



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ОНКОЛОГИЯ**

Д-р Маргарита Красенова Манева

**Предиктивна и прогностична стойност на маркер за
некроптоза – RIPK3 при пациенти с карцином на дебелото
черво в метастатичен стадий**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научен ръководител:

Доц. д-р Елеонора Георгиева Димитрова-Господинова, д.м.

Рецензенти:

Проф. д-р Красимир Димитров Иванов, д.м.н.

Доц. Желязко Илиев Арабаджиев, д.м.

Варна, 2022г.

Дисертационният труд съдържа 102 стандартни страници и е онагледен с 15 таблици и 20 фигури. Литературната справка включва 227 литературни източника, от които 227 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на Катедрен съвет по „Онкология“ на МУ-Варна и решение на ФС съгласно заповед на Ректора на МУ-Варна е избрано следното научно жури в състав:

Външни членове:

Проф. д-р Жасмина Михайлова Миланова, д.м.

Доц. Желязко Илиев Арабаджиев, д.м.

Проф. д-р Петранка Троянова, д.м.

Вътрешни членове:

Проф. д-р Красимир Димитров Иванов, д.м.н.

Доц. Д-р Николай Владимиров Цонев, д.м.

Резервен външен член:

Проф. Христо Благов Цеков, д.м.

Резервен вътрешен член:

Проф. д-р Росен Евгениев Маджов, д.м.н.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 26.05.2022г. от ч. във виртуална зала на електронната платформа Blackboard към МУ-Варна

СЪДЪРЖАНИЕ

- 1. Използвани съкращения / 5**
- 2. Въведение / 6**
- 3. Цел и задачи на дисертационния труд / 8**
 - 3.1 Цел на изследването / 8
 - 3.2 Задачи / 8
- 4. Материали и методи / 9**
 - 4.1 Материална база за реализиране на на дисертационния труд / 9
 - 4.2 Пациентска популация / 9
 - 4.3 Медицинска история на пациентите /10
 - 4.4 Рутинни клинични изследвания и биологични маркери / 3
 - 4.5 Специфични методи на изследване / 13
 - 4.6 Вид и продължителност на лечение / 15
 - 4.7 Образна оценка на терапевтичния отговор / 17
 - 4.8 Статистически дизайн и анализ / 18
- 5. Резултати / 20**
 - 5.1. Клинична и патологична характеристика на пациентите / 20
 - 5.2. Връзка между експресията на RIPK3 и клинично-патологичните характеристики / 25
 - 5.3. Прогностична стойност на степента на диференциация / 27

*5.4. Влияние на експресията на RIPK3 върху общата
преживяемост и преживяемостта без прогресия / 28*

6. Дискусия / 33

7. Заключение / 38

8. Изводи / 39

9. Приноси на дисертационния труд / 40

10. Научни публикации свързани с дисертационния труд / 41

1. Използвани съкращения

5-FU – 5-fluorouracil

AJCC - American Joint Committee on Cancer

CEA - карциноембрионален антиген

ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group

KRAS - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MLKL - смесен линеен киназен домейн

PET/CT - Positron emission tomography–computed tomography

RIPK1 – receptor-interacting protein kinase 1

RIPK3 - receptor-interacting protein kinase 3

КРК – колоректален рак

КТ – компютърна томография

ПКК – периферна кръвна картина

2. Въведение

Колоректалният карцином (КРК) е третият по честота солиден тумор в световен мащаб и една от водещите причини за смърт от онкологични заболявания и при двата пола. Докато оперативното лечение остава основен терапевтичен подход при пациенти с КРК в ранен стадий (I-II), то химиотерапията е опция на първи избор при метастатична или нерезектабилна болест (IV стадий).

При около 2/3 от пациентите с КРК се развиват далечни метастази, като черният дроб е най-често срещаното метастатично огнище. Около 15-25% от пациентите с КРК са с налични вторични лезии още към момента на диагнозата, докато други 18-25% от тях развиват далечни метастази до 5 години от поставянето ѝ. 5-fluorouracil (5-FU), синтетичен пиримидинов аналог, е стандартно използваният химиотерапевтичен медикамент за авансирал КРК и в комбинация с други агенти, постига първоначални нива на отговор от 40-50%.

През последните 50 години, въпреки многобройните предимства на 5-FU, клиничните му приложения са силно ограничени поради наличната лекарствена резистентност. С появата на ефективна системна химиотерапия, съчетана с биологични агенти, откриването на нови прогностични и предиктивни фактори, подпомагащи по-доброто разбиране на биологичното поведение на тумора, предвиждане ефекта от прилаганата химиотерапия, както и по-ранната диагноза, се наблюдава значително подобрение на 5-годишната преживяемост при пациенти с авансирало метастатично заболяване.

Клетъчната смърт чрез апоптоза е естествена бариера за развитието на карцином, тъй като ограничава неконтролираната пролиферация, индуцирана от онкогени. През последните години все по-голям брой проучвания показват, че съществуват и други

генетично програмирани видове клетъчна смърт, различни от апоптоза. Такъв вид е некроптозата – процес, строго регулиран от различни молекули и съчетаващ морфологични характеристики както на некроза, така и на възпаление.

Некроптозата е новооткрит път на регулирана апоптоза, чието действие изисква участието на рецептор-взаимодействащите протеин кинази 1 и 3 (RIPK1 и RIPK3), както и смесения линейен киназен домейн (MLKL). Тъй като некроптозата все повече се счита за важен процес в патогенезата на рака, по-задълбочено разбиране на механизмите на некроптозата е от съществено значение за разработването на нови подходи за регулирането ѝ при неопластични процеси.

Резистентността към апоптоза е до голяма степен основен фактор, водещ до неуспех на химиотерапията по време на лечението. Заобикалянето на апоптотичния път за индуциране на смърт на ракови клетки се счита за обещаващ подход за преодоляване на този проблем. Некроптозата е регулирана некротична клетъчна смърт по каспаза-независим начин и служи като алтернативен начин на програмирана клетъчна смърт, преодоляваща резистентността към апоптоза, засилвайки антитуморния имунитет при лечение на карцином.

Резистентността към 5-FU базирана химиотерапия е ключово предизвикателство при лечението на пациенти с мКРК и са необходими нови целеви подходи за подобряване на терапевтичните резултати. По тази причина откриването на нови предиктивни и прогностични маркери е от съществена важност за подобряване резултатите от лечението при пациенти с метастазирал дебелочревен карцином.

3. Цел и задачи на дисертационния труд

3.1. Цел на изследването

Цел на изследването е да се потърси корелация между експресията на RPK3 в първичния тумор при пациенти с карцином на дебелото черво в метастатичен стадий и някои клинично-патологични характеристики - пол, възраст, степен на туморна диференциация, KRAS мутационния статус, връзката ѝ с биологичното поведение на тумора, както и с преживяемостта без прогресия и общата преживяемост.

3.2. Задачи на изследването

1. Селектиране на болни с карцином на колона в метастатичен стадий.
2. Сравнително да се проучат нивата на имунохистохимична експресия на RPK3 в първичния тумор на пациенти с карцином на колона.
3. Да се анализират корелациите между имунохистохимичните нива на експресия на RPK3 с клинично-патологичните характеристики на болните с карцином на колона.
4. Да се анализира предиктивната възможност на експресията на RPK3 в първичния тумор за отговор към 5-FU базирана първа линия химиотерапия.
5. Да се анализира прогностичния потенциал на експресията на RPK3 в първичния тумор по отношение на преживяемостта на болните без прогресия и общата преживяемост.

4. Материали и методи

4.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

1. Клиника по медицинска онкология към УМБАЛ „Света Марина“ – гр. Варна
2. Лаборатория по Клинична имунология към Катедра по медицинска генетика
3. Медицински Университет и Университетска болница “Света Марина” – Варна

4.2 Пациентска популация

Проведохме ретроспективно неинтервенционално едноцентрово клинично изпитване, в което бяха разгледани случаите на 74 пациенти с нерезектабилен, метастатичен карцином на дебело черво. В изследването бяха включени пациенти, лекувани с първа линия 5-FU базирана химиотерапия в периода януари 2012г. до декември 2015г. в нашата университетска болница „Света Марина“. Всички те са стадираны с СТ или PET/СТ преди започване на лечението. Част от пациентите са получавали химиотерапия в адювантен аспект. Пърформанс/ЕСОГ статусът на пациентите е оценен на < 2 (Приложение). Всички от тях отговаряха на включващите критерии и няма изключващи критерии.

Включващи критерии:

1. Пациенти над 18 години
2. Хистологично доказан карцином на дебело черво

3. Пациенти в IV клиничен стадий – нерезектабилен или метастатичен КРК
4. Провели I линия химиотерапия с 5-FU базирана химиотерапия в УМБАЛ „Света Марина“ – гр. Варна за своето метастатично заболяване
5. ECOG PS – пърформанс статус < или = 2
6. Стойности на някои лабораторни показатели като ПКК, бъбречна и чернодробна функция в референтни граници

Исключващи критерии:

1. Пациенти в увредено общо състояние - ECOG (PS) над 2 според AJCC
2. Радикално оперирани пациенти без наличие на вторични лезии /адювантни/
3. Тежки и неконтролирани придружаващи заболявания
4. Сериозни отклонения от лабораторните показатели

4.3. Медицинска история на пациентите

За всеки пациент в изпитването е създадено отделно медицинско досие, включващо следната информация, където е била налична:

Демографски данни

Имена (Инициали):

ID номер/дата на раждане:

Възраст:

Пол: мъж/жена

Медицинска история

Пърформанс статус/ECOG: Общото състояние на всеки пациент според ECOG е оценено изходно като 0, 1 или 2 (Таблица 1)

Придружаващи болести:

Информация за онкологичната болест

Клинична диагноза: локализация на първичния тумор, TNM стадиране (Таблица), степен на диференциация

Дата на операция /ако е била осъществена такава/

Хистологичен резултат: номер, дата, брой парафинови блокчета

Локализация на първичния тумор:

Локализация на далечни метастази:

Молекулярно-патологичен анализ на RAS:

Дата на започване на системната химиотерапия от I линия:

Вид на системната химиотерапия

Изходни и контролни образни изследвания: КТ, ПЕТ/КТ, оценка по RECIST 1.1

Време свободно от болест

Обща преживяемост

Таблица 1. Оценка на общо състояние според скалата на Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

Степен	ECOG /PS/ пърформанс статус
0	Пациентът е активен, в състояние да извършва обичайните си физически дейности преди болестта, без да е ограничен
1	Съществуват ограничения във физическа активност, но пациентът има възможност за извършване на лека, ненатоварваща или седяща работа
2	Пациентът е амбулаторен и може да се грижи за себе си, но е неспособен да извършва трудова дейност. Прекарва > 50% от времето, в което е буден, в изправено състояние
3	Пациентът е способен само на ограничено самообслужване. Прекарва > 50% от времето, през което е буден, в леглото или на стола
4	Пациентът е напълно неспособен да осъществява самостоятелни грижи за себе си, напълно ограничен до леглото или стола
5	Смърт

4.4. Рутинни клинични изследвания и биологични маркери

Предварително бяха дефинирани необходимите параметри, които бяха проследени ретроспективно в рамките на изпитването.

1. Хематологични, биохимични резултати и стойности на СЕА от проведените рутинни изследвания.

2. Образна диагностика – изходни проведени КТ или PET/СТ, както е регулярни такива по време на системната терапия за оценка на лечението.

3. Туморно блокче от първичния тумор за хистологично изследване: фиксация в неутрален формалин, включване в парафинни блокчета, стандартно оцветяване с хематоксилин-еозин и оцветяване за оценка на туморна експресия на RIPK3.

4.5. Специфични методи на изследване

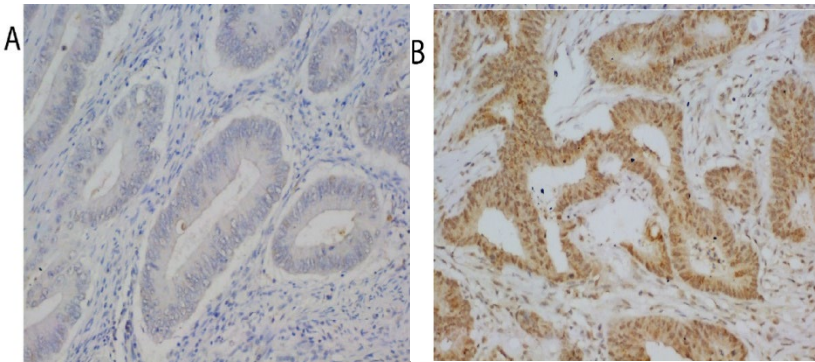
Подготовка на биопсичните материали за провеждане на имунохистохимично изследване

Проби от първичен аденокарцином на дебелото черво от 74 пациенти са изследвани в отделенията по клинична патология на УМБАЛ „Света Марина“. От парафиновите блокове са изрязани пет микрометрови участъци, които са поставени върху предметни стъкла. Участъците са депарафинизирани с ксилен и дехидратирани в градуирана серия от етанол. Извличането на антиген е извършено в предварително загрят EnVision FLEX Target Retrieval Solution (работен разтвор) в PT Link резервоари и са инкубирани в продължение на 30 минути при 97°C с pH=9. След охлаждане, предметните стъкла са поставени в разреден

FLEX промивен буфер със стайна температура (20x) за 1-5 минути. Пробите са тествани с рекомбинантно заешко поликлонално антитяло срещу RIPK3 (ABCAM's RabMab технология ab56164). Антитялото (Anti-RIPK3, разрежено 1:100) се инкубира в продължение на 20 минути. Откриването на нивата на експресия на RIPK3 е постигнато чрез използване на UltraVision система за откриване Anti-polyvalent, HRP/DAV. Накрая, реакцията се визуализира със субстрат-хромоген (DAV, диаминобензидин) реагент. Противооцветяването е извършено с помощта на хематоксилин на Mayer за оценка на имунооцветяването, цифровите изображения са получени с помощта на устройството Leica Aperio ScanScore AT2 (Aperio Technologies, Vista, CA).

Определяне нивата на експресия на RIPK3 и интерпретация на резултатите

Имунохистохимичната експресия на RIPK3 бе оценена чрез използване на H-score (histo-score) върху тъканните проби. 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: $[1x (\% \text{ клетки с } 1+) + 2x (\% \text{ клетки с } 2+) + 3x (\% \text{ клетки с } 3+)]$, в диапазон от 0 до 300. H-score бе използван и за оценка на ядрената експресия на RIPK3. Резултатът бе получен по формулата: $[1x (\% \text{ на слабо позитивни ядра } 1+) + 2x (\% \text{ умерено оцветени ядра } 2+) + 3x (\% \text{ на силно позитивни ядра } 3+)]$, в диапазон от 0 до 300. Средната стойност бе използвана за оценка на експресията на RIP3 групиране на пациентите в две категории от ниска и висока експресия (Фигура 1).



Фигура 1. Имунохистохимично оцветяване на RIPK3 в човешки карциноми на дебелото черво (20x увеличение) А - пациент с ниска експресия на RIPK3. В - пациент с висока експресия на RIPK3.

Определяне на RAS мутационен статус

За изследване на RAS мутационния статус на изследваните проби тъканните проби с дебелина 5 μm от парафиновите блокчета, които бяха подложени на депарафинизация. ДНК бе екстрахирана от вградената във формалин, фиксирана в парафин тъкан, след което изолираната ДНК бе изследвана за наличието на мутации във 2, 3 и 4 екзон на KRAS гена чрез алел-специфичен апарат за количествен PCR базиран анализ в реално време - Real-Time qPCR System (7500 ABI PRISM, Applied Biosystems, USA) в Национална генетична лаборатория – София.

4.6. Вид и продължителност на лечение

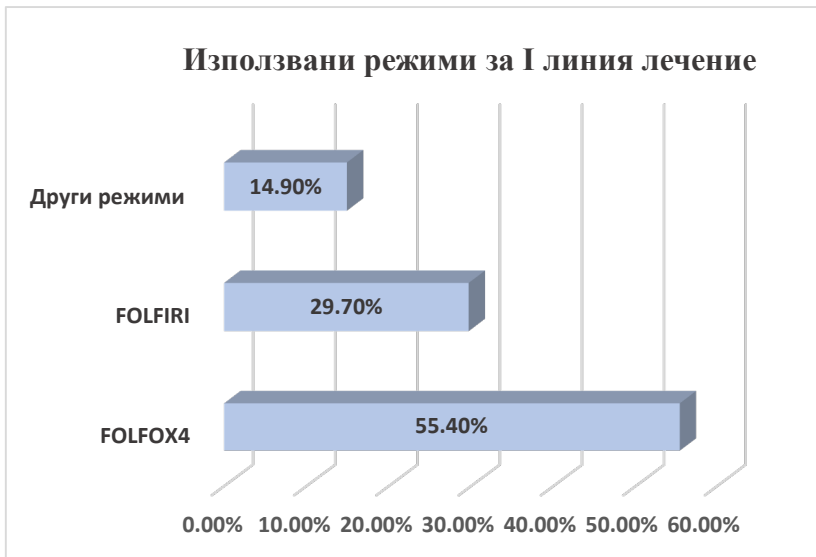
Всички пациенти са преминали поне три месеца лечение от 5-FU базирана първа линия химиотерапия. Най-голяма част от

пациентите с 55.4% (n=41) са лекувани с режим FOLFOX4/CAPEOX ± Bevacizumab/Panitumumab. 29.7% от пациентите (n=22) са подложени на лечение по схема FOLFIRI ± Bevacizumab/Panitumumab, а при останалите 14.9% (n=11) е бил използван режимът De Gramont (*Фигура 2*).

Режимите са повтаряни на всеки две седмици до регистриране на прогресия на заболяването, като всеки пациент е получавал лечение поне 3 месеца. Общо 60 пациенти (81.1%) са получили пълна доза от използваните химиотерапевтични медикаменти, докато при 18.9% (n=14) се е наложила корекция на дозата с нейното намаляване или пропускане на цикъл поради регистрирана токсичност. СВР бе отчетена при 35.1% от пациентите.

Пациенти с ниско ниво на експресия на RIPK3 показаха значително по-ниски нива на отговор към лечението в сравнение с тези с ниска експресия (16,2% срещу 54,1%).

Освен това, като се има предвид отговорът на химиотерапията по отношение на СВР, високата експресия на RIPK3 е положителен прогностичен маркер за степента на отговор (OR 0,165, 95% CI 0,05-0,49, P = 0,01).



Фигура 2. Разпределение на използваните режими за I линия системна химиотерапия.

4.7. Образна оценка на терапевтичния отговор

Образна оценка при всички пациенти е проведена преди започване на първа линия лечение, след което е регулярно осъществявана на всеки три месеца (4-6 проведени химиотерапевтични цикъла) в хода на системното лечение до регистриране на прогресия на болестта според критериите на RECIST 1.1. Изполваните образни методи за оценка са СТ на гръден кош, корем и малък таз или чрез PET/СТ. В хода на проведеното системно лечение са проследени параметрите PFS (преживяемост без прогресия), OS (обща преживяемост), където може да бъде определено. Видовете отговор към провежданото лечение по критериите на RECIST 1.1. и според

адаптираните критерии на EORTC са показани в Таблица. Видовете отговор са:

- **CR (пълен отговор)** – изчезване на всички таргетни лезии
- **PR (частичен/парциален отговор)** – намаляване с 30% или по-малко на сумата от най-дългите диаметри на таргетните лезии спрямо изходното измерване
- **SD (стабилна болест)** – липса на достатъчно намаляване в размерите на лезиите, както и достатъчно увеличение, което да се прецени като прогресия на болестта, като за сравнение се взема най-малкият сбор от най-дългите диаметри на фона на провежданото лечение.
- **PD (прогресия на болестта)** – появата на една или повече нови лезии или поне 20% увеличение в размера на сумата от най-дългите диаметри на таргетните лезии спрямо най-малката сума спрямо изследването (изходно или контрола по време на лечението).
- **Степен на клинична полза (CBR)** - се дефинира като процент пациенти с авансирал или метастатичен карцином, които са постигнали пълен отговор (CR), частичен отговор (PR) и стабилно заболяване (SD) в отговор към терапевтична интервенция в клинични проучвания на противоракови средства.

4.8. Статистически дизайн и анализ

Статистическите данни бяха обработени с помощта на програмен пакет SPSS version 23. Стойностите са представени с техните средни стойности \pm стандартно отклонение. За статистически достоверни са приемани разлики, при които р

$\leq 0,05$. При обработка на данните бяха използвани следните статистически методи:

- *Дескриптивен анализ на статистически величини* - средна стойност, стандартна грешка на средната, минимални и максимални стойности, медиана.

- *Графични методи* – за разпределение на пациентите по групи са използвани кръгови и кръгово-секторни диаграми, линейни графични изображения.

- *Корелационен анализ* – определени са коефициенти на линейна корелация по Spearman (параметричен метод). При интерпретирането на резултатите от корелационния анализ се използва следната скала за сила на корелацията според rho стойността:

- < 0.19 - много ниска корелация
- $0.19 \div 0.39$ – ниска корелация
- $0.40 \div 0.59$ – средна корелация
- $0.60 \div 0.79$ – силна корелация
- ≥ 0.80 – много силна корелация

- *Изследва се връзката между OS и PFS и нивото на експресия на RIPK3 в първичния тумор* - като времето до настъпването на конкретното събитие и крайните цели са анализирани по метода на Kaplan – Meier, а разликите бяха оценени с помощта на log-rank тест.

- *Бяха използвани Mann–Whitney U test и χ^2 тест* - за сравняване и оценка на корелациите между експресията на RIPK3 в първични тумори и клинично-патологични характеристики на пациентите като възраст, пол, KRAS статус, хистопатологична степен.

- Прогностичната и предиктивна стойност - на изследвания биомаркер беше оценена чрез Cox пропорционален хазартен модел.

5. Резултати

5.1. Клинична и патологична характеристика на пациентите

Проведохме ретроспективно проучване, в което бяха включени 74 пациенти с доказан карцином на дебело черво в метастатичен стадий, провели първа линия системна химиотерапия в УМБАЛ „Света Марина” – гр. Варна. Процентното разпределение на пациентите по групи според различните клинични и патологични параметри е представено на *Таблица 2*.

Таблица 2. Разпределение на общия брой пациенти по групи според някои демографски, клинични и патологични характеристики.

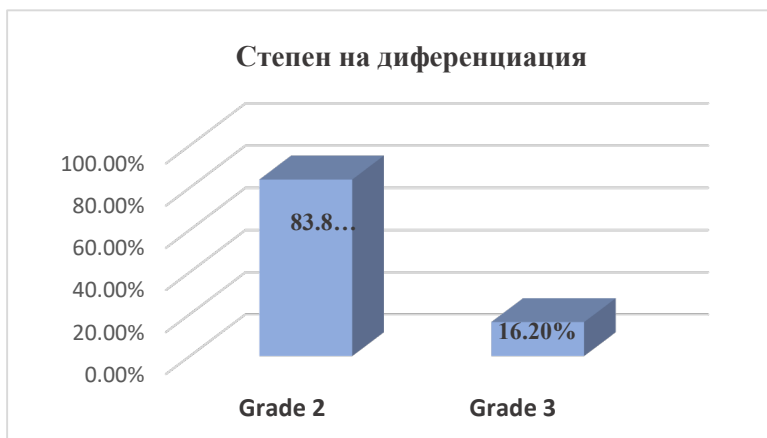
Пол (% , n)	
Мъже	56.8 % (n=42)
Жени	43.2 % (n=32)
Възраст при поставяне на диагнозата (% , mean \pmSD)	
Мъже	66.09 (\pm 7.734)
Жени	64.76 (\pm 8.118)
Общо	63.42 (\pm 10.476)
Локализация на тумора (% , n)	
Ляв колон	67.6 % (n=50)
Десен колон	32.4 % (n=24)
Локализация на метастазите (% , n)	
Черен дроб	81.1 (10.0)
Бял дроб	13.5% (28.0)
Перитонеум	12.2% (62.0)
Степен на диференциация (% , n)	
Grade 1	0 % (n=0)
Grade 2	83.8% (n=83.0)
Grade 3	16.2% (n=14.0)
Общо състояние ECOG (% , n)	
0	40.5 % (n=30)
1	54.1 (n=40)
2	5.4 % (n=4)
KRAS статус (% , n)	
KRAS мутация	35.1 % (n=25)
KRAS див тип	64.9 % (n=48)

Разпределението по пол е в полза на мъжете с 56.8% (n=42), спрямо 43.2 % (n=32) за жените (Фигура 3). Средната възраст при поставяне на диагнозата за мъжете е 66.09 години, а за жените

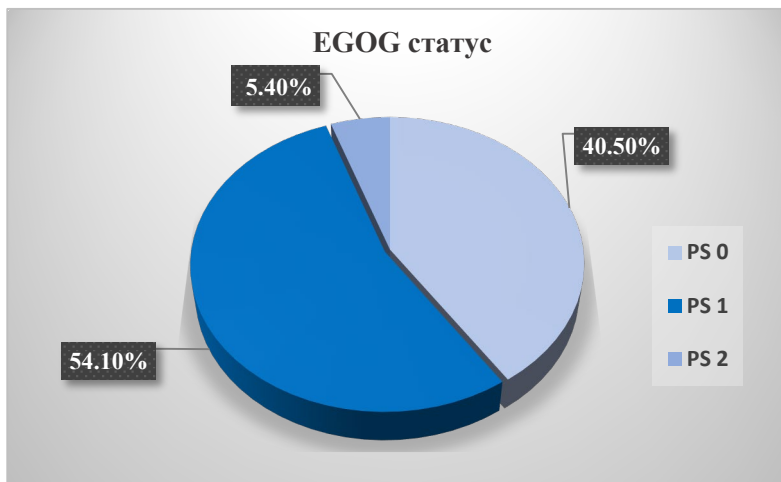
64.76 години. Средна възраст на участниците 63.42 години, като минималната е 24 години, а максималната 83 години.



Фигура 3. Кръгово-секторна диаграма, отразяваща разпределението на пациентите по пол.



Фигура 4. Стълбовидна диаграма отразяваща разпределение на пациентите според степента на диференциация на тумора /G/

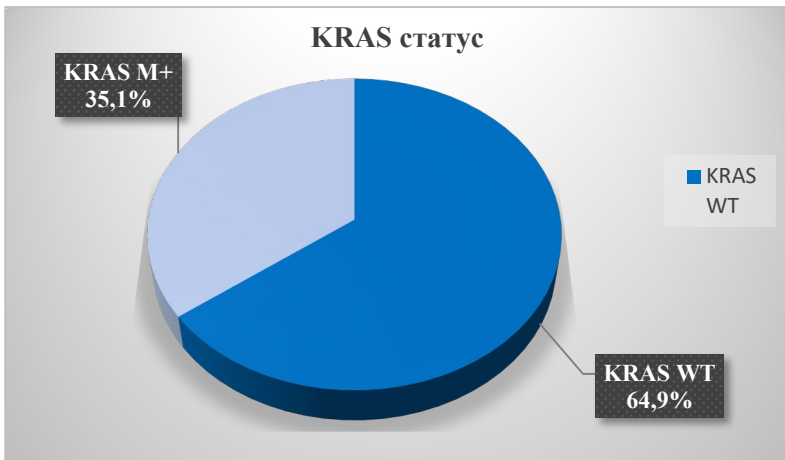


Фигура 5. *Кръгово-секторна диаграма, показваща разпределението на пациентите според общото състояние по скалата на ECOG.*

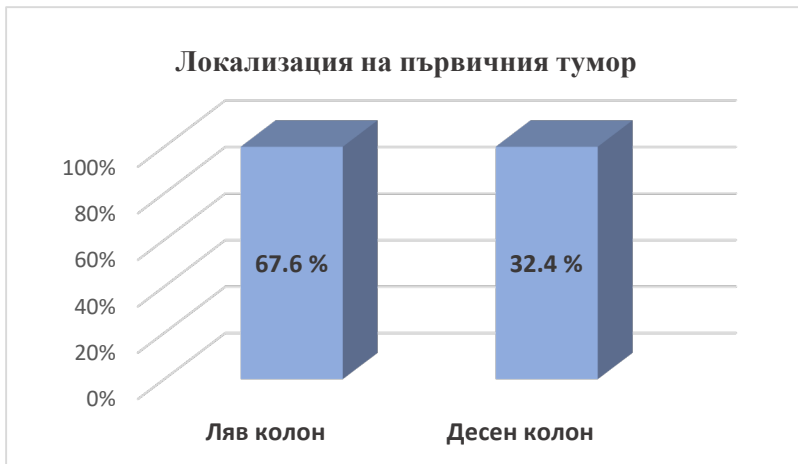
В изпитването са включени пациенти с общо състояние $<$ или $=$ 2, според скалата на ECOG (Таблица 2). По-голяма част от пациентите са с ECOG PS = 1 – 54.1% (n=40). 40.5% (n=30) от тях са в много добро общо състояние с PS = 0, а едва четирима от общата група (5.4%) са били с ECOG PS = 2 (Фигура 5).

KRAS статусът е бил изследван при всички пациенти. Преобладаващ дял от пациентската популация са с доказан KRAS мутационен статус див тип – 65% (n=48), докато останалите 25 пациенти (35%) са с доказана мутация (Фигура 6).

Според локализацията на първичния тумор превес вземат пациентите, чиято неоплазма произлиза от лявата част на колона с 67.6% (n=50), докато туморните процеси от десния колон са едва 32.4% (n=24) от изследваната популация (Фигура 7).



Фигура 6. *Кръгово-секторна диаграма, показваща разпределението на пациентите според KRAS мутационния статус.*



Фигура 7. *Стълбовидно-плоскостна диаграма, показваща локализацията на първичния тумор в лявата или дясна част на колона.*

5.2. Връзка между експресията на RIPK3 и клинично-патологичните характеристики на пациентите

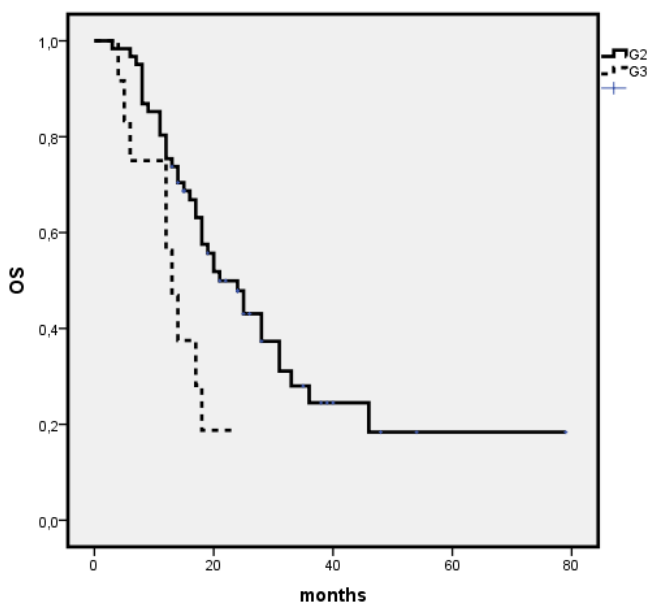
В изследваната пациентска популация не се наблюдава значима корелация между експресията на RIPK3 и възрастта, пола, KRAS статуса и степента на диференциация на пациентите. CBR (PR + SD за поне 6 месеца). Пациентите с ниско ниво на експресия на RIPK3 показват значително по-ниски нива на отговор от пациентите с високо ниво на експресия на RIPK3 (16,2% срещу 54,1%) (*Таблица 3*). Освен това, като се има предвид отговорът към химиотерапията по отношение на CBR, високата експресия на RIPK3 може да бъде отчетен като положителен прогностичен маркер за степента на отговор (OR 0,165, 95% CI 0,05-0,49, P = 0,01).

Таблица 3. Връзка между експресията на RIPK3 и някои показатели на пациентите. SD – стабилна болест, PR – частичен отговор, PD – прогресия на заболяването, M+ – налична мутация, WT – див тип

Показател	Ниска експресия на RIPK3	Висока експресия на RIPK3	P-value
Възраст			
<65	19 (51.4)	18 (48.6)	0.81
≥ 65	18 (48.6)	19 (51.4)	
Пол			
Мъже	23 (54.8)	19 (45.5)	0.34
Жени	14 (43.8)	18 (56.3)	
Степен на диференциация			
G1	9 (75)	3 (25.0)	0.07
G2	28 (45.2)	34 (54.8)	
Метастazi			
Черен дроб			
ДА	29 (45.2)	31 (83.8)	0.55
НЕ	8 (21.6)	6 (16.2)	
Перитонеум			
ДА	3 (8.1)	6 (16.2)	0.28
НЕ	34 (91.9)	31 (83.8)	
Бял дроб			
ДА	7 (18.9)	5 (13.5)	0.52
НЕ	30 (81.1)	32 (86.5)	
Отговор към ХТ			
SD + PR	6 (23.1)	20 (76.9)	0.001
PD	31 (64.6)	17 (35.4)	
KRAS			
M+	14 (53.8)	12 (46.2)	0.62
WT	23 (47.9)	25 (52.1)	

5.3. Прогностична стойност на степента на диференциация

В проведеното ретроспективно проучване, преобладаващ е броят на пациентите с умеренодиференцирани тумори G2 (n=84), докато броят на нискодиференцираните карциноми е едва 14. Болните с умеренодиференцирани тумори показаха сигнификатно по-дълга обща преживяемост от 31.3 (95% CI, 23.7 – 39.1) месеца в сравнение с групата пациенти със степен на диференциация G3, при които OS е 13.8 месеца (95% CI, 10.4 – 17.6) (log-rank test $p < 0.018$) (Фигура 8). Не бе отикрита сигнифиакнтна връзка между експресията на RIPK3 и степента на диференциация (Таблица 3).



Фигура 8. Kaplan-Meier крива на разпределение на общата преживяемост според степента на диференциация.

Средната OS за пациентите с умеренодиференцирани тумори G2 е 31.4 (95% CI, 23.7 – 39.1) месеца в сравнение с групата пациенти със степен на диференциация G3, при които OS е 13.8 месеца (95% CI, 10.4 – 17.6) (log-rank test $p < 0.018$)

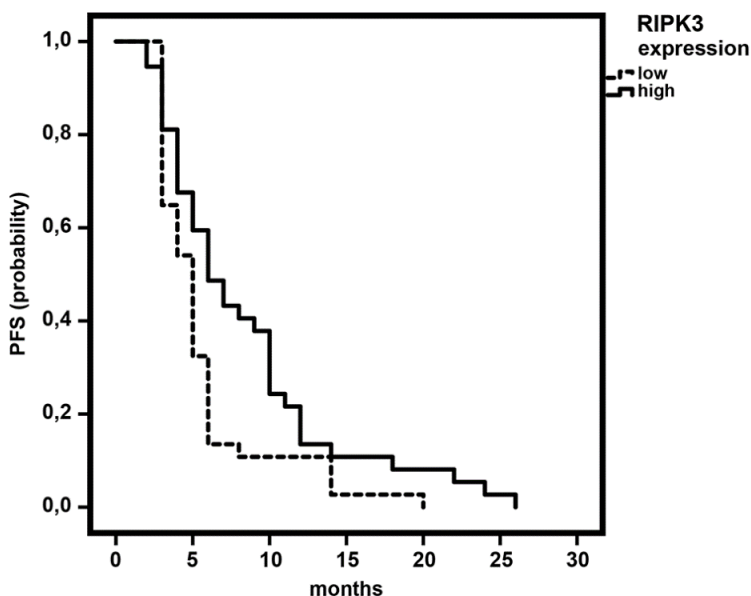
5.4. Влияние на експресията на RIPK3 върху общата преживяемост и преживяемостта без прогресия

Проведохме имунохистохимично изследване на експресията на RIPK3 в материал от първичния тумор на пациенти, лекувани в Клиника по медицинска онкология на УМБАЛ "Света Марина" в периода от 01.01.2012г. до 31.12.2015г. Не бе открита корелация между експресията на RIPK3 в първичния тумор и пола, степента на диференциация на карцинома и KRAS статуса. Бе установена сигнификантна разлика в средната преживяемост без прогресия (PFS) за групата пациенти с ниска експресия в сравнение с групата с висока експресия на RIPK3 (ниска експресия на RIPK3 с 5.6 месеца (95% CI, 4,6 - 6,8), срещу 8.4 месеца (95% CI, 6,4 - 10,3) за групата с висока експресия (log rank test $p = 0,02$) (Фигура 9).

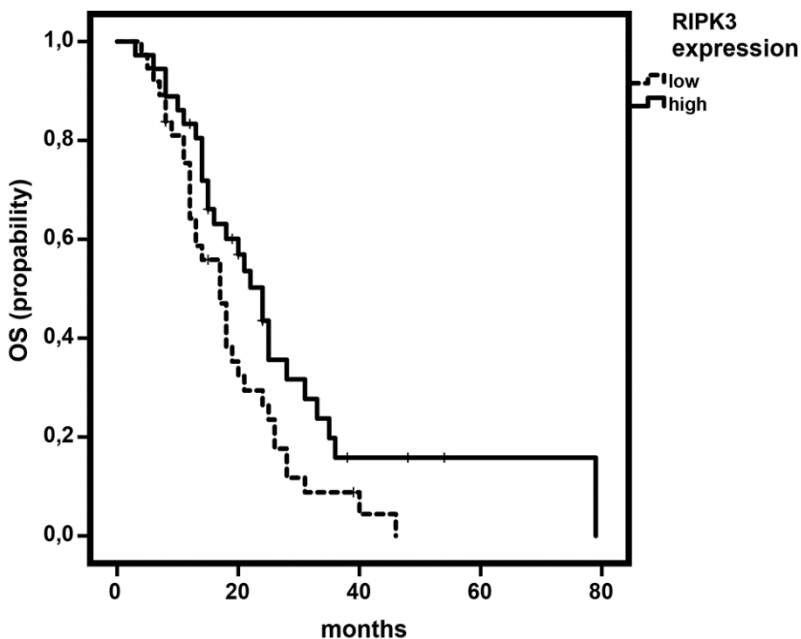
Сигнификантна разлика бе отчетена и по отношение на общата преживяемост в двете групи. Средната OS за групата пациенти с ниска експресия на RIPK3 е 18.5 месеца (95% CI, 15 - 21,9) в сравнение с групата пациенти с висока експресия където PFS е 29.3 месеца (95% CI, 20,8 - 37,9) (log-rank test $p = 0.036$) (Фигура 10).

Посредством унивариативен Соx-пропорционален регресионен анализ бе установено, че пациентите с високи нива на експресия на RIPK3 са свързани с по-нисък риск от прогресия на заболяването HR 0,61 (95% CI, 0,38-0,97; $p = 0,044$). В мултивариантния анализ, високата експресия на RIPK3 е

независим фактор за прогнозиране на по-продължителна PFS (HR 0,60, 95% CI 0,37-0,98, P=0,045) (Таблица 4). Също така в едновариантния анализ, високото ниво на експресия на RIPK3 е свързано с по-дълга OS HR 0,59 (95% CI, 0,35-0,98; p=0,044). Тази връзка не беше доказана при многовариантния анализ HR 0,65 (95% CI, 0,38-1,11; p=0,11) (Таблица 5). Степента на диференциацията на тумора беше независим прогностичен маркер по отношение на обща преживяемост (p < 0.05).



Фигура 9. *Kaplan-Meier* криви на разпределение на преживяемостта без прогресия (PFS). Средната PFS за групата пациенти с ниска експресия на RIPK3 е 5.6 месеца (95% CI, 4,4-6,8) в сравнение с групата пациенти с висока експресия където PFS е 8.4 месеца (95% CI, 6,4-10,3) (*log-rank test* p =0.02).



Фигура 10. Kaplan-Meier криви на разпределение на общата преживяемост (OS). Средната OS за групата пациенти с ниска експресия на RIPK3 е 18.5 месеца (95% CI, 15 - 21,9) в сравнение с групата пациенти с висока експресия където PFS е 29.3 месеца (95% CI, 20,8 - 37,9) (log-rank test $p=0.036$).

Таблица 4. Унивариативен и мултивариативен анализ за оценка на преживяемостта без прогресия.

Показател	Унивариативен анализ			Мултивариативен анализ		
	<i>Hazard ratio</i>	<i>95% CI</i>	<i>P-value</i>	<i>Hazard ratio</i>	<i>95% CI</i>	<i>P-value</i>
<i>Променлива</i>						
<i>Възраст</i>	1.005	0.63-1.59	0.1	0.91	0.56-1.47	0.7
<i>Пол</i>	0.84	0.52-1.34	0.4	0.95	0.58-1.55	0.8
<i>Степен на диференциация</i>	0.82	0.44-1.53	0.5	0.99	0.50-1.94	0.9
<i>KRAS статус</i>	0.66	0.41-1.09	0.1	0.64	0.38-1.11	0.1
<i>RIPK3 експресия</i>	0.61	0.38-0.97	0.044	0.60	0.37-0.98	0.045

Таблица 5. Унивариативен и мултивариативен анализ за оценка на общата преживяемост.

Показател	Унивариативен анализ			Мултивариативен анализ		
	<i>Hazard ratio</i>	<i>95% CI</i>	<i>P-value</i>	<i>Hazard ratio</i>	<i>95% CI</i>	<i>P-value</i>
<i>Променлива</i>						
<i>Възраст</i>	0.84	0.50-1.41	0.5	0.74	0.43-1.26	0.2
<i>Пол</i>	0.76	0.45-1.29	0.3	0.84	0.49-1.46	0.5
<i>Степен на диференциация</i>	0.32	0.16-0.62	<0.001	0.33	0.16-0.68	0.003
<i>KRAS статус</i>	1.35	0.80-2.27	0.2	0.89	0.50-1.57	0.6
<i>RIPK3 експресия</i>	0.59	0.35-0.98	0.04	0.65	0.38-1.11	0.1

6. Дискусия

Авансираният метастатичен КРК остава нелечима болест, която все още представлява предизвикателство за мултидисциплинарния екип от клиницисти, хирурзи и химиотерапевти поради високата честота на болестта сред популацията, диагностициране в сравнително късен стадий, високата честота на далечна дисеминация в черен дроб и други органи, туморна хетерогенност, липсата на достатъчно предиктивни маркери за отговор към лечение и наличната лекарствена резистентност.

Въвеждането и широкото приложение на таргетните агенти доведе до значително подобрение на преживяемостта без прогресия и общата преживяемост при пациенти с карцином на дебело черво в метастатичен стадий. Въпреки постигнатите успехи в лечението на тези пациенти, както и по-доброто разбиране на молекулярните пътища, все още познанията защо някои пациенти дават по-добър отговор към определено лечение, за сметка на други, остават недостатъчни. Макар големия напредък и постижения в медицината и онкологията, нуждата от откриването на нови предиктивни и прогностични фактори остава ключов по отношение преживяемостта и качеството на живот на пациентите.

Некроптозата е вид програмирана клетъчна смърт, вземаща участие в голям брой биологични процеси като възпаление, имуен отговор, метаболитни процеси и онкологични заболявания. Наред с други протеини, RIPK3 взема основно участие в некроптотичната сигнализация. Резистентността към регулираната клетъчна смърт е един от отличителните белези на онкологичните заболявания - поддържа клетъчното оцеляване и значително ограничава ефективността на конвенционалната лекарствена терапия. Установено е, че SN38, инхибиторът на топоизомераза, може да стимулира прогресията на некроптозата, да инхибира клетъчната

пролиферация и да индуцира натрупване на увреждане на ДНК при рак на дебелото черво. Тези открития показват, че инхибирането на активността на компонентите на некроптозата може да бъде стратегия при лечението на рак. Като се има предвид растящото значение на некроптозата при голяма част от неопластичните процеси, по-доброто разбиране на молекулярните механизми, залегнали в основата на некроптотичното сигнализиране, вероятно ще има важни последици за разработването на нови методи за регулиране на некроптоза при туморогенезата, както и ще даде информация за разработването на стратегии за преодоляване на терапевтичната резистентност.

RIPK3 е доказан независим прогностичен маркер при голям брой онкологични заболявания като нискодиференцирани глиоми, където високите нива на експресия на RIPK3 корелират с повишена смъртност. Редица проучвания доказват също връзката между ниската експресия на RIPK3 и по-лошата прогноза при пациенти с рак на гърдата, рак на стомаха, рак на яйчниците, плоскоклетъчен карцином на маточна шийка.

Резултати от ретроспективното проучване на Ke-jie Wand et. al, което изследва ролята на RIPK3 като прогностичен фактор при пациенти с простатен карцином, показват, че RIP3 е значително понижен в клетъчните линии и клиничните проби от рак на простатата и клиничните проби, докато свръхекспресирането на RIP3 потиска миграцията и инвазията на раковите клетки на простатата. Тези открития показват, че RIP3 е отговорен за прогресията на рака на простатата, което предполага, че RIP3 може да има потенциал да бъде прогностичен маркер или терапевтична цел срещу рак на простатата.

Други данни показват, че пациентите с плоскоклетъчен карцином на бял дроб (SCC NSCLC) с ниска експресия на RIPK3 имат

приблизително 2 до 3 пъти повишен риск от смърт в сравнение с тези с висока експресия на R1P1K3. Това наблюдение показва, че както е установено и при пациенти със SCC на хранопровода, R1P1K3 инхибира прогресията на тумора при пациентите със същия хистологичен тип при NSCLC.

Пациентите с ниска експресия на R1P1K3 и висока p53 показват приблизително 8,4 пъти повишен риск от смърт в сравнение с тези с висока експресия на R1P1K3 и ниска p53. Този резултат предполага, че използването на комбинации от биомаркери може да помогне за по-добро класифициране на пациентите според тяхната прогноза.

За пръв път в България и света в нашето изпитване бе потърсена връзка между нивата на експресия на маркера за некроптоза R1P1K3 и клинично-патологични характеристики на пациентите като пол, KRAS статус, степен на диференциация, както и връзката по отношение на OS и PFS при пациенти с мКРК.

В рамките на нашето ретроспективно проследяване бяха включени 74 пациенти с КРК в метастатичен стадий, провели минимум 3 курса от първа линия 5-FU базирана системна химиотерапия. Въпреки относително малката група изследвани пациенти и нуждата от допълнителни прочувания, получените данни предполагат, че нивото на експресия на R1P1K3 в първичните тумори е нов независим потенциален предиктивен биомаркер за преживяемост без прогресия при пациенти с метастатичен рак на дебелото черво.

Освен това открихме и връзка между есенциалния за некроптозата маркер R1P1K3 и клиничната полза (CBR). Според нашите резултати, високата експресия на R1P1K3 се свързва с по-добра ОС, което прави R1P1K3 потенциален прогностичен маркер при пациенти с мКРК. Според резултатите от нашето изследване не бе открита сигнификатна връзка между новото на експресия на R1P1K3 и

клиникопатологичните характеристики на пациентите като пол, KRAS статус, степен на диференциация.

След публикуване на нашите резултати по отношение ролята на RPK3 като прогностичен фактор при пациенти с авансирал КРК последват други изследвания в световен мащаб, подкрепящи твърденията ни. Резултатите от ретроспективно проучване от април 2021г. на Qun Zhao et. Al, включващо по-голяма пациентска кохорта от 41 нормални чревни проби и 286 туморни проби от пациенти с КРК, подобно на нашите, показват, че общата преживяемост е значително по-висока при пациенти с висока експресия на RPK3, отколкото при пациенти с намалена експресия на RPK3 при колоректален рак.

5-FU, аналог на пиримидина урацил, където водородът на позиция C5 е заменен с флуор, е антинеопластичен медикамент, който действа като антиметаболит. Той е един от най-често използваните химиотерапевтични агенти, като в комбинация с други лекарства влиза в лекарствените схеми за лечение на КРК, карциноми на глава и шия, карцином на стомаха, гърдата и др.

Поради своята структура, 5-FU пречи на нуклеозидния метаболизъм и може да бъде включен в РНК и ДНК, което води до цитотоксичност и клетъчна смърт. Добрият ефект на лечението с 5-FU базирана химиотерапия е до голяма степен свързан с нивата на експресия на няколко гена, като TS и DPD. Изследванията показват, че 5-FU упражнява своите противоракови ефекти главно чрез инхибиране на TS, за които пътищата не са напълно изяснени. През последните 50 години, въпреки многобройните предимства на 5-FU, клиничните му приложения са силно ограничени поради наличната лекарствена резистентност. Общият процент на отговор за напреднал колоректален рак при лечение само с 5-FU все още е едва

10–15%, а комбинацията от 5-FU с други противотуморни лекарства подобрява степента на отговор до 40–50%.

В момента се провеждат няколко изследвания за повишаване на чувствителността на 5-FU в раковите клетки и повишаване на неговата терапевтична ефективност чрез използването на нови комбинирани терапии. Комбинацията от 5-FU и други терапевтични агенти повишава лекарствения отговор проценти при няколко ракови заболявания. Въпреки това, ролята на ТМЕ в прогресията на рака и развитието на *de novo* резистентност също е критична.

Антиангиогенната терапия, насочена към ангиогенни растежни фактори (VEGF) и гени, свързани с ТМЕ, показва по-добри резултати, когато се комбинира с 5-FU химиотерапия.). Разбирането на механизмите на създалата се резистентност, както и откриването на нови прогностични и предиктивни фактори по отношение отговора към лечение с 5-FU, е съществена стъпка към преодоляването на този проблем.

Въпреки че статистическата значимост на нашето изследване е ограничена от малкия размер на пациентската кохорта, то настоящото ретроспективно проучване предполага, че пациентите с висока експресия на RIPK3 в първичния тумор могат да имат по-добър ефект при лечение с 5-FU базирана химиотерапия от първа линия. Това са доказателства, представени за пръв път в България и света, но са необходими допълнителни изследвания, за да се изследва по-детайлно ролята на некроптозата при пациенти с КРК. Въпреки тези ограничения, откриването нивото на експресия на RIPK3 може да има потенциал да идентифицира подходящи пациенти за нова терапия с пронекроптоза в клинични проучвания, за да се подобрят резултатите и преживяемостта на пациентите.

7. Заключение

За пръв път в България и света в нашето изпитване бе изследвано значението на нивата на експресия на маркера за нектоптоза RPK3 при пациенти с мКРК, провели I линия 5-FU-базирана ХТ по отношение на някои пациентски характеристики, OS, PFS и отговор към лечението. В заключение, като обобщение от нашето ретроспективно проучване става ясно, че маркерът за некроптоза RPK3 може да послужи като независим прогностичен маркер по отношение общата преживяемост при пациенти с авансирал мКРК, което е подкрепено и от последващи изпитвания в световен мащаб. Освен това бе доказана и стойността му по отношение лечението с първа линия 5-FU базирана ХТ при тези пациенти, превръщайки го в потенциален предиктивен фактор. Резултатите от нашето изпитване не откриха сигнификантна връзка между нивата на експресия на маркера за нектоптоза RPK3 и клиникопатологичните характеристики на пациентите като пол, KRAS статус, степен на диференциация.

Досега наличните изследвания, изучаващи връзката между некроптоза, нейните маркери и мКРК 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 неопластичните процеси. 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.

8. Изводи

1. Липсва корелация между нивото на експресия на RIPK3 в първичните тумори и клиникопатологичните характеристики на пациентите с КРК в метастатичен стадий.
2. Установи се по-добра обща преживяемост при пациенти с висока експресия на RIPK3, превръщайки го в потенциален прогностичен маркер.
3. Установи се по-добър отговор към 5-FU базирана химиотерапия от първа линия при пациенти с по-висока експресия на RIPK3.
4. Установи се потенциална прогностична стойност на RIPK3 като предиктивен фактор по отношение на 5-FU базирана ХТ.
5. Не бе доказана статистически значима връзка между нивото на експресия на RIPK3 и преживяемостта без прогресия при пациентите с мКРК.

9. Приноси

1. За първи път в България се изследва връзката между нивото на експресия на маркера за некроптоза RIPK3 при пациенти с метастатичен КРК.
2. За първи път в България се докладва за потенциала на нивото на експресия на RIPK3 да бъде използвано като прогностичен фактор по отношение на общата преживяемост при пациенти с дебелочревен карцином.
3. За първи път в България се докладва за потенциала на нивото на експресия на RIPK3 да бъде използвано като предиктивен фактор по отношение на 5-FU базираната първа линия химиотерапия при пациенти с мКРК.
4. За първи път в световната литература се изследва и докладва връзката между маркера за некроптоза RIPK3 и отговора на пациентите към лечение с 5-FU базирана първа линия ХТ при пациенти с мКРК.

10. Научни публикации, свързани с дисертационния труд

1. „Автофагия при солидни тумори“.

Автори: Елеонора Димитрова, Иван Донеv, Николай Цонев, Соня Драганова, Ростослав Манев, **Маргарита Богданова**, Христо Попов, Надежда Стефанова, Драгомир Стоянов, Явор Кашлов, Асен Янчев, Маргарита Георгиева.

Издание: Studia Oncologica

Страници: 47-56.

Дата на публикуване: 2016

Издател: Парадигма

2. „Некроптоза“

Автори: **М. Богданова**, И. Донеv, Н. Цонев, Е. Димитрова, Р. Манев, Др. Стоянов, Ч. Бъчваров, Г. Тодоров, Т. Радев, Н. Стефанова, К. Калчев, М. Таушанова

Издание: Studia Oncologica

Страници: 59-68

Дата на публикуване: 2017.

Издател: Парадигма

3. „Некроптоза - молекулярни механизми и ролята ѝ при злокачествените тумори“

Автори: Надежда Стефанова, Мария Цанева, Калин Калчев, **Маргарита Богданова**, Иван Донеv

Издание: Варненски медицински форум.

Дата на публикуване: 2017.

Издател: МУ-Варна

4. „RIPK3 expression as a potential predictive and prognostic marker in metastatic colon cancer“

Автори: Conev NV, Dimitrova EG, **Bogdanova MK**, Kashlov YK, Chaushev BG, Radanova MA, Petrov DP, Georgiev KD, Bachvarov CH, Todorov GN, Kalchev KP, Popov HB, Manev RR, Donev IS.

Издание с IF: Clinical and Investigative medicine.

Дата на публикуване: 2019/3.

5. „Имунотерапия при колоректален карцином“

Автори: д-р Ростислав Манев, д-р **Маргарита Манева**, доц. д-р Мария Раданова, дм,
доц. д-р Николай Цонев, дм

Издание: МЕДИНФО

Дата на публикуване: 2020/4

6. „Single nucleotide polymorphisms in microRNA genes and colorectal cancer risk and prognosis“

Автори: Maria Radanova, Maria Levkova, Galya Mihaylova, Rostislav Manev, **Margarita Maneva**, Rossen Hadgiev, Nikolay Conev, Ivan Donev

Издание с IF: Biomedicines.

Дата на публикуване: 2022/1

7. „3-year clinical experience in patients with unresectable metastatic colon cancer received first-line of chemotherapy“

Автори: Rostislav Manev, **Margarita Maneva**, Zhasmina Mihaylova, Nikolay Conev

Издание: Scripta Scientifica Medica

Дата на събмитване: 2022/3

Издател: МУ - Варна

Благодарности:

Специални благодарности на научния ми ръководител:

Доц. д-р Елеонора Димитрова, д.м. - за помощта и напътствията

Специални благодарности на:

Доц. д-р Николай Цонев, д.м. - за незаменимата помощ и идеи

Проф. д-р Иван Донев, д.м. - за идеята за тема, съвместната работа и помощта

На екипа на Клиниката по медицинска онкология при УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, на пациентите, които дадоха съгласие за участие в изследването и най-вече на семейството ми за подкрепата и търпението!!!