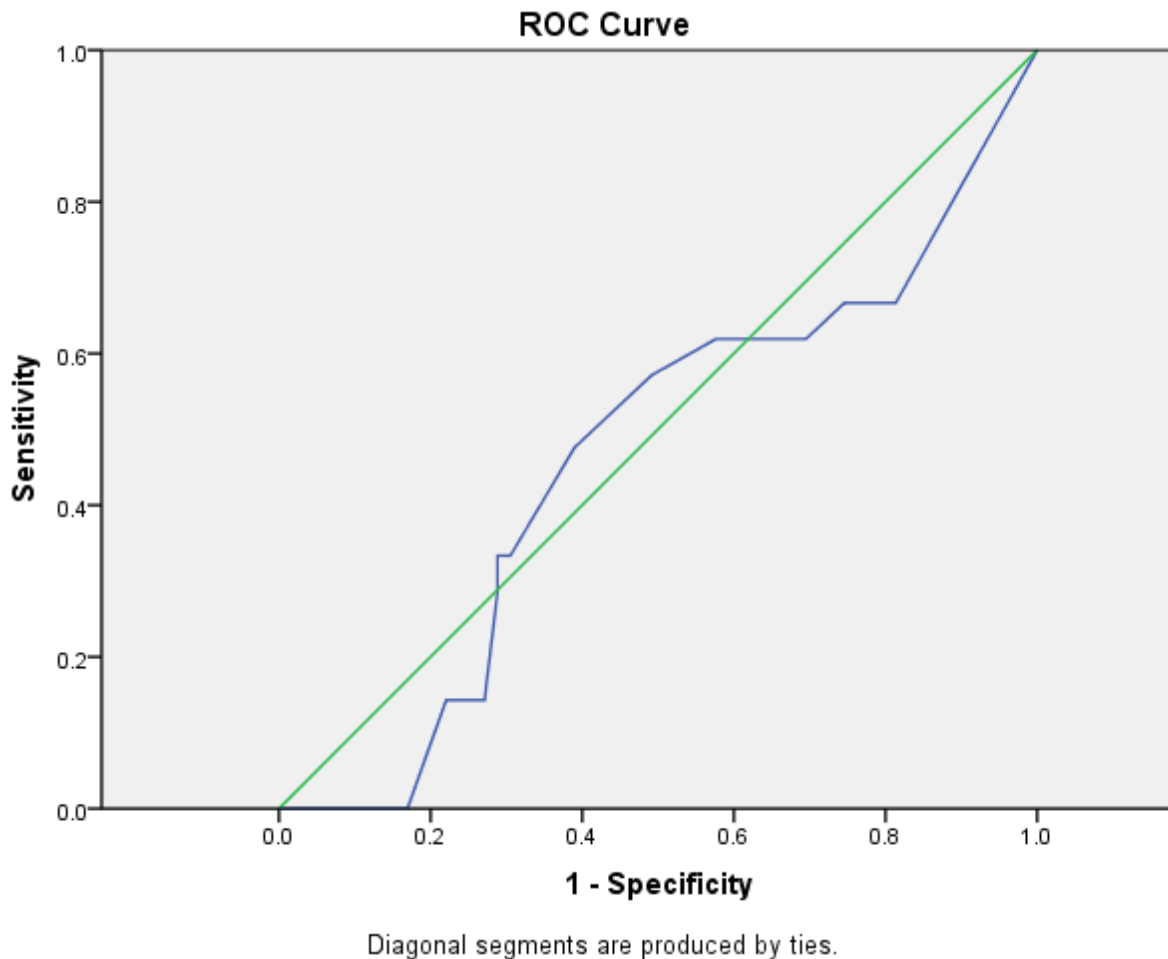
При имунохистохимичното изследване се установи експресия на gp130 в цитоплазмата на туморните клетки. Нивата на експресия оценихме с h-score скалата, като те варират от 0 до 300. На Фигура 26 е показана експресията на gp130 при low и high grade уротелни карциноми.



Фигура 26. Експресия на gp130 при low и high grade уротелни карциноми. А. Low grade уротелен карцином, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; Б. Липсва експресия на gp130 при low grade уротелен карцином, увеличение x100; В. High grade уротелен карцином, оцветяване с ХЕ, увеличение x100; Г. Интензивна цитоплазмена експресия на gp130 при high grade уротелен карцином, увеличение x100

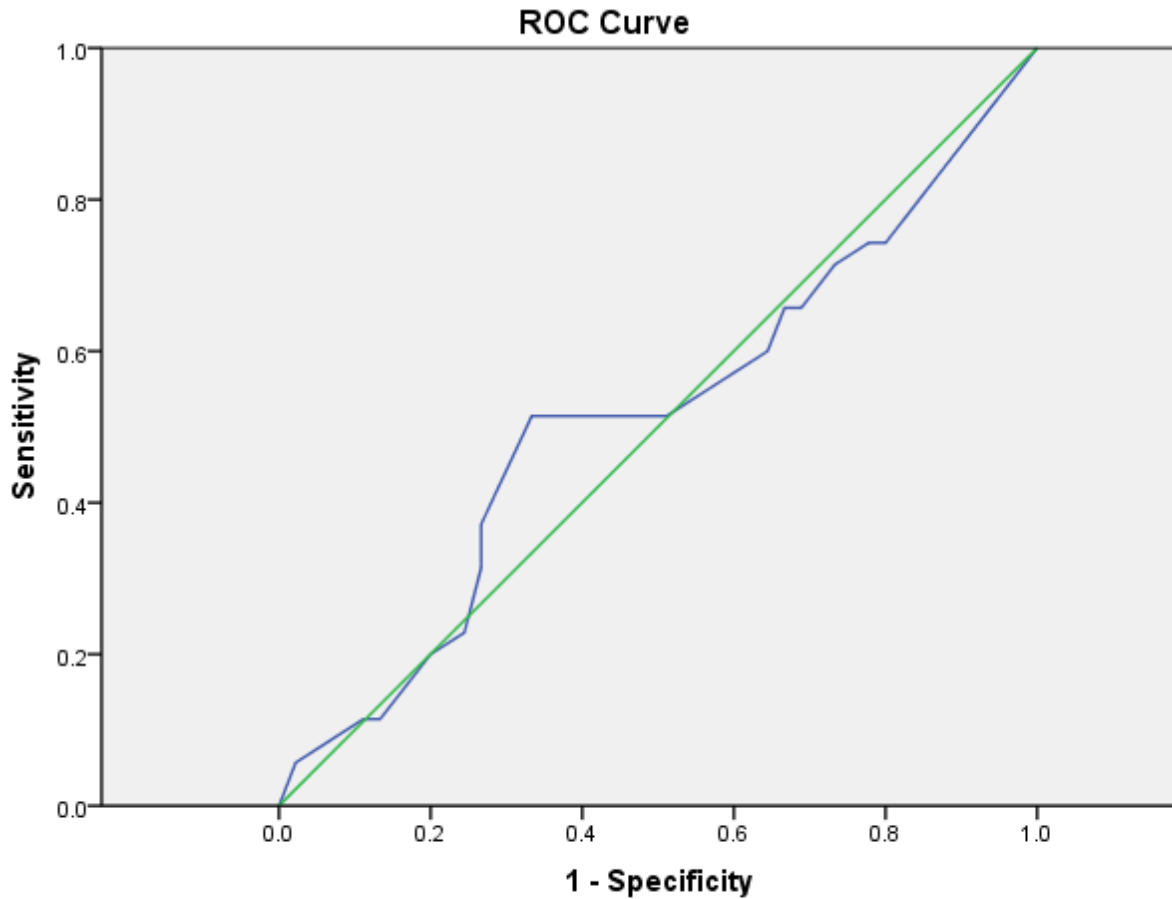
Експресията на gp130 се различава в двете групи уротелни карциноми с различна степен на диференциация – low и high grade, стадий (pT) и настъпването на локален рецидив. С помощта на ROC Curve анализ определихме cut-off стойността, която ни помогна да разделим експресионните нива на gp130 на такива с ниска и с висока степен на експресия. За cut-off стойност на експресия на gp130 установихме 140.

Анализът показва, че при оптимални гранични стойности на цитоплазмена експресия gp130 от туморните клетки не се установява връзка между експресионните нива и стадия на уротелните карциноми (AUC = 0.465, 95% CI: 0.319-0.611, p = 0.634), (Фиг. 27).



Фигура 27. ROC Curve анализ и определяне на cut-off стойността за gp130 (AUC = 0.465, 95% CI: 0.319-0.611, p = 0.634)

Сравнявайки експресионните нива на gp130 и диференциацията на тумора, също не бе установена статистически значима разлика (AUC = 0.514, 95% CI: 0.383-0.645, p = 0.827), (Фиг. 28).



Diagonal segments are produced by ties.

Фигура 28. ROC Curve анализ и определяне на cut-off стойността за gp130 ($AUC = 0.514$, 95% CI: 0.383-0.645, $p = 0.827$)

От извършените статистически анализи не се установи връзка между експресията на gp130 и клинико-морфологичните показатели (пол, възраст и настъпване на локален рецидив) при статистически значимо $p < 0.05$.

V. ОБСЪЖДАНЕ

Една от най-характерните особености в биологичното поведение на уротелните карциноми на пикочния мехур е изключително високата честота на рецидивирание в сравнение с малигнените епителни тумори с друга локализация. Имайки предвид това, ние си поставихме за цел да проведем проучване върху пациенти с ендоскопски доказан уротелен карцином на пикочния мехур с проследяване в продължение на петгодишен период за евентуална поява на локален рецидив. Възможните механизми за настъпване на рецидивите се дължат на инкомплетна резекция или вторично имплантиране. По-съществени са тези рецидиви, които представляват растеж на микроскопски тумори, невидими при първоначалното изследване или *de novo* поява на тумора. В биопсичните фишове от проведеното от нас изследване не бяха посочени достатъчно информативни клинични данни, които да ни позволят да разпределим рецидивиращите карциноми в подгрупи по този показател. Допускаме, че случаите в нашето проучване са предимно от първата и третата група (инкомплетна резекция и неустановени при биопсирането), защото при ендоскопското биопсиране възможността за имплантация е малка, а *de novo* туморите се появяват значително по-късно (Bryan R *et al* 2010).

На основание липса или поява на рецидив обособихме две отделни групи пациенти, които сравнихме по отношение на клинично-морфологичните показатели. Тъй като особеностите на туморните клетки са обект на задълбочени проучвания, ние се съсредоточихме върху фактори, произтичащи и от туморната строма.

В нашето проучване са включени 163 пациенти на средна възраст 65.92 ± 11.06 години, като повечето от тях (63) са във възрастовата група 61-70 години, което съвпада с данни от GLOBOCAN, СЗО и Националния раков регистър на България. При сравняването на групите уротелни карциноми с

рецидивиращ и нерещидивиращ ход установихме, че средната възраст при пациентите с настъпил локален рецидив е 47.09 ± 11.31 години и 66.01 ± 10.96 години при пациентите с нерещидивиращи уротелни карциноми. Прави впечатление, че при рецидивиращите уротелни карциноми средната възраст е по-ниска, без установени статистически значими различия. Може да допуснем, че появата на рецидивиращите уротелни карциноми в по-ранна възраст се асоциира с вероятност за по-бързо прогресиране на заболяването.

Според Shi B *et al* 2008 продължителността на преживяване без рецидив намалява с увеличаване на възрастта. Това вероятно е така, защото ракът на пикочния мехур има тенденция да бъде добре диференциран при пациенти под 40 годишна възраст и в стадий pTa, за разлика от по-възрастната популация. В нашата група 14 пациенти (8,59%) на възраст под 50 години първоначално са диагностицирани с неинвазивен карцином, от които 7 пациенти (4,29%) са с настъпил рецидив (средна стойност на преживяемост 13,6 месеца до настъпване на рецидив). Пациентите, помлади от 50 години, са обикновено в стадий pTa и low grade на диференциация в сравнение с пациенти над 50 годишна възраст. Според нашето проучване броят на pT1 туморите, които носят по-голям риск от прогресия, е значително по-малък при по-младите пациенти.

Yossepowitch и Dalbagni посочват, че по-високата честота на high grade туморите при по-възрастните популации трябва да бъде тълкувана внимателно, тъй като системата за класификация на туморите е претърпяла няколко модификации през годините и съществува възможност за променливост на степента на диференциация в тези изследвания.

Възрастта и полът на пациентите нямат отношение към склонността за рецидивирание. Нашите резултати показват, че при едновременната съпоставка на стадия със степента на диференциация и в двете групи се установява висока достоверност, като по-склонни към рецидивирание са

уротелните карциноми в стадий Та, които са с ниска степен на диференциация (Chamssuddin A *et al* 2013).

Според получените резултати при 121 от пациентите (74.23%) уротелният карцином се е появил след 60 годишна възраст и съотношението мъже/жени е 3/1. Тези данни съвпадат с резултатите от литературата (Aliramaji A *et al* 2015, Flaiga T *et al* 2017). Анализът на тези данни в двете подбрани от нас групи показва, че между тях не се установява статистически значима разлика по отношение на възраст и пол.

Проучванията върху карциногенезата, прогресията и метастазирането на малигнените тумори за дълго време бяха съсредоточени върху туморния паренхим. Туморната строма (съединителната тъкан между туморните гнезда и в зоната на инвазивния ръб) бе възприемана механично като опора или пасивна бариера. Според концепцията за персонализирана медицина всяка структурна особеност и/или функционално взаимодействие биха послужили за оптимизиране на диагностиката, прецизиране на терапията с определяне на таргети за въздействие и подобряване на прогнозирането. Освен всички клетъчни и неклетъчни компоненти на съединителната тъкан, туморното микрообкръжение включва и други клетки с висока метаболитна активност. Докато участието на лимфоцити, макрофаги, полиморфонуклеари е обект на редица изследвания, то ролята на еозинофилите е по-слабо проучена и съобщенията по този въпрос в периодичната литература са дори противоречиви.

Към класическото разбиране за ролята на еозинофилите при алергични и паразитни заболявания през 80-те години на XX век в научния печат се появиха съобщения за ТАТЕ - наличието на еозинофилни левкоцити около и сред гнездата на туморния паренхим. ТАТЕ бе установена при почти всички туморни локализации.

При проведеното от нас изследване тумор-асоциираната тъканна еозинофилия е установена при 102 пациенти (62,58%). Висока

статистическа достоверност ($p < 0.001$) бе установена между плътността на еозинофилната инфилтрация в стромата и настъпването на туморен рецидив. Когато в стромата на уротелния карцином при първичната ендоскопска биопсия се установи висок брой еозинофили (с плътност над $5,17$ брой/ mm^2) се приема, че рискът от локален рецидив е изключително висок. Подобна зависимост установяват и Miyata Y *et al* 2015 при Tis на пикочния мехур. Като продължение на анализа на тази зависимост Kaplan-Meier кривите не показват връзка между броя на TATE и времето до настъпване на локален рецидив. Въпреки склонността за рецидиви, според ROC Curve анализа високостепенната TATE не се отразява и на общата преживяемост. Предполага се, че еозинофилната инфилтрация благоприятства рецидивираването, тъй като при дегранулацията на еозинофилните левкоцитни гранули се освобождават фактори (главен алкален и катионен протеин, еозинофилна пероксидаза, еозинофилен невротоксин и др.) (Filipović M *et al* 2001), които активират мастоцити, фибробласти, процеси като фагоцитоза, възпаление и уротелна увреда (Ogasawara H *et al* 2020, Holm-Bentzen 1989 M, Rosenberg H *et al* 1999) и като цяло модулират туморната микросреда.

Количествените изследвания на еозинофилните инфилтрати представляват интерес и са обект на продължаващи задълбочени изследвания както при нетуморни (Awad H *et al* 2020), така и при туморни процеси (Horiuchi K *et al* 1993, Alrawi S *et al* 2005, Said M *et al* 2005).

Наблюдението и оценката на мастоцитите в туморната строма показва, че те са разположени поединично, в малки групи или под формата на къси верижки. Установихме наличие на тумор-асоциирани тъканни мастоцити и в двете групи пациенти, съответно с нередидивиращ и рецидивиращ уротелен карцином. Прави впечатление, че абсолютният им брой и плътността им са значително по-ниски при нередидивиращите карциноми, като при тях максималната плътност достига до 9 клетки/ mm^2 ,

а при рецидивиращите - до 30.70 mm². Както полуколичественият, така и количественият с Mann–Whitney test анализ показва, че има значима разлика ($\chi^2=13.49$, $p=0.0001$) в броя на ТАТМ в стромата на първичните тумори при пациенти от двете групи. Същата зависимост бе потвърдена и от ROC curve анализа. Броят и плътността на мастоцитите обаче не са свързани с преживяемостта без настъпил локален рецидив. От кривите на Kaplan-Meier личи, че пациентите с висок брой мастоцити в стромата нямат значителни разлики в преживяемостта без настъпил локален рецидив в сравнение с тези, на които броят на мастоцитите е по-малък.

Няма задоволително обяснение за увеличения брой мастоцити в стромата на рецидивиращите карциноми. Посочените тук резултати и литературните данни не са в състояние да дадат отговор на съществен въпрос – дали мастоцитите стимулират рецидивирането, или са неуспешен опит за потискането му. От една страна стимулираните мастоцити имат антитуморен потенциал чрез директно активиране на цитотоксични лимфоцити (Nakae S *et al* 2006). От друга страна данните за влиянието им върху ангиогенезата са противоречиви. Смята се, че чрез няколко различни механизма мастоцитите стимулират ангиогенезата и дори се допуска, че именно те отключват “angiogenetic switch” (Norrby K 2002, Peltanova *et al* 2019).

Други автори предполагат, че при определени условия и локализации ТАТМ предизвикват апоптоза на ендотелните клетки (Heikkilä H *et al* 2008).

Друг изследван от нас прогностичен фактор от туморната строма е FGF2, който взаимодейства с широк спектър клетки от туморното микрообкръжение и с елементи на екстрацелуларния матрикс. FGF2 притежава висок митогенен потенциал и участва в редица биологични процеси, включително туморен растеж и инвазия. Фактът, че той модулира ролята на еозинофилни и мастни клетки, както и други имунни клетки, го прави изключително важен фактор в прогресията на уротелните карциноми.

Неговият рецептор (FGFR3) показва мутации и свръхекспресия в голяма част от уротелните карциноми и дори представлява таргет за терапия с тирозин-киназни и нхибитори (Gust K *et al* 2013).

При проведеното от нас изследване позитивна експресия на FGF2 бе установена имунохистохимично в цитоплазмата на фибробластите в стромата на тумора и около тумора, както и в цитоплазмата на ендотелните клетки от кръвоносните съдове. В настоящото проучване не се установи зависимост между FGF2 и диференциацията/рецидивите на уротелните карциноми, а само връзка с инвазивността им.

Не се установи зависимост между експресията на FGF2 и изследваните клинично-патологични показатели (пол, възраст, диференциация и настъпване на локален рецидив) при статистически значимо $p < 0.05$. ROC curve анализът показва, че високите нива на експресия на FGF2 в стромата съответстват на нисък потенциал за субмукозна инвазия при висока статистическа значимост ($p < 0.0001$). С подобно значение за инвазивността на уротелния карцином е и експресията на CD10 – мембранен металопротеин с много противоречива роля за биологичното поведение на карциноми с различна локализация. Предишно наше изследване върху друга група уротелни карциноми на пикочния мехур показва позитивна CD10 експресия в инвазиращите в подлежащата гладка мускулатура тумори, докато в неинвазивните експресия не бе установена (Popov H *et al* 2015). CD10 инактивира редица фактори от ЕСМ, като разцепва аминоктерминалите на пептидни връзки и улеснява туморната прогресия. Конкретно за FGF се смята, че участва в блокирането на FGF-медираната ангиогенеза (Mishra D *et al* 2016).

Участието на стромата в карциногенезата и прогресията на малигнените тумори далеч не се изчерпва с получените резултати и коментиранияте данни от литературата. Като се има предвид бързото развитие на технологиите и навлизането им в биологичните науки и

медицинската практика е логично да се очакват нови предизвикателства. Например конфокална лазерна ендомикроскопия осигурява в реално време хистологичен образ на живи човешки тъкани в дълбочина около 60 μm . В интерстициума на субмукозите (включително и на пикочния мехур) този метод за първи път установява синусоидни структури, изпълнени с течност, за които се допуска, че играят роля в процеси като инвазия и разпространение на малигнени тумори (Benias P *et al* 2018).

GATA3 е транскрипционен фактор, който с последователности в ДНК регулира клетъчната диференциация и пролиферация, но неговата роля в туморогенезата все още не е изяснена. Автори като (Gulbinas A *et al* 2006, Engelsen I *et al* 2008), проследявайки експресията на GATA3 в някои тумори (панкреас, ендометриален карцином и др.), стигат до извода, че повишените експресионни нива на GATA3 имат негативна роля по отношение на степента на диференциация, стадия и прогнозата за развитието на тумора. Има обаче автори, които свързват по-благоприятния биологичен ход на тумори (например невробластом) с високите експресионни нива на GATA3 (Hoene V *et al* 2009). Имунохистохимичната експресия на GATA3 е широко използвана като полезен маркер за уротелна диференциация. В настоящото проучване ние определихме нивата на ядрена експресия на GATA3 от туморните клетки, които варират значително при пациенти с папиларен уротелен карцином на пикочния мехур. Не се установи връзка между експресията на GATA3 и изследваните клинично-патологични показатели (пол, възраст, диференциация и стадий) при статистически значимо $p < 0.05$. ROC curve анализът обаче показва, че високите нива на експресия на GATA3 намаляват или липсват при нередицивиращите карциноми, докато при рецидивиращите тя е интензивна при статистически значимо $p < 0.001$. Zheng Y *et al* 2012 и McConkey D *et al* 2009 обсъждат вероятността експресията на GATA3 да е свързана и с епително-мезенхимната трансформация, което предполага по-висока склонност към инвазия и метастазиране на уротелния

карцином. С този механизъм може да се обясни и ролята на GATA3 в настъпването на локален рецидив. Според други автори Li Y *et al* 2014 по-ниските нива на експресия на GATA3 се свързват с уротелни карциноми с high grade на диференциация и по-висока склонност към инвазия. Нашите резултати не доказват такава връзка.

Тези резултати могат да бъдат обяснени с различните хистогенеза и регулаторни механизми на туморите, свързани с експресията на GATA3 от туморните клетки и участието ѝ в епително-мезенхимната трансформация на туморната среда.

Нашето внимание бе насочено и към цитокератините, които са интермедиерни филаменти, характерни за цитоплазмата на епителните клетки. Преходният епител или уротелът на пикочните пътища показва промени в експресията и конфигурацията на CK20, свързани със стратификация и диференциация.

Позитивна експресия на CK20 наблюдавахме в цитоплазмата на клетките от уротелните карциноми. Не се установи връзка между експресията на CK20 и изследваните клинично-патологични показатели (пол, възраст, стадий и настъпване на локален рецидив) при статистически значимо $p < 0.05$. ROC curve анализът показва статистически значима разлика между low и high grade на диференциация на уротелните карциноми. При high grade туморите нивото на експресия на CK20 значително намалява по интензитет и площ от туморната тъкан, дори се забелязва тенденция към нейната загуба.

Проучвания на други автори показват, че експресията на CK20 до голяма степен е свързана с времето до настъпване на рецидив (Bertz S *et al* 2012). Нашите резултати не показаха статистически значима връзка между експресионните нива на CK20 и времето до настъпване на рецидив.

Автори като Desai S *et al*, оценявайки експресията на CK20 върху 42 low grade и 62 high grade уротелни карциноми, установяват, че тя е свързана

с high grade карциномите и стадия на тумора. За разлика от тях ние установихме връзка между високите нива на експресия и low grade диференциацията на уротелния карцином, като в същото време липсва такава връзка между експресията на CK20 и стадия на тумора.

Въпреки обширните проучвания относно ролята на CK20 експресията при уротелните карциноми става ясно, че има много разминавания и различия по отношение на тълкуването ѝ. Това ни дава основание да предположим, че тя варира при уротелните карциноми и CK20 не може да бъде категоричен диагностичен, прогностичен и предиктивен маркер за тумори с уротелен произход.

Ролята на gp130 при уротелния карцином на пикочния мехур не е достатъчно добре изяснена. Според Omokehinde T *et al* 2020 gp130 регулира широк спектър от процеси, които засягат включително туморната патогенеза и метастазирането. Автори като Xu S *et al* 2013 приемат, че gp130 може да има роля в инициацията на уротелния карцином посредством коекспресията с гени, стимулиращи пролиферацията на туморните клетки.

Martin D *et al* 2019, оценявайки експресията на gp130, Vcl-xL и VEGFR2 върху 11 уротелни карцинома докават, че тя е свързана с агресивността на тумора. По-специално експресията на gp130 значително корелира със степента на диференциация на тумора, нодалния статус и преживяемостта на пациентите. Същите автори отбелязват ниска експресия на gp130 главно при неагресивни папиларни тумори на пикочния мехур, докато високите нива корелират със злокачествени тумори с лоша прогноза. В настоящото изследване не установихме такава връзка, което може да се обясни с факта, че броят на изследваните от нас пациенти е по-голям и значимостта на изследването съответно е по-голяма. Установената позитивна експресия на gp130 в цитоплазмата на туморните клетки на карциномите не показва връзка с изследваните от нас клинично-патологични

показатели (пол, възраст, диференциация, стадий и настъпване на локален рецидив) при статистически значимо $p < 0.05$.

Въпреки данните от литературата и проведените до сега изследвания, все още има неясноти по отношение на механизмите и етапите на тяхното действие в туморогенезата.

По-доброто разбиране на сигналните пътища и поведението на туморните клетки, заобикалящата ги микросреда и взаимодействието между тях биха дали познания за механизмите, отговорни за стимулирането и/или инхибирането на туморогенезата. Има големи надежди, че изясняването на тези механизми може да доведе до разработването на нови терапевтични таргетни мишени с оглед предотвратяване както на появата и прогресията на тумора, така и на рецидивираването му.

При обобщението на резултатите, получени при изследването на 163 пациенти с уротелен карцином в стадий pTa и pT1, се установиха данни, потвърждаващи от една страна тези от литературата, а от друга - изясниха някои нови обстоятелства, имащи отношение към прогресията на уротелния карцином. Доказахме, че увеличеният брой на еозинофили и мастоцити в стромата, както и позитивната експресия на GATA3 са белези в първичния тумор, които статистически предопределят по-висок риск за по-ранно локално рецидивирање. Статистически значима връзка се установи и между експресията на FGF2 и инвазивността на карцинома.

Въз основа на тези закономерности бихме могли да предложим общ профил на рецидивирация уротелен карцином, който включва следните критерии:

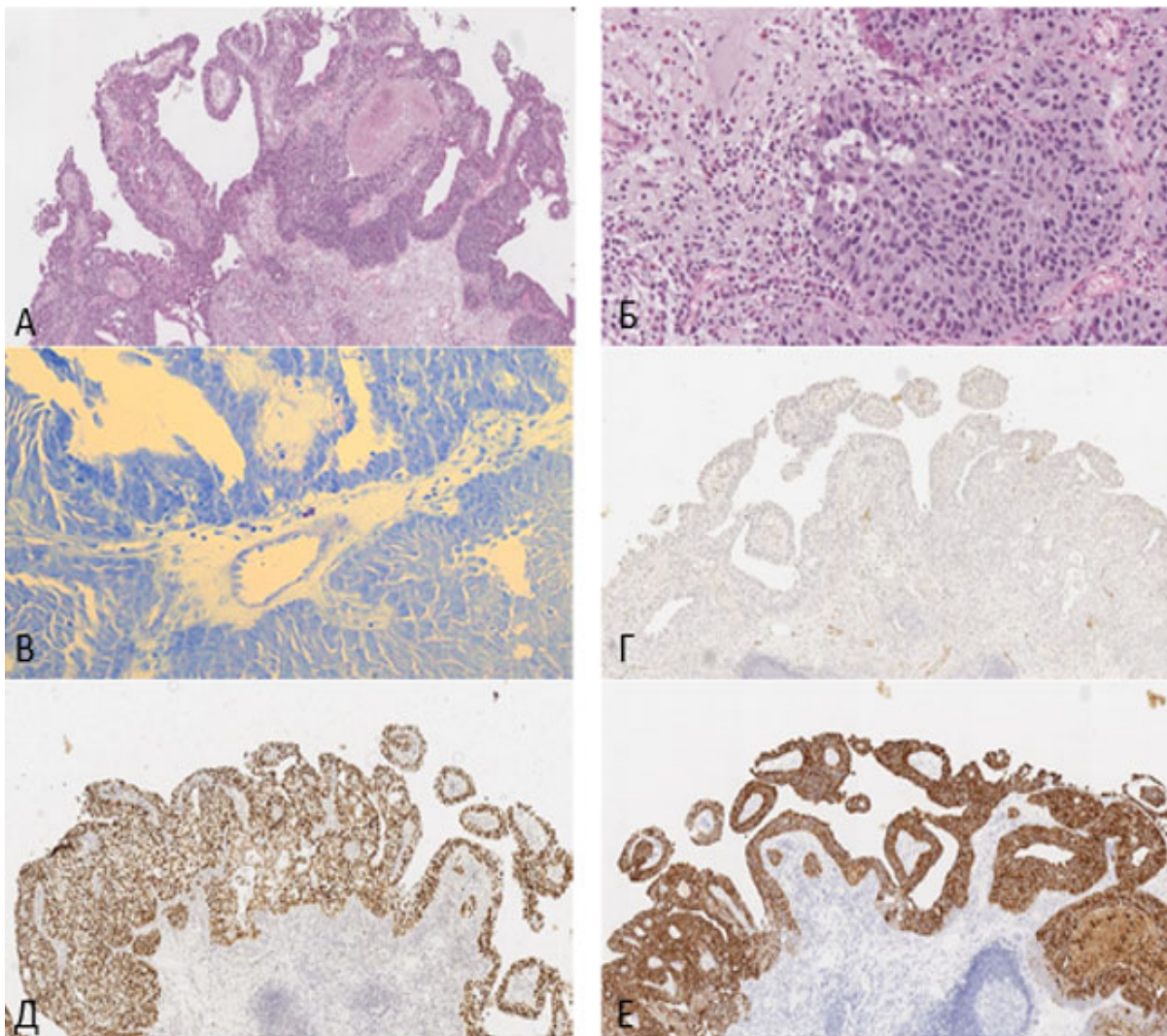
1. Първостепенни критерии:
 - тумор в стадий pT1
 - high grade степен на диференциация (CK20)
 - еозинофилни левкоцити над $5/\text{mm}^2$ на голямо увеличение
 - мастоцити над $4/\text{mm}^2$ на голямо увеличение

2. Допълнителни критерии:

- пациент над 60 години
- ядрена експресия на GATA3 в туморните клетки (h-score>155),

съответстваща приблизително на интензитет 2+ и експресия в около 50% от туморните клетки

На фигура №29 е представен морфологичният вариант на този профил.



Фигура 29. Хистологичен, хистохимичен и имунохистохимичен профил на рецидивирания уротелен карцином; А. High grade уротелен карцином, оцветяване с ХЕ, увеличение x40; Б. High grade уротелен карцином с TATE повече от 5/мм², оцветяване с ХЕ, увеличение x200; В. High grade уротелен карцином с TAMT повече от 4мм², оцветяване с Гимза, увеличение x200; Г. Липсва експресия на FGF2 при high grade уротелен карцином, увеличение x40; Д. Интензивна ядрена експресия на GATA3 при high grade уротелен карцином, увеличение x40; Е. Интензивна цитоплазмена експресия на CK20 при high grade уротелен карцином, увеличение x40

Отчитайки горепосочените критерии, морфологичната преценка на всеки бъдещ индивидуален случай ще позволи в окончателната биопсична диагноза да бъде вписан високият риск за рецидивирание. Това ще бъде още един критерий в стремежа за максимално индивидуализиране на терапията при онкологичния пациент и ще се отрази на клиничното му проследяване и своевременно установяване новата поява на рецидив.

VI. ИЗВОДИ

1. Настъпването на локалния рецидив при уротелните карциноми в стадий pT1 е много по-рано в сравнение с тези в стадий pTa.
2. Вероятността за локален рецидив статистически доказано е по-голяма при уротелните карциноми с high grade на диференциация.
3. Времето до настъпване на локален рецидив е много по-кратко при пациентите с уротелен карцином с high grade диференциация.
4. Наличието и плътността на TATE и броят на мастоцитите в стромата на уротелния карцином корелират позитивно, с висока степен на статистическа значимост ($p < 0.001$) с повишения риск от локален рецидив, но не могат да определят времето до неговото настъпване.
5. Високите нива на цитоплазмена експресия на FGF2 от стромата на тумора са предпоставка за намален риск от инфилтративен растеж в субмукозата.
6. Високите нива на експресия на ядрена GATA3 в туморните клетки корелират с по-висок риск от настъпване на локален рецидив, но не могат да определят времето до настъпването му.
7. Нивата на цитоплазмена експресия на CK20 в туморните клетки корелират с low grade диференциация на уротелните карциноми.
8. Нивата на експресия на gp130 не корелират с клиничко-морфологичните показатели.

VII. ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер:

1. Направена е морфологична оценка на голяма група уротелни карциноми, интерполирани спрямо склонността към локален рецидив.
2. Доказана е зависимостта между плътността на ТАТЕ, мастоцитите и настъпването на локален рецидив.
3. **Предложен е примерен морфологичен профил на рецидивирания уротелен карцином.**

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдена е връзката между стадия (pT), high grade на диференциация и по-ранното настъпване на локален рецидив.
2. Потвърдено е значението на еспресията на FGF2 и стадия (pT)/инвазивност.

Научно-приложни приноси:

1. Позитивната експресия на CK20 не може да бъде използвана като категоричен хистогенетичен маркер.
2. Потвърдена е връзката между експресията на CK20 и low grade на диференциация.
3. Експресията на GATA3 от уротелните тумори се свързва с настъпването на локален рецидив, но не може да бъде категоричен хистогенетичен маркер за уротелен произход на тумора.

VIII. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в научни списания:

1. **Роров Н**, Ghenev P. Comparative analysis of relapsing bladder urothelial cancer. *Acta morphologica et anthropologica*. 2012; 192-195.
2. **Роров Н**, Ghenev H. Expression of CD10 as a prognostic and predictive factor in urothelial carcinomas. *Trakia Journal of Sciences*. 2015, vol. 13, suppl. 2, pp 144-146.
3. **Роров Н**, Donev IS, Ghenev P. Quantitative analysis of tumor – associated tissue eosinophilia in recurring bladder cancer. *Cureus*. 2018; 10(9): e3279.

Участие в научни форуми:

1. **Попов Х**, Генов П. Сравнително морфометрично проучване на тумор асоциираните тъканни мастоцити при рецидивиращи уротелни карциноми на пикочен мехур. XI Национален конгрес по патология, Шумен, 16-18 май 2013, 43-44 стр.
2. **Попов Х**, Генов П. Микроскопски особености на редки варианти на уротелните карциноми. XI Национален конгрес по патология, Шумен, 16-18 май 2013, 46 стр.

Благодарност

През годините работа върху този проблем ми помагаша и подкрепяха много хора.

Преди всичко моите благодарности са отправени към научния ми ръководител.

Проф. д-р Петър Генов, освен че ме научи на основите на патологията, ме подкрепяше през цялото време с безкрайното си търпение, строгостта си на учител и с обичта си на приятел, както и настойчивостта му през годините ми помогна в трудни за мен моменти.

На проф. д-р Мария Цанева благодаря за искрената загриженост, с която ми помагаше, нейните полезни съвети и консултации по всякакви проблеми бяха винаги навременни.

На доц. д-р Екатерина Софтова благодаря за всички градивни критики и препоръки при многобройните обсъждания.

Благодаря на д-р Ина Кобакова за помощта и ежедневната подкрепа.

Благодаря на колегите за тяхната любезност и отзивчивост.

Благодарен съм и на лаборантите в Клиниката, които положиха усилия да срежат и оцветят многобройните препарати.

Благодаря на лаборант Велина Кеновска, която направи всичките имунохистохимични оцветявания.

Благодаря на Силвия Павлова отдели много време, за да ми помогне със статистическата обработка на данните.

Благодаря на Татяна Пенчева за отзивчивостта, с която помогна за стилистичната обработка на дисертационния труд.

Благодаря на моето семейство за проявеното разбиране и съпричастността през последните месеци и години.

Predictive and prognostic morphological factors in urothelial carcinoma of the urinary bladder

The carcinoma of the urinary bladder is an extremely insidious neoplasm with a marked recurrency potential. The aim of the present study is to analyse and compare the clinico-morphological and immunohistochemical characteristics of the urothelial carcinoma of the urinary bladder in order to find features, which appear to be prognostic and/or predictive. We have separated our patients into two groups of recurrent and non recurrent tumors.

We have established a relation between the tumor stage, the tumor differentiation and the time to recurrence. According to our results, the higher the number of the tumor associated tissue eosinophils and mast cells in the tumor stroma and the stronger the positive expression of GATA3, the higher the risk of local recurrence. There is also a statistically significant relation– intensive FGF2 expression is associated with minor potential for cancer submucosal invasion. The expression of gp130 did not correlate with any of the clinico-morphological characteristics. Based on our results, we suggest a profile of the patient at higher risk for recurrence of urothelial bladder cancer. Thus in the final biopsy a reliable prognosis for the risk of recurrence could be included.