



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

**д-р Мария Иванова Пенкова-Иванова**

**ЕКСПРЕСИЯ НА МАРКЕРИ ЗА ТУМОРНА  
РЕВЕРСИЯ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:**

**доц. д-р Елеонора Георгиева Димитрова-Господинова, д.м.**

---

**ВАРНА, 2024 г.**

Дисертационният труд съдържа 117 стандартни страници и е онагледен с 18 таблици и 17 фигури. Литературната справка включва 274 литературни източника, от които 1 на кирилица и 273 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на Катедрен съвет по „Онкология“ на МУ-Варна и решение на ФС протокол №..... и съгласно заповед на Ректора на МУ-Варна е избрано следното научно жури в състав:

**Външни членове:**

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

Проф. д-р Христо Благоев Цеков, д.м.н.

Доц. Желязко Илиев Арабаджиев, д.м.,

**Вътрешни членове:**

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

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

**Резервен външен член:**

Проф. д-р Петранка Петрова Кънева-Троянова, д.м.

**Резервен вътрешен член:**

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

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 20.02.2024 г. от 13 ч. във виртуална зала на електронната платформа Webex към МУ-Варна на открито заседание на научното жури.

## *Съдържание:*

<b>1. Използвани съкращения .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Въведение .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Цел и задачи на изследването.....</b>	<b>11</b>
3.1 Цел на изследването.....	11
3.2 Задачи на изследването.....	11
<b>4. Материали и методи.....</b>	<b>12</b>
4.1 База на реализиране на дисертационния труд.....	12
4.2 Пациентска популация.....	12
4.3 Медицинска история на пациентите .....	15
4.4 Специфични методи на изследване .....	16
4.4.1 Имунохистохимичен метод на изследване .....	16
4.4.2 Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимично изследване.....	17
4.4.3 Имунохистохимичен протокол .....	18
4.4.4 Метод за отчитане нивата на експресия на ТСТР..	19
4.5 Образна оценка на терапевтичния отговор.....	22
4.6 Методи за медико-статистическа обработка на данните 24	
4.6.1 Метод на статистическа групировка на данните ...	24
4.6.2 Метод на статистическото оценяване .....	24
4.6.3 Графичен метод .....	24
4.6.4 Непараметричен анализ .....	24
4.6.5 Корелационен анализ.....	25
4.6.6 Анализ на преживяемостта.....	26

4.6.7 Cox proportional hazards models.....	26
<b>5. Резултати .....</b>	<b>26</b>
5.1 Клинична и патологична стратификация на пациентите .....	26
5.2 Асоциация между нивата на експресия на ТСТР, демографските и клинично-патологичните характеристики в изследваната пациентска популация.....	33
5.3 Асоциация между нивата на експресия на ТСТР и преживяемостта в изследваната пациентска популация .....	36
<b>6. Дискусия .....</b>	<b>42</b>
<b>7. Заключение .....</b>	<b>47</b>
<b>8. Изводи .....</b>	<b>48</b>
<b>9. Приноси на дисертационния труд .....</b>	<b>49</b>
<b>10. Научни публикации, свързани с дисертационния труд.....</b>	<b>50</b>

## ***1. Използвани съкращения***

### ***На кирилица:***

**ГИТ** - гастроинтестинален тракт

**ДНК** - дезоксирибонуклеинова киселина

**иРНК** - информационна рибонуклеинова киселина

**ИХХ** - имунохистохимия

**КРК** - колоректален карцином

**РНК** - рибонуклинова киселина

**ФАП** - фамилна аденоматозна полипоза

### ***На латиница:***

**AJCC** - American Joint Committee on Cancer

**ASO** - antisense oligonucleotide

**cAMP-РКА** – Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate protein kinasae A pathway

**CDH1L** – Chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein 1-like gene

**Cdk1** – cyclin-dependent kinase 1

**CEA**- carginoembryonic antigen

**CIMP** - CpG Island Methylator Phenotype

**CIN** - chromosomal instability

**СК 7**- cytokeratin 7

**СК 20** –cytokeratin 20

**DCR** – disease control rate  
**DFS** – disease-free survival  
**ECOG** - Eastern Cooperative Oncology Group  
**eIF4E** - eukaryotic translation elongation factors 4E  
**EGFR** – epidermal growth factor receptor  
**Hsp27** – heat shock protein 27  
**GDP** –guanosite diphosphate  
**GTP** - guanosine triphosphate  
**HCC** – hepatocellular carcinoma  
**HIF1 $\alpha$**  - hypoxia inducible factor 1 $\alpha$   
**HNPCC** - hereditary nonpolyposis colorectal cancer  
**HRF** - histamine-releasing factor  
**KRAS** - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog  
**KREV 1** - protein encoded by the RAP1A gene  
**lncRNA**- long no-coding RNA  
**LOH** – loss of heterozygosity  
**Mcl-1** - myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1  
**miRNAs or miR** - micro-RNA  
**MMR-DNA** - mismatch repair genes  
**mRNA**- messenger RNA  
**MrsB** – methionine sulfoxide reductase B  
**MSI** - microsatellite instability  
**MSI-H** - microsatellite instability – high  
**MSI-L** - microsatellite instability – low

**MYC** – myelocytomatosis oncogene

**NcRNA** - non-coding RNA

**NOTCH** - cell signaling system present in most animals

**NUMB** – a membrane-associated protein related with cell differentiation

**OS** - overall survival

**PI3K** - phosphoinositide 3-kinases

**PFS** – progression-free survival

**PTEN** - phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

**PTEN/FOXO3/CCND1** - phosphatase and tensin homolog/forkhead box O3/cyclinD1 signaling pathway

**RAP1A** - Ras-related protein Rap-1A

**RIG-I** - retinoic acid-inducible gene I

**SIAH** - Ubiquitin Protein Ligase

**STAT 3** - Signal transducer and activator of transcription 3

**TAMs** – tumor-associated macrophages

**TCTP1** - translationally controlled tumor protein 1

**TGF- $\beta$  RII** – transforming growth factor beta, receptor II

**TSAP6** – tumor suppressor activated pathway 6

**VEGF** – vascular endothelial growth factor

**5'-TOP** - 5'-terminal-oligopyrimidine tract

## ***2. Въведение***

В световен мащаб колоректалният карцином (КРК) заема трето място по честота сред злокачествените новообразувания при човека и представлява около 10% от всички видове злокачествени солидни тумори. КРК е втората най-честа причина за смърт от злокачествени заболявания, като ежегодно е отговорен за възникване на над 700 000 нови смъртни случая. Около 25% от новодиагностицираните пациенти са в IV-ти клиничен стадий. При около 50% от пациентите диагностицирани в ранен стадий се очаква прогресия на болестта с развитие на далечни метастази. Въвеждането на скринингови програми, ранната диагноза, лечение и проследяване осигурява подобряване на общата преживяемост (OS). Днес OS при пациенти с метастатично заболяване е ~30 месеца, почти двойно повече отколкото преди 20 години, но въпреки това 5 годишната преживяемост в IV клиничен стадий остава под 14%.

Развитието на КРК е многостъпален процес, който е повлиян от редица ендогенни и екзогенни фактори. По отношение на канцерогенезата КРК е хетерогенна болест, в чиято основа стоят множество сложни взаимодействия между факторите на околната среда и генетичната предразположеност на индивида. В 5-10% от пациентската популация се установява генетична предиспозиция. Това са лицата, при които се установяват някои от добре известните ни наследствени синдроми, като фамилна аденоматозна полипоза (ФАП) и синдрома на Линч. Въз основа на фамилната анамнеза КРК може да се класифицира като спорадичен, наследствен и фамилен рак.



За пръв път Vogelstein и Fearon разясняват патогенезата на КРК, представяйки своя модел, според който дебелочревният рак възниква на базата на малигнизирал във времето аденом. Днес благодарение на молекулярната биология се наблюдава значителен тласък в изясняване на патогенезата му. Натрупаните знания за възникналите геномни и епигеномни нарушения, вземащи участие в най-ранните етапи на канцерогенезата, са от съществено значение за изработване на ефективна терапевтична стратегия при пациенти с КРК. Генетичните нарушения се изявяват като като хромозомна нестабилност (CIN) и микросателтна нестабилност (MSI), докато епигенетичните нарушения се дължат на хиперметиране на промоторните зони на редица гени, известни като CpG острови и това води до развитие на метилаторен фенотип в колоректалния епител.

Множеството дългогодишни проучвания върху канцерогенезата разкриват до голяма степен основните пътища на малигнената трансформация и основните характеристики, които притежават неопластичните клетки. Но всички тези знания поставят и друг важен въпрос. Възможен ли е обратния процес? Способни ли са туморните клетки могат да загубят своя малигнен потенциал и какво всъщност представлява туморната реверсия?

Туморната реверсия е сложен биологичен процес, осъществяващ се под въздействието на редица генетични и епигенетични фактори, които водят до потискане на малигнения фенотип на клетката, т.е неопластичните клетки загубват напълно или частично своите злокачествени характеристики. От изключителна важност е да се разясни,

че процесът на туморна реверсия е различен от туморната супресия, която се постига чрез таргетиране на някои онкогенни събития. При туморната реверсия не е задължително участието на туморосупресорните гени. До момента са известни поне 300 гена, които са ангажирани в този процес, като например: SIAH 1, PSEN1, TSAP6 и най-вече TP53/TP53. Ключов момент в репрограмизирането на туморните клетки е намаляване експресията на TP53/TP53.

Translational controlled tumor protein (TCTP) е протеин със строго съхранена структура, който е локализиран в цитоплазмата и ядрата на всички еукариотни клетки (. Той взема участие в редица фундаментални клетъчни процеси като: репарация на ДНК, синтез и деградация на протеини, стабилизация на делителното вретено, регулация на клетъчния растеж, инхибиране на апоптозата и други. Дисрегулацията в нивата на TCTP може да индуцира развитие на множество патологични процеси, предвид ключовото място, което той заема в поддържането на клетъчната хомеостаза, Доказано е, че TCTP има сигнификантна роля в канцерогенезата на голям брой злокачествени солидни тумори. Установено е, че високата експресия на TCTP в туморната тъкан, е лош прогностичен маркер.

Изследването в дисертационния труд е съсредоточено върху доказването на потенциалната стойност на TCTP като нов прогностичен биомаркер при пациенти с хистологично верифициран карцином на дебелото черво.

### ***3. Цел и задачи на изследването***

#### ***3.1 Цел на изследването***

Целта на настоящото изследване е да се идентифицира потенциалната стойност на ТСТР като нов прогностичен биомаркер при пациенти с хистологично верифициран колоректален карцином.

#### ***3.2 Задачи на изследването***

Във връзка с така формулираната цел на дисертационния труд бяха поставени следните задачи:

1. Да се селектират пациенти с хистологично верифициран колоректален карцином, при които предстои започване на системна лекарствена терапия.

2. Да се съберат основните клиничко-патологични характеристики на пациентите, както и отговорът им към проведената системна лекарствена терапия.

3. Да се изследват чрез имунохистохимични методи ядрените нива на експресия на ТСТР в клетките от първичния тумор при пациенти с колоректален карцином.

4. Да се изследват чрез имунохистохимични методи цитоплазмените нива на експресия на ТСТР в клетките от първичния тумор на пациенти с колоректален карцином.

5. Да се определят корелации между ядрените и цитоплазмените нива на експресия ТСТР в клетките от първичния тумор и различни клиничко-патологични характеристики при селектираните пациенти.

6. Да се анализира прогностичния потенциал на ядрената и цитоплазмената експресия на ТСТР в първичния

тумор по отношение на преживяемостта без рецидив и преживяемостта без прогресия при селектираните пациенти.

7. Да се анализира прогностичния потенциал на ядрената и цитоплазмената експресия на ТСТР в първичния тумор по отношение на общата преживяемост при селектираните пациенти.

8. Да се сравнят получените данни у изследваната пациентска популация с натрупаните данни от световната литература.

#### ***4. Материали и методи***

##### ***4.1 База на реализиране на дисертационния труд***

- Клиника по медицинска онкология – Университетска многопрофилна болница за активно лечение „Света Марина“ – гр. Варна
- Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология – Медицински университет и Университетска многопрофилна болница за активно лечение „Света Марина“ - Варна

##### ***4.2 Пациентска популация***

Проведе се ретроспективно неинтервенционално едноцентрово изследване, обхващащо общо 74 участника, получили системна лекарствена терапия по повод на колоректален кацином в периода от месец януари 2015 г. до месец декември 2015 г. Всички те са стадирани с СТ или ПЕТ/СТ преди започване на лечение и са били с добър пърформанс статус оценен по ECOG като < 2 (Табл.1). Всички участници отговарят на включващите критерии на изследването и нямат изключващи критерии.

### ***Включващи критерии:***

1. Възраст над 18 години.
2. Пациенти с хистологично верифициран КРК, претърпели хирургично лечение на първичния тумор.
3. Системната лекарствена терапия да е проведена в Клиника по медицинска онкология към УМБАЛ „Света Марина“, гр. Варна.

В настоящото изследване са включени пациенти, получили палиативна химиотерапия по повод на метастатично заболяване или пациенти, получили адювантна терапия поради висок риск от рецидив (високорисков II или III стадий).

4. ECOG PS – пърформанс статус  $\leq 2$  (Табл.1).
5. Липса на сериозни отклонения в лабораторните показатели като: ПКК, съхранена чернодробна и бъбречна функция.

**Табл. 1 Оценка на общото състояние според скалата на Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), адаптирано по Robert L. Comis, MD, Group Chair.**

Оценка	ECOG (PS) – пърформанс статус
0	Пациентът е напълно активен, може да извършва всички дейности от време преди болестта си без ограничения
1	Съществуват ограничения във физическата активност, но пациентът има възможност за извършване на лека или седяща работа (например лека домашна или работа в офис)
2	Пациентът е амбулаторен и може да се грижи изцяло за себе си, но е налице невъзможност за извършване на трудова дейност; прекарва > 50% от времето, в което е буден, в изправено положение
3	Пациентът е способен само на ограничени грижи за себе си; прекарва > 50% от времето, в което е буден, в леглото
4	Пациентът е напълно неспособен да се грижи за себе си; напълно прикован към леглото или стола
5	Смърт

### ***Исключващи критерии:***

1. ECOG (PS) – пърформанс статус > 2 според AJCC.
2. Пациенти, чиито туморни блокчета не позволяваха допълнителна имуно-хистохимична обработка.
3. Липсваща информация в болничния архив, непозволяваща определяне на ключови за проучването параметри като: DFS, PFS, OS.

### ***4.3 Медицинска история на пациентите***

Параметрите на изследване и проследяване бяха предварително дефинирани и ретроспективно събрани в рамките на нашето проучване. В индивидуално медицинско досие за всеки един участник от изпитването бе събрана следната информация:

#### ***Демографски данни:***

- *Имена (Инициали):*
- *ID номер/дата на раждане:*
- *Възраст:*
- *Пол: мъж/жена*

#### ***Медицинска история:***

- *Изходната оценка на пърформанс статус (PS) на всеки пациент според Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (табл. 13)*
- *Наличие/отсъствие на придружаващи заболявания*

### **Информация за онкологичната болест:**

- *Клинична диагноза: локализация на първичния тумор, TNM стадиране и степен на диференциация*
- *Дата на поставяне на диагнозата*
- *Дата и обем на хирургичната интервенция*
- *Хистологичен резултат: номер, дата, брой парафинови блокчета*
- *Дата на започване на системна лекарствена терапия*
- *Вид на получената системна лекарствена терапия (адювантна, палиативна)*
- *Молекулярно-патогенетичен анализ на RAS статуса при метастатичните пациенти*
- *Резултати от CT и PET/CT като изходни изследвания и рестадиращи такива на всеки 3 месеца в хода на провежданото лечение, оценка по RECIST 1.1.*
- *Преживяемост без прогресия*
- *Обща преживяемост*

## **4.4 Специфични методи на изследване**

### **4.4.1 Имунохистохимичен метод на изследване**

Използван е индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ, като се използва следното антитяло:



*– Анти-TPP1 антитяло с католожен № ABIN701089, произведено в САЩ, поликлонално заешко антитяло срещу човешкия TPP1, с разреждане 1:400 и антигенно разкриване при рН 9,0*

Изследването на туморния тъканен биомаркер е осъществено в Катедра по Обща и Клинична патология на УМБАЛ „Света Марина“, гр. Варна.

#### ***4.4.2 Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимично изследване***

1. Фиксираните в неутрален формалин и включени в парафинови блокчета биопсични материали бяха нарязани на срези с дебелина 5 микрона и бяха поставени върху предметни стъкла.

2. Получените срези се депарафинират в низходяща редица от алкохоли, както следва: етанол 100% 3 мин., етанол 90% 3 мин., етанол 80% 3 мин., етанол 70% 3 мин., ксилол 3x10 мин. Последващо се измиват с течаща вода и поставяне на срезите в дестилирана вода.

3. Антигенно разкриване: За антигенно разкриване срезите се инкубират в предварително загрят EnVision FLEX Target Retrieval Solution в PT Link контейнери за 30 мин. при 97° С в среда с рН=9. След охлаждане пробите се промиват на стайна температура с разреден измиващ буфер FLEX Wash Buffer (20x) за 1-5 минути.

### ***4.4.3 Имунохистохимичен протокол***

Получените срези бяха оцветени според EnVision FLEX чрез използване на автоматичен оцветител DAKO Autostainer/Autostainer Plus.

1. Инкубация с пероксидазен блокиращ разтвор (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) на стайна температура за 5 мин. с оглед блокиране на ендогенната пероксидазна активност. След инкубация се изплакват с измиващ буфер за 5 мин.

2. Инкубация с първичното анти тяло (анти-TPP1), в съответното разреждане (1:400) на стайна температура за 20 мин.

3. Промивка с измиващ буфер на стайна температура за 2x5 мин.

4. Инкубация с маркиран полимер HRP на стайна температура за 20 мин.

5. Поредна промивка с измиващ буфер на стайна температура за 3x5 мин.

6. Инкубация на срезите с хромоген DAB пероксидазен разтвор при непрекъснато микроскопиране за 2x5 мин.

7. Последна промивка с измиващ буфер за 2 мин.

8. За 2 мин. изплакване с дестилирана вода.

9. Контраоцветяване с Mayer's hematoxylin за 5 мин. за морфологично потвърждаване.

10. Поредно изплакване на пробите с дестилирана вода за 5 мин.

11. Дехидриране в обратен възходящ ред: етанол 70%, етанол 80%, етанол 90%, етанол 100%. Процесът е със същата продължителност както при депарафинизацията.

12. Полагане на срезите в монтираща среда и поставяне върху предметно стъкло.

#### **4.4.4 Метод за отчитане нивата на експресия на ТСТР**

Оценка на имунохистохимичното изследване е направена, като са изследвани 10 полета на най-голямо увеличение (x400). Направени са дигитални снимки на случаите с помощта на сканиращ апарат Leica Aperio ScanScope AT2 device (Aperio Technologies, Vista, CA), като последващ анализ на образите бе осъществен със софтуер ImageScope V12.1.0.5029 (Aperio).

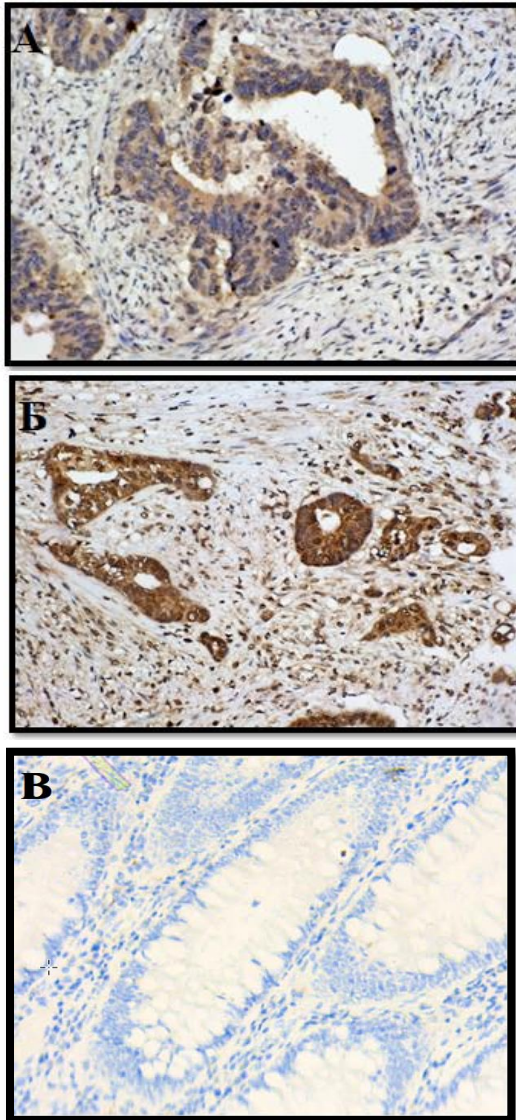
Двама патолози независимо един от друг извършиха имунохистохимична оценка на нивата на експресия на ТСТР в ядрото и цитоплазмата на туморните клетки, използвайки т.нар. H-score (histo score). Позитивно оцветяване се идентифицира при регистриране на ядрената и цитоплазмената кафява оцветка в туморните клетки. Интензитетът на оцветяване бе класифициран в четиристепенна скала:

- 0 – липсващо оцветяване
- 1+ – слабо оцветяване, светложълто
- 2+ – наситено оцветяване, наситено жълто
- 3+ – силно оцветяване, кафяво

Изчисляване на общия H-score (histo score) на тъканните проби бе осъществен по следната формула:

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

В нашата пациентска популация средният цитоплазмен H-score бе 180. Въз основа на получената средна стойност пациентите бяха разделени в две групи за последващия статистически анализ, такива с нисък ( $\leq 180$ ) и такива с висок ( $> 180$ ) цитоплазмен H-score. Средната стойност на ядреният H-score в изледваните проби бе 0, като съответно пациентите бяха стратифицирани отново в две групи: такива с липсваща ядрена експресия на TSTR (H-score=0) и такива с наличие на експресия на TSTR в ядрото (H-score>0) (Фиг.1). Следвайки същия протокол бе извършена оценка на ядрения и цитоплазмения TSTR H-score в здрава тъкан от областта на резекционните линии.



**Фигура 1.** Имунохистохимично оцветяване на ТСТР при колоректален карцином. (А) Ниска ядрена експресия на ТСТР (Б) Висока ядрена експресия на ТСТР (В) Здрава дебелочревна тъкан от резекционните линии.

#### **4.5 Образна оценка на терапевтичния отговор**

Всички селектирани пациенти са провели системна лекарствена терапия по повод на КРК. Някои от тях са лекувани в адювантен аспект, а други са получили палиативна химиотерапия по повод на метастатично заболяване. Всеки един от пациент е стадирен чрез образно изследване преди започване на лечение и регулярно на всеки три месеца по време на лечението до доказване прогресия на болестта според RECIST 1.1 критериите (Табл.2). Образните методи за оценка, които се използват са СТ на гръден кош и корем, както и целотелесен ПЕТ/СТ. В хода на проведената системна лекарствена терапия, използвайки образните методи за оценка на болестта, са проследени следните параметри:

– *Преживяемост без заболяване (DFS) дефинирано като времето до настъпване на рецидив или смърт поради каквато и да е причина при пациенти, получили лечение в адювантен аспект.*

– *Преживяемост без прогресия (PFS) дефинирано като времето изминало от започване на първа линия терапия по повод на метастатично заболяване и настъпване на прогресия или смърт поради каквато и да е причина.*

– *Обща преживяемост (OS) дефинирано като времето между първоначалната диагноза на заболяването и смъртта на пациента.*

– *Степен на контрол на болестта (DCR) се дефинира като броя на пациентите с пълн или частичен отговор, или стабилно заболяване след получаване на първа линия лечение по повод на местатична болест.*

**Табл.2 Видове отговор към провежданата терапия по критериите на RECIST 1.1 и според адаптираните критерии на EORTC**

<b>Вид отговор</b>	<b>Адаптирани EORTC ПЕТ/СТ критерии</b>	<b>RECIST 1.1</b>
<b>Пълен отговор (CR)</b>	Липса на натрупване на FDG във всички лезии	Изчезване на всички мерими лезии
<b>Частичен отговор (PR)</b>	Намаляване с 25% или по-малко на сбора на SUV <sub>max</sub> след повече от 1 проведен ХТ цикъл в до 5 таргетни лезии	Намаляване с 30% или по-малко на сумата от най-дългите диаметри на таргетните лезии спрямо изходното измерване
<b>Стабилна болест (SD)</b>	Липса на достатъчно намаляване в размерите на лезиите, както и достатъчно увеличение, което да се прецени като прогресия на болестта	Липса на CR, PR или PD
<b>Прогресия на заболяването (PD)</b>	Увеличение с 25% или повече в общия сбор на SUV <sub>max</sub> или появата на натрупване на FDG в нови лезии (нови лезии и/или прогресия на съществуващо нетаргетни лезии)	Появата на една или повече нови лезии или поне 20% увеличение в размера на сумата от най-дългите диаметри на таргетните лезии спрямо най-малката сума спрямо изследването

#### ***4.6 Методи за медико-статистическа обработка на данните***

Анализът на данните се извърши със статистически пакет IBM SPSS for Windows, v.23 (IBM Corp.). Всички стойности са представени като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение (SD). За статистически достоверни са приемани разлики, при които  $p \leq 0,05$ . Следните статистически методи бяха използвани при обработка на данните:

##### ***4.6.1 Метод на статистическа групировка на данните***

Подредбата на признаците е по вид и е осъществена във вариационни, интервални, категорийни, степенни и динамични статистически редове.

##### ***4.6.2 Метод на статистическото оценяване***

Осъществен чрез точкови оценки (за изчисляване на средната аритметична величина, медианата или модата на непрекъснати признаци), чрез интервални оценки и чрез интервали на доверителност (CI);

##### ***4.6.3 Графичен метод***

Използвани са линейни и плоскостни графични изображения, кръгови диаграми, кръгово-секторни диаграми, стереограми, както и символни диаграми.

##### ***4.6.4 Непараметричен анализ***

Осъществен чрез  $\chi^2$  (хи-квадрат) по Pearson, чрез Mann-Whitney тест, Kruskal-Wallis H тест, Jonckheere-Terpstra тест, t-test на Student.



- $\chi^2$  (хи-квадрат) тестът или тестът на Fisher бяха приложени, за да се сравнят ядрените и цитоплазмените нива на TCTP в различните пациентски подгрупи.
- *t*-test се използва за сравнение между нивата на експресия на TCTP в туморните клетки и здравите дебелочревни епителни клетки от резекционните линии.
- Mann-Whitney U тестът и тестът на Jonckheere-Terpstra се приложиха за сравнение и идентифициране на връзка между нивата на TCTP в туморните клетки и кликопатологичните характеристики на изследваната група.

#### **4.6.5 Корелационен анализ**

Определени са коефициенти на линейна корелация по Spearman. Корелационният коефициент  $\rho$  може да приема стойности между 0 и -1 при обратнопропорционална връзка и между 0 и +1 при правопрпорционална връзка. При интерпретирането на резултатите от корелационния анализ се използва следната скала за сила на корелацията според  $\rho$  стойността:

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

#### **4.6.6 Анализ на преживяемостта**

За тази цел се използваха методите на Kaplan-Meier, като разликите бяха оценени чрез log-rank тест;

#### **4.6.7 Cox proportional hazards models**

Cox proportional hazards models - за определяне HRs и интервал на конфиденциалност 95% CIs – тест за оценка на прогностичната стойност на установен биомаркер.

### **5. Резултати**

#### **5.1 Клинична и патологична стратификация на пациентите**

Ретроспективното проучване, което проведохме обхваща 74 пациенти с хистологично верифициран дебелочревен карцином. Всеки един от участниците бе получил системна лекарствена терапия по повод на онкологичното заболяване в Клиника по медицинска онкология на УМБАЛ „Света Марина“ – гр. Варна.

В хода на изследването за пациентите бяха събрани следните клинични данни: демографски данни (име, пол, възраст при поставяне на диагнозата и др.), локализация на първичен тумор, TNM класифициране, вид и продължителност на системната лекарствена терапия, общо състояние според ECOG (PS).

Събраните патологични данни бяха следните: хистологична характеристика на тумора, степен на диференциация, мутационен статус на *RAS*.

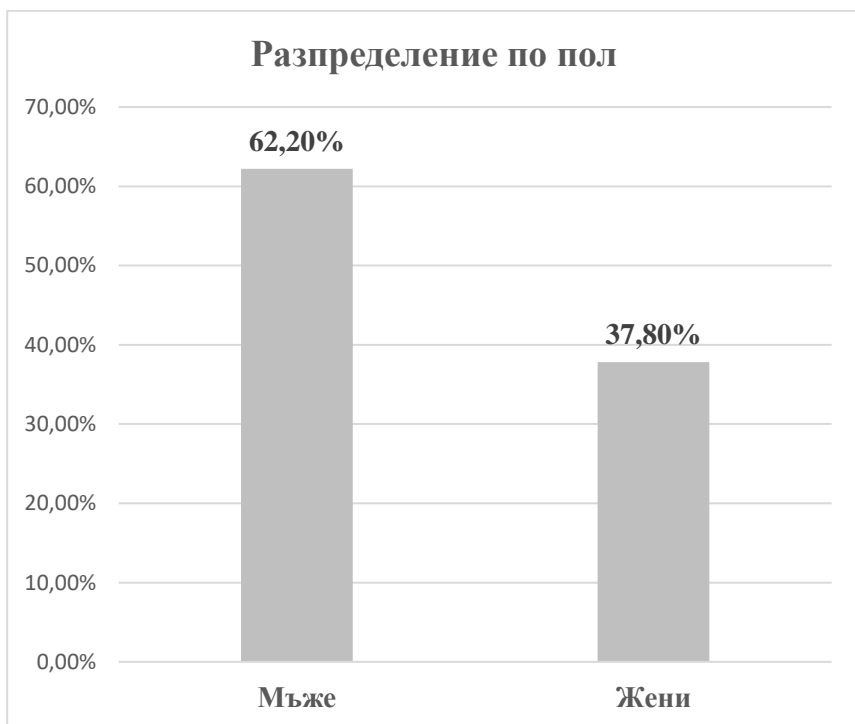
Според различните клинични и патологични параметри, пациентите бяха разпределени по групи (Табл.3).

**Табл.3 Изходни клиничкопатологични характеристики на пациентите**

<b>Пол (N, %)</b>	
Мъже	46 (62.2)
Жени	28 (37.8)
Средна възраст (years) +/- SD	64.9 +/- 9
<b>Локализация на тумора (N, %)</b>	
Ляв колон	43 (58.2)
Десен колон	31 (41.8)
<b>Степен на диференциация (N, %)</b>	
Grade 1	0 (0)
Grade 2	62 (83.8)
Grade 3	12 (16.2)
<b>RAS статус (N, %)</b>	
Див тип (wild type)	41 (55.4)
Мутирал тип	33 (44.6)
<b>Групи пациенти според стадия на болестта (N, %)</b>	
Неметастатично заболяване	20 (27)
Първично метастатично заболяване	54 (73)
<b>Стадий при диагностициране (N, %)</b>	
Втори стадий	2
Трети стадий	18
Четвърти стадий	54
<b>Общо състояние ECOG (N, %)</b>	
0	46 (62.16)
1	28 (37.84)

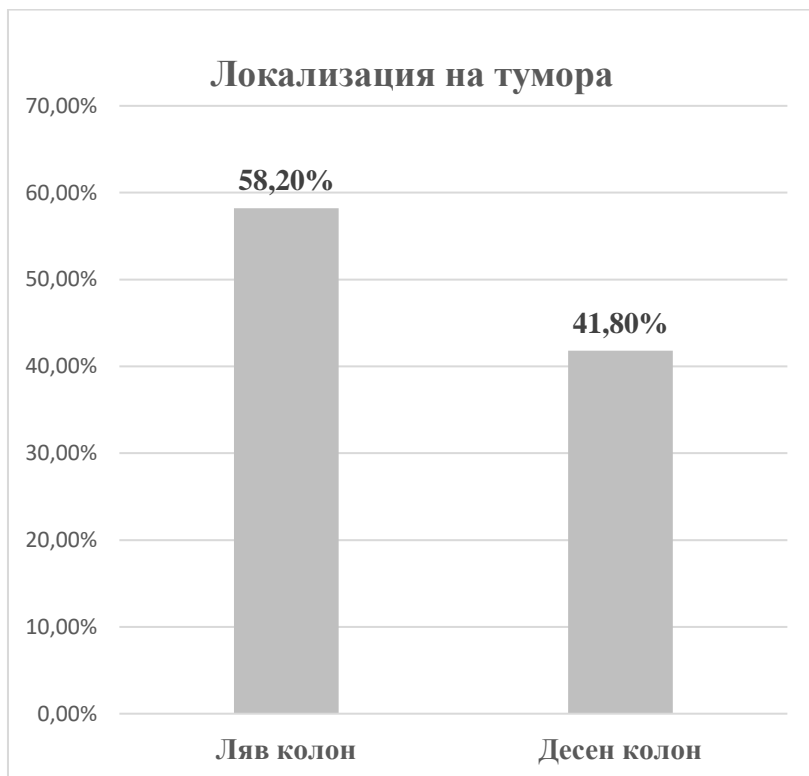
### Разпределение по групи

В общата пациентска популация (n=74) разпределението по пол бе в полза на мъжете с 62.2% (n=46), спрямо 37.8% за жените (n=28). Средната възраст на селектираните участници при поставяне на диагнозата е 64.9 години с минималната възраст 24 г. и максимална - 82 г. (Фиг. 2)



**Фигура 2. Стълбовидна плоскостна диаграма отразяваща разпределението на пациентите по пол (%)**

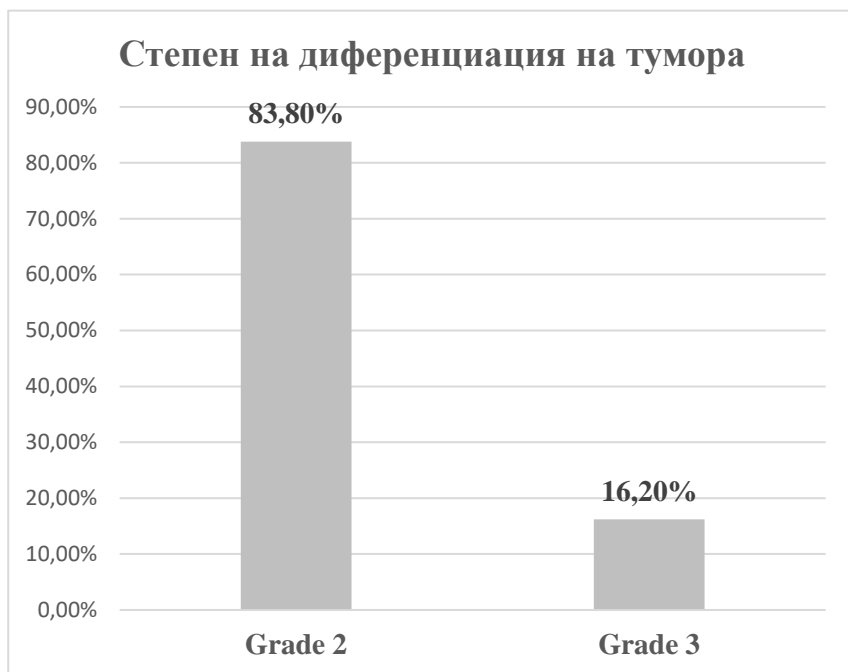
При 58.2% (n=43) от всички селектирани пациенти КРК бе с лявостранна локализация, а при 41.8% (n=31) произхождаше от десния колон (Фиг.3).



**Фигура 3. Стълбовидна плоскостна диаграма отразяваща разпределението на пациентите според първичната локализация на тумора (%)**

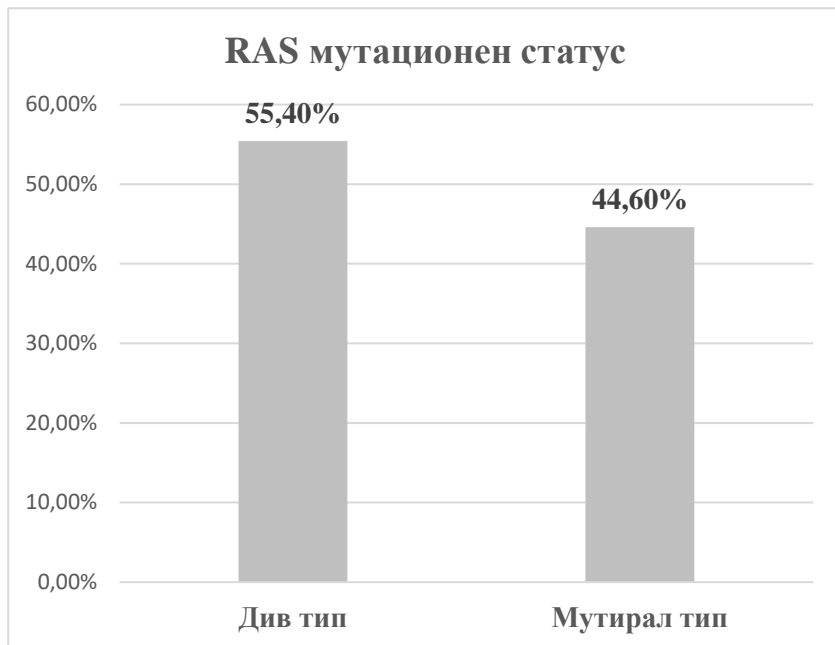
В зависимост от степента на диференциация на тумора преобладават пациентите с Grade 2 тумори – 83.8% (n=62)

следвани от групата на пациентите с Grade 3 диференциация - 16.2% (n=12) (Фиг. 4).



**Фигура 4. Стълбовидна плоскостна диаграма отразяваща разпределението на пациентите според степента на диференциация на тумора (%)**

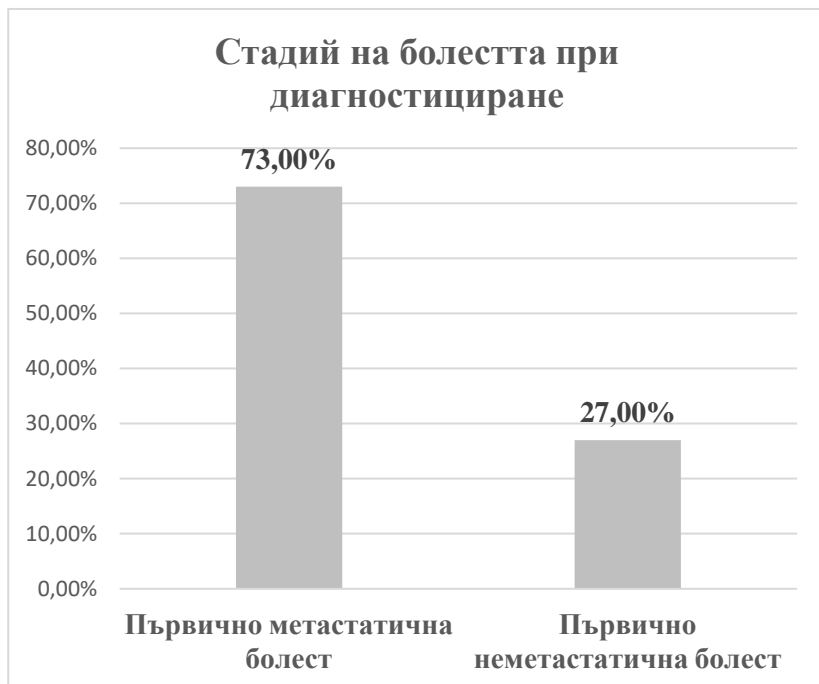
Според молекулярно-патологичното изследване на RAS статуса водещ е броят на болни с RAS див тип (wild type) - 55,4% (n=41), докато тези с RAS мутирал тип бяха 44,6% (n=33) (Фиг. 5).



**Фигура 5. Стълбовидна плоскостна диаграма отразяваща разпределението на пациентите според RAS мутационния статус (%)**

Включените в настоящото изследване пациенти бяха разпределени в две групи, в зависимост от стадия на болестта. Преобладаващата част от тях бяха диагностицирани с първично метастатично заболяване – 73% (n=54), докато 27% (n=20) бяха с първично неметастатична

болест, като от тях 18 души бяха в трети клиничен стадий и само 2 във втори. В хода на проучването 85% (n=17) от неметастатичните болни прогресираща до IV стадий (Фиг.6).

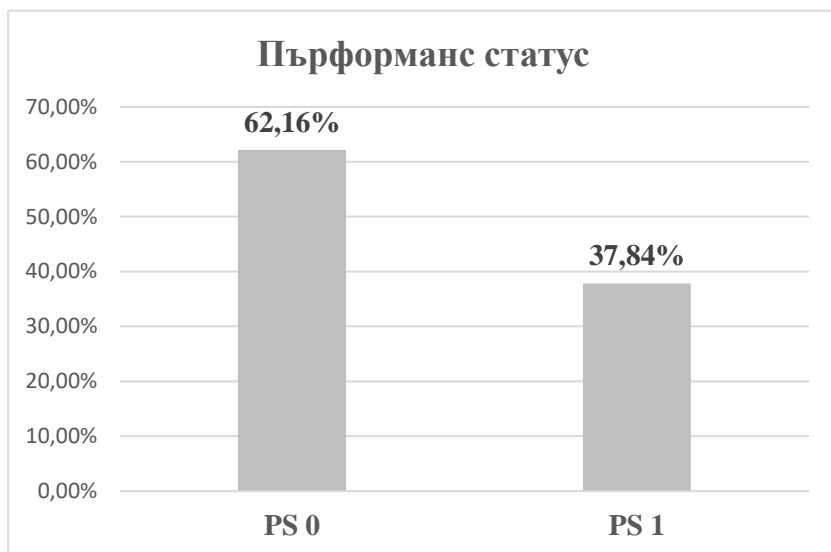


**Фигура 6. Стълбовидна плоскостна диаграма отразяваща разпределението на пациентите според клиничния стадий на болестта (%)**

В изпитването са включени пациенти с пърформанс статус < 2, оценено по скалата на ECOG (PS). Основната част от всички пациентите при започване на първи цикъл



химиотерапия са с ECOG 0 – 62.16% (n=46), следвани от тези с ECOG 1 – 37.84% % (n= 28). (Фиг. 7).



**Фигура 17. Стълбовидна плоскостна диаграма отразяваща разпределението на пациентите според пърформанс статуса (%)**

## **5.2 Асоциация между нивата на експресия на ТСТР, демографските и клинично-патологичните характеристики в изследваната пациентска популация**

Прилагайки статистическия метод на непараметричен анализ ( $\chi^2$  тест) в селектираната група пациенти не се откри значима корелация по отношение на ядрените и цитоплазмените нива на експресия на ТСТР и полът,

възрастта, ECOG (PS), степен на диференциация на тумора, локализация на първичния тумор, стадия при диагностициране и най-добрия отговор към първа линия системна лекарствена терапия (Табл.4).

Пациентите с по-висок ядрен ТСТР Н-скор показват тенденция за по-голям брой различни метастатични огнища при поставяне на диагнозата ( $p = 0.059$ , Jonckheere-Terpstra тест).

По-високият ядрен ТСТР Н-скор се свързва с по-висока степен на диференциация на тумора ( $p = 0.049$ , Mann-Whitney тест) (Фиг.8).

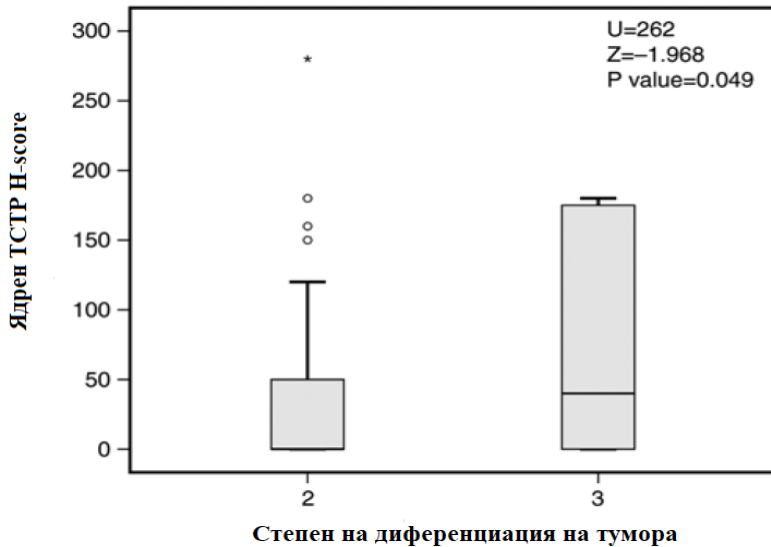
В туморните клетки средният цитоплазмен и ядрен ТСТР Н-Score бе сигнификантно по-висок сравнено със съседната здрава тъкан от областта на резекционната линия ( $p = 0.004$  и  $p < 0.001$ ; Т-тест за двойки извадки).

**Таблица 4. Асоциация между нивата на експресия на ТСТР и клинично-патологичните характеристики на пациентите**

Клинично-патологични характеристики	Цитоплазмена експресия на ТСТР			Ядрена експресия на ТСТР		
	Висока	Ниска	P-Value	Висока	Ниска	P-Value
<b>Възраст</b>			0.056			0.621
<64	24 (75.0%)	8 (25.0%)		21 (65.6%)	11 (34.4%)	
>64	22 (54.4%)	20 (47.6%)		30 (71.4%)	12 (28.6%)	
<b>Пол</b>			0.323			1
Мъже	31 (67.4%)	15 (32.6%)		32 (69.6%)	14 (30.4%)	
Жени	15 (53.6%)	13 (46.4%)		19 (67.9%)	9 (32.1%)	
<b>ECOG</b>			0.622			0.606
0	30 (65.2%)	16 (34.8%)		33 (71.7%)	13 (28.3%)	
1	16 (57.1%)	12 (42.9%)		18 (64.3%)	10 (35.7%)	

<b>G</b>			0.757			0.173
2	39 (62.9%)	23 (37.1%)		45 (72.6%)	17 (27.4%)	
3	7 (58.3%)	5 (41.7%)		6 (50.0%)	6 (50.0%)	
<b>RAS статус</b>			0.630			0.802
WT	24 (58.5%)	17 (41.5%)		29 (70.7%)	12 (29.3%)	
M+	22 (66.7%)	11 (33.3%)		22 (66.7%)	11 (33.3%)	
<b>Локализация на тумора</b>			0.229			0.612
Ляв колон	24 (55.8%)	19 (44.2%)		31 (72.1%)	12 (27.9%)	
Десен колон	22 (71.0%)	9 (29.0%)		20 (64.5%)	11 (35.5%)	
<b>Групи пациенти според стадия при диагностициране</b>			0.280			0.266
Неметастатичен	10 (50%)	10 (50%)		16 (80%)	4 (20%)	
Метастатичен	36 (66.7%)	18 (33.3%)		35 (64.8%)	19 (35.2%)	
<b>Стадий при диагностициране</b>			0.420*			0.447*
Втори стадий	1 (50%)	1 (50%)		2 (100%)	0 (0%)	
Трети стадий	9 (50%)	9 (50%)		14 (77.8%)	4 (22.2%)	
Четвърти стадий	36 (66.7%)	18 (33.3%)		35 (64.5%)	19 (35.5%)	
<b>Най-добър отговор към първа линия ХТ</b>			0.277			0.784
CR	1 (33.3%)	2 (66.7%)		3 (100%)	0 (0%)	
PR	6 (85.7%)	1 (14.3%)		5 (71.4%)	2 (28.6%)	
SD	15 (53.6%)	13 (46.4%)		19 (67.9%)	9 (32.1%)	
PD	22 (66.7%)	11 (33.3%)		21 (63.6%)	12 (36.4%)	
<b>DCR</b>			0.474			0.613
CR+PR+SD	22 (57.9%)	16 (42.1%)		27 (71.1%)	11 (28.9%)	
PD	22 (66.7%)	11 (33.3%)		21 (63.6%)	12 (36.4%)	

\* *Тест на Fisher*



**Фигура 8. Box plot графика отразяваща ТСТР H-score в ядрото при пациенти с различна степен на диференциация на КРК**

### **5.3 Асоциация между нивата на експресия на ТСТР и преживяемостта в изследваната пациентска популация**

Проведеното изследване установи, че липсва статистически значима връзка между нивата на цитоплазмена експресия на ТСТР и DFS ( $p=0.723$ ), PFS ( $p=0.377$ ) и OS ( $p=0.990$ ).

Пациентите, които са имали отрицателен ядрен ТСТР H-скор в първичния тумор, се отличават със статистически значими по-добри клинични резултати. PFS за групата с отрицателна ядрена експресия на ТСТР е 7.7 месеца (95% CI, 5.8-9.5) срещу 5.5 месеца (95% CI, 3.2-7.8) при групата с

позитивна ядрена експресия на ТСТР ( $p=0.023$ , Mantel-Cox log-rank) (Фиг. 9).

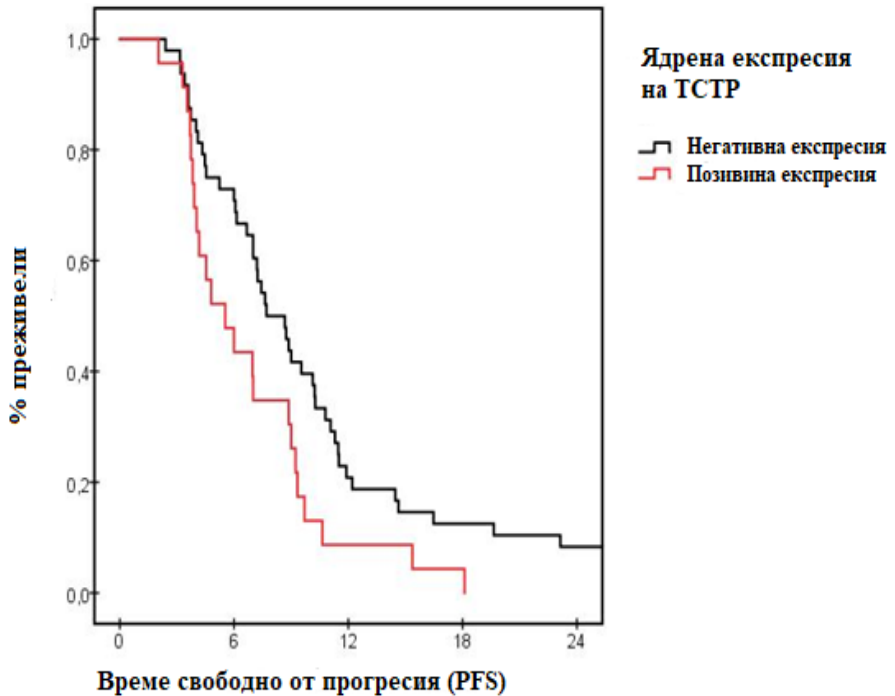
Отново при пациентите с негативна ядрена експресия на ТСТР се установява значително по-висока средна обща преживяемост (22.2 месеца; 95% CI, 16.1–28.3) сравнено с групата с позитивна ядрена експресия на ТСТР (средно 13.2 месеца; 95% CI, 10.1-16.3) ( $p=0.008$ , Mantel-Cox log-rank) (Фиг.10) (Табл.5).

Унивариативния Сох регресионен анализ показва, че позитивният ТСТР Н-скор е статистически значим рисков фактор за по-лош PFS (HR 1.797; 95% CI, 1.073-3.010;  $p=0.026$ ) и по-лош OS (HR 1.995; 95% CI, 1.189-3.348;  $p=0.009$ ) (Табл.6).

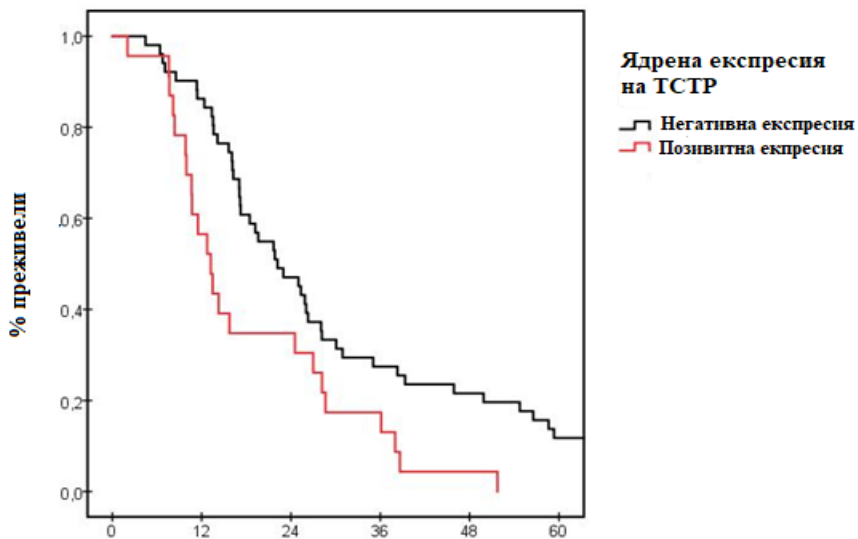
В мултивариативния Сох регресионен модел положителният ядрен ТСТР Н-скор е независим рисков фактор за по-лошо време свободно от прогресия и по-лоша обща преживяемост (Табл.7).

Преживяемостта без заболяване при неметастатичната група пациенти не се различава в зависимост от степента на ядрена експресия на ТСТР ( $p=0.813$ ).

Едногодишната обща преживяемост в пациентската популация с негативна ядрена експресия на ТСТР бе 86.3% сравнено с 56.5% при пациенти с позитивна експресия на ТСТР в ядрото ( $p=0.008$ ). Статистически се доказва сигнификантна негативна корелация между ядрения ТСТР Н-score и OS ( $p= -0.287$ ;  $p=0.013$ ).



*Фигура 9. Kaplan-Meier криви на разпределението на преживяемостта без прогресия (PFS) при групите с позитивна ядрена експресия и с негативна ядрена експресия на TCTP*



Обща преживяемост (OS)

**Фигура 10. Kaplan-Meier криви на разпределението на общата преживяемостта (OS) при групите с позитивна ядрена експресия и с негативна ядрена експресия на TCTP**

**Таблица 5. Средна обща преживяемост и време свободно от прогресия в зависимост от ядрения TCTP H-score**

Ядрен TCTP H-score	PFS			OS		
	Медиана	95% Интервал на сигурност		Медиана	95% Интервал на сигурност	
		Долна граница	Горна граница		Долна граница	Горна граница
Липсваща експресия	7.700	5.852	9.548	22.200	16.069	28.331
Позитивна експресия	5.533	3.238	7.829	13.233	10.155	16.311

**Таблица 6. Унивариативен анализ за оценка на преживяемостта без прогресия и общата преживяемост**

Показател	PFS			OS		
	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
<b>Възраст</b>			0.682			0.606
≤64	1	-		1	-	
>64	1.105	0.685-1.782		1.134	0.703-1.828	
<b>Пол</b>			0.326			0.286
Мъже	1	-		1	-	
Жени	1.284	0.779-2.117		1.301	0.802-2.111	
<b>ECOG</b>			0.109			<b>0.012</b>
0	1	-		1	-	
1	1.489	0.915-2.423		1.871	1.148-3.047	
<b>G</b>			0.311			<b>0.006</b>
2	1	-		1	-	
3	1.387	0.736-2.613		2.491	1.293-4.799	
<b>RAS статус</b>			0.485			<b>0.002</b>
WT	1	-		1	-	
M+	1.184	0.737-1.900		2.113	1.306-3.420	
<b>Локализация на тумора</b>			0.301			0.154
Ляв колон	1	-		1	-	
Десен колон	1.287	0.798-2.075		1.422	0.877-2.305	
<b>Стадий при диагностициране</b>			0.318			<b>&lt;0.001</b>
Неметастатичен	1	-		1	-	
Метастатичен	1.331	0.759-2.334		3.174	1.775-5.673	
<b>TSTR – цитоплазмена експресия</b>			0.379			0.990
Ниска	1	-		1	-	
Висока	1.249	0.761-2.049		1.003	0.619-1.626	
<b>TSTR – ядрена експресия</b>			<b>0.026</b>			<b>0.009</b>
Ниска	1	-		1	-	
Висока	1.797	1.073-3.010		1.995	1.189-3.348	



**Таблица 7. Мултивариативен анализ за оценка на преживяемостта без прогресия и общата преживяемост**

Показател	PFS			OS		
	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
<b>Пол</b>			0.456			<b>0.024</b>
Мъже	1	-		1	-	
жени	1.225	0.719-2.088		1.845	1.085-3.137	
<b>G</b>			0.290			<b>0.003</b>
2	1	-		1	-	
3	1.432	0.736-2.785		3.092	1.481-6.456	
<b>RAS</b>			0.809			<b>0.009</b>
WT	1	-		1	-	
M+	1.063	0.646-1.750		2.050	1.196-3.512	
<b>ECOG</b>			0.097			<b>0.043</b>
0	1	-		1	-	
1	1.570	0.921-2.676		1.703	1.017-2.851	
<b>Стадий при диагностициране</b>			0.853			<b>0.005</b>
Неметастатичен	1	-		1	-	
Метастатичен	1.060	0.571-1.967		2.352	1.290-4.286	
<b>TCTP – ядрена експресия</b>			0.042			<b>0.040</b>
Ниска	1	-		1	-	
Висока	1.743	1.021-2.975		1.799	1.027-3.151	

## **6. Дискусия**

Карциномът на дебелото черво е третият най-често срещан карцином в световен мащаб и втора водеща причина за настъпване на смърт от онкологично заболяване. В глобален план се предвижда нарастване на броя на случаите на КРК с тревожната тенденция за увеличаване на заболяемостта и сред по-млади пациенти. През последните няколко десетилетия петгодишната преживяемост се повиши до над 60%, благодарение на напредъка в разкриването на основните патофизиологични механизми, по които възниква болестта и значително увеличаване на наличните възможности за лечение на локално и метастатично заболяване.

ТСТР е мултифункционален протеин, заемащ ключова регулаторна роля в редица клетъчни процеси като: клетъчен растеж, прогресия на клетъчния цикъл, синтеза на протеини, апоптоза, имунен отговор и малигнена трансформация. Този протеин е със строго съхранена структура и може да бъде открит във всички еукариотни клетки, като взаимодейства и с редица други протеини. Освен че взема участие в множество нормални клетъчни функции, той е в основата на патогенезата на редица заболявания.

Множество проучвания установяват връзката между ТСТР и онкогенната трансформация, като нивата на експресия на ТСТР в клетките на редица злокачествени солидни тумори са значително по-високи, отколкото в нормалните клетки от които произлизат. ТСТР блокира транскрипцията на p53 и по този начин инхибира активирането на апоптозата в туморните клетки. Инхибирайки експресията на ТСТР в неопластичните клетки

се потиска малигнения фенотип на раковите клетки, като те стават по-уязвими към оксидативен и метаболитен стрес. Високите нива на ТСТР се свързват още и с химиорезистентност. ТСТР играе важна роля в прогресията на туморите чрез инхибиране на апоптозата, ускоряване на излизането от митоза, индукция на инвазията и метастазирането.

Туморната реверсия е биологичен процес, при който някои от неопластичните клетки загубват частично или напълно малигнения си фенотип. Откриването на основните молекули, участващи в нея е интригуващо за клиницистите, защото именно те могат да се използват като таргет при лечение на онкологичното заболяване. По време на процеса на реверсия се установяват значително понижени нива на ТСТР, което от своя страна повишава интересът към него и използването му за потенциален терапевтичен таргет при лечение. Доказано е, че потискайки нивата на експресия на ТСТР в клетките на КРК се инхибира инвазията и миграцията *in vitro*, и развитието на чернодробни метастази *in vivo*.

Драстичното повишаване на броя на злокачествените заболявания в световен мащаб причинява огромни икономически и социални щети. Основни при лечението на повечето тумори остават класическите химиотерапевтици, които обаче се характеризират с множество странични ефекти като: алоpecia, гастроинтестинални прояви и потискане на костно-мозъчната функция. Друг основен проблем при тях е и развитието на лекарствена резистентност. Затова и в последните десетилетия се работи основно за откриване на нови по-ефективни и с по-добра поносимост терапевтични агенти.

КПК е хетерогенно заболяване, като резултатите от лечението са различни в различните пациентски популации и зависят от биологията на тумора (наличие на RAS и BRAF мутации, микросателитна нестабилност и др.). Въпреки програмите за скрининг, напредъкът в диагностиката и лечението, колоректалният карцином, особено в напреднал стадий, все още остава едно от злокачествените заболявания с лоша прогноза. Следователно е налице нужда от идентифициране на нови прогностични маркери, които да ни бъдат опорна точка в избора на терапевтична стратегия и да подсказват вероятния резултат от лечението.

Настоящото ретроспективно изследване бе проведено, за да оцени ролята на нивата на експресия на TCTP като прогностичен фактор при пациенти с хистологично верифициран колоректален карцином. Към настоящия момент са налице малко на брой проучвания, изследващи този проблем.

В това ретроспективно проучване открихме значителни разлики в преживяемостта на пациентите с КПК в зависимост от нивата на експресия на TCTP в ядрата на туморните клетки от първичния тумор. Въпреки сходните клинично-патологични характеристики (пол, възраст, ECOG, PS, степен на диференциация, RAS статус и стадий при диагностициране) в изследваната пациентска популация установихме, че средната PFS и OS са значително по-ниски в подгрупата с по-висока ядрена експресия на TCTP. Мултивариативният регресионен анализ показва, че ядрената експресия на TCTP е независим рисков фактор за по-лош PFS и OS в селектираната група пациенти. По отношение на

цитоплазмените нива на ТСТР не бе открита прогностична стойност.

Днес съществува значителен интерес към прогностичната стойност на ТСТР при различни видове тумори. Някои проучвания при рака на гърдата установяват, че по-високата експресия на ТСТР в ядрото се свързва с по-висока степен на диференциация на тумора и по-висока експресия на Ki-67 като маркер за агресивност на заболяването. В друго проучване върху хепатоцелуларен карцином се доказва, че високата експресия на ТСТР е лош прогностичен маркер, свързан с по-кратка обща преживяемост. При пациенти с глиоми отново се потвърждава, че високите нива на ТСТР се свързват с по-ниска степен на диференциация и по-кратка обща преживяемост. Подобни са и резултатите при пациентки с епителни овариални тумори.

Към настоящия момент натрупаните данни за прогностичната стойност на ТСТР при пациенти с КРК са значително ограничени (286). Fisher et al. изследват ролята на ТСТР иРНК и нивата на експресия на протеина като прогностичен фактор при различни видове тумори. В тяхното проучване не се наблюдава връзка между експресията на ТСТР иРНК и общата преживяемост при пациенти с карцином на дебелото черво, но ядрената експресия на ТСТР се свързва с по-ниска степен на диференциация на тумора, каквато се установява и в нашето изследване. Xiao et al. установяват по-висока експресия на ТСТР при по-ниско диференцирани тумори и при пациенти с метастатично заболяване. Те свързват завишените нива на ТСТР с по-кратка преживяемост без метастази.

От самото си откриване е известна ключовата роля на ТСТР, както в канцерогенезата на злокачествените солидни тумори, така и в процеса на туморна реверсия. Нивата на експресия на ТСТР са значително по-високи в туморните клетки, отколкото в ревертантнит. ТСТР стимулира канцерогенезата свързвайки се с p53 и последващо инхибиране на апоптозата. Потискане на функцията на ТСТР активира от своя страна апоптозата и намалява жизнеспособността на туморните клетки. Чрез потискане на експресията на ТСТР се подобрява отговорът на лечението с 5-флуороурацил и Оксалиплатин в клетъчни линии на дебелочревен карцином.

Използването на ТСТР като прогностичен маркер при пациенти с КРК е обещаващо, но съществуват и някои пречки, за да бъде внедрен в рутинната клинична практика. На първо място е липсата на стандартизиран метод за изследване на нивата му на експресия. Повечето проучвания до момента използват имунохистохимичния метод за измерване, но тук има значителна вариабилност в използваните антители и системите използвани за оценка. Това налага методите за оценка за бъдат стандартизирани, за да се гарантира, че експресията на ТСТР може да бъде надеждно измерена и сравнима при различните проучвания. Повечето налични до момента проучвания са малки и ретроспективни, което пък от своя страна налага провеждане на проспективни проучвания с по-голяма пациентска кохорта с оглед валидиране на ТСТР като прогностичен маркер.

В нашето изследване съществуват няколко ограничения, като основното е неговият ретроспективен

характер. Селектираните пациенти бяха проследени за определен интервал от време, което не ни позволи да използваме информация на по-скорошно установени прогностични и предиктивни маркери, като наличие на BRAF мутации или микросателитна нестабилност. Поради тази причина не успяхме да направим анализ на връзката между нивата на експресия на ТСТР и рутинно използваните в клиничната практика прогностични маркери. От друга страна по-дългият период на проследяване ни даде възможност да извършим статистически анализ на преживяемостта.

В заключение, нашето проучване разкри, че ядрените нива на експресия на ТСТР могат да бъдат използвани като прогностичен маркер при пациенти с рак на дебелото черво. Положителната ядрена експресия на ТСТР се свързва с пониска степен на диференциация на тумора и по-кратки преживяемост без прогресия и обща преживяемост. Доколкото ни е известно нашето проучване е първото, което идентифицира стойността на ядрената експресия на ТСТР като прогностичен маркер по отношение на PFS и OS при пациенти с хистологично верифициран КРК. Нашите открития биха били от полза за идентифициране на пациенти с по-агресивни тумори и по-лоша прогноза, а това от своя страна би ни било полезно за избора на индивидуална терапевтична стратегия.

#### Заклучение

В обобщение, най-важният принос на изследването в дисертационния труд е откриването на връзка между нивата на експресия на биомаркера за туморна реверсия ТСТР и приживяемостта при пациенти с хистологично верифициран

колоректален карцином. Нашето ретроспективно проучване установи, че има обратно пропорционална зависимост между ядрените нивата на експресия на ТСТР в клетките от първичния тумор и времето свободно от прогресия и общата преживяемост в пациентската популация. Това доказва, че ядреният Н-скор на ТСТР може да се послужи като независим прогностичен маркер по отношение на PFS и OS при болни с карцином на дебелото черво. Резултатите, които получихме са в унисон с резултатите от проведените до момента изпитвания в световен мащаб. Изследването ни не установи сигнификантна корелация между нивата на експресия на ТСТР и клинично-патологичните характеристики на пациентската популация.

Процесът на туморната реверсия е интригуващ проблем за редица изследователи. Макар че вече са известни някои от основните молекули и пътища по които се осъществява, все още натрупаните данни в световната литература са недостатъчни. Детайлното изясняване на фините молекулни механизми на протичане биха били стабилна основа, върху която да се изгради по-добра терапевтична стратегия при лечението на пациенти със злокачествени солидни тумори.

## ***7. Изводи***

1. Не се установи корелация между ядрените и цитоплазмените нивата на експресия на ТСТР в клетките на първичния тумор и някои клиничнопатологични характеристики като: пол, възраст, ECOG (PS), локализация на първичния тумор, стадий при диагностицирането.



2. Установи се правопрпорционална зависимост между ядрените нива на експресия на ТСТР и по-големия брой различни метастатични огнища при пациентите в IV стадий.

3. Установи се правопрпорционална зависимост между ядрените нива на експресия на ТСТР и по-високата степен на диференциация на тумора.

4. Установи се обратнопрпорционална зависимост между ядрените нива на експресия на ТСТР и преживяемостта свободна от прогресия.

5. Установи се обратнопрпорционална зависимост между ядрените нива на експресия на ТСТР и общата преживяемост.

6. Установи се, че високите ядрени нива на експресия на ТСТР са независим прогностичен фактор за по-лоша преживяемост без прогресия и обща преживяемост.

7. Не се установи корелация между цитоплазмените и ядрени нива на експресия на ТСТР и преживяемостта свободна от заболяване.

## ***8. Приноси на дисертационния труд***

1. За пръв път в световен мащаб се докладва потенциалната роля на нивото на експресия на ТСТР в първичния тумор като прогностичен фактор по отношение на преживяемостта без прогресия и общата преживяемост при пациенти с хистологично верифициран колоректален карцином.

2. За пръв път в България се изследва нивото на експресия на ТСТР в първичния тумор като маркер за

туморна реверсия при пациенти с хистологично верифициран колоректален карцином.

3. За пръв път в България се изследва нивото на ТСТР в първичния тумор и корелацията му с различни клиничко-патологични характеристики при пациенти с хистологично верифициран колоректален карцином.

## ***9. Научни публикации, свързани с дисертационния труд***

### **Публикации:**

#### **1. „Prognostic value of translationally controled tumor protein in colon cancer“**

**Автори:** Dragomir Svetozarov Stoyanov, Mariya Penkova, Nikolay Conev, Ivan Donev

**Дата на публикуване:** 2023/9/1

**Източник:** *Molecular and Clinical Oncology*

**Брой:** 3/2023

**Страници:** 1-8

**Издател:** Spandidos Publications

#### **2. „До каква степен Lonsurf® измени терапевтичния отговор при метастатичен колоректален карцином“**

**Автори:** Т. Панайотова, М. Пенкова-Иванова, Н. Цонев

**Дата на публикуване:** 2023

**Източник:** PRO MEDIC

**Брой:** 3/2023

**Страници:** 54-60

**Издател:** Медик принт ЕООД

**3. „Циркулураци нуклеозоми с посттранслационни модификации като епигенетични биомаркери при злокачествени солонни тумори“**

*Автори:* М. Радаонова, Т. Панайотова, Р. Манев, М.

*Манева, Д. Стоянов, М. Пенкова, Н. Цонев*

*Дата на публикуване:* 2021/4

*Източник:* MEDINFO

*Брой:* 4/2021

*Страници:* 94-99

*Издател:* МЕДИНФО ЕООД

**Участия:**

**1. „Translationally controlled tumor protein as a prognostic marker in metastatic colon cancer”**

*Автори:* Dragomir Svetozarov Stoyanov, Mariya

*Penkova, Nikolay Conev, Ivan Donev*

*Дата на публикуване:* 2023/6/1

*Издание:* реферирано с импакт фактор – *Journal of Clinical Oncology*

*Том:* 41

*Страници:* e15513-e15513

*Издател:* American Society of Clinical Oncology

**2. „Regorafenib and trifluridine/tipiracil efficacy and safety in chemorefractory metastatic colorectal cancer patients: A single Bulgarian centre retrospective study”**

*Автори:* M Penkova, D Stoyanov, T Panayotova, I

*Donev, M Petrova, N Conev*

*Дата на публикуване:* 2020/7/1

*Издание:* реферирано с импакт фактор – *Annals of Oncology*

*Страници:* S100

*Издател:* Elsevier

**Изказвам най-искрена и сърдечна благодарност на:**

– Научният ми ръководите доц. д-р Елеонора Димитрова, д.м за ценните идеи и насоки, допринесли за реализирането на дисертационния труд.

– Доц. Николай Цонев, д.м. за съветите и професионалните напътствия, които са прозорец към светлия път на науката.

– Д-р Теодорика Панайотова, д.м. и д-р Драгомир Стоянов, д.м за неограничената подкрепа и приятелство.

– Семейството ми за безкрайната обич.