МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА
„Проф. д-р Параскев Стоянов"

Факултет „Медицина"

Катедра „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология"

Д-р Мартина Георгиева Стоева

ИМУНОХИСТОХИМИЧНА ЕКСПРЕСИЯ НА МАРКЕРА ЗА НЕКРОПТОЗА RIPK3 ПРИ КАРЦИНОМ НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане

на образователна и научна степен **„доктор"**

Научна специалност: „Патологоанатомия и цитопатология"

Научен ръководител:
Проф. д-р Мария Цанева, д.м.

Варна, 2022 г.

Дисертационният труд съдържа 133 стандартни страници и е онагледен с 50 таблици и 42 фигури. Литературната справка включва 205 литературни източника, от които 4 на кирилица и 201 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на катедрен съвет на Катедрата по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при МУ „Проф. Д-р Параскев Стоянов" – Варна на 10.01.2022 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 11.03.2022 г., петък, пред научно жури в състав:

Външни членове:

1. Проф. д-р Радина Иванова, д.м.н.
2. Доц. д-р Екатерина Софтова-Златарова, д.м.
3. Доц. д-р Силвия Генова, д.м.

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Добринка Радойнова, д.м.н.
2. Доц. д-р Деян Дженков, д.м.

Резервен външен член:

1. Проф. д-р Веселин Беловеждов, д.м.

Резервен вътрешен член:

1. Проф. д-р Петър Генев, д.м.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ 4

I. ВЪВЕДЕНИЕ 5

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 8

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ 9

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ 14

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....72

VI. ИЗВОДИ.....74

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 76

VIII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....76

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

СЗО – Световна здравна организация
ФКБ – фибро-кистична болест
BRCA1 – Breast cancer 1
DFS – Disease-free survival
ER – Estrogen receptor
HER2 - Human epidermal growth factor receptor 2
IS – Intensity score
MLKL – Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase
NOS – not otherwise specified
PR – Progesterone receptor
PS – Proportion score
RIPK1 – Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RIPK3 - Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 3 MLKL
TS – Total score
WHO – World health organization

I. ВЪВЕДЕНИЕ

При жени, карциномът на млечната жлеза по данни на Globocan за 2020 г. е най-често диагностицираният злокачествен тумор и най-честата причина за смърт от малигнено заболяване, а като причина за смърт в света при двата пола се нарежда на пето място (Globocan 2020). Очаква се повишаване на заболеваемостта и смъртността през следващите години. Международната агенция за анализ на злокачествените заболявания (International Agency for Research on Cancer) прогнозира, че до 2040 г. заболеваемостта от карцином на гърдата ще се увеличи с повече от една трета и ще надхвърли 3 милиона нови случаи годишно, а смъртността от заболяването ще се повиши с повече от половината спрямо настоящия момент и се очаква смъртните случаи да бъдат повече от 1 милион годишно.

За развитието на карцинома на гърдата влияние оказват някои генетични предразположения и редица рискови фактори. По-голямата част от наследствените фактори са свързани с мутации на BRCA1 и BRCA2 (Park MJ et al., 2011). Рисковите фактори са свързани с експозиция на паренхима на млечната жлеза на различни хормони по време на живота (ранно менархе, късна менопауза, затлъстяване, употреба на хормонални препарати), намалена физическа активност, тютюнопушене употреба на алкохол и др. (Collaborative Group, 2002; Steiner E et al., 2008; Park MJ et al., 2011). Честотата на заболяването нараства бързо с напредване на възрастта след 40 години (Berg WA, 2007; Berg WA, 2009).

Световната здравна организация (СЗО), на базата на хистогенезата и моделите на растеж, разглежда различни хистологични категории на мамарен карцином, които се различават по свързаните с тях рискови фактори, клинична картина, отговор към лечение и прогноза (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2019). Освен от класическите прогностични фактори, като хистологичен вариант, степен на диференциация и TNM стадий, лечението зависи и от молекулярния профил на тумора, т.е. от експресията на естрогенния рецептор (ER), прогестероновия рецептор (PR), рецептора за епидермален растежен фактор (HER2) и от

пролиферативния маркер Ki67 ((Li CI et al., 2003; De Azambuja E et al., 2007; Yerushalmi R et al., 2010; Goldhirsch A et al., 2013; Makki J, 2015; Mueller C et al., 2018; Foukakis T, Bergh J, 2021).

Основните терапевтични методи при пациенти с карцином на млечната жлеза са: хирургично лечение, лъче- и химиотерапия, хормонална и таргетна терапия (Dhankhar R et al., 2010). Въпреки тези утвърдени в годините терапевтични подходи, науката не спира да търси нови допълнителни стратегии за по-успешно справяне с това широко разпространено заболяване. Една от насоките, по които се работи, е откриване на варианти за активиране на клетъчната смърт при туморните клетки. При хора, протеин p53, който индуцира апоптозата е нефункционален в повече от половината карциноми. Доскоро апоптозата се приемаше за единствена форма на програмирана клетъчна смърт, докато некрозата се разглеждаше като „неочаквана“ форма на смърт, нерегулирана от молекулярни механизми (Linkermann A, Green DR, 2014). Терапевтично индуцираната апоптоза, в болшинството от случаите на мамарен карцином, се приемаше за единствената стратегия за индуциране на клетъчна смърт. Неотдавна се откри нова форма на програмирана некротична клетъчна смърт, некроптоза, която прилича по механизъм на апоптозата и има морфологично сходство с некрозата (Christofferson DE, Yuan J, 2010). Некроптозата се медиира главно от Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1 (RIPK1), Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 3 (RIPK3) и Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase (MLKL), а се инхибира от некростатин-1 (Nec-1), който е първият добре дефиниран инхибитор на некроптозата, повлияващ предимно активността на RIPK1 (Degterev A et al., 2008).

Некроптозата участва в регулирането на редица физиологични процеси, но и в развитието на много заболявания при хората. Освен ключова роля при вирусни инфекции, се предполага, че некроптозата има важни функции при регулиранена биологията на злокачествените заболявания, като онкогенеза, метастатичен потенциал, туморен имунитет и др. (Stoll G et al., 2017; Seehawer M et al., 2018). Като интермедиерна форма на клетъчна смърт с характеристики, както на апоптоза, така и на некроза, се предполага че ключовите медиатори на некроптотичния път самостоятелно или в комбинация

потенцират метастазите и прогресията при малигнените тумори (Park S et al., 2009; Strilic B et al., 2016; McCormick KD et al., 2016). Съществуват и данни, че некроптозата служи и като механизъм, който предпазва от развитие на туморен процес, когато апоптозата е компрометирана (Feng X et al., 2015; Höckendorf U et al., 2016).

Данните в литературата за ролята на некроптозата в прогресията и преживяемостта на пациентите с карцином на млечната жлеза са крайно оскъдни и по-детайлното проучване на сигналните ѝ пътища би изяснило участието ѝ в мамарната канцерогенеза и би предоставило нови стратегии за терапевтично повлияване.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящото изследване е да се проучи експресиятана некроптотичния маркер RIPK3 във връзка с клинико-морфологичните показатели, рецепторния статус, пролиферативния маркер Ki67 и преживяемостта на пациентите без прогресия при карцином на млечната жлеза.

За реализиране на поставената цел бяха формулирани следните задачи:

1. Да се проучат клинико-морфологичните характеристики на пациентите с карцином на млечната жлеза.
2. Да се определи рецепторният статус: ER, PR, HER2 и пролиферативният маркер Ki67 в туморната тъкан на пациентите с мамарен карцином.
3. Да се проучи преживяемостта на пациентите с карцином на гърдата.
4. Да се изследва цитоплазмената и ядрената експресия на RIPK3 в неопластичната тъкан при карцинома на млечната жлеза.
5. Да се анализира цитоплазмената експресия на RIPK3 във връзка с клинико-морфологичните характеристики, молекулярния профил, пролиферативния маркер Ki67 и преживяемостта на пациентите с карцином на гърдата.
6. Да се проучи ядрената експресия на RIPK3 във връзка с клинико-морфологичните характеристики, молекулярния профил, пролиферативния маркер Ki67 и преживяемостта на пациентите с карцином на гърдата.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

Бази за реализиране на дисертационния труд

- Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология – МУ – Варна
- Клиника по обща и клинична патология – УМБАЛ „Света Марина“ - Варна
- Клиника по медицинска онкология – УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

Пациенти и характеристика на проучваните групи

В настоящото изследване са включени общо 98 пациенти, като 79 от тях са с диагноза карцином на млечната жлеза, а останалите 19 са контроли. Прицелната група включва 16 случая с лобуларен карцином и 63 случая с дуктален карцином. Контролите са представени от 10 случая с непролиферативен тип фиброкистична болест (ФКБ) и 9 случая от пролиферативен тип. Диагнозата и стадият на 71 от случаите на мамарен карцином са определени според 5-то издание на СЗО на туморите на млечна жлеза от 2019 г. При тези пациенти е извършена мастектомия с регионална лимфна дисекция. Диагнозата на останалите 8 случая с карцином е поставена хистологично на „tru-cut“ биопсия с достатъчно туморна тъкан, а стадият е определен чрез образни изследвания. При 58 случая е проведена последваща хормоно-, лъче- и/или химиотерапия в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна и на тези пациенти е определена преживяемостта без заболяване (Disease-free survival – DFS). При всички пациенти е отчетено нивото на ядрена и цитоплазмена експресия на RIPK3.

Рутинни изследвания

От всеки случай с карцином на млечната жлеза, за хистологично изследване са взети средно по четири-пет материала от тумора и допълнително от кожа и мамила, когато са били налични. Проучени са всички изпратени лимфни възли. Материалите са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин и след съответната обработка са включени в парафин с точка на топене 52ºC - 54ºC с цел изготвяне на парафинови

блокчета. Срези с дебелина 5 μm са стандартно оцветени с хематоксилин-еозин за оценка на хистологичните промени в тумора и за присъствието на метастази в изпратените лимфни възли. При всички тумори са определени хистологичният тип, степента им на диференциация, стадият на заболяването по TNM, оценен е имунохистохимичният им статус според експресията на ER, PR, HER2 и Ki67.

Специфични методи на изследване

Имунохистохимичен метод

Предварително готови имунохистохимични препарати

След поставяне на диагнозата на всеки тумор, за определяне на молекулярния му профил са оценени нивата на експресия на имунохистохимичните маркери ER, PR, HER2 и Ki67. Използваните антитела са представени на таблица 1.

Таблица 1. *Използвани реагенти.*

Антитяло	Разреждане	Позитивна контрола	Фирма производител
Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor α, Clone EP1	Готово за употреба	Пролифера-тивен тип ФКБ	Dako
Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR 636	Готово за употреба	Пролифера-тивен тип ФКБ	Dako
Polyclonal Rabbit Anti-Human c-erbB-2 Oncoprotein, Unconjugated, Affinity isolated	1:600	Доказано позитивен мамарен карцином	Dako
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen Клон MIB-1	Готово за употреба	Тонзила	Dako

Извършени за целите на дисертацията имунохистохимични изследвания

Използван бе индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024. Антителата, реактивите за оцветяване и използваните работни концентрации са представени на таблица 2и 3.

Използвано е антитялото Anti-RIP3, кат. № ab62344. Антителата са производство на ABCAM's RabMab technology.

Негативните контроли са изработени като вместо първичното антитяло, срези от използваните парафинови блокчета се инкубират с нормален неимунен серум.

За позитивни контроли са използвани тъкани от черен дроб, които са оцветени с Anti-RIPK3.

Таблица 2. *Използвани реагенти.*

Антитяло	**Разреж-дане**	**Позитивна контрола**	**Маркер за:**	**Фирма произво-дител**
Анти RIPK3(ab62344) Rabbit polyclonal to RIP3	1:100	Черен дроб	Некроп-тоза	ABCAM's RabMab technology

Таблица 3. *Системи за оцветяване и други реактиви.*

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

Нива на експресия на RIPK3 и интерпретация на резултатите

Имунохистохимичната експресия на RIPK3 бе оценена полуколичествено чрез използване на H-score (histo-score) върху тъканните срези. Първо, за всяка клетка в различни полета бе оценена интензивността на цитоплазмената експресия (0 липсва реакция, 1+ слаба позитивност, 2+ умерена позитивност или 3+ силна позитивност). Процентът на позитивните клетки за всеки

отделен интензитет бе определен, като накрая H-score бе изчислен посредством следната формула:
[1x (% клетки с 1+) + 2x (% клетки с 2+) + 3x (% клетки с 3+)], в диапазон от 0 до 300.

H-score бе използван и за оценка на ядрената експресия на RIPK3. Резултатът бе получен по формулата:
[1x (% ядра с 1+) + 2x (% ядра с 2+) + 3x (% ядра с 3+)], в диапазон от 0 до 300.

Статистически методи

Данните бяха обработени и анализирани с помощта на софтуер SPSS ver. 23. Използвани са тестът на Mann-Whitney, Chi-square ($\chi 2$) тест, анализ на съответствието (correspondence (Pairwise Comparisons) за сравняване и оценкана корелациите между експресията на RIPK3 в неопластичната тъкан и клинико-патологичните характеристики на пациентите, като възраст, хистологичен вид на тумора, Т- стадий, степен на диференциация, степен на разпространение на тумора (метастази), експресия на имунохистохимичните маркери ER, PR, HER2 и Ki67 (поотделно за всеки от тях).

С цел обработка на данните с изброените тестовестойностите на ядрената и цитоплазмената експресия на RIPK3в туморната тъкан бяха разпределени спрямо медианата и по персентили (до 33-тия персентил – ниска експресия, между 33-тия и 66-тия персентил – умерена експресия и над 66-тия персентил – висока експресия).

За изследване на нормалността на разпределението (test of normality) беше използван тестът на Shapiro-Wilk.

Качествените променливи са представени с абсолютен брой и относителен дял при описателния анализ на демографските и клинични характеристики на участниците в проучването, а количествените – със средна стойност и стандартно отклонение.

При проверката на хипотези за връзка между две качествени променливи е използван тестът $\chi 2$. При изследване на зависимостта между две величини, измерени по ординалната скала е използвана рангова корелация на Спиърман.

Сравненията между повече от две групи са извършени с one way ANOVA тест.

Силата на зависимостта между две променливи беше оценена с коефициента Kendall's tau c. Стойностите му се оценяват по следния начин:

- < ± 0,1 – много слаба зависимост
- от ± 0,1 до ± 0,19 – слаба зависимост
- от ± 0,2 до ± 0,29 – умерена зависимост
- > ± 0,3 – силна зависимост

Кривите на преживяемост според експресията на RIPK3 в туморната тъкан са оценени с помощта на метода на Каплан-Майер (Kaplan-Meier method), а разликите са измерени с помощта на логранк (Logrank) тест.

Всеки показател е представен с 95% интервал на доверителност (Confidence interval – CI).

Резултатите са отчитани като статистически значими при $p < 0,05$.

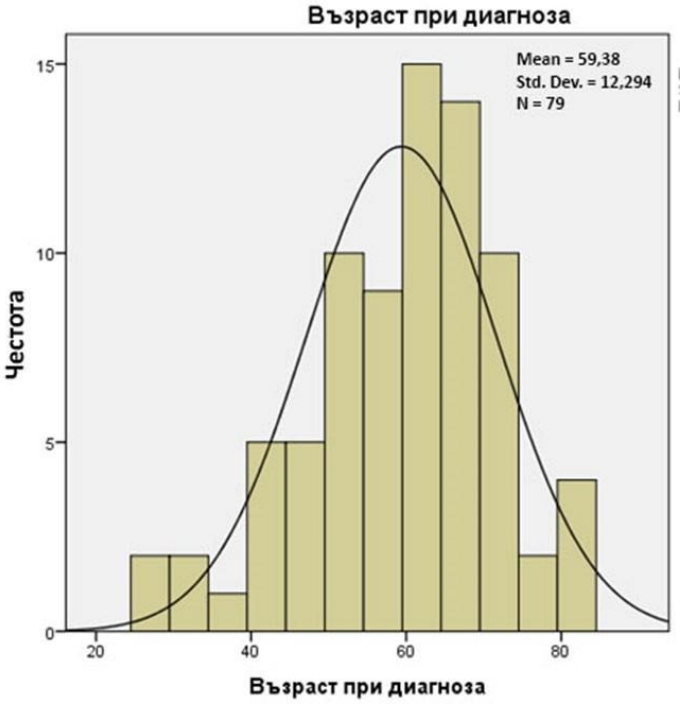
Резултатите са представени в обобщен вид в таблици и са илюстрирани с подходящи графики: стълбовидни, точкови, линейни и др.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Клинико-морфологични характеристики на пациентите с карцином на млечната жлеза

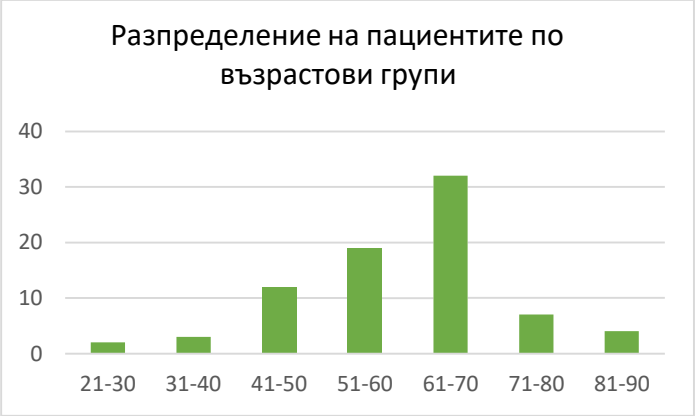
Възраст на пациентите с карцином на гърдата

Проучени са 79 пациенти с диагноза карцином на млечната жлеза, оперирани в УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД за период от 8 години (2010 г.- 2018 г.). Средната възраст на болните е 59,38±12,2 г., като минималната възраст е 27 г., а максималната – 82 г. (фигура 1).



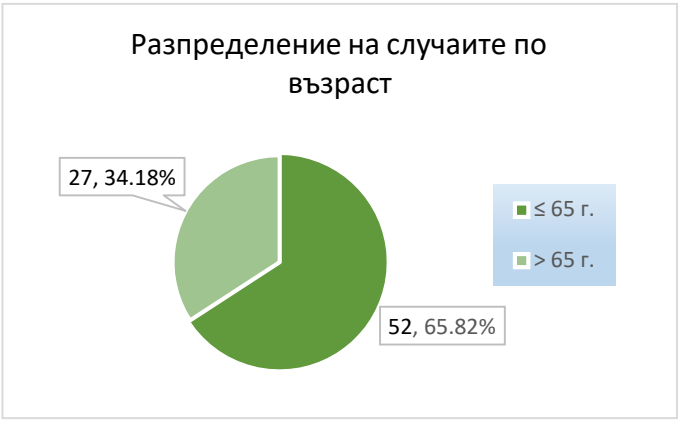
Фигура 1. *Честота на възрастовото разпределение на пациентите с карцином на гърдата.*

Получените от нас резултати (фигура 2) показват, че най-голям брой пациенти с карцином на гърдата - 32 (40,51%) случая са във възрастовата група – 61-70 г.



Фигура 2. *Разпределение на пациентите по възрастови групи.*

За последващата статистическа обработка на данните за възрастта на пациентите, случаите бяха разделени в две групи: ≤65 г. (52 пациента, представляващи 65,82% от всички 79 случая) и > 65 г. (27 пациента – 34,18%) (фигура 3).

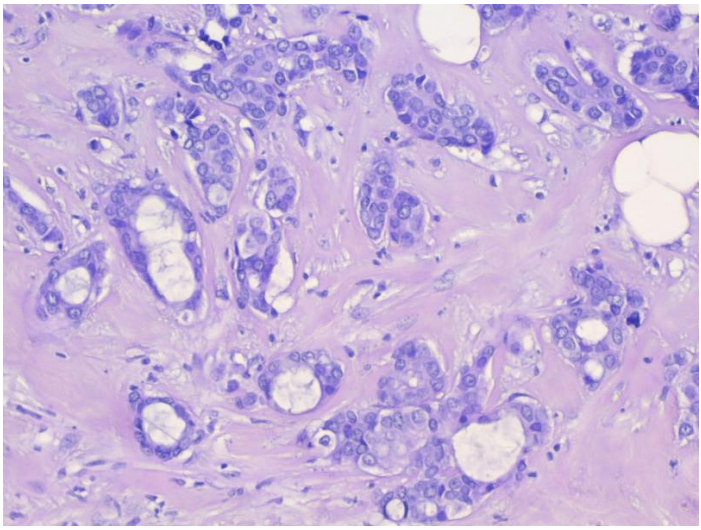


Фигура 3. *Разпределение на случаите по възраст.*

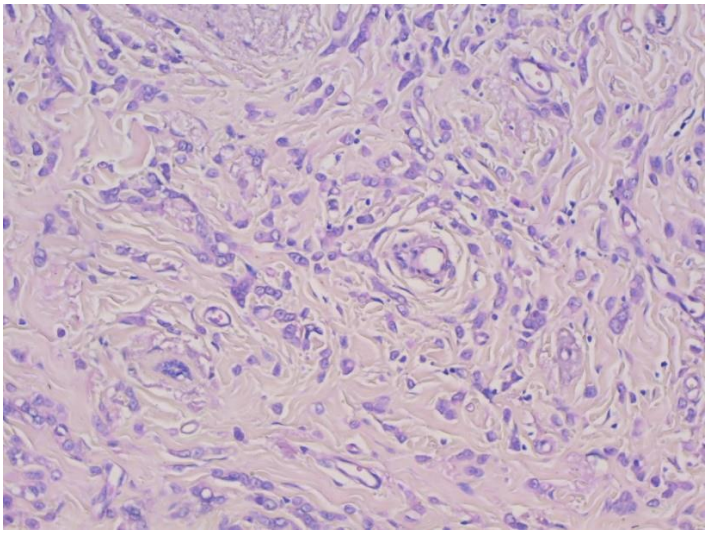
Хистологичен тип на тумора

От общо 79 изследвани случая с карцином на гърдата, 63 (79,75%) са с диагноза дуктален карцином от неспециален тип (NOS), а останалите 16 (20,25%) са категоризирани като лобуларен карцином (фигура 4 – 6).

Фигура 4. *Разпределение на случаите по хистологичен вариант*



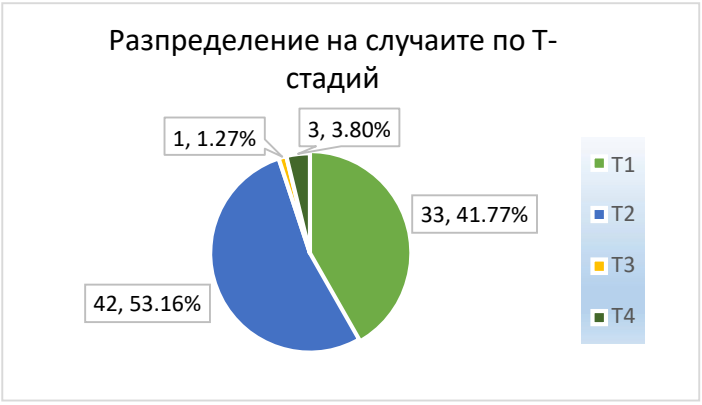
Фигура 5. *Дуктален карцином на млечната жлеза от неспециален тип, ХЕ х200.*



Фигура 6. *Лобуларен карцином на млечната жлеза, ХЕ х200.*

Т-стадий на карциномите на гърдата

От изследваните 79 случая с карцином на млечната жлеза, само при един (1,27%) пациент стадият на тумора е Т3. В стадий Т2 са 42 (53,16%) от случаите, в стадий Т1 са 33 (41,77%) от случаите и стадий Т4 се установи при 3-ма (3,80%) пациента (фигура 7).



Фигура 7. *Разпределение на случаите по Т-стадий.*

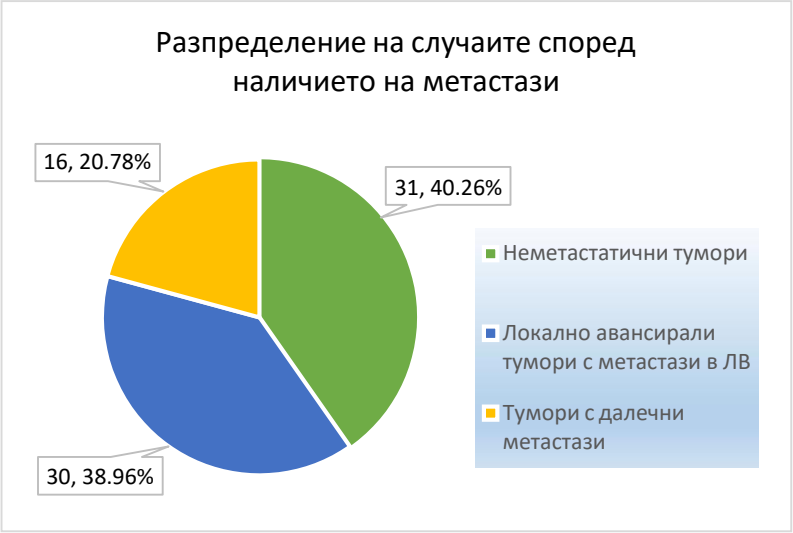
Степен на диференциация на карциномите на гърдата

Според степента на диференциация на туморите, те се разпределят както следва: високо диференцирани тумори (G1) – 17 (21,52%) случая, умерено диференцирани тумори (G2) – 33 (41,77%) случая и ниско диференцирани тумори (G3) – 29 (36,71%) случая (фигура 8). Получените от нас резултати относно разпределението на случаите с карцином на гърдата във връзка със степента на диференциация не се различава от данните на Won et al. (2021), които определят степента на диференциация на карциномите на млечната жлеза при 257 пациента. Те, подобно на нас, установяват, че най-голям е относителният дял на умерено диференцираните тумори, G2 (51,2%), следвани от ниско диференцираните тумори, G3 (29,9%) и най-малък е броят на случаите с високо диференцирани тумори, G1 (18,9%). Взети заедно, данните от литературата и тези от настоящото изследване показват, че карциномът на гърдата по време на диагностицирането му най-често показва умерена степен на диференциация.

***Фигура 8**. Разпределение на случаите по степен на диференциация на тумора.*

Метастази

Според степента им на разпространение, изследваните от нас тумори са групирани в три категории (фигура 9). Първата група обединява тумори, локализирани само в гърдата, без наличие на метастази. В тази група са включени 31 (40,26%) случая. Втората група е от 30 (38,96%) случая от локално авансирали карциноми с метастази в регионалните лимфни възли. Третата група включва 16 (20,78%) случая, при които се откриват далечниметастази. За двама от пациентите липсва информация за N и M стадия на заболяването. Установеният от нас модел на разпространение на туморния процес по време на диагностицирането му не се различава от данните в проучването на Won et al. (2021), при които също преобладават пациентите с неметастатична болест (N0), които са 146 (56,8%) от всички 257 случая. На второ място по честота е групата с локално авансиралозаболяване (N1, N2 и N3), представено от 107 случая (41,6%) и само 4 (1,6%) са пациентите с далечни метастази.

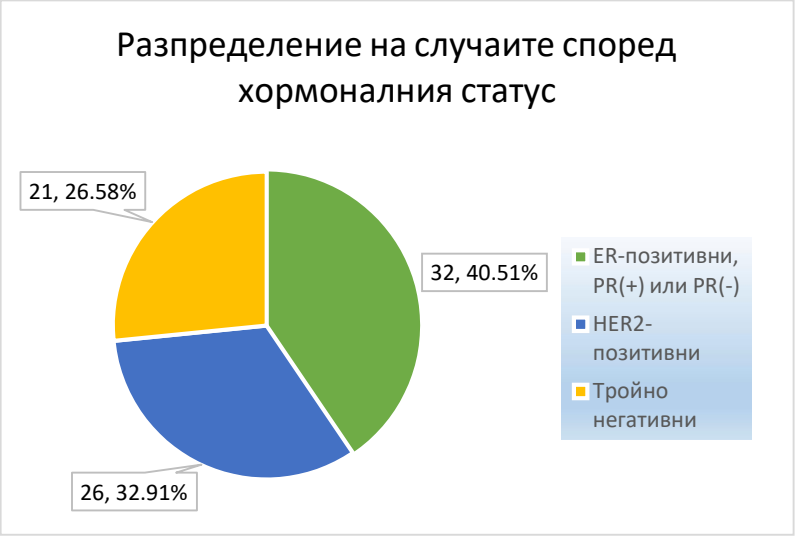


Фигура 9. *Разпределение на случаите според N и M стадия.*

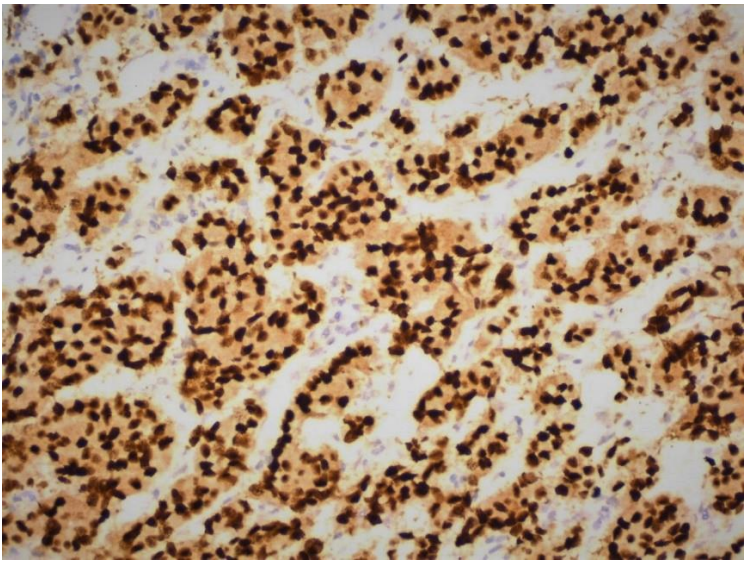
Рецепторен статус и Ki67 в туморната тъкан при карцином на гърдата

Рецепторен статус на карцинома на гърдата

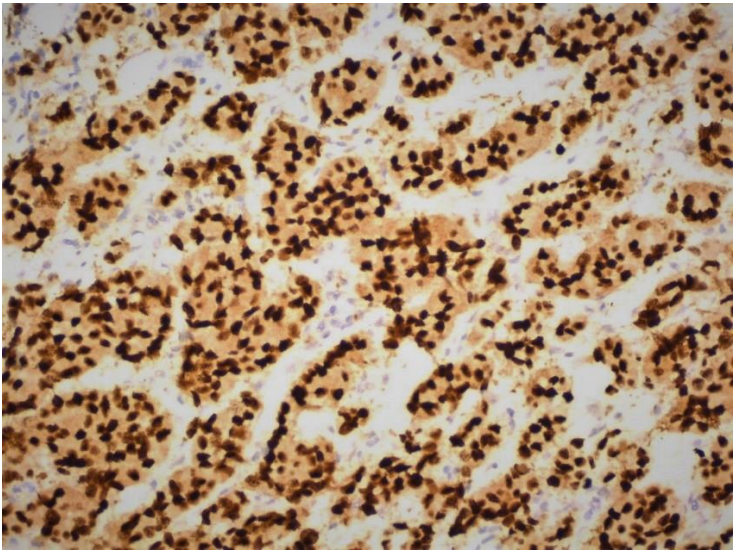
Според експресията на ER, PR и HER2 туморите са разпределени в три групи, както следва: ER-позитивни тумори - 32 (40,51%) случая, от които 30 са и PR-позитивни, а другите два са PR-негативни, HER2-позитивни тумори - 26 (32,91%) случая и тройно негативни карциноми (ER-, PR-, HER2-негативни) - 21 (26,58%) случая (фигура 10 – 13).



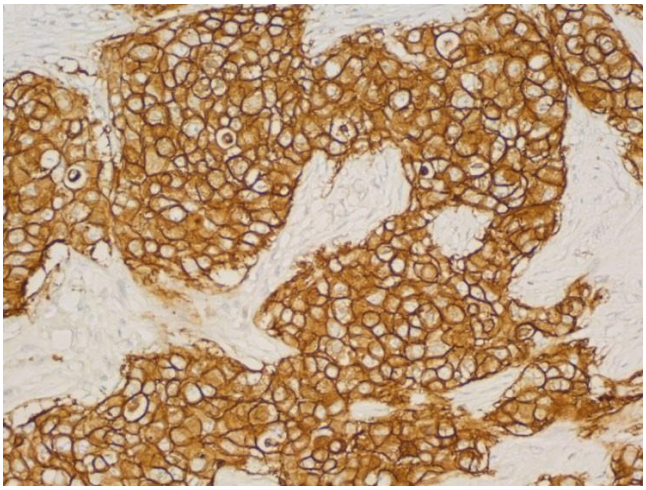
Фигура 10. *Разпределение на случаите според хормоналния статус.*



Фигура 11. *Имунохистохимична експресия на ER при ER-позитивен тумор, х 200.*



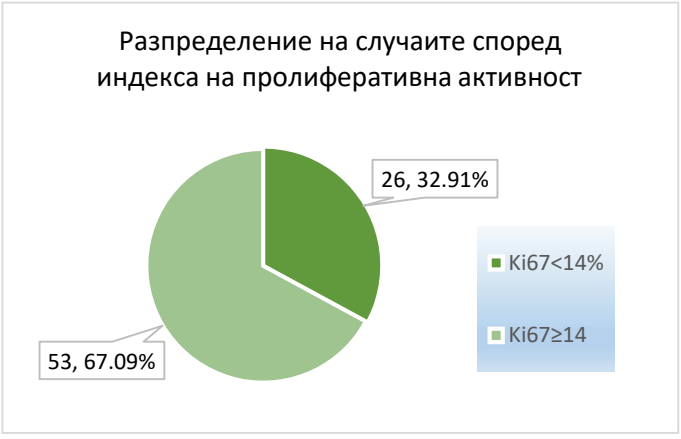
Фигура 12. *Позитивна имунохистохимична експресия на PR, х 200.*



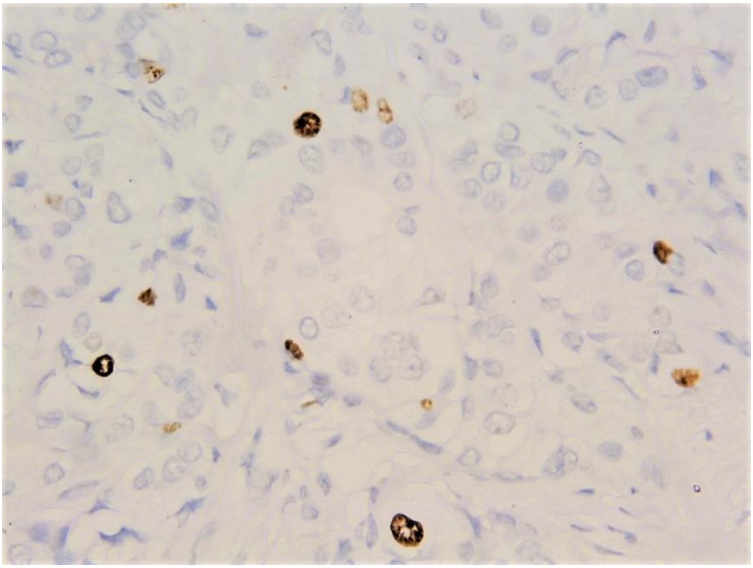
Фигура 13. *Позитивна имунохистохимична експресия на HER2, х 200.*

Експресия на Ki67 в туморната тъкан при карцином на гърдата

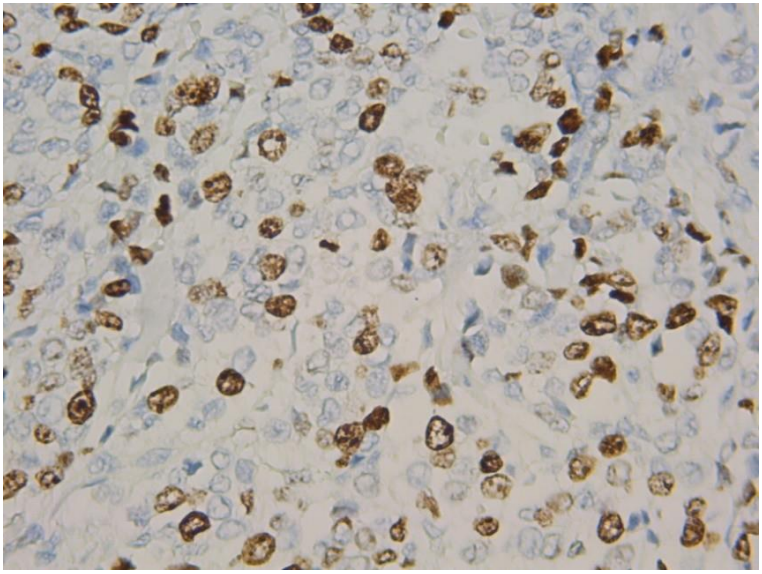
По този показател случаите са категоризирани в две групи: карциноми с Ki67<14%, които са 26 случая (32,91%) и група с Ki67≥14%, 53 случая (67,09%) (фигура 14 – 16).



Фигура 14. *Разпределение на случаите според индекса на пролиферативна активност.*



Фигура 15. *Имунохистохимична експресия на Ki67<14%, x 400*

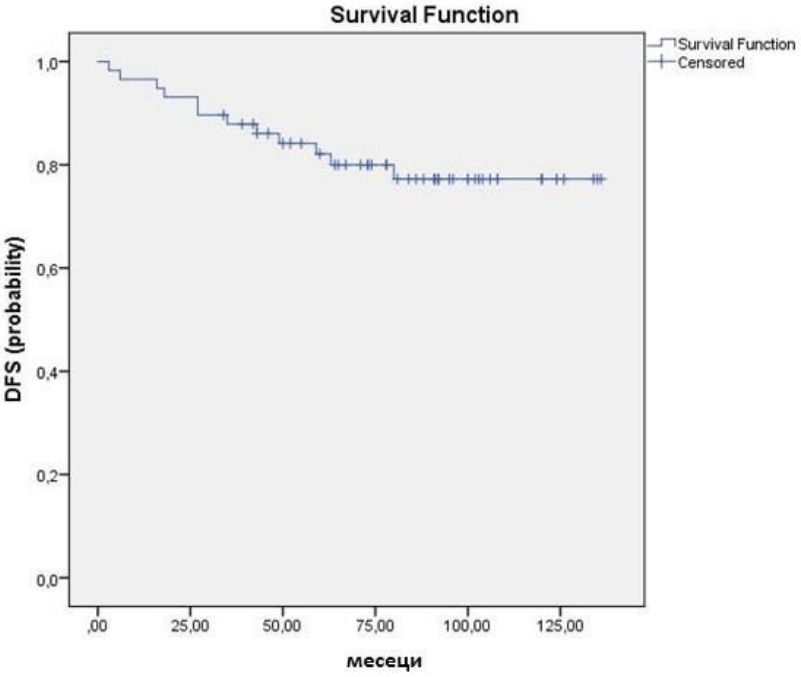


Фигура 16. *Имунохистохимична експресия на Ki67≥14%, x 400.*

Преживяемост без прогресия на пациентите с карцином на гърдата

Преживяемостта без прогресия на пациентите с карцином на гърдата в месеци е показана на фигура 17. От изследваните 79 случая на мамарен карцином, данни за преживяемостта бяха налице при 58 пациента. При всички тях е проведена адювантна хормоно-, лъче- и/или химиотерапия. След лечението е постигната ремисия и бяха налице данни за хода на заболяването след поставяне на диагнозата и проведената терапия.

Средната преживяемост без прогресия в настоящата извадка от пациенти е 113,8 месеца (CI, 102,5 – 125,1).



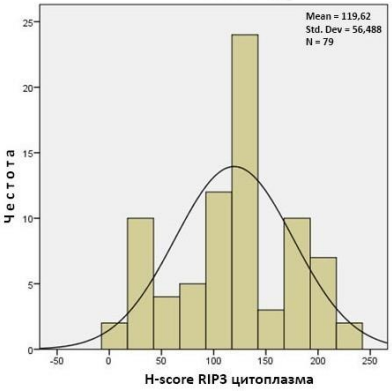
Фигура 17. *Kaplan-Meier крива на разпределение на преживяемостта без заболяване на пациентите с карцином на млечната жлеза в месеци.*

Експресия на RIP3 в туморната тъкан при мамарен карцином и в нетуморната тъкан при фибро-кистична болест на млечната жлеза

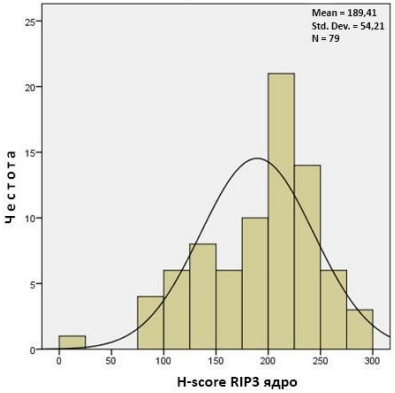
Цитоплазмената и ядрената експресия на RIP3 беше изследвана в туморната тъкан на всичките 79 пациенти. Средната стойност на цитоплазмена експресия на RIP3, определена чрез H-score е 119,6±56,4, като минималната стойност е 5, а максималната е 230 (фигура 18). Средната стойност на ядрената експресия на RIP3 е 189,4±54,2, като минималната стойност е 5, а максималната е 285 (фигура 19).

Средните стойности на цитоплазмената експресия в настоящото проучване не се различават съществено от средните стойности на цитоплазмената експресия на RIP3 при колоректален карцином, където са били 131,88±84,00, определени също чрез H-score (Стефанова Н., 2017). По отношение на средните стойности на ядрената експресия в същото проучване са отчетени стойности от 132,37±91,05 и те са значително по-ниски от получените данни в настоящото изследване.

За проверка на нормалното разпределение (test of normality) на ядрената и цитоплазмената експресия на RIP3 беше използван тестът на Shapiro-Wilk. Получените стойности на p=0,014 за цитоплазмената експресия и p=0,004 за ядрената експресия показват сигнификантна разлика в разпределението на случаите. Това означава, че интензивността на реакцията за RIP3 в ядрото и цитоплазмата на туморните клетки при отделните случаи не следват нормалното разпределение (фигура 18 и 19).



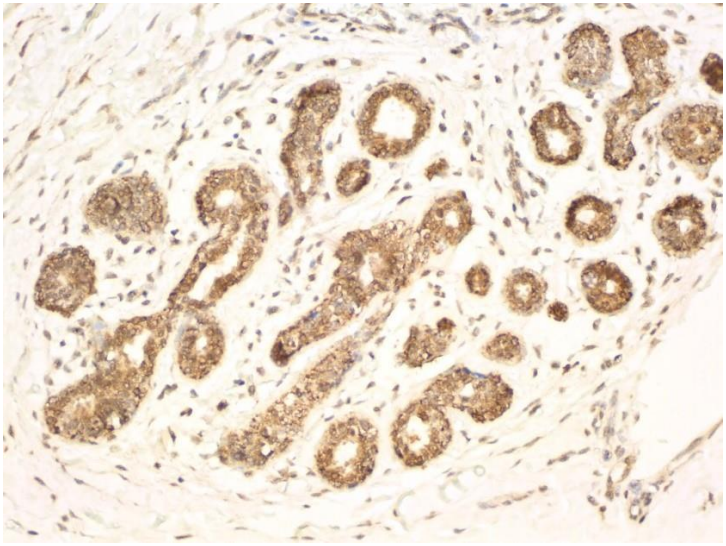
Фигура 18. *Цитоплазмена експресия на RIP3 в туморна тъкан на мамарен карцином.*



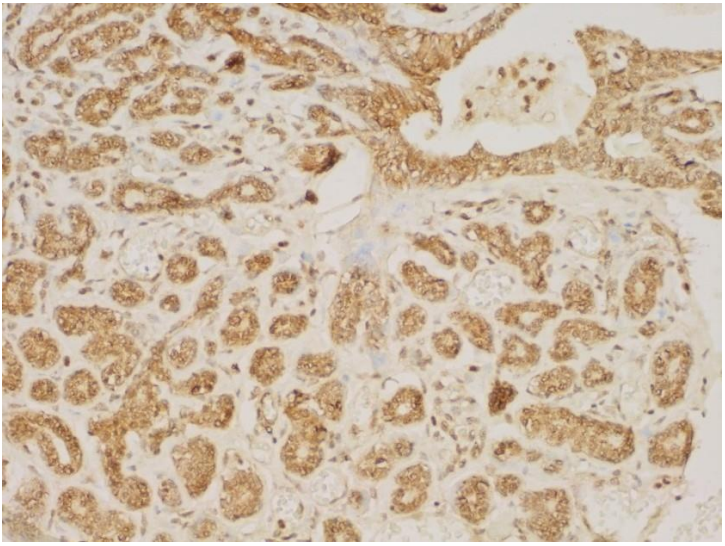
Фигура 19. *Ядрена експресия на RIP3 в туморна тъкан на мамарен карцином.*

Определиха се и стойностите на ядрената и цитоплазмената експресия на RIP3 в туморната тъкан спрямо медианата и по персентили. Медианата на имунохистохимичната реакция в цитоплазмата на туморните клетки е 120, а тази в ядрата е 200. Стойностите на ядрена и цитоплазмена експресия на RIP3 до 33-тия персентил, между 33-тия и 66-тия персентил и над 66-тия персентил съответно са: до 102,00, между 102,00 и 139,00 имежду 139,00 и 230,00 за цитоплазмената експресия и до 182,60,между 182,60 и 215,00 и между 215,00 и 285,00 за ядренатаекспресия.

При 19 пациенти с ФКБ, разпределени в две групи (10 случая с непролиферативен тип ФКБ и 9 случая с пролиферативен тип ФКБ), беше изследвана експресията на RIP3, като цитоплазмена и ядрена реакция се установи и при двата типа ФКБ (фигура 20, 21).



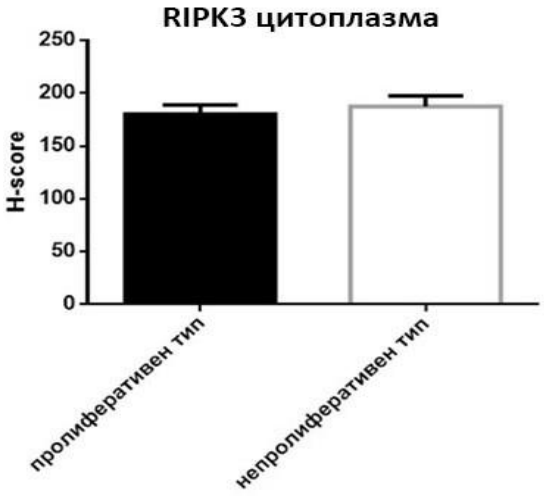
Фигура 20. *Имунохистохимична експресия на RIPK3 при непролиферативен тип ФКБ, x200.*



Фигура 21. *Имунохистохимична експресия на RIPK3 при пролиферативен тип ФКБ, x200.*

Средната стойност на цитоплазмена експресия на RIP3 в групата на пролиферативния тип ФКБ е 180,6±8,4, като минималната е 170, а максималната е 195. При случаите с непролиферативен тип ФКБ нивата на експресия в цитоплазмата са както следва: средна стойност – 187,5±10,1, минимална – 170 и максимална – 200. Не се установи съществена разлика между цитоплазмената експресия на маркера за некроптоза в двете групи пациенти (p>0,05) (фигура 22).

Анализът на цитоплазмената експресия на RIPK3 в съседната на колоректален карцином нетуморна тъкан, на базата на средните стойности, показа по-ниски нива на експресия – 149,38±92,00 (Н. Стефанова (2017).

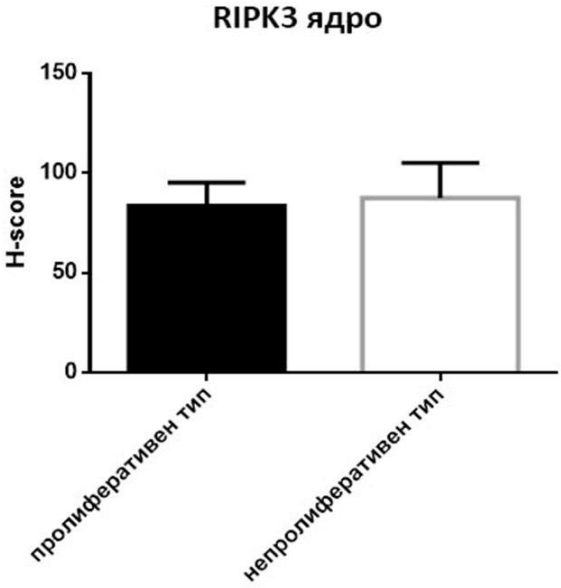


Фигура 22. *Цитоплазмена експресия на RIPK3 при пролиферативен и непролиферативен тип ФКБ.*

Средните стойности на ядрената експресия на RIP3 в тъканите на пролиферативния тип ФКБ е 83,6±11,7, като минималната е 60, а максималната е 95. Близки по стойност са резултатите и в групата на непролиферативния тип ФКБ, където средната стойност е 87,5±17,6, минималната е 60, а максималната – 115 (фигура 23).

Независимо от хистологичния вариант на ФКБ, ядрената експресия в тъканите на гърдата е по-ниска в сравнение с ядрената експресия в нетуморната тъкан на колоректален карцином, където средните стойности са 135,94±94,15 (Н. Стефанова, 2017).

Според нас, разликите в цитоплазмената и ядрената експресия при ФКБ и нетуморната тъкан при колоректален карцином могат да бъдат тъканно обусловени.



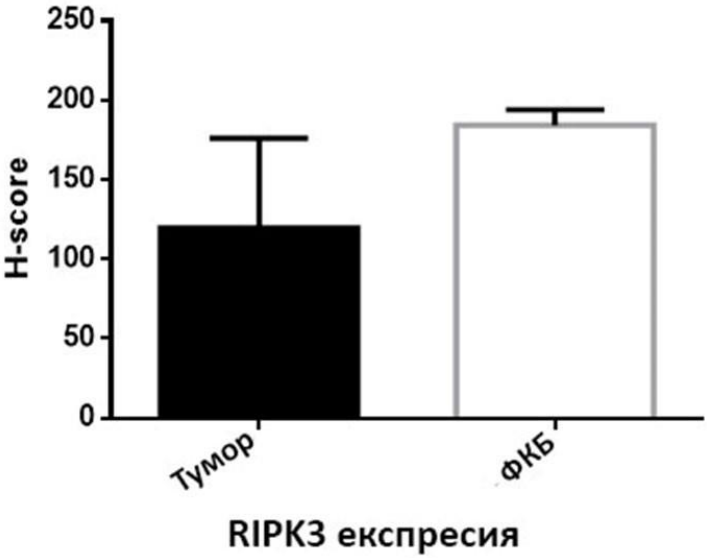
Фигура 23. *Ядрена експресия на RIPK3 при пролиферативен и непролиферативен тип ФКБ.*

Предвид представените данни относно цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK3 за ФКБ се прецени, че двете групи пациенти с ФКБ могат да се обединят и да се разглеждат заедно. При последващите анализи между експресията на RIPK3 в туморната тъкан и в контролната група, са взети средните стойности на цитоплазмената и ядрената експресия на RIPK3 общо за всички пациенти с ФКБ, които са съответно 184,2±9,7 и 85,6±14,8.

Сравнителен анализ между средните стойности на експресията на RIP3 в туморната тъкан и в контролната група

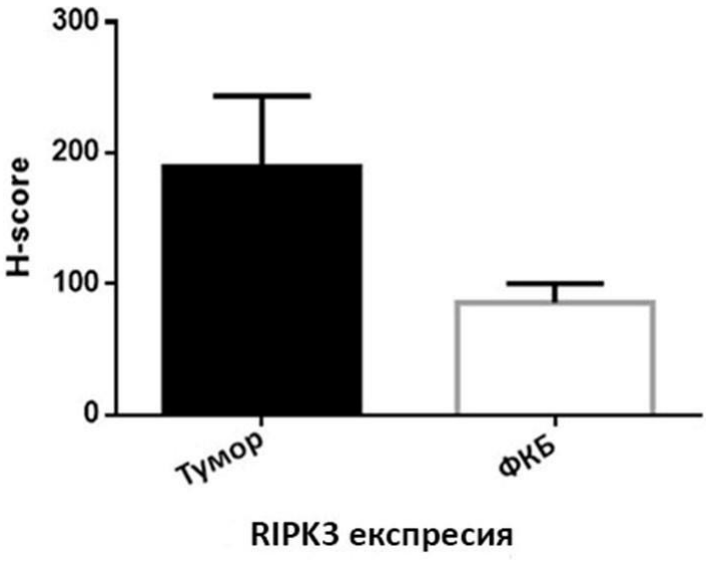
При анализа на средните стойности на цитоплазмената и ядрената експресия на RIP3 в туморната тъкан и в контролната група се установи статистически значима разлика и при двата вида експресия ($p<0.0001$).

На фигура 24 е представен H-score на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на мамарния карцином и в контролната група. В тъканите при ФКБ експресията е по-висока в сравнение с туморната тъкан.



Фигура 24. *Цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан и във ФКБ.*

Данните относно ядрената експресия са напълно противоположни (фигура 25). Ядрената експресия на RIPK3 в туморната тъкан е значително по-висока отколкото в контролната група.



Фигура 25. *Ядрена експресия на RIPK3 в туморната тъкан и във ФКБ.*

Получените от нас данни се различават от резултатите, публикувани от Стефанова (2017) за колоректален карцином, при който не се е открила статистически значима разлика по отношение на двете локализации на имунохистохимичната експресия на RIPK3, ядрена и цитоплазмена, между туморната и нетуморната тъкан, когато е използвана тристепенна скала на оценка: „–“, „+“, „++“. Нашите резултати не се различават от данните на Feng et al. (2015), които оценяват имунохистохимичната цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на 112 пациента с дебелочревен карцином и я сравняват с нормална мукоза, използвайки също три степени на оценка. Те установяват по-високо цитоплазмено ниво на експресия на RIPK3 в нетуморната тъкан в сравнение с туморната тъкан. Подобно понижение на тъканната експресия на RIPK3 при колоректален карцином, в сравнение със съседната нетуморна тъкан, е установено и от други автори (Moriwaki et al., 2015). Освен при карцином на дебелото черво, по-ниски нива на експресия на RIPK3 са наблюдавани при CD34+ бласти от пациенти с остра миелоидна левкемия в сравнение със CD34+

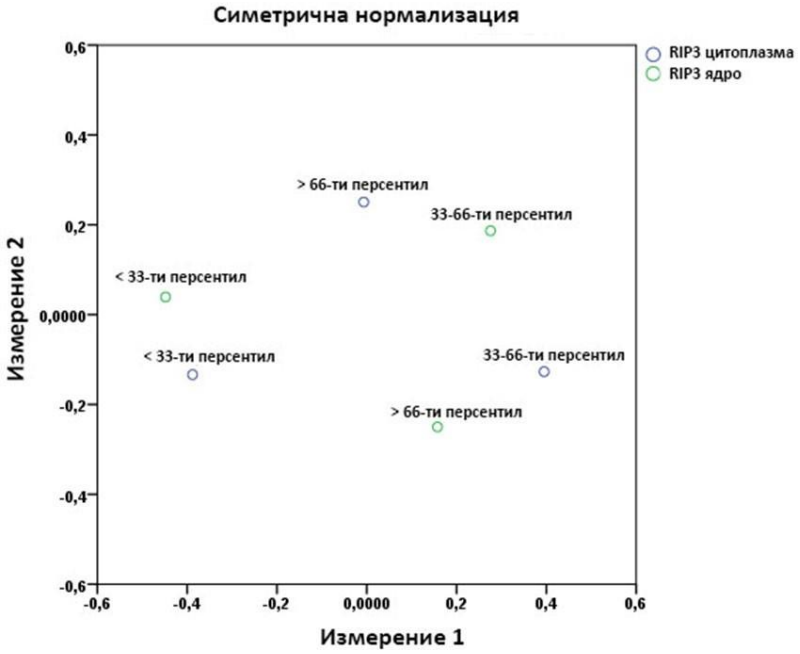
клетки от костен мозък на здрави донори при прилагане на RQ-PCR (Nugues AL et al., 2014). Резултати, подобни на настоящото изследване са установени при анализиране на тъканната експресия на RIPK3 чрез Western blot (Karami-Tehrani et al.,2016). Авторите определят нивото на RIPK3 при 30 случая с карцином на млечната жлеза и го сравняват със съседен нормален паренхим от гърда при 20 от пациентите и установяват сигнификантно по-ниски нива на експресия на RIPK3 в тумора. Получените от нас резултати и данните от литературата подсказват, че туморите, в хода на неопластичната прогресия, са придобили механизми,чрез които могат да избегнат некроптозата посредством понижена експресия на ключови компоненти от сигналния път натози вид клетъчна смърт.

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

За да изследваме дали има зависимост между ядрената и цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан приложихме анализа на съответствието (correspondence analysis). На таблица 4 е представено разпределението на случаите според реакцията на RIPK3 в ядрото и цитоплазмата на туморните клетки по персентили. Посочените данни са представени графично на фигура 26, при която разстоянието между точките на отделните категории отразява зависимостта между тях. Колкото по-близо една до друга са разположени две точки в координатната система, толкова по-силна е зависимостта между тях. От фигура 26 се вижда, че точките са разположени далеч една от друга, което означава, че няма зависимост между ядрената и цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан. Сравнителният анализ показва, че липсва сигнификантна зависимост между изследваните показатели (p=0,926).

Таблица 4. *Разпределение на случаите според ядрената и цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан по персентили.*

Група	**RIPK3 (ниска ядрена експр.)**	**RIPK3 (умерена ядрена експр.)**	**RIPK3 (висока ядрена експр.)**	**P-value**
RIPK3 (ниска цитопл. експр.)	10 (38,5%)	8 (28,6%)	8 (32,0%)	**0,926**
RIPK3 (умерена цитопл. експр.)	7 (26,9%)	10 (35,7%)	9 (36,0%)	
RIPK3 (висока цитопл. експр.)	9 (34,6%)	10 (35,7%)	8 (32,0%)	
Общо	**26 (100%)**	**28 (100%)**	**25 (100%)**	



Фигура 26. *Зависимост между ядрената и цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан.*

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от клинико-морфологичните характеристики, молекулярния профил, пролиферативния маркер Ki67 и преживяемостта на пациентите с карцином на гърдата

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от клинико-морфологичните характеристики на тумора

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от възрастта на пациентите

За да анализираме данните с цел оценка на зависимостта между цитоплазмената експресия на RIPK3 и възрастта на пациентите, се използва Chi-square (χ^2) тест. Стойността на полученото p=0,639 показва, че липсва зависимост между двата показателя: нивото на цитоплазмена експресия на RIPK3 и разпределението на пациентите по възраст (над и под 65 г.) (таблица 5).

Таблица 5. *Разпределение на пациентите по възраст спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
≤ 65 г.	27 (67,5%)	25 (64,1%)	**0,639**
> 65 г.	13 (32,5%)	14 (35,9%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Тестът Mann-Whitney, приложен за анализ между цитоплазмената експресия на RIPK3 във връзка с възрастта на пациентите, отново потвърди липсата на сигнификантна зависимост между двата параметъра (p=0,992). Средната стойност на цитоплазмената експресия на RIPK3 в групата на пациентите под 65 г. възраст е 119,4±55,14, като при останалите 27 пациента над 65 г. тя е почти същата – 120,0±60,08 (таблица 6).

Таблица 6. *Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и възрастта на пациентите.*

Група	Брой случаи (n)	Средна стойност на цитоплазмена експресия на RIPK3	Стандартно отклонение	P-value
≤ 65 г.	52	119,4	55,14	**0,992**
> 65 г.	27	120,0	60,08	

Won et al. (2021) търсят зависимост между имунохистохимичната експресия на RIPK3 в цитоплазмата на туморните клетки и възрастта при 257 пациента с карцином на млечната жлеза и подобно на нас, не откриват зависимост между двата показателя. В тяхното изследване пациентите са разделени на две групи, но за граница те приемат 50 г. Данните от настоящото проучване не се различават от тези на Стефанова (2017), която анализира двата показателя при колоректален карцином и подобно на нас разделя пациентите на две групи: под 65 г. и над 65 г. При колоректален карцином, Feng et al. (2015) също не откриват сигнификантна зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и възрастта, като границата е отново 65 г. В литературата има данни, различни на представените досега. Karami-Tehrani et al. (2016), разделят пациентите с мамарен карцином на три възрастови групи: под 40 год., между 40 и 60 год. и над 60 год. Те установяват статистически значима по-висока експресия на RIPK3 при туморите, когато пациентите са над 60 г., в сравнение с другите две групи – под 40 г. и между 40 и 60 г. Според нас, различията по отношение показателя възраст вероятно се дължат на случайния подбор на пациентите в проучванията и зависят от избрания начин на разпределение по групи.

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от хистологичния вид на тумора

Сравнителният анализ на данните на цитоплазмената експресия на RIPK3 по отношение на хистологичния вариант на тумора се извърши с помощта на χ^2 тест. Стойността на полученото p=0,082 показва, че има известна тенденция за

зависимост между нивата на цитоплазмена експресия на RIPK3 и хистологичния вариант на тумора, но разликата не е статистически значима (таблица 7). При лобуларния карцином преобладават случаите с висока експресия, докато при дукталния вариант по-често се среща ниската експресия.

Таблица 7. *Разпределение на туморите по хистологичен вариант спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
Дуктален карцином	35 (87,5%)	28 (71,8%)	**0,082**
Лобуларен карцином	5 (12,5%)	11 (28,2%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

При сравнителния анализ на стойностите на цитоплазмената експресия на RIPK3 спрямо хистологичния вариант на тумора чрез теста на Mann-Whitney се установи статистически значима разлика в експресията на RIPK3 между дукталния и лобуларния карцином (p=0,046). Средната стойност на цитоплазмената експресия на RIPK3 при 16-те случая на лобуларен карцином е 147,2±52,19, като тя е значително по-висока в сравнение с останалите 63 пациента с дуктален карцином, при които стойностите са 112,6±55,76 (таблица 8).

Таблица 8. *Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и хистологичния вариант на тумора.*

Група	**Брой случаи (n)**	**Средна стойност на цитопл. експр. на RIPK3**	**Стандартно отклонение**	**P-value**
Дуктален карцином	63	112,6	55,76	**0,046**
Лобуларен карцином	16	147,2	52,19	

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от Т-стадия на туморите

Сравнителният анализ между цитоплазмената експресия на RIPK3 и Т-стадия на включените в изследването тумори беше първоначално извършен чрез χ^2 тест, който не показа зависимост между двата изследвани показателя (p=0,695) (таблица 9).

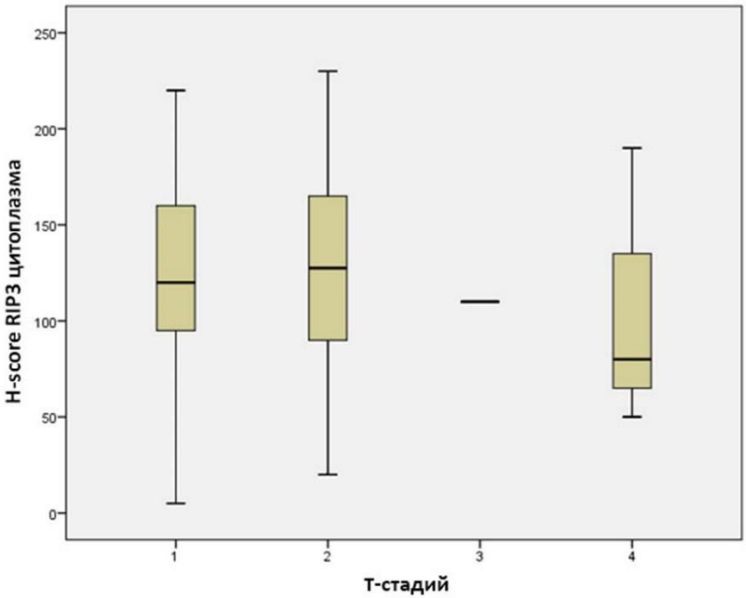
Таблица 9. *Разпределение на случаите по Т-стадий спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
T1	17 (42,5%)	16 (41,0%)	**0,695**
T2	20 (50,0%)	22 (56,4%)	
T3	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
T4	2 (5,0%)	1 (2,6%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Анализът на данните чрез теста Mann-Whitney за оценяване на зависимостта между цитоплазмената експресия на RIPK3 и Т-стадия на туморите се направи само за случаите, диагностицирани в Т1 и Т2 стадий. Установеното p=0,608 показва липса на статистически значима зависимост между двата изследвани показателя. Средните стойности на цитоплазмената експресия на маркера за некроптоза при 33-те случая с Т1 стадий са 116,2±61,42, а при 42 от случаите, които са в Т2 стадий, са 123,5±53,13 (таблица 10). За трите тумора в Т4 стадий бяха определени средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 от 106,7±73,71, докато за единствения случай с карцином на гърдата в Т3 стадий, определянето на средни стойности не беше възможно. Поради малкия брой случаи в последните две категории, те не бяха включени в Mann-Whitney теста (фиг. 27).

Таблица 10. *Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и Т-стадия на туморите.*

Група	Брой случаи (n)	Средна стойност на цитопл. експр. на RIPK3	Стандартно отклонение	P-value
T1	33	116,2	61,42	**0,608**
T2	42	123,5	53,13	



Фигура 27. *Разпределение на случаите по Т-стадий спрямо средните стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморните клетки.*

При сравняване на собствените резултати с тези от проучването на Won et al. (2021) за зависимостта между нивото на цитоплазмена експресия на RIPK3 и Т-стадия на туморите, ние установихме, че има известни сходства в получените данни от двете изследвания. Won et al. (2021) съобщават, че размерът на туморите показва обратна зависимост от цитоплазмената експресия на маркера за некроптоза в туморните клетки. Според техните данни големите размери на тумора са асоциирани с ниска експресия на RIPK3 (Won KY et al., 2021). Авторите на

проучването анализират 13 случая на карцином на млечната жлеза в T3 и T4 стадий от общо 257 пациента и установяват, че при 2 (1,8%) от тях има висока цитоплазмена експресия в тумора, докато при останалите 11 (7,5%) пациента експресията е ниска. В настоящото изследване, от включени 79 пациента, 4-ма са в T3 и T4 стадий, като при 3 (7,5%) от тях има ниска цитоплазмена експресия на RIPK3, а при 1 (2,6%) тя е висока (таблица 15) – данни, които не се различават от тези на Won et al. (2021). Поради изключително малкия брой пациенти в T3 и T4 стадий, в настоящото изследване няма възможност за статистическианализ на данните. Резултатите на Feng et al. (2015) при колоректален карцином не се различават от тези на Won et al. (2021) при мамарен карцином. Feng et al. (2015) също установяват, че колоректалните карциноми в T3 и T4 стадий имат ниска цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморните клетки. Според Karami-Tehrani et al. (2016), обаче, няма сигнификантна разлика между нивото на експресия на RIPK3 в туморните клетки и размера на мамарния карцином. В изследването на Karami-Tehrani et al. (2016), размерът на туморите е разделен на две категории: под 2,5 см. и над 2,5 см., а не според T-стадия на заболяването. Подобни на Karami-Tehrani et al. (2016) резултати са наблюдавани и при колоректален карцином (Стефанова 2017). Стефанова също не открива статистически значима разлика в експресията на RIPK3 при карциноми на дебелото черво, които се намират в различен T-стадий. Според нас, вариациите в резултатите могат да се дължат от една страна на различния брой пациенти с карциноми, включени в отделнте T-стадии, а от друга да са свързани с вида на изследваните тумори.

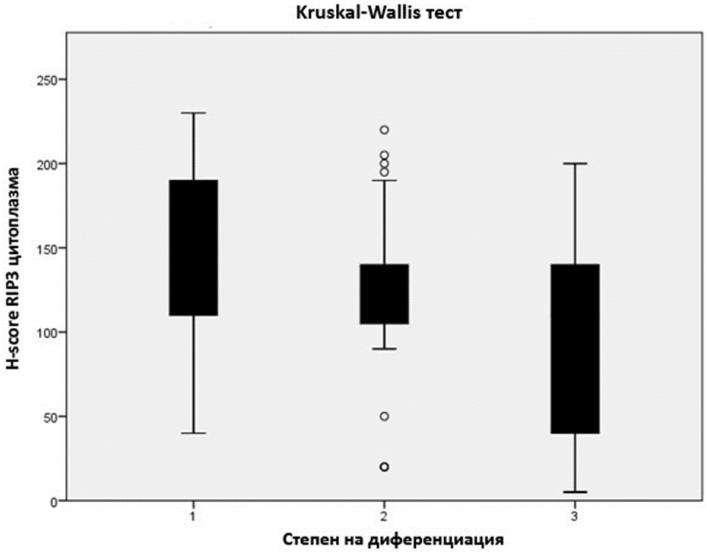
Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от степента на диференциация на тумора (G)

Тестът Kruskal-Wallis за оценка на зависимостта между цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморните клетки и степента на диференциация на карциномите показа статистически значима разлика (p=0,034). От направения анализ става ясно, че цитоплазмената експресия на RIPK3 се различава

между групите тумори с различна степен на диференциация (G1, G2 и G3) (фигура 28, таблица 11).

Таблица 11. *Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и степента на диференциация на тумора.*

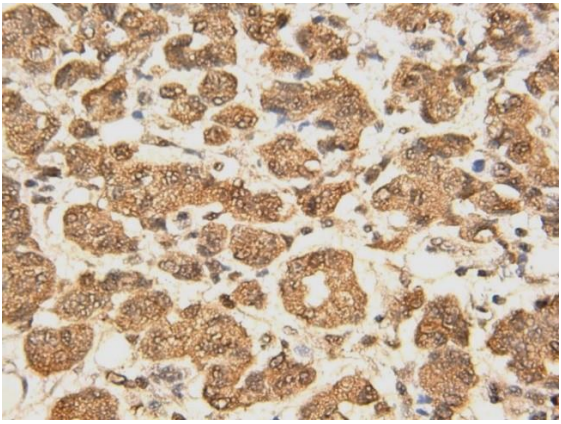
Група	Брой случаи (n)	Средна стойност на цитопл. експр. на RIPK3	Стандартно отклонение	P-value
G1	17	146,2	50,70	**0,034**
G2	33	124,7	50,06	
G3	29	98,3	60,21	



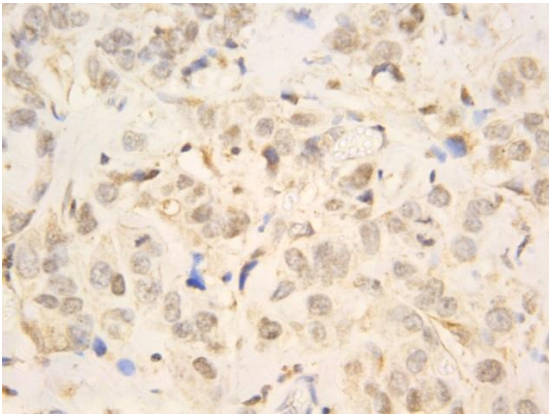
Фигура 28. *Разпределение на случаите според степента им на диференциация спрямо средните стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморните клетки.*

При последвалия допълнителен анализ на данните за оценка на зависимостта между туморите с различна степен на диференциация във връзка с експресията на RIPK3, групите се сравниха по двойки (Pairwise Comparisons). На таблица 11 са представени средните стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 при карциномите с G1, G2 и G3. Туморите с висока степен

на диференциация имат средни стойности на експресия на RIPK3 146,2±50,70 (фигура 29) и те са сигнификантно по-високи спрямо туморите с ниска степен на диференциация (средни стойности 98,3±60,21; p=0,011) (фигура 30). Туморите с G3 показват само тенденция към по-ниска експресия на цитоплазмения некроптотичен маркер в сравнение с туморите с G2 (124,7±50,06; p=0,104). Не се откри значима разлика в цитоплазмената експресия на RIPK3 между туморите с висока и умерена степен на диференциация (p=0,225).



Фигура 29. *Висока цитоплазмена експресия на RIPK3 при високо диференцирани тумори (G1), x 400.*



Фигура 30. *Ниска цитоплазмена експресия на RIPK3 при ниско диференцирани тумори (G3), x 400.*

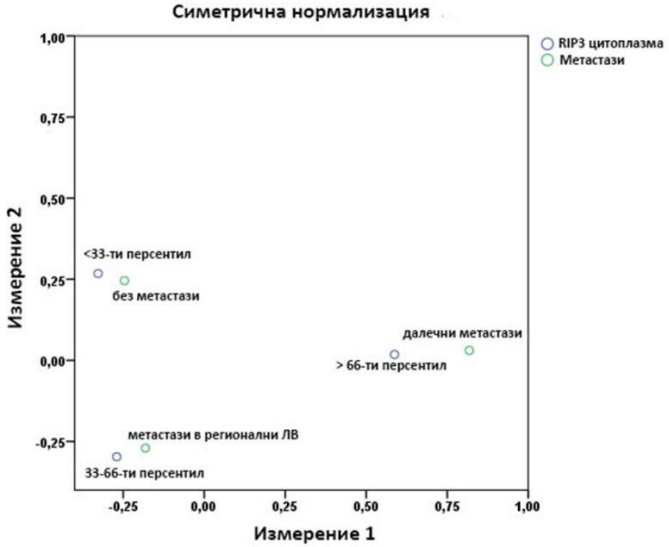
Won et al. (2021) откриват, че ниската цитоплазмена експресия на RIPK3 при мамарен карцином е асоциирана с изразен ядрен атипизъм. Получените от нас резултати, че ниската експресия на RIPK3 в цитоплазмата на клетките на мамарен карцином се среща при ниска степен на диференциация на тумора не се различава от тези на Won et al. (2021), защото G3 диференциацията на туморите се асоциира с изразен ядрен плеоморфизъм. При оценката на експресията на RIPK3 в тумора във връзка с цялостната степен на диференциация на мамарните карциноми, Won et al. (2021) не откриват статистически значима зависимост между G и RIPK3 експресията, което се различава от получените от нас резултати. Feng et al. (2015), подобно на Won et al. (2021), също не откриват статистически значима разлика между цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморните клетки и степента на диференциация на колоректалния карцином. При изследването на Feng et al. (2015), както и при нас, по-голямата част от туморите с ниска степен на диференциация показват слаба до липсваща експресия на RIPK3 в цитоплазмата, но вероятно поради малкия брой случаи с G3, включени в проучването им (само 11 от общо 112), статистическият анализ при тяхното изследване не показва сигнификантна разлика в сравнение с пациентите с G1 и G2 тумори. Независимо че в изследването на Стефанова (2017) преобладават карциноми на дебелото черво с G3 диференциация, които показват ниска степенна експресия на RIPK3, тя също не докладва за статистически значима зависимост между двата показателя (10 случая спрямо 4 случая с висока експресия). За разлика от предходните изследвания, резултатите от проучването на Karami-Tehrani et al. (2016), са напълно в съответствие с данните от настоящото изследване. Авторите установяват, че ниските нива на експресияна RIPK3 се срещат при ниско диференцираните мамарни карциноми за разлика от високо и умерено диференцираните тумори, където експресията е висока. Подобно на нас, те не откриват сигнификантна зависимост между нивата на експресия на RIPK3 между карциномите с G1 и G2. На базата на данните отлитературата и на тези получени от нас, можем да заключим, че несъответствията в получените резултати най-вероятно се дължат на недостатъчния брой случаи, включени в групата на ниско диференцираните тумори.

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от степента на разпространение на тумора (метастази)

Анализът на съответствието (correspondence analysis) беше приложен за оценка на цитоплазмената експресия на RIPK3 във връзка със степента на разпространение на тумора. На таблица 12 е представено разпределението на случаите според присъствието или липсата на метастази спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по персентили. Посочените данни са представени графично на фигура 31, от която се вижда, че няма достатъчно силна зависимост между изследваните показатели. Това се потвърждава и от липсата на сигнификантна разлика между цитоплазмената експресия на RIPK3 и степента на разпространение на туморите (p=0,625).

Таблица 12. *Разпределение на случаите според степента на разпространение на туморите спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по персентили.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (умерена експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
Без метастази	12 (46,1%)	10 (40,0%)	9 (34,6%)	**0,625**
Метастази в регионални ЛВ	10 (38,5%)	11 (44,0%)	9 (34,6%)	
Далечни метастази	4 (15,4%)	4 (16,0%)	8 (30,8%)	
Общо	**26 (100%)**	**25 (100%)**	**26 (100%)**	



Фигура 31. *Връзка между цитоплазмената експресия на RIPK3 и степента на разпространение на тумора.*

Подобно на резултатите, получени от нас, Feng et al. (2015) и Стефанова (2017), анализирайки имунохистохимичната цитоплазмена експресия на RIPK3 във връзка със статуса на регионалните лимфни възли при колоректални карциноми, не установяват зависимост между двата показателя.

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от молекулярния профил на тумора

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от ER

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от площта на експресия на ER в туморите (Proportion score – PS)

Силата на зависимостта между цитоплазмената експресия на RIPK3 и площта на експресия на ER в туморите беше оценена с коефициента Kendall's tau c. Стойността му от 0,197 показва слаба

към умерено изразена позитивна зависимост между изследваните показатели, която се свързва с тенденция за слаба сигнификантна зависимост между тях (p=0,079). Разпределението на случаите според степента на разпространение на ER в туморите е показано на таблиза 13.

Таблица 13. *Разпределение на случаите според степента на разпространение на ER в туморите спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
ER PS0	18 (45,0%)	8 (20,5%)	**0,079**
ER PS2	0 (0,0%)	1 (2,6%)	
ER PS3	0 (0,0%)	1 (2,6%)	
ER PS4	2 (5,0%)	4 (10,3%)	
ER PS5	20 (50,0%)	25 (64,0%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от интензивността на експресията на ER в туморните клетки (Intensity score – IS)

С коефициента Kendall's tau c се определи силата на зависимостта между цитоплазмената експресия на RIPK3 и интензитета на реакцията на ER в туморните клетки. Стойността му е 0,341, което показва силна положителна зависимост между изследваните показатели. Това означава, че цитоплазмената експресия на RIPK3 и интензитета на реакцията за ER в туморните клетки са свързани със сигнификантна зависимост (p=0,003). При изразена експресия на ER в ядрата на туморните клетки, цитоплазмената експресия на RIPK3 в клетките също е висока. На таблица 14 е представено разпределението наслучаите според интензивността на експресията на ER в туморите.

Таблица 14. *Разпределение на случаите според интензивността на реакцията за ER в туморите спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

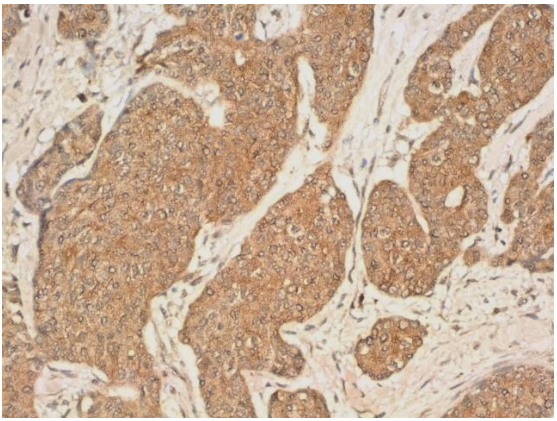
Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
ER IS0	18 (45,0%)	8 (20,5%)	**0,003**
ER IS1	2 (5,0%)	1 (2,6%)	
ER IS2	9 (22,5%)	8 (20,5%)	
ER IS3	11 (27,5%)	22 (56,4%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от общия скор на ER в туморните клетки (Total score – TS)

Чрез коефициента Kendall's tau c се установи стойност от0,297, което показва умерена към силна положителна зависимостмежду цитоплазмената експресия на RIPK3 и общия скор отплощта и интензивността на реакцията за ER в туморните клетки. Тази позитивна зависимост се подкрепя и от стойностите нар=0,011 между двата показателя: цитоплазмената експресия на RIPK3 и TS на ER в туморните клетки. Получените резултати показват, че колкото по-висок е TS на ER в туморните клетки, толкова по-силна е цитоплазмената реакция на RIPK3 в клетките(фигура 32). И обратното, колкото по-нисък е TS на ER в туморните клетки, толкова по-слаба е цитоплазмената експресия на RIPK3 в клетките. На таблица 15 е представено разпределението на случаите според общия скор от площта и интензитета на реакцията за ER и RIPK3 в туморните клетки.

Таблица 15. *Разпределение на случаите според TS на ER в туморните клетки спрямо цитоплазмената експресия на RIP3 по медианата.*

Група	RIP3 (ниска експр.)	RIP3 (висока експр.)	P-value
ER TS0	18 (45,0%)	8 (20,5%)	**0,011**
ER TS4	0 (0,0%)	1 (2,6%)	
ER TS5	1 (2,5%)	2 (5,1%)	
ER TS6	2 (5,0%)	1 (2,6%)	
ER TS7	8 (20,0%)	7 (17.9%)	
ER TS8	11 (27,5%)	20 (51,3%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	



Фигура 32. *Висока цитоплазмена експресия на RIPK3 при ER-позитивен тумор с TS=8, x 200.*

Получените от нас резултати са в съответствие с данните от проучването на Karami-Tehrani et al. (2016), които съобщават за сигнификантна зависимост между експресията на RIPK3 в туморните клетки и ER статус на мамарните карциноми. Те установяват, че ER-негативните тумори са свързани с по-ниско ниво на експресия на маркера за некроптоза. Не всички автори откриват подобна зависимост. Според Won et al. (2021) зависимост между експресията на RIPK3 и ER няма.

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от PR

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от площта на експресия на PR в туморите (Proportion score – PS)

Стойността на коефициента Kendall's tau с за връзката между цитоплазмената експресия на RIPK3 и степента на разпространение на PR в туморите е 0,322. Тя показва наличието на силна положителна зависимост между двата показателя, което се потвърждава и от установената сигнификантна зависимост между тях (p=0,005). Тези данни насочват към идеята, че колкото повече туморни клетки експресират прогестерон, толкова по-изразена е цитоплазмената реакция на RIPK3. Разпределението

на случаите според степента на разпространение на PR в туморите е показано на таблица 16.

Таблица 16. *Разпределение на случаите според степента на разпространение на PR в туморите спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
PR PS0	23 (57,5%)	12 (30,8%)	**0,005**
PR PS1	1 (2,5%)	1 (2,6%)	
PR PS2	3 (7,5%)	2 (5,1%)	
PR PS3	2 (5,0%)	4 (10,3%)	
PR PS4	5 (12,5%)	6 (15,4%)	
PR PS5	6 (15,0%)	14 (35,9%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от интензивността на експресия на PR в туморните клетки (Intensity score – IS)

Зависимостта между цитоплазмената експресия на RIPK3 и интензитета на реакцията на PR в туморните клетки на базата на коефициента Kendall's tau c е 0,334, което означава силна положителна зависимост между тях. Тези резултати са свързани с присъствие на сигнификантна зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и интензитета на реакцията за PR в туморните клетки (p=0,003). Данните показват, че колкото е по-изразена експресията на прогестерон в ядрата на туморните клетки, толкова по-силна е цитоплазмената реакция на RIPK3 в клетките. На таблица 17 е представено разпределението на случаите според двете степени на експресия на PR в туморите.

Таблица 17*. Разпределение на случаите според интензивността на реакцията за PR в туморите спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експр.)	RIPK3 (висока експр.)	P-value
PR IS0	23 (57,5%)	12 (30,8%)	**0,003**
PR IS1	4 (10,0%)	3 (7,7%)	
PR IS2	9 (22,5%)	13 (33,3%)	
PR IS3	4 (10,0%)	11 (28,2%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от общия скор на разпространение и интензитет на реакцията за PR в туморните клетки (Total score – TS)

Коефициента Kendall's tau c за връзката между двата показателя: цитоплазмена експресия на RIPK3 и общия скор на разпространение и интензитет на реакцията за PR в туморните клетки е 0,333, което означава силна позитивна зависимост между двата показателя. Тази положителна зависимост се подкрепя и от стойностите на p=0,004, показващи присъствие на сигнификантна зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и TS на PR в туморните клетки. При висок TS на PR в туморните клетки, цитоплазмената експресия на RIPK3 в клетките също е висока. На таблица 18 е представено разпределението на случаите според общия скор на разпространение и интензитет на реакцията на PR в туморните клетки.

Таблица 18. *Разпределение на случаите според TS на PR в туморните клетки спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
PR TS0	23 (57,5%)	12 (30,8%)	**0,004**
PR TS2	0 (0,0%)	1 (2,6%)	
PR TS3	3 (7,5%)	0 (0,0%)	
PR TS4	1 (2,5%)	1 (2,6%)	
PR TS5	3 (7,5%)	7 (17,9%)	
PR TS6	5 (12,5%)	2 (5,1%)	
PR TS7	1 (2,5%)	8 (20,5%)	
PR TS8	4 (10,0%)	8 (20,5%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Представените резултати от настоящото проучване се различат от данните получени от Karami-Tehrani et al. (2016) и от Won et al. (2021). При тези две изследвания статистически значима зависимост между нивото на експресия на RIPK3 в туморните клетки и PR статус на карциномите не е установена.

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от експресията на HER2

Цитоплазмената експресия на RIPK3 в неопластичната тъкан във връзка с експресията на HER2 от туморните клетки първоначално беше анализирана чрез χ^2 тест, който не установи зависимост между двата показателя (p=0,577) (таблица 19).

Таблица 19. *Разпределение на туморите по HER2 статуса спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
HER2-позитивни	12 (30,0%)	14 (35,9%)	**0,577**
HER2-негативни	28 (70,0%)	25 (64,1%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Допълнителният анализ на данните с теста на Mann-Whitney за оценка на зависимостта между цитоплазмената експресия на RIPK3 и експресията на HER2 от туморните клетки също показа, че такава липсва (p=0,342). Средните стойности на цитоплазмена експресия на маркера за некроптоза в групата на HER2-положителните тумори са сравнително близки с тези на HER2-негативните карциноми, като стойностите са съответно 131,5±45,27 и 113,8±60,79 (таблица 20).

Таблица 20. *Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и експресията на HER2.*

Група	Брой случаи (n)	Средна стойност на цитопл. експр. на RIPK3	Стандартно отклонение	P-value
HER2(+)	26	131,5	45,27	**0,342**
HER2(-)	53	113,8	60,79	

Тези резултати съответстват на данните, получени от Karami-Tehrani et al. (2016), които подобно на нас, не откриват зависимост между нивото на експресия на RIPK3 и това на HER2 в туморните клетки. Получените от нас данни се различават от тези на Won et al. (2021), които съобщават за статистически значима обратна зависимост между цитоплазменото ниво на RIPK3 в туморните клетки и HER2 статуса на тумора. Според

авторите, HER2-позитивните карциноми имат ниско ниво на имунохистохимична цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморните клетки.

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 при тройно негативните тумори спрямо всички останали карциноми

Анализът Chi-square показа статистически значима зависимост между нивото на цитоплазмена експресия на RIPK3 в тройно негативните тумори от една страна спрямо всички останали включени в проучването карциноми от друга (p=0,026) (таблица 21).

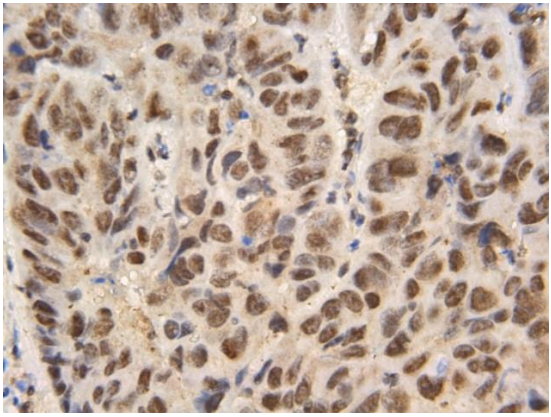
***Таблица 21**. Разпределение на случаите в отделните групи тумори спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
Тройно негативни тумори	15 (37,5%)	6 (15,4%)	**0,026**
ER(+), PR(+) или PR(-) и HER2-позитивни тумори (общо)	25 (62,5%)	33 (84,6%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

При анализиране на средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 при тройно негативните тумори от една страна и всички останали случаи (ER-позитивни, PR-позитивни или PR-негативни и HER2-позитивни) от друга страна се потвърди статистически значимата разлика на стойностите на маркера за некроптоза между двете групи тумори (p=0,002). Средната стойност на цитоплазмена експресия на RIPK3 при всички 21 случая на тройно негативни карциноми е 80,5±60,85 (фигура 33), като тя е значително по-ниска в сравнение с останалите 58 пациента, чиито тумори са позитивни на ER или HER2, при които стойностите са 133,8±47,94 (таблица 22).

***Таблица 22**. Зависимост между средните стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в тройно негативните тумори спрямо всички останали изследвани карциноми.*

Група	**Брой случаи (n)**	**Средна стойност на цитопл. експр. на RIPK3**	**Станд. откл.**	**P-value**
Тройно негативни тумори	21	80,5	60,85	**0,002**
ER(+), PR(+) или PR(-) и HER2(+) тумори (общо)	58	133,8	47,94	



***Фигура 33.** Ниска цитоплазмена и висока ядрена експресия на RIPK3 при тройно негативни тумори, x400.*

Сравнихме получените от нас данни с тези на Won et al. (2021), които подобно на нас анализират имунохистохимичната цитоплазмена експресия на RIPK3 при тройно негативните карциноми спрямо позитивните за ER, PR или HER2 тумори, но за разлика от нас, те не установяват статистически значима разлика между групите. При тройно негативните карциноми, включени в тяхното проучване, 28 (25.2%) случая са с високи нива на експресия на RIPK3, докато 42 (28.8%) случая са с ниска позитивност срещу 6 (15,4%) случая с висока експресия при настоящото изследване и 15 (37,5%) с ниска позитивност. Независимо, че Won et al. (2021) не са установили статистически

значима разлика, моделът на експресия е сходен. Ниската експресия се среща по-често при тройно негативните карциноми в сравнение с високата експресия.

Сравнителен анализ на цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от индекса на пролиферативна активност Ki67

Тестът Chi-square показа, че има статистически значима зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и пролиферативната активност, определена чрез Ki67 (p=0,046) (таблица 23).

Таблица 23. *Разпределение на туморите по Ki67 спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
Ki67<14%	9 (22,5%)	17 (43,6%)	**0,046**
Ki67≥14%	31 (77,5%)	22 (56,4%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

На таблица 24 са показани данните от анализа между цитоплазмената експресия на RIPK3 и Ki67 чрез теста Mann-Whitney. Средните стойности на реакцията в цитоплазмата за RIPK3 при туморите с ниска и висока пролиферативна активност е съответно 144,0±48,27 и 107,6±56,76. От данните става ясно, че съществува статистически значима разлика между стойностите на RIPK3 в двете групи тумори (p=0,015). Резултатите показват, че при ниска експресия на Ki67 в туморните клетки има висока цитоплазмената реакция на RIPK3 в клетките и обратно.

Таблица 24. *Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и Ki67.*

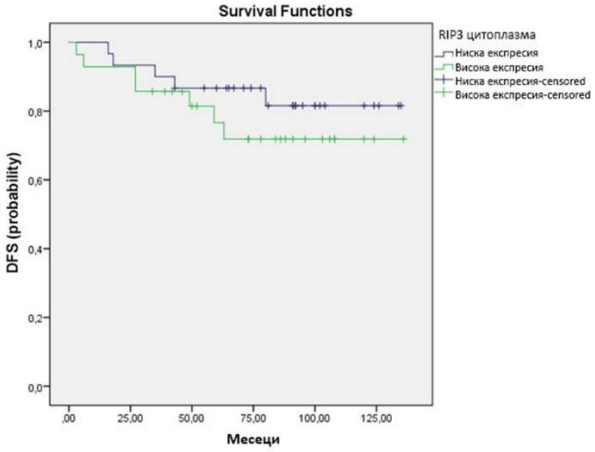
Група	**Брой случаи (n)**	**Средна стойност на цитопл. експр. на RIPK3**	**Стандартно отклонение**	**P-value**
Ki67<14%	26	144,0	48,27	**0,015**
Ki67≥14%	53	107,6	56,76	

Получените от нас резултати се различават от данните на Karami-Tehrani et al. (2016) и на Won et al. (2021), които не откриват статистически значима зависимост между RIPK3 експресията и пролиферативния маркер Ki67 в туморните клетки.

Сравнителен анализ на преживяемостта без заболяване (Disease-free survival – DFS) спрямо цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморите

Данни за преживяемостта на анализираните от нас случаи бяха налице за 58 пациента. Цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморите на тези пациенти беше разпределена по медианата, при което се установи, че 30 случая имат ниска експресия, а останалите 28 случая са с високо ниво на цитоплазмена реакция.

За да изследваме влиянието на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан върху DFS, използвахме Kaplan-Meier test. Средната преживяемост в месеци е 117,9 мес. (CI, 104.2 – 131.7) за случаите с ниска цитоплазмена експресия на RIPK3 и 107,9 мес. (CI, 89.9 – 125.9) за туморите с висока цитоплазмена реакция. Ние не установихме статистически значима разлика в преживяемостта на пациентите в зависимост от цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан (log rank p=0,36) (фиг. 34).



Фигура 34. *Kaplan-Meier криви на разпределение на преживяемостта без заболяване на пациентите с мамарен карцином в зависимост от цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан.*

Получените резултати са в съответствие с данните, получени от Lomphithak et al. (2021), които изследват 88 случая с холангиоцелуларен карцином и не откриват сигнификантна зависимост между имунохистохимичната цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморните клетки и преживяемостта на пациентите без заболяване.

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от клинико-морфологичните характеристики, молекулярния профил, пролиферативния маркер Ki67 и преживяемостта на пациентите с карцином на гърдата

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от клинико-морфологичните характеристики на тумора

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от възрастта на пациентите

Тестът Chi-square за анализ на ниската и високата ядрена експресия на RIPK3 в туморната тъкан във връзка с възрастта на пациентите показа, че липсва статистически значима зависимост между ядрената реакция на некроптотичния маркер при пациентите под и над 65 г. възраст (p=0,528) (таблица 25).

Таблица 25. *Разпределение на пациентите по възраст спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
≤ 65 г.	25 (62,5%)	27 (69,2%)	**0,528**
> 65 г.	15 (37,5%)	12 (30,8%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Анализът на Mann-Whitney между средните стойности на нуклеарната експресия на RIPK3 и възрастта на пациентите също не откри статистическа зависимост (p=679). Средната стойност на ядрената експресия на RIPK3 в групата на пациентите под 65г. възраст е 190,5±56,63, като при останалите 27 пациента над 65 г. тя е почти същата – 187,2±50,18.9 (таблица 26).

Таблица 26. *Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и хистологичния вариант на тумора.*

Група	Брой случаи (n)	Средна стойност на ядрена експр. на RIPK3	Стандартно отклонение	P-value
≤ 65 г.	52	190,5	56,63	**0,679**
> 65 г.	27	187,2	50,18	

Получените от нас резултати за липсата на зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и възрастта на пациентите не се различават от тези на Стефанова (2017), която разделя нуклеарната експресия на RIPK3 в туморните клетки на ниска и висока според cut-off стойността. В нейното изследване при колоректален карцином случаите също са разделени на две групи, ≤ 65 г. и > 65 г., и подобно на настоящото изследване не сеоткрива статистически значима разлика между нивата на нуклеарна експресия на RIPK3 в зависимост от възрастта напациентите.

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от хистологичния тип на тумора

За анализа на ядрената експресия на RIPK3 във връзка с хистологичния тип на тумора се използва χ^2 тест. Сигнификантна зависимост между двата показателя не се установи (p=0,239) (таблица 27).

Таблица 27. *Разпределение на туморите по хистологичен вариант спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
Дуктален карцином	34 (85%)	29 (74,4%)	**0,239**
Лобуларен карцином	6 (15%)	10 (25,6%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителният анализ на данните между ядрената експресия на RIPK3 спрямо хистологичния вариант на тумора чрез теста на Mann-Whitney също не показа статистически значима зависимост

между двата изследвани показателя (p=0,683). Средните стойности на нуклеарната експресия на маркера за некроптоза са близки при двата вида тумори – при дукталния карцином тя е 190,4±51,37, а при лобуларния 185,3±65,97, което обяснява липсата на значима връзка между анализираните показатели (таблица 28).

Таблица 28. *Сравнителен анализ между ядрената експресия на RIPK3 и хистологичния вариант на тумора.*

Група	**Брой случаи (n)**	**Средна стойност на ядр. експр. на RIPK3**	**Стандартно отклонение**	**P-value**
Дуктален карцином	63	190,4	51,37	**0,683**
Лобуларен карцином	16	185,3	65,97	

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от Т-стадия на туморите

Сравнителният анализ между нуклеарната експресия наRIPK3 и Т-стадия на изследваните тумори отначало беше проверена чрез χ^2 тест, който не показа статистически значима зависимост между двата изследвани показателя (p=0,249) (таблица 29).

Таблица 29. *Разпределение на случаите по Т-стадий спрямо ниската и високата ядрена експресия на RIPK3 по медианата.*

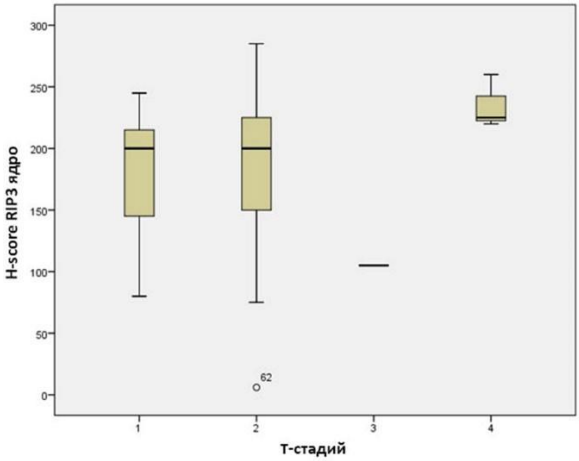
Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
T1	17 (55,0%)	16 (51,3%)	**0,249**
T2	22 (42,5%)	20 (41,0%)	
T3	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
T4	0 (0,0%)	3 (7,7%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителният анализ на данните чрез теста на Mann-Whitney между средните стойности на нуклеарната експресия на RIPK3 и Т-стадия на туморите се извърши само за случаите, диагностицирани в Т1 и Т2 стадий. Определеното p=0,477

показва липса на статистически значима зависимост между двата показателя. Туморите в Т1 стадий са 33 случая със средни стойности на експресия на некроптотичния нуклеарен маркер 182,8±47,91, а туморите в Т2 стадий са 42 случая със средни стойности 193,3±58,31 (таблица 30). За трите тумора в Т4 стадий бяха определени средни стойности на нуклеарна експресия 235,0±21,79. В Т3 стадий има само един тумор. Поради малкия брой случаи в последните две категории, те не бяха включени в теста на Mann-Whitney (фигура 35).

Таблица 30. *Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и Т-стадия на туморите.*

Група	Брой случаи (n)	Средна стойност на ядр. експр. на RIPK3	Стандартно отклонение	P-value
Т1	33	182,8	47,91	**0,477**
Т2	42	193,3	58,31	



Фигура 35. *Разпределение на случаите по Т-стадий спрямо средните стойности на ядрена експресия на RIPK3 в туморните клетки.*

Представените от нас резултати съответстват на тези в проучването на Стефанова (2017), която също не открива статистически значима разлика между нивото на нуклеарната експресия на RIPK3 при колоректален карцином в зависимост от Т-стадия на заболяването.

Сравнителен анализ на средните стойности на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от степента на диференциация на тумора (G)

Сравнителният анализ, чрез теста на Kruskal-Wallis, на средните стойности на ядрената експресия на RIPK3 в туморните клетки във връзка със степента на диференциация на карциномите не показа статистически значима разлика (p=0,896) (фигура 36). Средните стойности на ядрената експресия на RIPK3 при туморите с висока, умерена и ниска степен на диференциация са съответно 185,6±63,88, 189,6±47,95 и 191,4±56,72 и са представени на таблица 31.

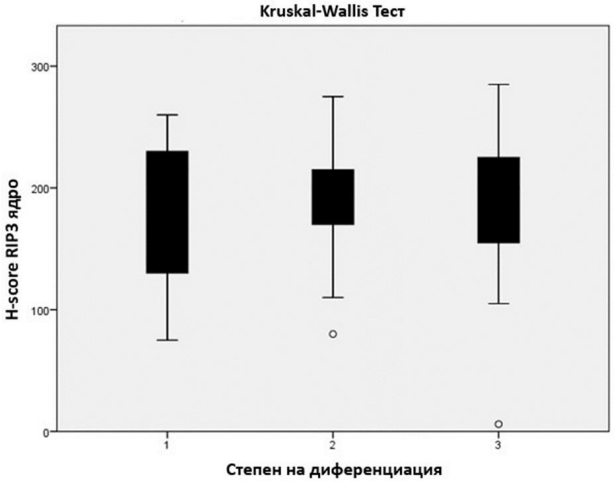
Таблица 31. *Сравнителен анализ между средните стойности на ядрената експресия на RIPK3 и степента на диференциация на туморите.*

Група	Брой случаи (n)	Средни стойности на ядр. експр. на RIPK3	Стандартно отклонение	P-value
G1	17	185,6	63,88	**0,896**
G2	33	189,6	47,95	
G3	29	191,4	56,72	

Беше извършен допълнителен анализ на данните между отделните групи тумори с трите различни степени на диференциация като групите се сравниха по двойки (Pairwise Comparisons). Този анализ също не показа статистически значима разлика между показателите. При изследване на стойностите на нуклеарната експресия на RIPK3 в групите с G1 и G2 се установи p=0,721, при двойката тумори с G2 и G3 p=0,836, а при сравнението на ядрената експресия на RIPK3 в туморите с G1 и G3 p=0,667.

Данните от настоящото изследване съответстват на публикуваните от Стефанова (2017) резултати, при които също не се открива сигнификантна зависимост между ядрената

експресия на RIPK3 в туморните клетки и степента на диференциация на колоректалния карцином.



Фигура 36. *Разпределение на карциномите на гърдата според степента им на диференциация спрямо средните стойности на ядрена експресия на RIPK3 в туморните клетки.*

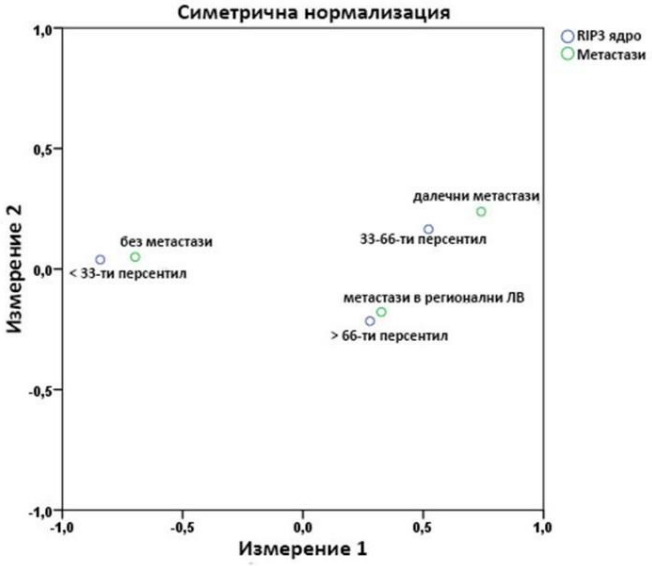
Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 спрямо N и M стадия

Чрез анализа на съответствието (correspondence analysis) се сравниха данните от ядрената експресия на RIPK3 във връзка със степента на разпространение на тумора. На таблица 32 е представено разпределението на случаите според присъствието или липсата на лимфни и далечни метастази спрямо ядрената експресия на RIPK3 по персентили. На фигура 37 е представена зависимостта между ядрената експресия на маркера за некроптоза и степента на разпространение на туморите. Между нуклеарната експресия на RIPK3 и метастазите в регионалните лимфни възли съществува сигнификантна зависимост (p=0,049). Колкото по-висока е експресията на RIPK3 в ядрата на туморните клетки, толкова по-голяма е вероятността туморът да има метастази в лимфните възли. При останалите две групи (без

метастази и с далечни метастази) липсва статистически значима зависимост с ядрената експресия на RIPK3.

Таблица 32. *Разпределение на случаите според степента на разпространение на туморите спрямо ядрената експресия на RIPK3 по персентили.*

Група	**RIPK3 (ниска експресия)**	**RIPK3 (умерена експресия)**	**RIPK3 (висока експресия)**	**P-value**
Без метастази	16 (64,0%)	7 (25,9%)	8 (32,0%)	
Метастази в регионални ЛВ	7 (28,0%)	12 (29,6%)	11 (44,0%)	**0,049**
Далечни метастази	2 (8,0%)	8 (44,5%)	6 (24,0%)	
Общо	**25 (100%)**	**27 (100%)**	**25 (100%)**	



Фигура 37. *Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и степента на разпространение на тумора.*

В литературата липсват данни относно зависимостта между ядрената експресия на RIPK3 и степента на разпространение на карциномите на млечната жлеза. Има проучвания, които анализират зависимостта между цитоплазмената експресия на маркера за некроптоза в туморните клетки и вероятността за метастазиране на тумора. Won et al. (2021) съобщават, че при ниска цитоплазмена експресия на RIPK3 има по-голяма вероятност за метастази в регионалните лимфни възли при пациенти с карцином на гърдата, отколкото при висока експресия. Weber et al. (2018) предполагат, че задържането на RIPK3 и MLKL в ядрото, предотвратява процеса на цитозолната RIPK3/MLKL олигомеризация и в резултат на това се блокира клетъчната смърт. Според нас, високата нуклеарна експресия на RIPK3 може да се възприеме като начин туморните клетки да избягат от некроптозата чрез задържане на RIPK3 в ядрото на клетката. Механизмите, които участват в този процес все още не са изяснени. Взети заедно, данните от литературата и получените от нас резултати показват, че ниската цитоплазмена експресия и високата ядрена експресия на RIPK3 са свързани с повишен риск от поява на метастази в регионалните лимфни възли. При колоректален карцином сигнификантна зависимост между ядрената експресия на RIPK3 в туморните клетки и N-стадия на дебелочревния карцином не е установена (Стефанова, 2017).

Сравнителен анализ на нуклеарната експресия на RIPK3 в зависимост от молекулярния профил на тумора

Сравнителен анализ на нуклеарната експресия на RIPK3 в зависимост от ER

Сравнителен анализ на нуклеарната експресия на RIPK3 в зависимост от площта на експресия на ER в туморите (Proportion score – PS)

Сравнителният анализ между ядрената експресия на RIPK3 във връзка с площта на експресия на ER в туморите беше направен с коефициента Kendall's tau c. Стойността му от 0,148 показва слаба позитивна зависимост между изследваните

показатели, но липсва сигнификантна зависимост между тях (p=0,195). Разпределението на случаите според площта на разпространение на ER в туморите е показано на таблица 33.

Таблица 33. *Разпределение на случаите според площта на експресия на ER в туморите спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
ER PS0	14 (35,0%)	12 (30,8%)	**0,195**
ER PS2	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
ER PS3	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
ER PS4	5 (12,5%)	1 (2,6%)	
ER PS5	19 (47,5%)	26 (66,7%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 във връзка с интензивността на експресия на ER в туморните клетки (Intensity score – IS)

Сравнителният анализ между ядрената експресия на RIPK3 във връзка с интензивността на нуклеарната експресия на ER в туморните клетки беше извършен с помощта на коефициента Kendall's tau c. Получената стойност от 0,151 показва слаба положителна зависимост между показателите: ядрена експресия на RIPK3 и интензивност на реакцията за ER, но зависимостта не е сигнификантна (p=0,213). На таблица 34 е представено разпределението на случаите според интензивността на експресията на ER в туморите.

Таблица 34. *Разпределение на случаите според интензивността на реакцията за ER в туморите спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
ER IS0	14 (35,0%)	12 (30,8%)	**0,213**
ER IS1	2 (5,0%)	1 (2,6%)	
ER IS2	11 (27,5%)	6 (15,4%)	
ER IS3	13 (32,5%)	20 (51,3%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от общия скор (площ и интензивност на реакцията на ER в туморните клетки) (Total score – TS)

Чрез коефициента Kendall's tau с се анализира ядрената експресия на RIPK3 във връзка с общия скор от площ на разпространение и интензитет на реакцията за ER в туморните клетки. Получената стойност от 0,176 показва слаба позитивна зависимост между двата показатели, но тя не е сигнификантна (p=0,150). На таблица 35 е представено разпределението на случаите според общия скор на ER и ядрената експресия на RIPK3 в туморните клетки.

Таблица 35. *Разпределение на случаите според TS на ER в туморните клетки спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
ER TS0	14 (35,0%)	12 (30,8%)	**0,150**
ER TS4	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
ER TS5	3 (7,5%)	0 (0,0%)	
ER TS6	2 (5,0%)	1 (2,6%)	
ER TS7	8 (20,0%)	7 (17,9%)	
ER TS8	12 (30,0%)	19 (48,7%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 зависимост от PR

Сравнителен анализ на нуклеарната експресия на RIPK3 в зависимост от площта на експресия на PR в туморите (Proportion score – PS)

С коефициента Kendall's tau с се анализира ядрената експресия на RIPK3 във връзка с площта на експресия на PR в туморите. Стойността му от -0,185 показва наличие на слаба негативна зависимост между двата показателя, но без да се открива сигнификантна зависимост между тях (p=0,131). Разпределението на случаите според площта на експресия на PR в туморите е показано на таблица 36.

Таблица 36. *Разпределение на случаите според площта на експресия на PR в туморите спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
PR PS0	17 (42,5%)	18 (46,2%)	**0,131**
PR PS1	0 (0,0%)	2 (5,1%)	
PR PS2	2 (5,0%)	3 (7,7%)	
PR PS3	1 (2,5%)	5 (12,8%)	
PR PS4	5 (12,5%)	6 (15,4%)	
PR PS5	15 (37,5%)	5 (12,8%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от интензивността на експресията на PR в туморните клетки (Intensity score – IS)

Сравнителният анализ на ядрената експресия на RIPK3 във връзка с интензивността на реакцията за PR в туморните клетки беше направен с помощта на коефициента Kendall's tau c. Получената стойност от -0,095 показва много слаба отрицателна зависимост между изследваните показатели. Стойността е много близка до 0, което означава почти пълна липса на зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и интензитета на реакцията за PR в туморните клетки, което се потвърждава и от стойността на p=0,436. На таблица 37 е представено разпределението на случаите според интензивността на експресията на PR в туморите.

Таблица 37. *Разпределение на случаите според интензивността на реакцията за PR в туморите спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
PR IS0	17 (42,5%)	18 (46,2%)	**0,436**
PR IS1	2 (5,0%)	5 (12,8%)	
PR IS2	12 (30,0%)	10 (25,6%)	
PR IS3	9 (22,5%)	6 (15,4%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от общия скор от площ и интензивност на реакцията за PR в туморните клетки (Total score – TS)

Чрез определяне на коефициента Kendall's tau с се анализира ядрената експресия на RIPK3 във връзка с общия скор от площ и интензивност на реакцията за PR в туморните клетки. Получената стойност от -0,160 показа слаба отрицателна зависимост между изследваните показатели, но зависимостта между ядрената експресия на RIPK3 и TS на PR в туморните клетки не е сигнификантна (p=0,197). На таблица 38 е представено разпределението на случаите според общия скор от разпространението и интензивността на реакцията за PR в туморните клетки.

Таблица 38. *Разпределение на случаите според TS на PR в туморните клетки спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
PR TS0	17 (42,5%)	18 (46,2%)	**0,197**
PR TS2	0 (0,0%)	1 (2,6%)	
PR TS3	0 (0,0%)	3 (7,7%)	
PR TS4	1 (2,5%)	1 (2,6%)	
PR TS5	3 (7,5%)	7 (17,9%)	
PR TS6	4 (10,0%)	3 (7,7%)	
PR TS7	8 (20,0%)	1 (2,6%)	
PR TS8	7 (17,5%)	5 (12,8%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 във връзка експресията на HER2 в туморите

Ядрената експресия на RIPK3 във връзка с HER2 статуса на туморите беше анализирана чрез теста на Chi-square, но статистически значима зависимост между нуклеарния маркер за некроптоза при двете групи тумори – HER2-позитивни и HER2-негативни – не се установи (p=0,689) (таблица 39).

Таблица 39. *Зависимост на ядрената експресия на RIPK3 във връзка с експресията на HER2.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
HER2-позитивни	14 (35,0%)	12 (30,8%)	**0,689**
HER2-негативни	26 (65,0%)	27 (69,2%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

На таблица 40 е показана ядрената експресия на RIPK3 във връзка с експресията на HER2 при различните тумори. Средните стойности на реакцията за RIPK3 в ядрата на туморните клетки при 26-те случая на HER2-позитивни карциноми са 187,3±48,40, а в групата от 53-те HER2-негативни тумора са 190,5±57,26. Статистически значителна разлика между ядрените стойности на RIPK3 в двете групи тумори липсва (p=0,484).

Таблица 40. *Сравнителен анализ между ядрената експресия на RIPK3 и експресията на HER2*

Група	Брой случаи (n)	Средна стойност на ядр. експр. на RIPK3	Стандартно отклонение	P-value
HER2 (+)	26	187,3	48,40	**0,484**
HER2 (-)	53	190,5	57,26	

Сравнителен анализ между ядрената експресия на RIPK3 при тройно негативните тумори спрямо всички останали карциноми

С теста χ^2 беше анализирана ядрената експресия на RIPK3 при тройно негативните карциноми спрямо всички останали тумори – ER-позитивни, PR-позитивни или PR-негативни и HER2-позитивни. Статистически значима разлика между двете групи не беше установена (p=0,852) (таблица 41).

Таблица 41. *Разпределение на случаите в отделните групи тумори спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
Тройно негативни тумори	11 (27,5%)	10 (25,6%)	**0,852**
ER(+), PR(+) или PR(-) и HER2 (+) тумори (общо)	29 (72,5%)	29 (74,4%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

За да се анализира ядрената експресия на RIPK3 при тройно негативните тумори от една страна и всички останали карциноми (ER-позитивни, PR-позитивни или PR-негативни и HER2-позитивни) от друга се използва теста на Mann-Whitney. Средните стойности на ядрена експресия при всички 21 случая на тройно негативни тумори е 195,1±61,19, докато при останалите 58 тумора те са 187,3±51,88. Експресията на RIPK3 в двете групи не показва статистически значима разлика (p=0,474) (таблица 42).

Таблица 42. *Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и тройно негативните тумори спрямо всички останали изследвани карциноми.*

Група	Брой случаи (n)	Средна стойност на ядр. експр. на RIPK3	Станд. откл.	P-value
Тройно негативни тумори	21	195,1	61,19	**0,474**
ER(+), PR(+) или PR(-) и HER2(+) тумори (общо)	58	187,3	51,88	

Сравнителен анализ на ядрената експресия на RIPK3 във връзка с индекса на пролиферативна активност Ki67

Оценката на ядрената експресия на RIPK3 във връзка със стойността на Ki67 в туморите беше първоначално извършена

чрез χ^2 тест, който не откри зависимост между двата показателя (p=0,379) (таблица 43).

Таблица 43. *Разпределение на туморите според Ki67 спрямо ядрената експресия на RIPK3 по медианата.*

Група	RIPK3 (ниска експресия)	RIPK3 (висока експресия)	P-value
Ki67<14%	15 (37,5%)	11 (28,2%)	**0,379**
Ki67≥14%	25 (62,5%)	28 (71,8%)	
Общо	**40 (100%)**	**39 (100%)**	

Анализът с теста на Mann-Whitney на средните стойности на ядрената експресия на RIPK3 във връзка със степента на пролиферативна активност на туморите също не установи статистически значима разлика (p=0,125). Средните стойности на ядрена експресия при 26-те случая с Ki67<14% са 174,3±57,69, докато при останалите 53 тумора с Ki67≥14% са 196,8±51,36 (таблица 44).

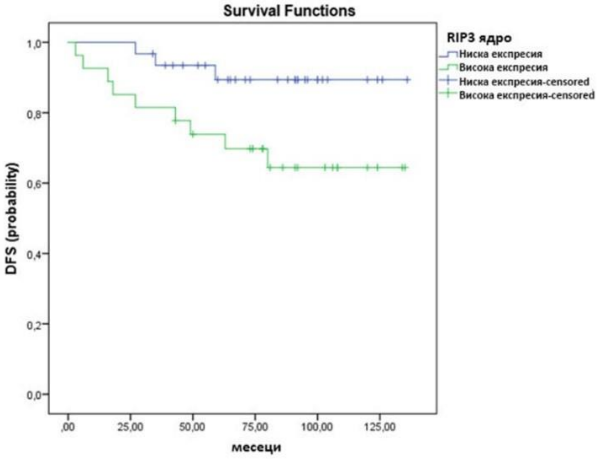
Таблица 44. *Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 в туморите и Ki67.*

Група	Брой случаи (n)	Средна стойност на ядр. експресия на RIPK3	Стандартно отклонение	P-value
Ki67<14%	26	174,3	57,69	**0,125**
Ki67≥14%	53	196,8	51,36	

Сравнителен анализ на преживяемостта без заболяване (Disease-free survival – DFS) спрямо ядрената експресия на RIPK3 в туморите

Ядрената експресия на RIPK3 при туморите, за които имаше данни за преживяемостта без заболяване, беше разпределена по медианата и се установи, че при 31 случая експресията е ниска, а при останалите 27 случая тя е висока. За да се оцени нуклеарната експресия на RIPK3 в туморната тъкан във връзка с преживяемостта без заболяване беше използван теста на Kaplan-Meier. Средната преживяемост на пациентите в месеци е 126,0 мес. (CI, 115,2 – 136,7) за случаите с ниска ядрена експресия на

RIPK3 и 99,9 мес. (CI, 80,8 – 119,1) за тези с висока експресия. Разликата в преживяемостта без прогресия при пациентите с ниска и висока ядрена експресия на RIPK3 е статистически значима (log rank p=0,033) (фигура 38). При висока нуклеарна експресия на RIPK3 в туморните клетки, преживяемостта е по-ниска в сравнение с пациентите с ниски нива на ядрена експресия на RIPK3.



Фигура 38. *Kaplan-Meier криви на разпределение на преживяемостта без заболяване на пациентите с мамарен карцином в зависимост от ядрената експресия на RIPK3 в туморната тъкан.*

За първи път при карцином на гърдата е извършен анализ на преживяемостта без заболяване спрямо ядрената експресия на RIPK3. В литературата подобни данни не се откриха. Won et al. (2021) съобщават, че преживяемостта без заболяване при пациенти с мамарен карцином е по-малка, когато туморните клетки имат ниска цитоплазмена експресия на RIPK3 в сравнение със случаите с висока експресия. Подобни са и резултатите на Feng et al. (2015) при колоректален карцином. На базата на данните, съобщени от Weber et al. (2018) относно възможността за преминаване на RIPK3 от ядрото в цитоплазмата на клетките и обратно, можем отново да предположим, че високата ядрена експресия на RIPK3 при карцинома на гърдата означава, че чрез задържане на некроптотичния протеин в ядрото на туморните клетки се избягва формирането на некрозома в цитоплазмата и

съответно не настъпва клетъчна смърт. Това би могло да се разглежда като възможен механизъм на туморните клетки за дълготрайно оцеляване. Ако приемем тази хипотеза за вярна, нашите резултати за зависимостта между ядрената експресия на RIPK3 в туморните клетки и преживяемостта без заболяване могат да бъдат разглеждани като съответстващи на данните от проучванията на Won et al. (2021) и Feng et al. (2015).

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заболеваемостта и смъртността от карцином на млечната жлеза в световен мащаб продължават да се увеличават с всяка изминала година. Въпреки че преживяемостта на пациентите с това заболяване е по-висока от тази на другите солидни тумори, високата честота, по-младата възраст при поставяне на диагноза, агресивността на тумора, ранните метастази в лимфните възли и лошата прогноза при пациентите с карцином на гърдата, особено при тези с тройно негативен вариант на тумора, не могат да бъдат игнорирани. Поради хетерогенността на мамарния карцином и сложните механизми за регулирането му, стратегиите за биомедицинско лечение са изправени пред големи предизвикателства в клиничната практика. Понастоящем известните основни стратегии за лечение на заболяването, като хирургия, химиотерапия, лъчетерапия, имунотерапия и хормонална терапия, може да не доведат до пълнотоелиминиране на тумора, а и се свързват с предизвикване на неблагоприятни странични ефекти. Необходими са иновативни нови терапии, особено за пациентите с недостатъчно ефективно лечение, като тези с тройно негативен карцином на гърдата и при проявено метастатично заболяване.

Активирането на клетъчната смърт може да се разглежда като възможен нов вариант за лечение на злокачествените заболявания като цяло. Некроптозата е вид некротична форма на програмирана клетъчна смърт, която има мощна имуногенност и участва в сложно взаимодействие с други видове клетъчна смърт като автофагия и апоптоза. Все повече се увеличават доказателствата, които показват, че тя играе важна роля при прогресията и метастазирането на туморите, имунната реакция срещу злокачествените клетки и в прогнозата на пациентите с малигнени заболявания. Стимулирането на некроптозата чрез различни медикаменти и химични съединения, предизвикващи или манипулиращи некроптотичния път, се очертава като нов подход за преодоляване на резистентността на туморните клетки към апоптоза и поддържане на антитуморния имунитет при лечението на злокачествените заболявания.

Данните за влиянието на некроптозата при развитието и прогресията на карцинома на млечната жлеза са твърде оскъдни.

Има единични съобщения, че ниската експресия на RIPK3 се свързва с агресивни клинични характеристики, докато високата експресия на RIPK3 е асоциирана с по-добра преживяемост, като маркерът за некроптоза се явява независим прогностичен фактор. Необходими са допълнителни задълбочени проучвания с цел да се изследва ролята на некроптозата в развитието, метастазирането и бъдещото лечение на пациентите с карцином на млечната жлеза.

VI. ИЗВОДИ

1. Карциномът на гърдата, към момента на неговото диагностициране, най-често се открива във възрастта между 61 и 70 години, в болшинството от случаите се намира в T2 N0 стадий, показва умерена степен на диференциация и високо Ki67.
2. След проведена адювантна хормоно-, лъче- и/или химиотерапия и постигната ремисия, средната преживяемост без прогресия на пациентите с карцином на гърдата е 113,8 месеца.
3. Цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на мамарен карцином е по-ниска, докато ядрената експресия е по-висока в сравнение с контролната група.
4. Цитоплазмената експресия на RIPK3 при лобуларния карцином е по-висока в сравнение с дукталния карцином.
5. Най-ниска е цитоплазмената експресия на RIPK3 при тройно негативните карциноми.
6. Цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на мамарен карцином не показва зависимост от възрастта на пациентите, Т-стадия, степента на разпространение на тумора (метастази), HER2 статуса на тумора и не е асоциирана с преживяемостта на пациентите.
7. Високо диференцираните мамарни карциноми имат по-високи стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 спрямо туморите с ниска степен на диференциация.
8. Интензивна цитоплазмена експресия на RIPK3 при карцином на гърдата има при изразена интензивност и висок общ скор на ER, при изразена експресия по площ и интензивност и висок общ скор на PR и при ниска експресия на Ki67.
9. Ядрената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на мамарен карцином не показва зависимост от възрастта на пациентите, хистологичния тип на карцинома, Т-стадия и степента на диференциация на тумора.

10. При висока ядрена експресия на RIPK3 в туморните клетки съществува голяма вероятност туморът да има метастази в лимфните възли.
11. Ядрената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на мамарен карцином не показва зависимост от площта, интензитета и общия скор на ER и PR, както и от HER2 статуса на тумора и пролиферативния маркер Ki67.
12. Високата нуклеарна експресия на RIPK3 в туморната тъкан е асоциирана с ниска преживяемост без прогресия на пациентите с карцином на млечната жлеза.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научни приноси с оригинален характер

1. Осъществен е комплексен клинико-морфологичен и имунохистохимичен анализ на рецепторния статус и на RIPK3, маркер за некроптоза, при пациенти с мамарен карцином.
2. Извършен е анализ на имунохистохимичната експресия на маркера за некроптоза RIPK3 с оглед изясняване ролята му за прогнозата и преживяемостта при пациенти с мамарен карцином.

Научни приноси с практическо-приложен характер

1. За първи път у нас е определена прогностичната и предиктивна стойност на RIPK3 при пациенти с мамарен карцином.
2. Оценена е екпресията на RIPK3 във връзка с пролиферативния маркер Ki67 и рецепторния статус на пациентите с карцином на гърдата.
3. Анализирана е експресията на RIPK3 във връзка с клинико-морфологичните показатели за определяне на риска от поява на метастази.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Пълнотекстови статии

1. Stoeva M. New aspects in the classification of epithelial tumors of the mammary gland. Varna Medical Forum, 2021; Vol. 10 (2): 118-123.
2. Stoeva M., Stoev L., Tzaneva M. Necroptosis-molecular mechanisms and role in tumor growth. Varna Medical Forum, 2021; Vol. 10 (2): 124-129.

Участия

1. M. Stoeva, L. Stoev, M. Tzaneva. Expression of necroptosis marker RIPK3 in breast cancer: a clinico-morphological and immunohistochemical analysis. IMAB, 2021.