



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

д-р Снежана Стоянова Спасова-Няголова

**ПРОГНОСТИЧНИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ ПРИ
БЪБРЕЧНОКЛЕТЪЧЕН КАРЦИНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

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

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

Проф. д-р Валентин Христофоров Икономов, д.м.н.

Варна, 2018

Дисертационният труд съдържа 142 стандартни страници и е онагледен с 16 таблици и 43 фигури. Литературната справка включва 221 литературни източника, от които 3 на кирилица и 218 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 18.09.2018 г. от 14.30 часа в
въз основа на Заповед № Р-109-303/29.05.2018 г. на Ректора на МУ-Варна, пред научно жури в състав:

Външни членове:

Проф. д-р Ангел Атанасов Ангелов, д. м. н.
Доц. Д-р Веселин Тодоров Беловеждов, д.м.
Доц. д-р Елена Гълъбова Порязова-Маркова, д.м.

Вътрешни членове:

Проф. д-р Иван Донев Щерев, д.м.
Доц. д-р Петър Иванов Генев д.м.

Резервен външен член:

Доц. д-р Силвия Николаева Генова, д.м.

Резервен вътрешен член:

Доц. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.

Съдържание

Въведение	5
Цел и задачи	6
Материали и методи	6
Резултати	9
Обсъждане	35
Заклучение	45
Изводи	46
Приноси	47
Публикации и участия в научни конгреси, свързани с дисертационния труд	48

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

БКК – бъбречноклетъчен карцином

мБКК – метастатичен бъбречноклетъчен карцином

сБКК – светлоклетъчен бъбречноклетъчен карцином

СК – саркоматоидна компонента

ТН – туморна некроза

На латиница

DFS - disease free survival

EMT - epithelial–mesenchymal transition

FG - Fuhrman grade

HER2 - human epidermal growth factor receptor 2

HIF1 α - hypoxia-inducible factor 1 α

LATS - large tumor suppressor kinase

mTOR - mammalian target of rapamycin

NF - neurofibromatosis

NP - Neuropilin

OS - overall survival

PD-L1 - programmed death-ligand 1

TAZ - transcriptional coactivator with PDZ-binding motif

TGF β - Transforming growth factor β

TKI - tyrosine kinase inhibitor

VEGF - Vascular endothelial growth factor

VEGFR - Vascular endothelial growth factor receptor

VHL - Von Hippel Lindau

YAP - Yes-associated protein

I. Въведение

Съвременните познания за биологично развитие на бъбречноклетъчния карцином (БКК) показват, че той е уникален и неподражаем по своето протичане. БКК представлява група от малигнени неоплазми, всяка произлизаща от различна част на нефрона, с различни генетични характеристики и специфична туморна биология, различен интензитет на прогресия и непредсказуема еволюция.

Бъбречноклетъчният карцином представлява около 3% от всички малигнени тумори и 90% от туморите на бъбрека (Gupta K et al., 2008). Повечето от случаите се диагностицират във възрастния интервал 50-70 години. (Ferlay J et al., 2013). Около 30% от пациентите към момента на диагностицирането са вече с наличие на метастази (Wong M et al., 2017). БКК в ранните стадии протича благоприятно, но съществува риск за рецидив и прогресия на заболяването. Определянето на морфологични маркери, които да прогнозира биологичното поведение на локализиран БКК ще доведат до по-добро проследяване и грижа за тези пациенти. Лечението на пациентите с метастазирал към момента на поставяне на диагнозата БКК е все още предизвикателство. От 2005 г. са одобрени различни таргетни терапии, насочени предимно към инхибиране на mammalian target of rapamycin (mTOR), васкуларния ендотелен растежен фактор (VEGF) или негови рецептори (VEGFR). Тези лекарства подобряват показателите на средната преживяемост до приблизително 2,5-3 години (Pal S et al., 2015).

С оглед определяне поведението на туморите все по-насочено се търсят маркери, с помощта на които би могла да се изясни тяхната биология. Много нови молекули, участващи в процеса на ангиогенезата или в процесите на клетъчна пролиферация са обект на интерес при различни типове неоплазми, включително и при БКК.

Невропилините са многофункционални трансмембранни протеини, които имат важна роля при ангиогенезата, имунитета и онкогенезата (Bagri A et al., 2009). Невропилин-1 (NP-1) и неговият хомолог невропилин-2 (NP-2) са ко-рецептори, които потенцират отговорите спрямо няколко растежни фактора при физиологични и патологични състояния. Те се експресират от ендотелни клетки, епителни клетки, клетки на имунната система и често от злокачествени туморни клетки (Wild J et al., 2012; Jubb A et al., 2012).

Нирро-сигналният път е важен регулатор при физиологичната клетъчна пролиферация и при туморогенезата. При бозайници този път отрицателно регулира клетъчния растеж (Ehmer U et al., 2016). Компонентите му чрез каскада от последователни реакции довеждат до фосфорилирането на YAP и индуцират цитоплазмената му транслокация и последващото му разграждане. Под влияние на различни външи и вътрешни за клетката фактори YAP се транслокира в ядрото и задвижва процесите на клетъчна пролиферация. Повишена ядрена експресия се доказва при различни видове тумори и това корелира с напреднал туморен стадий, висока степен на диференциация и развитие на метастази (Kang W et al., 2011; Wang Y et al., 2010).

Ролята на NP-1 и YAP-1 при БКК все още не е напълно изяснена. Усилията на различните изследователи са насочени към изясняване значението им като фактори за прогресията на заболяването и като мишена за нови терапевтични стратегии. Липсата на еднопосочни заключения в достъпната литература, както и оскъдността на морфологични проучвания посветени на тези сравнително отскоро познати молекули, обуславят необходимостта от допълнителен анализ на експресията им при БКК.

II. Цел и задачи

2.1. Цел

Цел на настоящата работа е да се оцени ролята на определени клиничко-морфологични показатели и на експресията на YAP-1 и Neuropillin-1 при пациенти с БКК с оглед значението им като прогностични и предиктивни маркери.

2.2. Задачи:

Във връзка с тази цел бяха формулирани следните основни задачи:

1. Да се сравнят морфологични показатели (стадий, Fuhrman grade, туморна некроза, саркоматоидна компонента, ангажиране на бъбречна вена) при пациенти с БКК без и с метастази към момента на диагностицирането.
2. Да се изследва локализацията и интензивността на имунохистохимичната експресия на Neuropilin-1 в първичния тумор при БКК с метастази.
3. Да се изследва локализацията и интензивността на имунохистохимична експресия на YAP-1 в първичния тумор при БКК с метастази.
4. Да се анализират корелациите между имунохистохимичните нива на експресия на Neuropilin-1 и YAP-1 и клиничко-морфологичните показатели на пациенти с БКК с метастази.
5. Да се анализира ролята на YAP-1 и Neuropillin-1 като фактори с прогностична и предиктивна стойност.

III. Материали и методи на изследване

3.1. Материали, използвани в изследването

3.1.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

- „Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ – Медицински Университет – Варна
- Използвана е информация от електронна база данни „MultiLab“ на Университетска болница „Св.Марина“ – Варна

3.1.2. Пациентска популация

Обект на настоящото проучване са 148 пациента с БКК разпределени в две групи болни.

Първата група се състои от 98 пациенти (n=98) с диагноза бъбречно-клетъчен карцином за периода 2009 – 2017 г. При тези пациенти не са открити хистологично или чрез образни изследвания метастази (N0; M0). Изследвани са хистологични препарати от първичните тумори и са оценени следните хистологични показатели: хистологичен тип, степен на диференциация, инфилтрация в бъбречна вена, наличие на саркоматоидна компонента и наличие и площ на туморните некрози.

Втората група се състои от 50 пациенти (n=50) с диагноза карцином на бъбрека в метастатичен стадий (в лимфни възли и/или далечни органи) за период от 10 години (2005 г. - 2015 г.). Диагнозата и стадият на тумора са извършени на базата на хистологични и образни изследвания (компютърна томография и PET/CT). За тази група пациенти също са изследвани хистологичен тип, степен на диференциация, инфилтрация в бъбречна вена, наличие на саркоматоидна компонента и наличие и площ

на туморните некрози. По този показател е извършен сравнителен анализ между двете групи. В допълнение за тази група са изследвани нивата на имуно-хистохимична експресия на YAP-1 и Neuropillin-1. За част от пациентите последващото лечение е с химиотерапевтици (n=13), а друга част – с медикаменти от групата на тирозин-киназни инхибитори (n=32). Малка група не са провели системно лечение (n=5).

3.2. Методи на изследване

3.2.1. Хистологични изследвания

Инцизионна биопсия при радикална или парциална нефректомия за хистологичен анализ: средно по три блокчета са изследвани от всеки туморен резектат, включващи туморен паренхим, огнища с некрози и части от отграничаващата го съединително-тъканна капсула. Материалите са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин и след съответната обработка включени в парафин с точка на топене 52-54°C с цел изготвяне на парафинови блокчета. Срези с дебелина 5 µm са стандартно оцветени с хематоксилин-еозин за оценка на хистологичните промени в тумора.

Критерии за категоризиране на всеки показател:

- **Хистологичен тип на тумора.** Диагнозата е поставена чрез прилагане на класификацията на СЗО за туморите на бъбрека от 2016 година. Базирайки се на 8-мо издание на AJCC (2017) бяха определени T-, N -, M стадия. Наличието на метастази в лимфните възли беше установено чрез биопсично изследване, а наличието на далечни метастази (M) – при хистологично верифициране или чрез наличните образни изследвания на пациентите.
- **Степен на диференциация.** Определяне на степента на диференциацията на тумора е съгласно приетата четири степенна скала на Fuhrman, класифицираща вида и размера на туморните ядра. Определянето на ядрения грейд се осъществява в огнището с най-малигна характеристика при най-високо увеличение (400x).
- **Саркоматоидна компонента.** Саркоматоидната компонента беше оценено като фокуси с източено-клетъчна или рабдоидна компонента в тумора и беше оценена в две категории: налична и липсваща.
- **Ангажирането на бъбречната вена** от туморния процес беше оценено хистологично, също в две категории: налична и липсваща.
- **Площ на некрози.** Разпространението на некрози в туморната тъкан беше определено полуколичествено въз основа на четиристепенна скала:
 - липсващи зони на некроза;
 - огнищни некрози, обхващащи <10% от туморната тъкан в изследваните препарати;
 - умерено изразени некрози, обхващащи от 10% до 30% от туморната тъкан в изследваните препарати;
 - обширни зони с некроза, които обхващат \geq 30% от туморната тъкан в изследваните препарати.

3.2.2. Специфични методи на изследване

3.2.2.1. Имунохистохимични методи и използвани антитела. Използван бе индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024. Използвани са следните антитела, производство на ABCAM's RabMab technology.

- Anti-YAP1, кат. № ab114862, поликлонално заешко антитяло, в разреждане 1:400, като маркер за регулатор на транскрипция в каскадата на Hippo-сигнален път.

- Anti-Neuropilin1, кат. № ab81321, моноклонално заешко антитяло, в разреждане 1:200, като регулатор на VEGF-индуцираната ангиогенеза.
- За позитивни контроли е използвана тъкан от верифициран овариален карцином за Anti-YAP1 и тъкани от черен дроб за Anti-Neuropilin1.

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

3.2.2.2. Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимично изследване.

- Биопсичните материали (фиксираны в неутрален формалин и включени в парафинови блокчета) бяха нарязани на срези с дебелина 5µm и поставени върху силанизираны стъкла.
- Депарафинизацията се осъществи в низходяща редица от алкохоли, както следва: Ethanol 100% 3 мин., Ethanol 90% 3 мин., Ethanol 80% 3 мин., Ethanol 70% 3 мин., Xylo1 3 x 10 мин. След това срезите се измиха с течаща вода и се поставиха в дестилирана вода.
- Антигенно разкриване: разкриването на антигените се осъществи с предварително загрят до 65°C En Vision FLEX Target Retrieval Solution62 (работен разтвор) в PT Link контейнер, като срезите бяха инкубирани за 20 мин. при температура 97°C и рН=9. След охлаждане пробите бяха промити на стайна температура с измиващ буфер FLEX Wash Buffer (20x) за 1-5 минути

3.2.3. Методи на отчитане на имуно-експресията на *Neuropilin-1*

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

Имунохистохимичната експресия на *Neuropilin-1* бе оценена полуколичествено чрез използване на H-score (histo-score) върху тъканните проби. Първо, за всяка клетка в различни полета бе определена мембранната интензивност (0, 1+, 2+, или 3+). Процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет бе пресметнат, като накрая H-score бе изчислен посредством следната формула:

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

Крайният скор беше дихотомно разделен според медианата на пробите (всички случаи над медианата бяха отразявани като високи експресионни нива, а тези под медианата – като ниски експресионни нива).

3.2.4. Методи на отчитане на имуно-експресията на *YAP-1*

Интерпретацията е осъществена посредством полуколичествен метод според пропорцията и интензитета на ядрената кафява оцветка. Процентът на *YAP-1* позитивни клетки (P) бе оценен като 0 (по-малко от 10% позитивни клетки), 1 (10-49% позитивни клетки), 2 (50-74% позитивни клетки) или 3 (повече от 75% позитивни клетки). Интензивността (I) бе оценена по следния начин: 0 (безцветно), 1 (светложълто до кафяво), 2 (кафяво), 3 (тъмнокафяво). Получените резултати за процента оцветени клетки - P и интензивността на тяхното оцветяване - I бяха сумирани в общ скор. Общата сума на P и I бе оценена за всеки отделен случай и крайният скор на

биомаркерните нива беше дихотомно разделен според cut-off стойността на пробите. Случаи над cut-off стойността бяха определени като високи експресионни нива, а тези под cut-off стойността – като ниски експресионни нива.

3.2.5. Статистически методи

Статистическият анализ е осъществен чрез програмен продукт MS Excel 2016 и статистическа програма MedCalc Version 18.2.1 за Windows и включва следните методи:

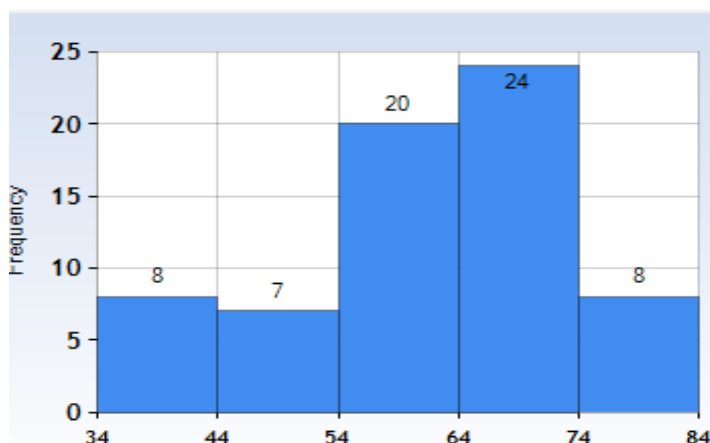
- Deskриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност, стандартно отклонение, минимална и максимална стойност.
- Корелационен анализ за оценка на зависимостта между изследваните показатели. При тестването на хипотезите за влиянието на даден фактор е използван екзактният тест на Фишер (Fisher's exact test) и χ^2 тест на Pearson.
- Анализ на преживяемостта – Kaplan-Meier test, Cox regression, за изследване на преживяемостта на пациентите с БКК според влиянието на ниската и високата експресия на антителата и изследваните клиничнопатологични характеристики
- Сравнителен анализ (оценка на хипотези) – t-test Student's за сравняване на количествени и качествени показатели и изследване на разликата между тях
- При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0.05$ при доверителен интервал 95%.
- Графичното и таблично изобразяване на статистическите данни е осъществено с помощта на Microsoft Office 2016.

4. Резултати

4.1. Основни клинично-морфологични характеристики на пациенти с БКК без метастази

4.1.1. Възраст на пациентите

В настоящото проучване ние изследвахме материали от 98 пациента, средната възраст на които е $60,53 \pm 11,21$ год., като най-младият пациент е на 34 години, а най-възрастният - на 80 години.

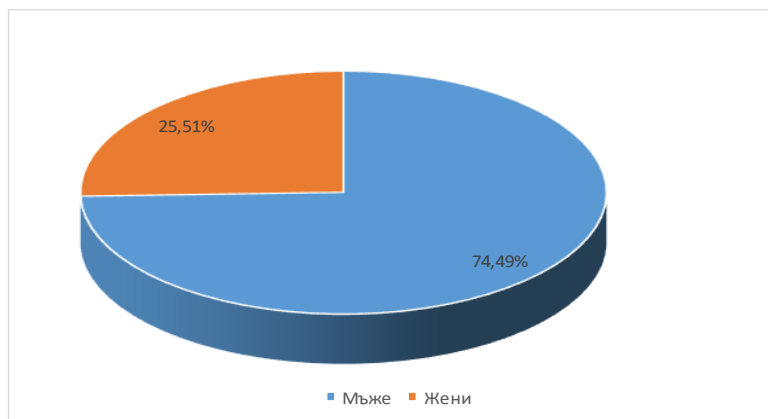


Фигура 1. Разпределение на пациентите във възрастови групи

Пациентите са разделени в пет възрастови интервални групи, като най-голям е процентът на групата 64-73 години (24.48%) и на групата 54-63 години (20,40%) (Фиг. 1).

4.1.2. Пол на пациентите

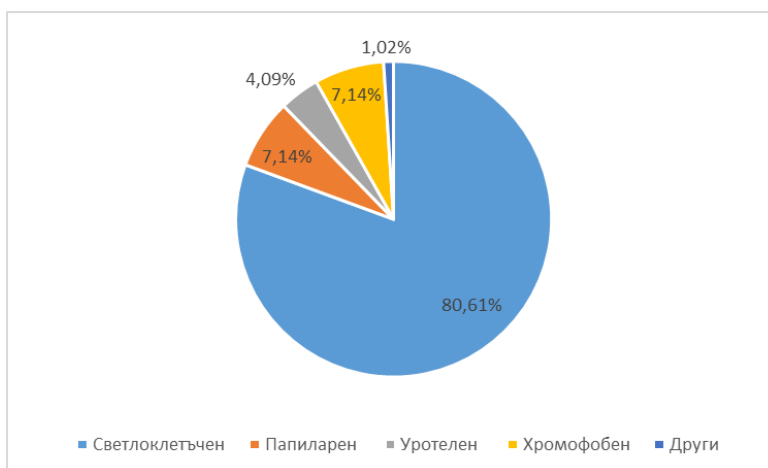
В изследваната група подчертано доминира мъжкият пол – 73 от случаите (74,49%), докато жените са почти три пъти по-малко на брой 25 (25,51%) (Фиг. 2).



Фигура 2. Разпределение на пациентите по пол

4.1.3. Разпределение според хистологичния тип

В най-голям процент от случаите с БКК се установява светлоклетъчният вариант 79 (80,61%), следван съответно от папиларен 7 (7,14%), хромофобен 7 (7,14%), уротелен 4 (4,09%) и други 1 (1,02%). (Фиг.3)

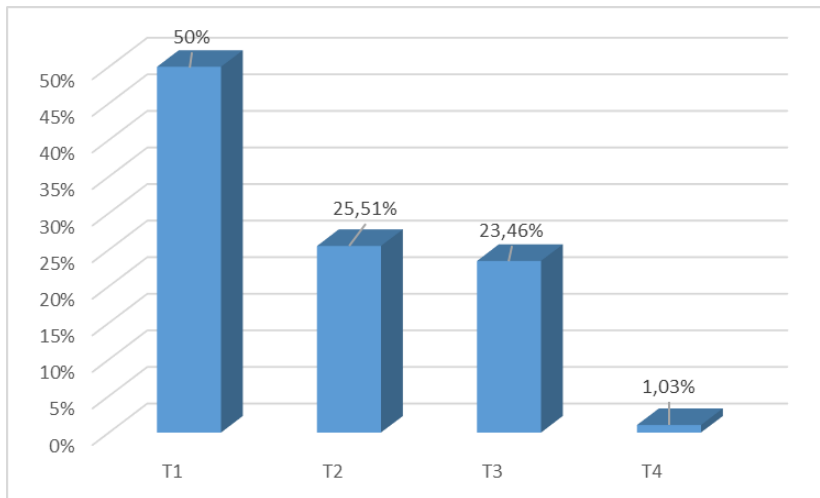


Фигура 3. Разпределение на пациентите според хистологичния тип на тумора

4.1.4. Големина на тумор – Т-стадий и степен на диференциация

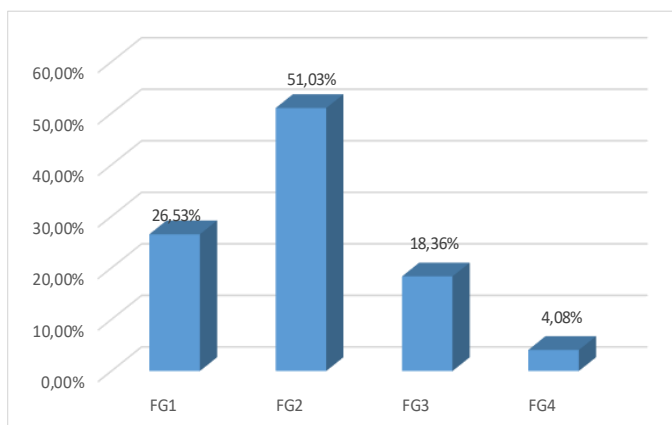
В зависимост от големината на тумора, респективно Т-стадия най-голяма група са пациентите с тумор класифициран като Т1 – 49 (50%), 25 (25,51%) са в групата

категоризирани като T2; приблизително толкова са и пациентите в стадий T3 - 23 (23,46%); най-малко са пациентите с T4 – 1 (1,03%) (Фиг. 4)



Фигура 4. Разпределение на случаите с БКК в зависимост от T-стадия

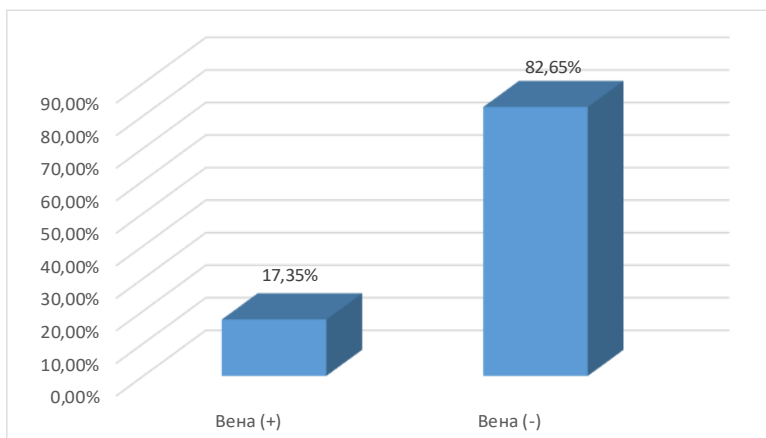
Според степента на диференциация на БКК, определена по скалата на Fuhrman, най-много от пациентите са оценени като FG2 – 51 (51,03%); пациентите с тумори, оценени като FG1 са 26 (26,53%), а тези оценени като FG3 – 18 (18,36%); с най-висок ядрен грейд FG4 са 3-ма (4,08%) от пациентите в изследваната група (Фиг.5).



Фигура 5. Разпределение на случаите с БКК в зависимост от Fuhrman grade

4.1.5. Ангажиране на бъбречна вена

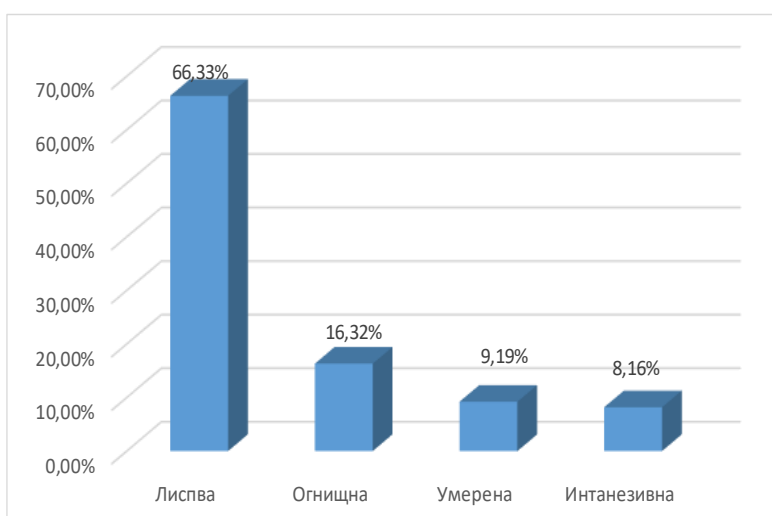
По показател ангажиране на бъбречната вена в доминиращата част - 82,65% (n=81) от пациентите такава не е доказана; при 17,35% (n=17) от тях е доказана хистологично инфилтрация от тумора в хилусните венозни съдове (Фиг. 6)



Фигура 6. Разпределение на случаите с БКК в зависимост от ангажиране на бъбречната вена от туморния процес

4.1.6. Туморна некроза и саркоматоидна компонента

При изследваните пациенти бяха отчетени наличието и интензивността на туморните некрози. В повече от половината от пациентите - 65 (66,33%) такива не се наблюдаваха, огнищни некрози се откриха при 16 (16,32%), умерено изразени – при 9 (9,19%), а интензивни – при 8 (8,16%) (Фиг. 7).



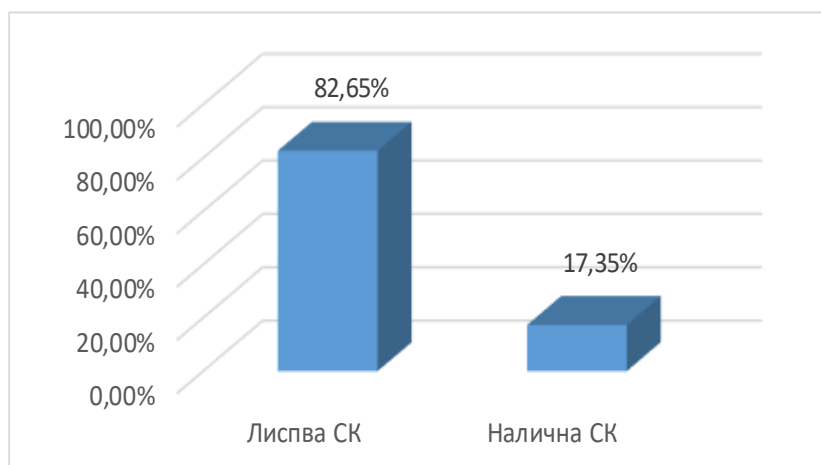
Фигура 7. Разпределение на случаите с БКК в зависимост от показател туморна некроза

При изследване връзката между наличие на некрози и останалите параметри, се установи статистически значима, права връзка между големината на тумора (Т-стадий) и оформянето на некрози ($p < 0,05$). Не се доказва статистически значима връзка между туморните некрози и степента на диференциация (FG), наличието на саркоматоидна компонента и ангажирането на бъбречната вена (Таблица 1).

Таблица 1. Корелация между морфологичните параметри на БКК и наличие на туморни некрози.

Показател		Туморни некрози		p
		Налични (n=33)	Липсващи (n=65)	
Големина на тумора (T-стадий)	T1	8	37	<i>p</i> <0,05
	T2	11	13	
	T3	14	14	
	T4	1	1	
Степен на диференциация (Fuhrman)	FG1	4	22	<i>p</i> >0,05
	FG2	19	32	
	FG3	8	10	
	FG4	2	1	
Саркоматоидна компонента (+)		8	9	<i>p</i> >0,05
	Саркоматоидна компонента (-)	25	56	
Ангажиране на вена (+)		4	13	<i>p</i> >0,05
	Ангажиране на вена (-)	29	52	

При изследваните пациенти бе отчетен показателят наличие/отсъствие на саркоматоидна компонента. При повече от пациентите - 81 от случаите (82,65%) такава не се наблюдава; едва при 17 от случаите (17,35%) се откриха морфологични данни за СК (Фиг. 8).

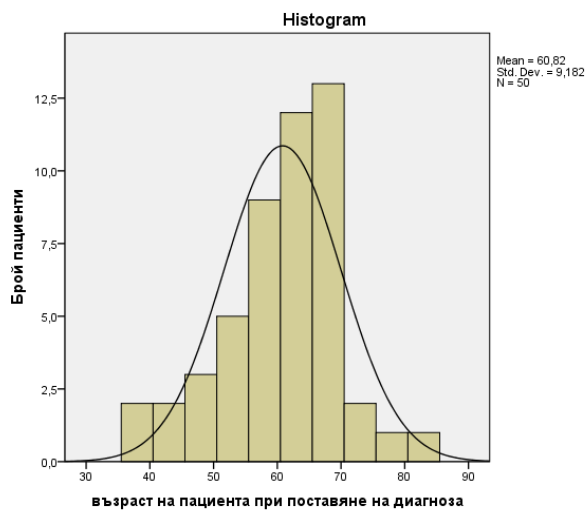


Фигура 8. Разпределение на случаите с БКК в зависимост от наличието на саркоматоидна компонента в тумора

4.2. Анализ на пациентите с метастатичен бъбречноклетъчен карцином

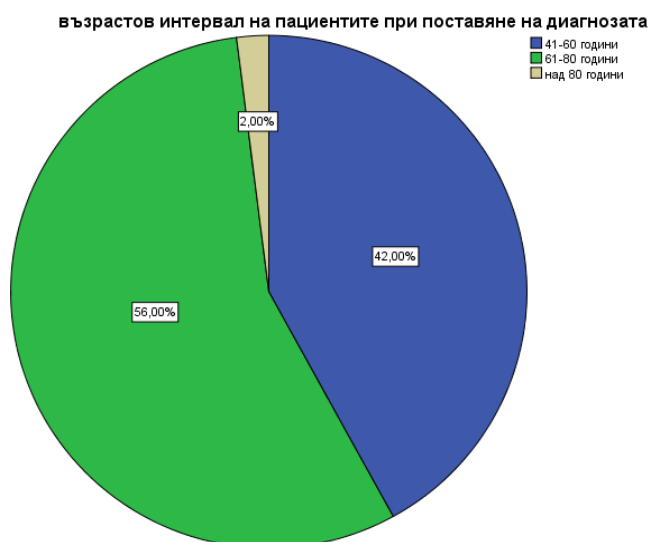
4.2.1. Основни клиничко-морфологични характеристики на пациентите с метастатичен бъбречноклетъчен карцином

Проучени са 50 пациента с диагноза метастатичен карцином на бъбрека, за период от 10 години (2005 г.- 2015 г.). Средната възраст на болните е $60,82 \pm 9,18$ г., минималната възраст е 38 г., максималната – 82 г. (Фиг.9).



Фигура 9. Честота на възрастовото разпределение на пациенти с мБКК.

Най-голям е броят на пациентите с мБКК във възрастовата група 61-80г. В този възрастов интервал са 56% от пациентите, а в интервала 41-60 г. попадат 42% от пациентите в изследваната група (Фиг. 10).



Фигура 10. Разпределение на пациентите с мБКК според възрастовия интервал при поставяне на диагнозата.

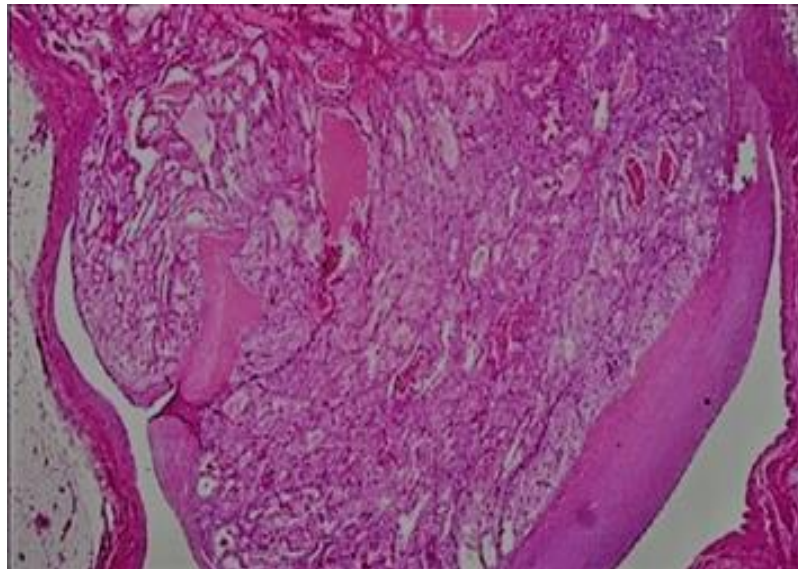
На таблица 2. са представени основните клиничко-мофологични характеристики на изследваните пациенти. Установява се, че мъжкият пол е значително по-засегнат – 36 пациенти (72%), докато жените са 2,5 пъти по-малко – 14 пациентки (28%).

В повечето от случаите с метастазирал БКК туморът в авансирал. В Т3 стадий са категоризирани 23 неоплазми (46% от случаите). БКК в Т1 стадий, Т2 стадий и Т4 стадий са установени съответно в 7 случая (14%), 16 случая (32%), 4 случая (8%). Редно е да се отбележи, че дори при тумори, класифицирани според големината си като Т1 са налични далечни метастази (при 2-ма от пациентите далечни множествени; при 4-ма – далечни единични; при 1 – метастази в лимфен възел.

В 22 от случаите на БКК (44%) не бяха открити метастази в регионалните лимфни възли. Честотата на туморите с N1 стадий е 42% (21 карцинома). В повечето от случаите липсват патоморфологични данни за статуса на лимфните възли и за органните метастази, но определянето на N-стадия и M- стадия е извършено на базата на образни изследвания.

Най-честото място, в което се откриват далечни метастази е белият дроб – в 29 (57,99%) от случаите, последвани от чернодробни, костни метастази и такива в ЦНС. Преобладават единичните метастазни огнища – 28 (56%), а тези с две или повече локализации са – 16 (32%).

По отношение показателят ангажиране на бъбречната вена от туморен процес такава хистологично е доказана при 38% от случаите с мБКК (n=19), а при 62% от случаите такава не се доказва (n=31) (Фиг. 11).



Фигура 11. Туморен ембол – гнезда от туморни клетки с белези за сБКК в лумена на вената. Оцв. с ХЕ. Увел. x50

Таблица 2. Клинико-морфологични показатели на пациентите с мБКК..

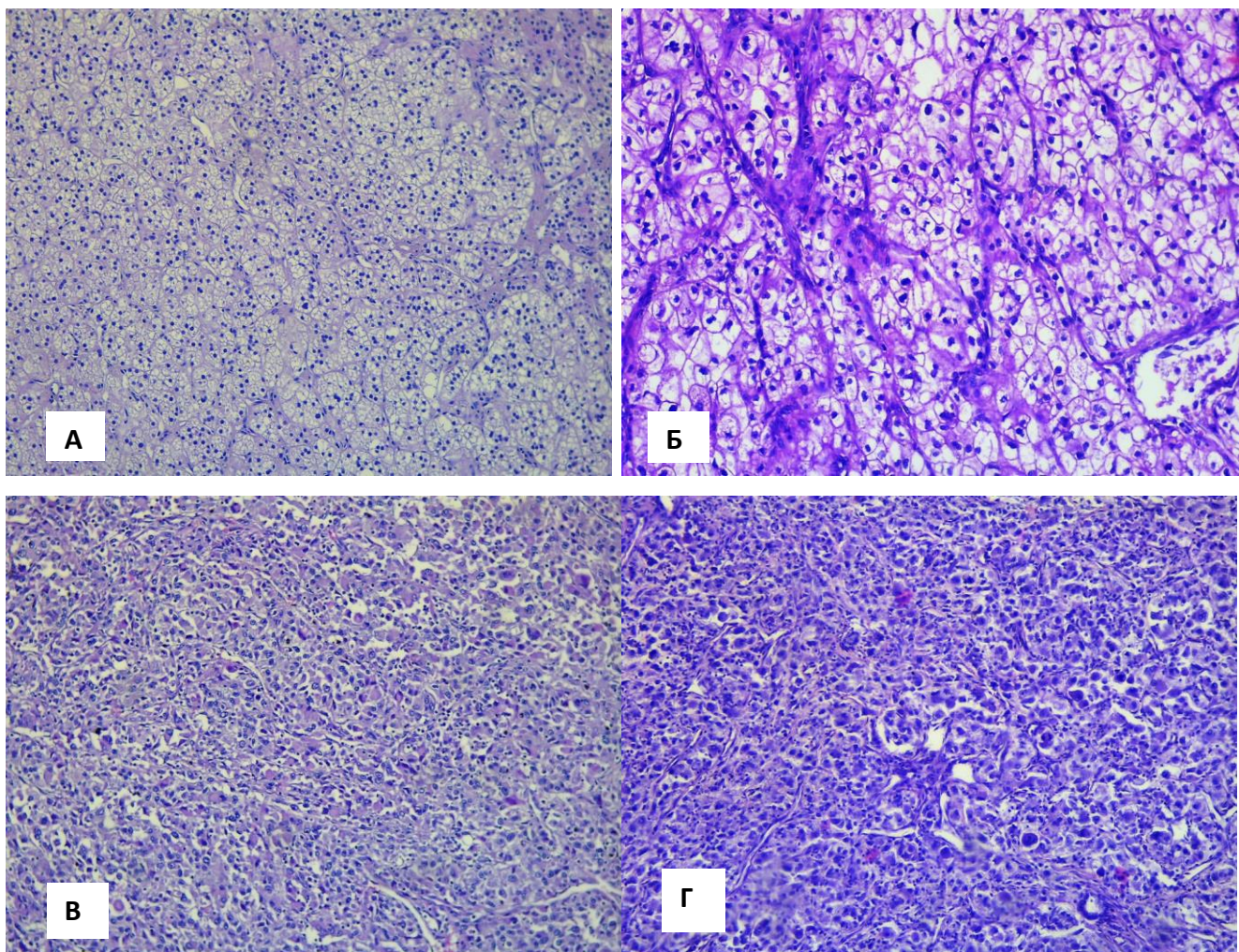
Показател		Брой пациенти	%
Пол	Мъже	36	72%
	Жени	14	28%
Ангажиране на бъбречна вена	Да	19	38%
	Не	31	62%
Хистологичен тип	Светлоклетъчен	40	80%
	Други(уротелен, папиларен, хромофобен)	10	20%
Т-стадий	T1	7	14%
	T2	16	32%
	T3	23	46%
	T4	4	8%
N-стадий	N0	22	44%
	N1	21	42%
	Nx - неизвестен	7	14%
M-стадий	<2	28	56§
	≥2	16	32%
	X	6	12%
Мозъчни метастази	да	6	12%
	не	-	-
Костни метастази	да	9	18%
	не	-	-
Белодробни метастази	да	29	57.99%
	не	-	-
Чернодробни метастази	да	10	20%
	не	-	-

При детайлното изследване на доминиращия хистологичен тип – светлоклетъчен БКК (табл. 3) се установи преобладаване на тумори с ядрен грейд по Fuhrman (FG) 2 и 3 - съответно 15 (37,5%) и 17 (42,5%) от случаите, докато високо диференцираните (FG1) и ниско диференцираните тумори (FG4) са съответно – 6 случая (15%) и 2 случая (5%) (Фиг.12).

Таблица 3. Клинико-морфологични показатели при сБКК.

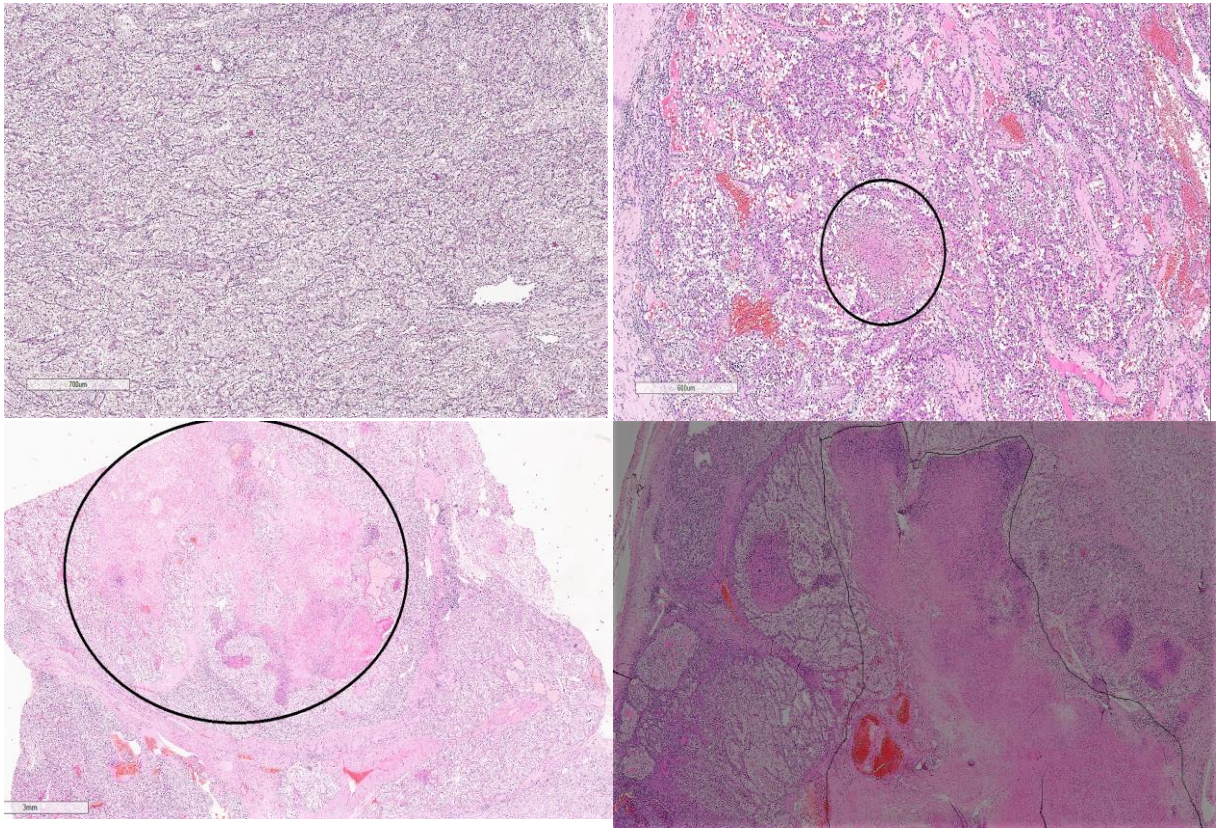
Показател		Брой пациенти	%
Fuhrman грейд	1	6	15%
	2	15	37,5%
	3	17	42,5%
	4	2	5%
Некрози	Без некрози	7	17,5%
	Огнищни	9	22,5%
	Умерени	4	10%
	Обширни	20	50%
Саркоматоидна компонента	Липсва	22	55%
	Присъства	18	45%

Некрози в туморната тъкан на сБКК се установиха в 33 от неоплазмите (82,5%), като преобладаваха случаите с интензивни некрози. Те бяха намерени в 20 случая (50% от неоплазмите). Огнищни некрози бяха наблюдавани в 9 случая (22,5%), умерени - в 4 (10%). Не се откриха некрози в 7 случая (17,5%) (Фиг. 13).

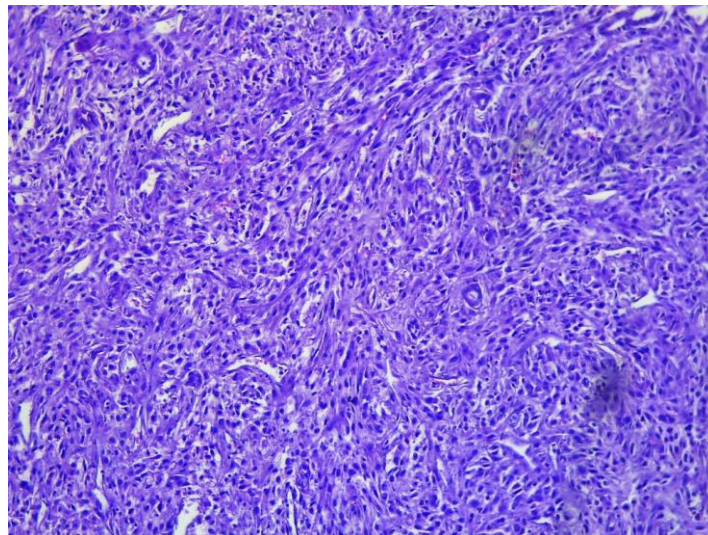


Фигура 12. Степени на диференциация на БКК по скалата на Fuhrman: А. FG1 – Малки, униформени ядра без нуклеоли. Б.FG2 - Леко неравномерни ядра, с нуклеоли, В.FG3 Изразена неравномерност на ядрата, диаметър 20 микрона Г.FG4 Плеоморфни, лобулирани клетки плюс белезите от степен 3. Оцв. с ХЕ. Увел. x100.

По отношение на наличието или отсъствието на саркоматоидна компонента при 22 от случаите (55%) такава компонента не беше открита, докато в 18 (45%) е представена (Фиг. 14).



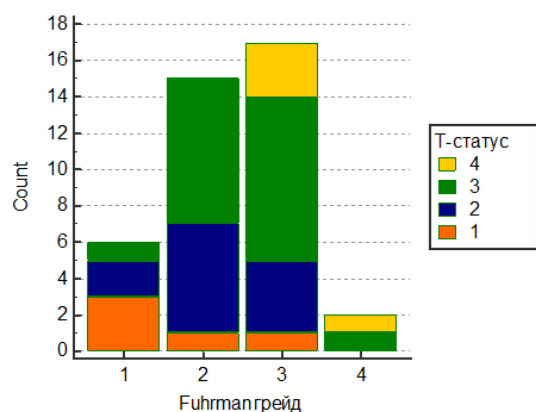
Фигура 13. Видове некрози в туморната тъкан при БКК според площта им. А. Липсват некрози; Б. Огницини некрози; В. Умерено изразени некрози; Г. Обширни некрози. Оцв. с ХЕ; Увел. X50.



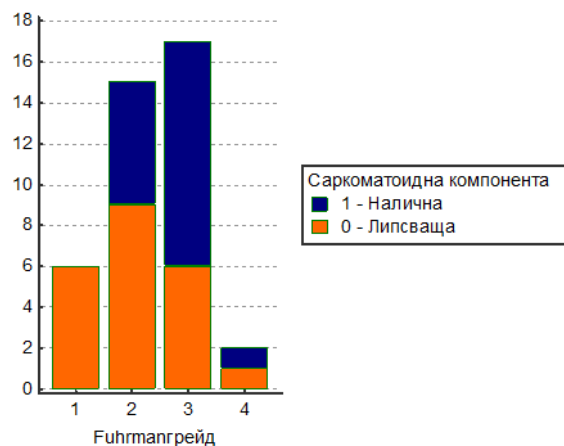
Фигура 14. Саркоматоидна компонента при светлоклетъчен вариант на БКК. Оцв. с ХЕ. Увел. x100.

4.2.2. Връзки между основните изследвани показатели при метастатичен БКК

Резултатите от кростабулационното съпоставяне на степента на ядрения грейд по Fuhrman и големината на тумора (T) и анализа χ^2 -тест потвърждават статистическата значима корелация между размера на тумора и висок ядрен грейд в туморната тъкан. Налице е права връзка, което показва, че по-големите по-размер тумори се асоциират с по-ниска диференциация ($p = 0,04$); (Фиг. 15).



Фигура 15. Връзка между степен на ядрения грейд и големината на тумора (T), ($p = 0,04$).

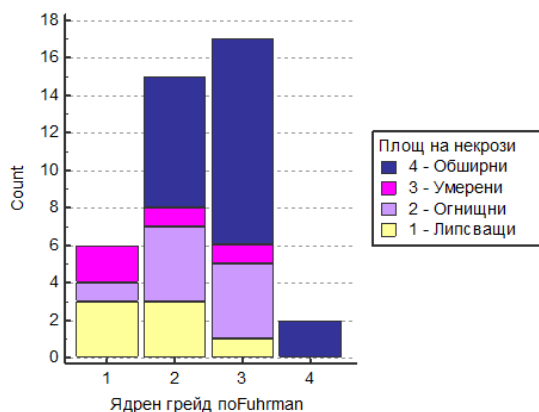


Фигура 16. Връзка между степен на ядрения грейд и наличието на саркоматоидна компонента ($p = 0,01$).

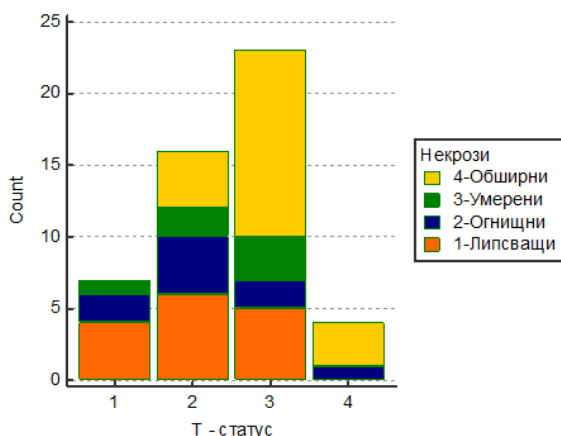
Ние установихме статистически значима, правопрпорционална положителна кростабулационна връзка между наличието на саркоматоидна компонента и степента на диференциация (FG) при тумори с метастази ($p = 0,01$) (Фиг. 16).

Коагулационната некроза в метастатичните сБКК е често срещана. Въпреки че корелационният анализ не показва статистически достоверна зависимост между наличието на некрози и степента на диференциране на тумора, все пак се наблюдава тенденция по-изразените по-плоч некрози да се наблюдават в по-ниско диференцирани тумори (Фиг.17).

При изследване на зависимостта между големината на тумора и наличието и изразеността на коагулационна туморна некроза не се установи статистически значима връзка ($p=0,1692$) (Фиг.18).



Фигура 17. Връзка между степен на ядрения грейд и наличието и площта на туморни некрози ($p > 0,05$).



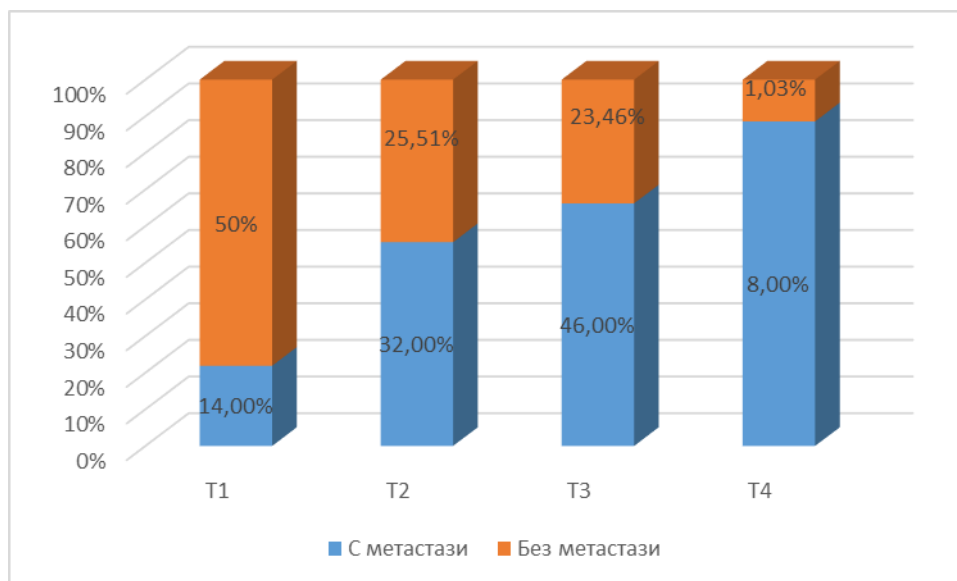
Фигура 18. Връзка между Т-стадий и наличието и площта на туморни некрози, ($p = 0,1692$)

4.2.3. Сравнителен анализ на основните морфологични показатели при метастатичен и неметастатичен БКК

С оглед установяване на значими връзки между основните клинично-морфологични показатели и наличието на метастази, както и извеждане на определен хистоморфологичен профил на рисковите пациенти чрез кростабулационно разпределение съпоставихме показателите при двете групи пациенти – с метастази и без метастази. При анализирането на големината на тумора (Т-стадий) бе установена значителна права връзка с наличието на метастази, т.е. при по-големи по размер тумори се установяват по-често метастази ($\chi^2 = 22.0247$; $p = 0.000047$) (Таблица 4. и Фиг. 19).

Таблица 4. Кростабулационна зависимост между големината на тумора (Т-стадий) и наличието на метастази.

	С метастази	Без метастази	Общо
T1	7 (14.00) [7.51]	49 (50.00) [3.83]	56
T2	16 (32.00) [0.33]	25 (25.51) [0.17]	41
T3	23 (23.46) [3.58]	23 (46.00) [1.83]	46
T4	4 (1.03) [3.16]	1 (8.00) [1.61]	5
Общо	50	98	148

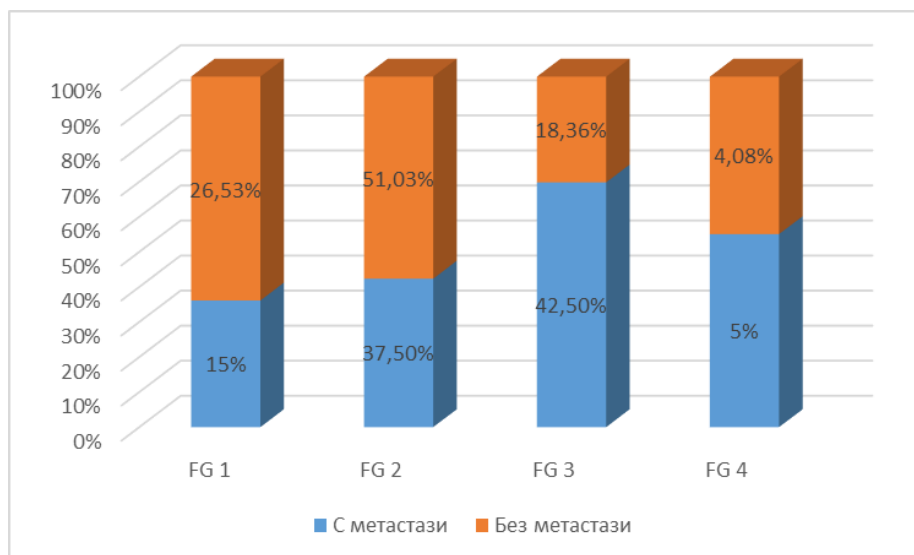


Фигура 19. Кростабулационна зависимост между T-стадия и наличие или отсъствие на метастази; ($p=0.000047$).

При кростабулационното сравняване на двете групи пациенти по отношение степента на диференциация се установи, че съществува статистически значима права връзка - в случаите с метастази доминират туморите с ниска степен на диференциация, респективно висок FG (Таблица 5. и Фиг. 20), докато при пациенти без метастази туморите са с предимно нисък FG ($\chi^2=9.7019$; $p=0.023331$).

Таблица 5. Кростабулационна зависимост между степен на диференциация (FG) на тумора и наличието на метастази.

	С метастази	Без метастази	Общо
FG1	6 (15.00) [1.16]	26 (26.53) [0.47]	32
FG2	15 (37.50) [0.89]	51 (51.03) [0.36]	66
FG3	17 (42.50) [4.63]	18 (18.36) [1.89]	35
FG4	2 (5.00) [0.21]	4 (4.08) [0.09]	6
Общо	40	98	138

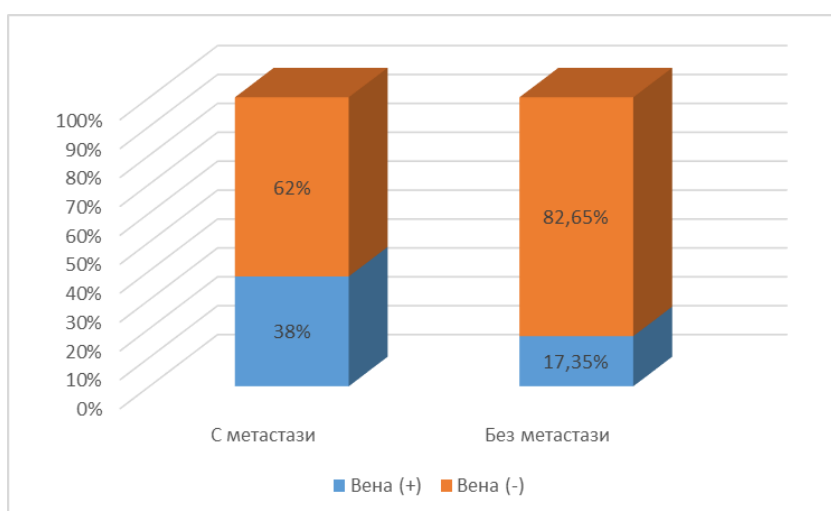


Фигура 20. Кростабулационна зависимост между Fuhrman grade и наличие или отсъствие на метастази; ($p=0.023331$).

Хистологичното доказване на ангажирането на бъбречната вена също показва различие при пациентите в двете групи. При използването на χ^2 -тест се установява обективно съществуваща права връзка между наличието на венозно ангажиране от тумора и наличие на метастази ($\chi^2=7.672$; $p=0.0082$) (Таблица 6. и Фиг. 21)

Таблица 6. Кростабулационна зависимост между наличието на туморни емболи в бъбречната вена и наличие или отсъствие на метастази

	С метастази	Без метастази	Общо
Наличие на туморни емболи	19 (12.16) [3.84]	17 (23.84) [1.96]	36
Без туморни емболи	31 (37.84) [1.24]	81 (74.16) [0.63]	112
Общо	50	98	148

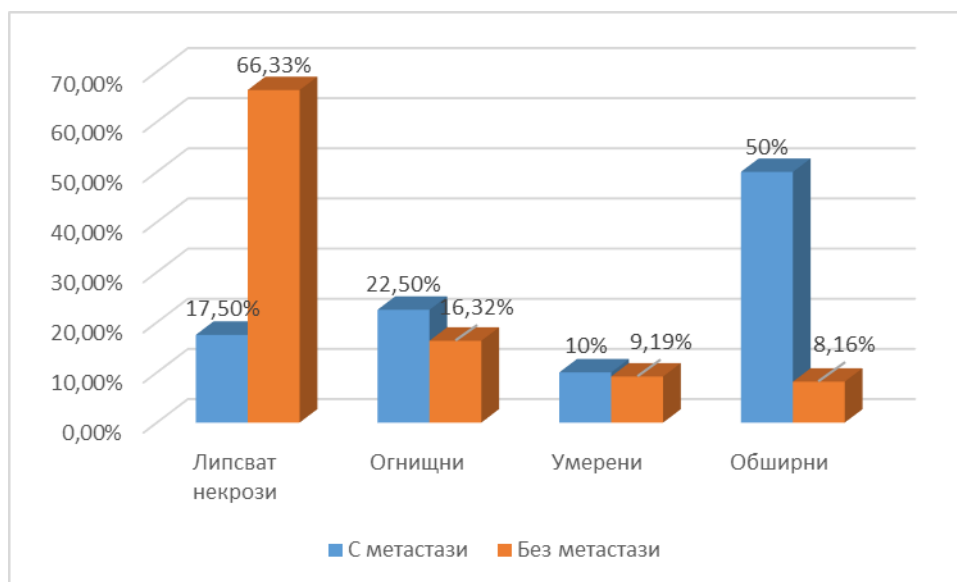


Фигура 21. Кростабулационна зависимост между наличието на туморни емболи в бъбречната вена и наличие или отсъствие на метастази ($p=0.0082$).

При изследване на връзката между площта на туморните некрози и липсата или наличието на метастази се установи също статистически достоверна права връзка ($\chi^2=38.1018; p<0.00001$). При туморите с метастази доминират случаите с некрози, като по-голямата част от тях те са обширни по площ. При случаите без метастази по-голям е броят на тумори, в които не се откриват огнища на коагулационна некроза (Таблица 7 и Фиг. 22).

Таблица 7. Кростабулационна зависимост между степен на изразеност на туморните некрози и наличието на метастази.

	С метастази	Без метастази	Общо
Без некрози	7 (20.87) [9.22]	65 (51.13) [3.76]	72
Огнищни некрози (<10% от туморната тъкан)	9 (7.25) [0.42]	16 (17.75) [0.17]	25
Умерено изразени некрози (10-30% от туморната тъкан)	4 (3.77) [0.01]	9 (9.23) [0.01]	13
Обширни некрози ($\geq 30\%$ от туморната тъкан)	20 (8.12) [17.40]	8 (19.88) [7.10]	28
Общо	40	98	138

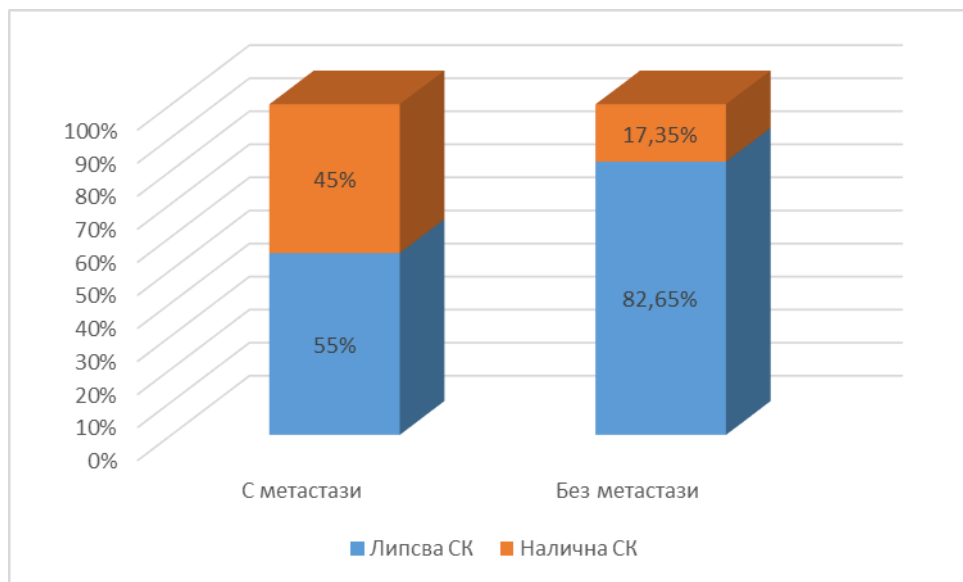


Фигура 22. Кростабулационна зависимост между наличието на туморни некрози и наличие или отсъствие на метастази

Аналогична зависимост и права връзка установихме при кростабулационното разпределение на пациентите с метастази и без метастази в зависимост от наличие и отсъствие на саркоматоидна компонента в туморния паренхим ($\chi^2=14.2547$; $p=0.00016$) (Таблица 8 и Фиг. 23)

Таблица 8. Кростабулационна зависимост между наличието на саркоматоидна компонента (СК) и наличие или отсъствие на метастази

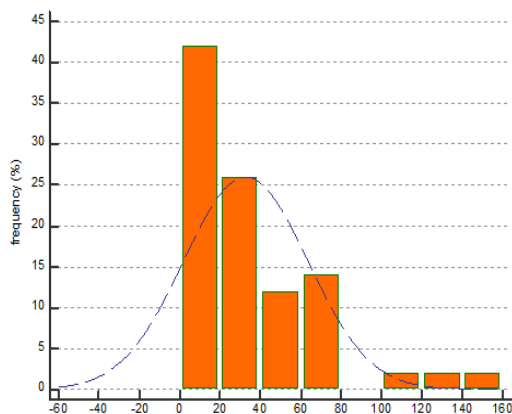
	С метастази	Без метастази	Общо
Липсва саркоматоидна компонента	22 (29.86) [2.07]	81 (73.14) [0.84]	103
Налична саркоматоидна компонента	18 (10.14) [6.08]	17 (24.86) [2.48]	35
Общо	40	98	138



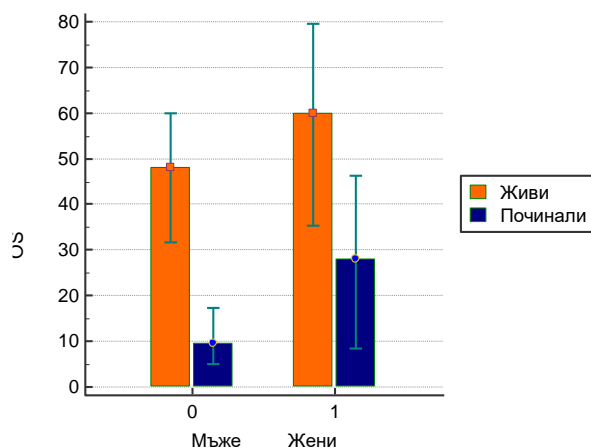
Фигура 23. Кростабулационна зависимост между наличието на саркоматоидна компонента (СК) и наличие или отсъствие на метастази ($p=0.00016$)

4.2.4. Сравнителен анализ на клинично-морфологичните показатели и общата преживяемост при пациенти с метастатичен бъбречноклетъчен карцином

Тридесет от пациентите (60%) с мБКК към датата на проведеното проучване са починали. При тях средната обща преживяемост е $15,76 \pm 13,53$ месеца, като минималната е 1 мес., а максималната преживяемост е 49 месеца (Фиг. 24).



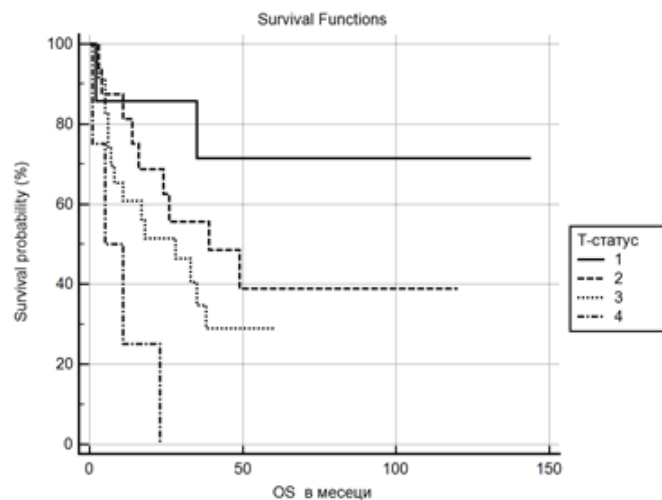
Фигура 24. Честота на преживяемостта на пациентите с мБКК в месеци



Фигура 25. Сравняване на общата преживяемост на пациентите по пол ($p > 0,05$).

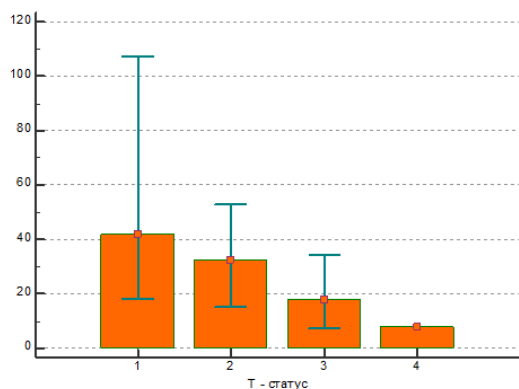
Средната обща преживяемост при жените с мБКК е $26,83 \pm 15,28$ месеца, докато при мъжете е $13,00 \pm 11,83$ месеца. Не беше установена статистически значима зависимост между пола на пациентите и месеците на преживяемост (Фиг.25).

При използване на статистически анализ за преживяемост с оглед преценяване прогностичното значение на големината на тумора (Т-стадий) се доказва, че размерите на лезиите имат категорично прогностично значение по отношение на общата преживяемост. Налице е достоверна разлика в общата преживяемост при различните размери ($95\%CI$; *Logrank test* $p=0,01$) (Фиг.26).

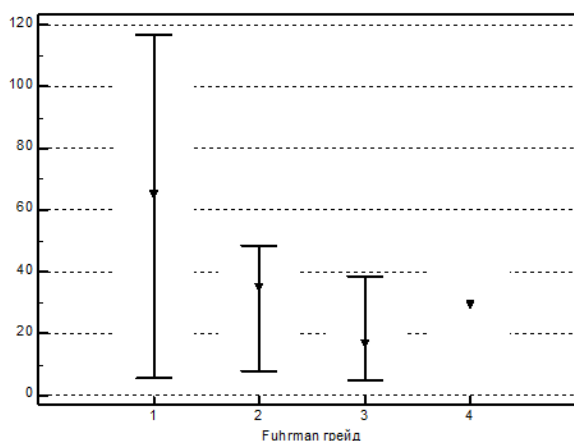


Фигура 26. Kaplan-Meier криви на OS според големината на тумора (Т-стадий), ($p=0,01$)

Средната обща преживяемост зависи от размера на тумора (Фиг. 27). Най-много са починалите пациенти с мБКК, които по време на поставяне на диагнозата са били в стадий Т3 – 15 случая (50%). Най-висока обща преживяемост – $20,66 \pm 15,52$ месеца се наблюдава при пациенти в стадий Т2, като изненадващо тя е по-голяма от пациентите със стадий Т1 ($18,50 \pm 12,46$). Най-ниска е общата преживяемост при пациентите в стадий Т4 – $10,00 \pm 9,59$ месеца, докато при стадий Т3 е $14,80 \pm 12,64$ месеца.



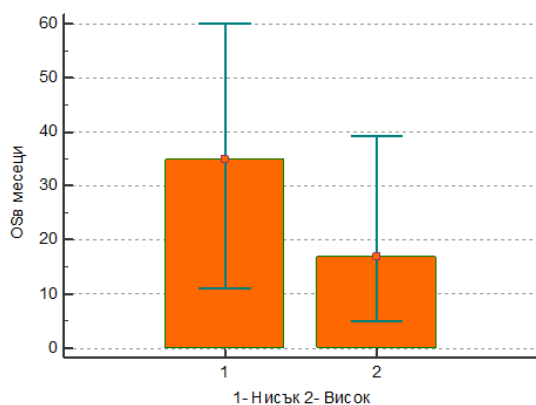
Фигура 27. Сравнителен анализ на преживяемостта на пациентите с мБКК в зависимост от големината на тумора (T).



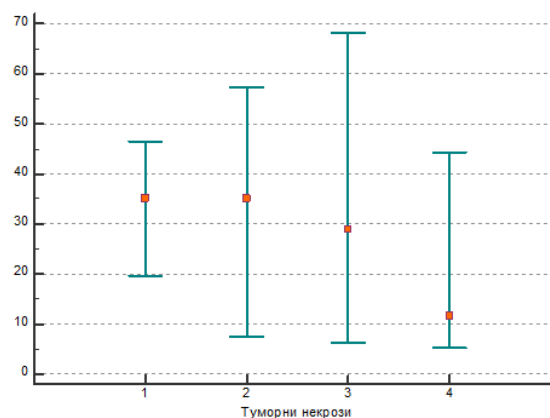
Фигура 28. Средна обща преживяемост (в месеци) на пациентите с мБКК в зависимост от ядрения грейд

В зависимост от степента на диференциация най-много са починалите пациенти от мБКК с ядрен грейд 3 по Fuhrman – 12 (79,10%) от случаите. Те имат най-ниска преживяемост – $13,10 \pm 12,73$ месеца. Средната обща преживяемост при всички пациенти е най-висока при FG 1 – 62,66 мес., при FG-2 – 30,46 мес., при FG3 – 22,05 мес., а при FG4 – 29,50. По-високата преживяемост при FG4 вероятно се дължи на малкото на брой пациенти в тази група (Фиг.28).

Анализирайки преживяемостта на пациентите с мБКК чрез обединяване на степените на ядрения грейд до дихотомна скала (1-нисък и 2-висок), се установи, че има статистически значима сигнификантност между FG и общата преживяемост ($p=0,04$) (Фиг. 29). Средната продължителност при нисък грейд е $39,66 \pm 33,15$ месеца, докато при висок е $22,84 \pm 19,94$ месеца.



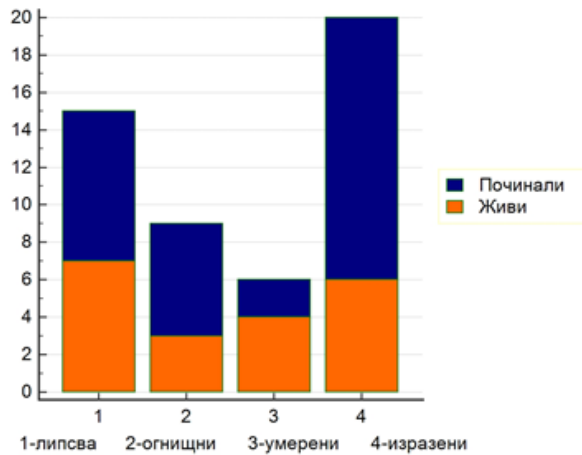
Фигура 29. Сравнителен анализ на преживяемостта на пациентите с мБКК в зависимост от ядрения грейд в двустепенна скала ($p=0,04$)



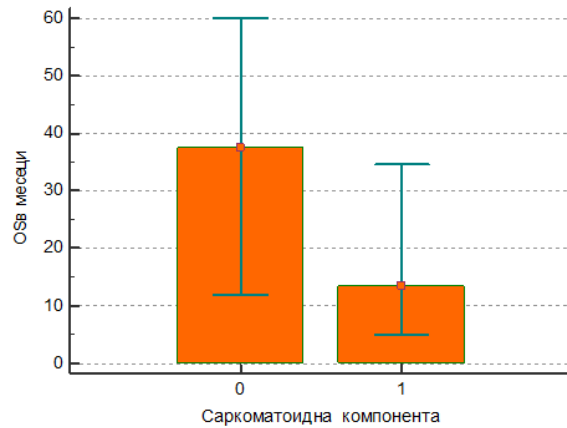
Фигура 30. Средна обща преживяемост (в месеци) на пациентите с мБКК в зависимост от площта на туморните некрози.

По отношение на наличието и степента на изразеност на некрози в тумора, се установява, че с най-висока средна обща преживяемост са пациентите, при които липсва туморна некроза (46,06 мес.), като тези средни стойности респективно намаляват с наличието и увеличаването на площта им (Фиг.30).

Въпреки тази тенденция, не се установява статистически значима връзка между туморните некрози и смъртността на пациентите (Фиг. 31).



Фигура 31. Честотно разпределение на туморни некрози при починали и живи пациенти ($p = 0,3831$).



Фигура 32. Сравнителен анализ на преживяемостта на пациентите с мБКК карцином в зависимост от наличието на саркоматоидна компонента.

По отношение на представянето на саркоматоидна компонента се установи, че когато е представена в туморната тъкан общата преживяемост е значително по-ниска $21,66 \pm 20,59$ месеца, в сравнение с тумори, в които не се наблюдава – $39,86 \pm 31,97$ месеца ($p = 0,04$) (Фиг. 32).

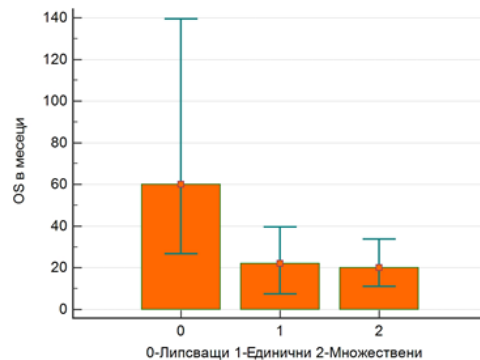
На таблица 9 е представена оценката на риска в зависимост от клинично-патологични показатели за преживяемостта на пациентите с мБКК, получена посредством мултивариативен Соx-пропорционален регресионен анализ.

Таблица 9. Оценка на риска в зависимост от клинично-патологичните показатели за преживяемостта на пациентите с мБКК

Показател	Обща преживяемост (Мултивариантен анализ)		
	HR	95 % CI	p
Възраст (≥ 65 г)	0.994	0.964–1.024	$p > 0,05$
Пол (мъж)	1.068	0.480–2.376	$p > 0,05$
Ядрен грейд (FG3-FG4)	0,8354	0,2660 to 2,6242	$p > 0,05$
Саркоматоидна компонента	2,6305	1,0270 to 6,7372	$p < 0,05$
Туморни некрози	0,9728	0,6296 to 1,5030	$p > 0,05$
T-стадий (T3-T4)	2,2923	1,0484 to 5,0120	$p < 0,05$

От представените данни става ясно, че най-висок риск за смъртност има при пациенти с по-голям размер на тумора – T-стадия и с наличието на саркоматоидни изменения в туморния строеж.

Анализът на пациентите с мБКК показва, че общата преживяемост на пациентите зависи от наличието и броя на далечните метастази. Средната обща преживяемост при пациенти без далечни метастази е $74,33 \pm 47,33$ месеца, при пациенти с метастази в един орган - $24,03 \pm 20,59$ месеца, а при пациенти с метастази в повече от един орган $22,31 \pm 21,32$ месеца. Установи се значима статистическа връзка между преживяемостта и наличието и броя на далечни метастази ($p=0,02$) (Фиг.38).



Фигура 38. Сравнителен анализ на преживяемостта на пациентите с БКК карцином в зависимост от наличието на метастази в отдалечени органи.

По отношение специфичната локализация на метастазите се установи, че белодробната локализация се асоциира с най-лоша прогноза по отношение на бъдещата преживяемост. За останалите локализации такава статистически достоверна връзка не се установи (Таблица 13).

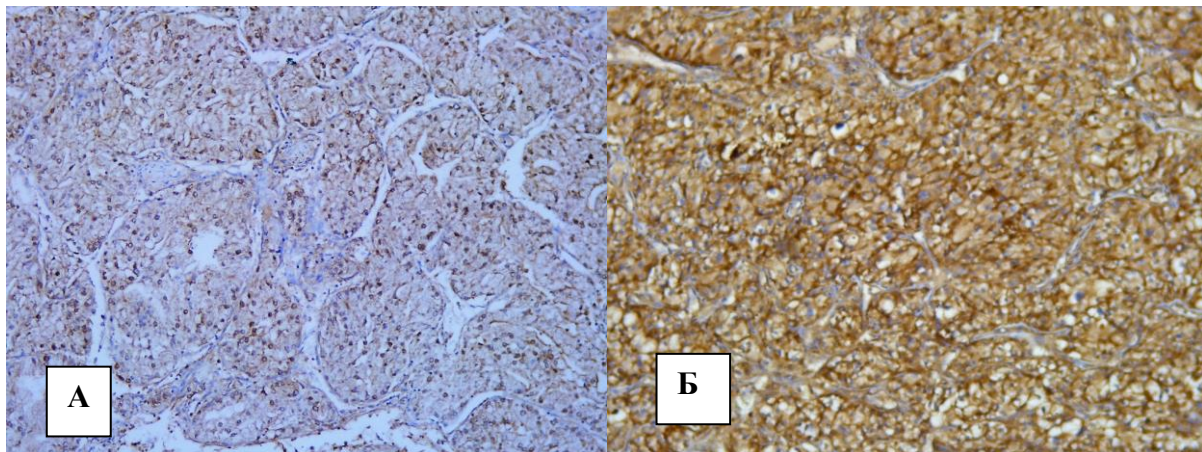
Таблица 13. Преживяемост на пациентите с БКК в зависимост от локализацията на далечни органни метастази.

Далечни метастази				
Орган		Брой	Средна обща преживяемост (мес.)	p
Бял дроб	Да	29	$24 \pm 23,92$	$p = 0,03$
	Не	21	$40,19 \pm 36,07$	
Мозък	Да	6	$26,33 \pm 24,72$	$p = 0,64$
	Не	44	$31,40 \pm 31,27$	
Кости	Да	9	$35,22 \pm 29,19$	$p = 0,55$
	Не	41	$39,82 \pm 18,90$	
Черен дроб	Да	10	$27,6 \pm 22,16$	$p = 0,11$
	Не	40	$34,1 \pm 32,71$	

4.2.5. Оценка на тъканната експресия на *Neuropilin-1* при метастатичен бъбречноклетъчен карцином

4.2.5.1. Корелация на имунохистохимичната експресия на *NP-1* с клинично-морфологичните показатели

В настоящето изследване се установи, че експресията на *NP-1* е предимно в клетъчната мембрана на туморните клетки при БКК. Ниска експресия се наблюдава при 29 от пациентите (57,99%), а при останалите се наблюдава висока експресия (42,11%, n=21) (Фиг. 39). На таблица 14 са представени нивата на експресия на *Neuropilin-1* в туморната тъкан и съпоставянето ѝ с клинично-морфологичните показатели на БКК.



Фигура 39. Експресия на *Neuropilin-1*; А – ниска експресия; Б – висока експресия. Имунохистохимично изследване с анти *Neuropilin-1*. Увеличение $\times 100$

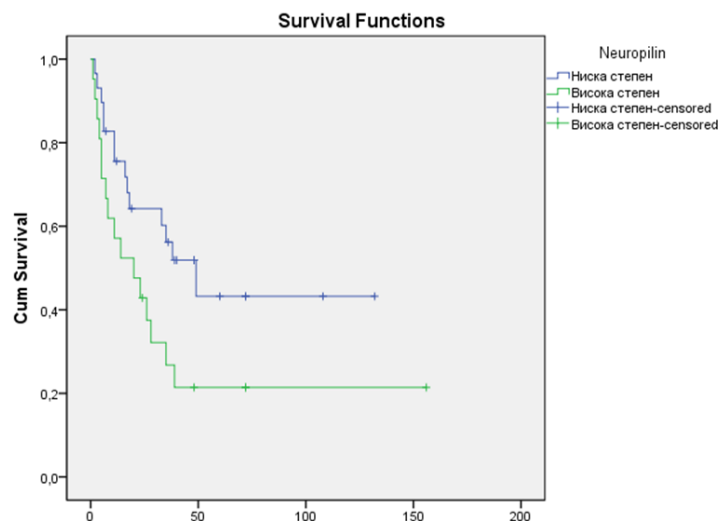
Получените резултати показват, че няма статистически значима корелация между нивата на експресия и пола на пациентите, TNM–стадия, туморните некрози, ядрения грейд и саркоматоидната компонента. При направената проверка на хипотезата, че интензивността на експресията може да повлияе преживяемостта се установи статистически значима връзка между експресията и това дали пациентите са починали или не.

Таблица 14. Нива на експресията на *Neuropilin-1* в туморната тъкан при изследваните клинично-патологични параметри при БКК.

Показател		Експресия на NP-1		p
		Висока	Ниска	
Пол	Мъже	16	20	>0,05
	Жени	5	9	
Хистологичен тип	Светлоклетъчен	17	23	>0,05
	Други (уротелен, папиларен, хромофобен)	4	6	
T стадий	T1	4	3	>0,05
	T2	7	9	
	T3	7	16	
	T4	3	1	
N стадий	N0	8	14	>0,05
	N1	6	8	
	N2	2	5	
	Nx - неизвестен	5	2	
M стадий	<2	13	15	>0,05
	≥2	6	10	
	x	2	4	
Статус на пациента	Починали	16	14	<0,05
	Живи	5	15	
Светлоклетъчен хистологичен тип n=40 (80%)				
Fuhrman грейд	1	2	4	>0,05
	2	4	11	
	3	11	6	
	4	0	2	
Некрози	Без некрози	7	8	>0,05
	Огнищни	5	4	
	Умерени	2	4	
	Обширни	7	13	
Саркоматоидна компонента	Липсва	7	15	>0,05
	Присъства	10	8	

4.2.5.2. Оценка на влиянието на експресията на *Neuropilin-1* в туморна тъкан върху общата преживяемост на пациентите с мБКК

След получения резултат от непараметричния анализ, че между преживяемостта на пациентите и експресията на NP-1 има статистически достоверна връзка данните за общата преживяемост бяха сравнени при двете групи пациенти – такива с висока и такива с ниска експресия. Пациентите с високи нива на експресия на NP-1 в туморните клетки имат по-кратка обща преживяемост - $42,81 \pm 12,11$ месеца, в сравнение с пациенти с ниска експресия в тумора - $66,37 \pm 10,17$ месеца (95% CI, Logrank test $p=0,03$) (Фиг. 40).

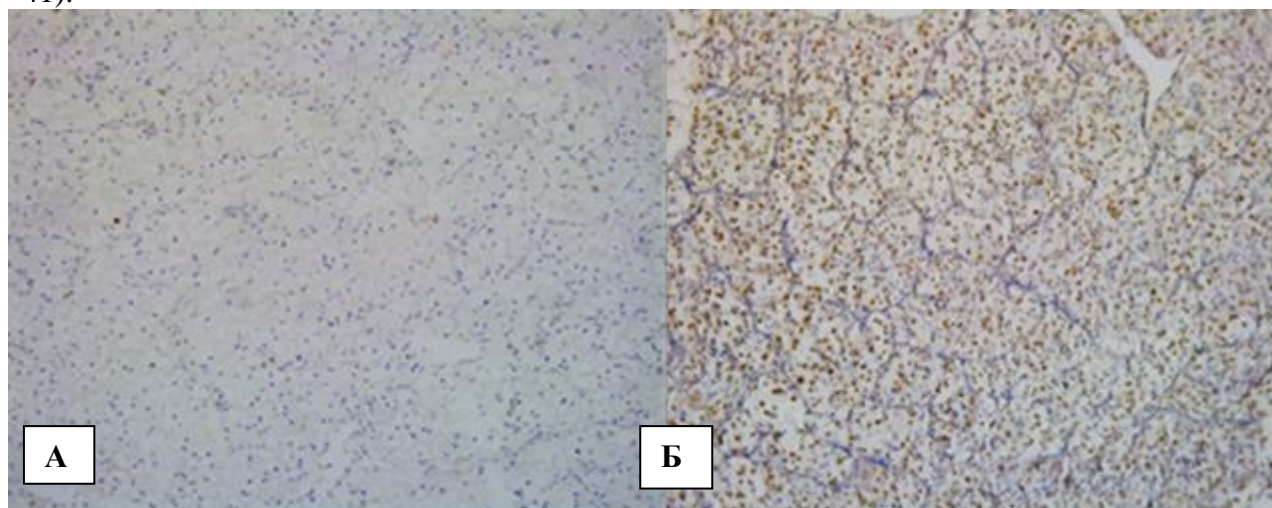


Фигура 40. Kaplan-Meier криви на OS спрямо тъканните нива на експресия на NP-1 в първичния тумор (дихотомно разпределени по медиана на ниски и високи нива на експресия).

4.2.6. Оценка на тъканната експресия на YAP-1 при метастатичен бъбречноклетъчен карцином

4.2.6.1. Корелация на имунохистохимичната експресия на YAP-1 с клиничко-морфологичните показатели

Експресията на маркер YAP-1 беше изследвана в туморната тъкан на пациентите с метастатичен БКК. Маркерът се позитивира в ядрата на туморните клетки и експресията беше отчетена като ниска и висока. Ниска ядрена експресия се наблюдава в 26 от пациентите (52%, n=26), висока експресия - в останалите 24 (48%, n=24) (Фиг. 41).



Фигура 41. Експресия на YAP-1 в бъбречно-клетъчен карцином; А – ниска експресия; Б – висока експресия. Имунохистохимично изследване с анти YAP-1. Увеличение x 100

На таблица 15 са представени нивата на експресия на YAP-1 в туморната тъкан и съпоставянето ѝ с клиничко-морфологичните показатели на БКК. Получените резултати показват, че има статистически значима корелация между нивата на ядрена експресия

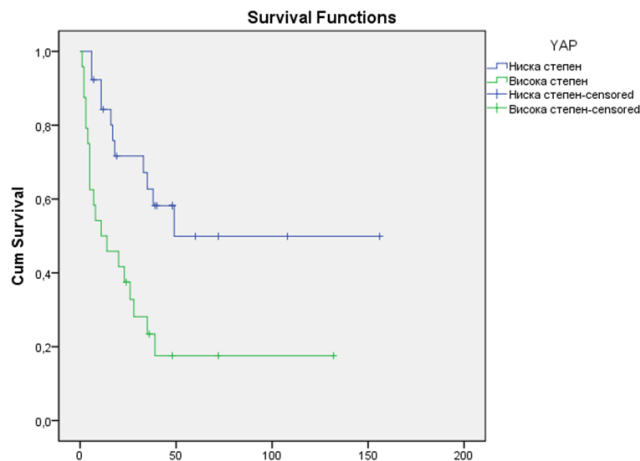
на YAP-1 и наличието на саркоматоидна компонента в туморната тъкан ($p < 0,05$). Както и при Neugorlin-1, при направената проверка на хипотезата, че интензивността на експресията може да повлияе преживяемостта се установи статистически значима връзка между експресията и това дали пациентите са починали или не.

Таблица 15. Нива на експресията на YAP-1 в туморната тъкан при изследваните клиничко-морфологични показатели при БКК.

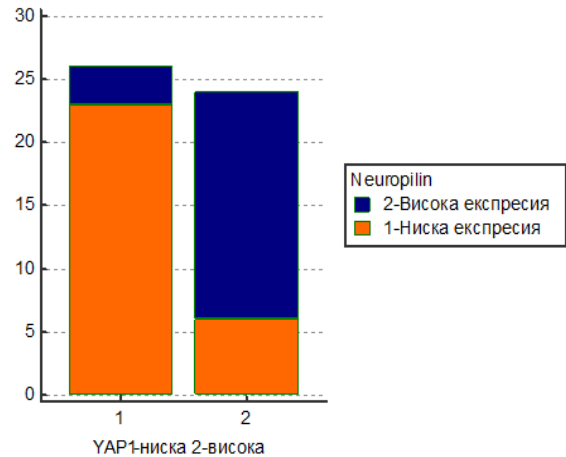
Показател		Експресия на YAP-1		p
		Висока	Ниска	
Пол	Мъже	19	17	>0,05
	Жени	5	9	
Хистологичен тип	Светлоклетъчен	19	21	.
	Други (уротелен, папиларен, хромофобен)	5	5	
Т стадий	T1	2	5	.
	T2	9	7	
	T3	10	13	
	T4	3	4	
N стадий	N0	9	13	>0,05
	N1	7	7	
	N2	3	4	
	Nx - неизвестен	5	2	
M стадий	<2	15	13	>0,05
	≥2	6	10	
	x	3	3	
Статус на пациента	Починали	16	14	<0,05
	Живи	5	15	
Светлоклетъчен хистологичен тип n=40 (80%)				
Fuhrman грейд	1	2	4	>0,05
	2	5	10	
	3	12	5	
	4	0	2	
Некрози	Без некрози	7	8	>0,05
	Огнищни	4	5	
	Умерени	3	3	
	Обширни	10	10	
Саркоматоидна компонента	Липсва	7	15	<0,05
	Присъства	12	6	

4.1.1.1. *Оценка на влиянието на експресията на YAP-1 в туморна тъкан върху общата преживяемост на пациентите с метастатичен бъбречноклетъчен карцином*

На двете групи пациенти – тези с ниска и тези с висока степен на ядрена експресия на YAP-1 беше извършен анализ на преживяемостта по метода на Kaplan-Meier. Пациентите с високи нива на туморна експресия на YAP-1 имат по-кратка обща преживяемост (31,81±8,90 мес.) в сравнение с пациенти с ниска ядрена експресия на YAP-1 в туморната тъкан (87,58±12,78 мес.) (95% CI; Logrank test p=0,001) (Фиг. 42).



Фигура 42. *Kaplan-Meier криви на OS спрямо тъканните нива на експресия на YAP-1 в първичния тумор (дихотомно разпределени по медиана на ниски и високи нива на ядрена експресия).*



Фигура 43. *Корелация между нивата на експресия на NP-1 и YAP-1 (p < 0,0001)*

Резултатите от кростабулационното съпоставяне на имунохистохимичната експресия на NP-1 с нивата на експресия на YAP-1 в туморните клетки показаха, че при 46% от пациентите (n=23) се наблюдава ниска експресия едновременно и на двете антитела, докато при 36% (n=18) – се наблюдава висока експресия на двете антитела. Стойностите при анализа χ^2 -тест потвърждават статистическата значимост между нивата на експресия на двете антитела ($\chi^2=20.63$; $p=0.000006$), а резултатите от корелационния анализ показват силна взаимовръзка между експресията на NP-1 антитяло и YAP-1 ($r=0.6424$; $p=0,00001$) (Фиг. 43).

Посредством унивариативен Сох-пропорционален регресионен анализ за влиянието на стойностите на NP-1 и YAP-1 се установи, че при висока експресия и на двете антитела съществува висок риск смъртност (Таблица 16).

Таблица 16. *Унивариантен анализ за оценка на риска за преживяемост в зависимост от експресията на NP-1 и YAP-1.*

Показател	Обща преживяемост (Унивариативен анализ)		
	HR	95 % CI	p
Neuropilin-1 (висока експресия)	2,1068	1,0242 to 4,3336	0,04
YAP-1 (висока експресия)	3,2731	1,5381 to 6,9653	0,0021

5. Обсъждане

5.1. Сравнителен анализ на основните клиничко-морфологични показатели при бъбречноклетъчен карцином с и без метастази

5.1.1. Възраст и пол

В нашето проучване при сравняването на двете групи пациенти с БКК установихме, че средната възраст на засягане е приблизително еднаква ($60,53 \pm 11,21$ г. при пациентите без метастази и $60,82 \pm 9,18$ г. при тези с метастази). При разглеждането на възрастовото засягане по групи прави впечатление, че групата пациенти на възраст между 41-60 години с метастази е почти половината от общия брой на пациентите (42%). Може да допуснем, че появата на БКК на по-ранна възраст се асоциира с по-голяма вероятност за бързо прогресиране и метастазиране на заболяването. Такава тенденция се наблюдава и при туморите на млечната жлеза (Gajdos C et al., 2000), и дебелото черво (Parhamore J et al., 1998). По отношение на възрастовото засягане при БКК Sanchez-Ortiz et al. (2004) показват подобна зависимост. Според тях, пациенти под 40 годишна възраст са с по-голям риск от развитие на метастази в лимфните възли. Отнесено към общата преживяемост, както според тях, така и според други автори (Verhoest G et al., 2007), младата възраст (<40 г.) при БКК се приема за добър прогностичен фактор. В опит да обяснят това противоречие, Karakiewicz P et al. (2008) правят анализ, при който установяват, че по-лошата прогноза за младите пациенти е право пропорционална на увеличаването на възрастта, но само до достигане на 50 годишна възраст. Във възрастния интервал 50-75 години рисковата крива върви без промяна (под формата на плато), а след 75 години прогнозата отново се влошава. Съобразно това, в зависимост от възрастта (в асоциация и с други фактори) биха могли да се препоръчат корекции, специфични за възрастта, за прилагане на типа на адювантна терапия, както и за честота и продължителността на проследяване на такива пациенти.

При сравняване на разпределението на пациентите по пол ние установихме, че и при двете групи пациенти подчертано доминира мъжкият пол – 2,5-3 пъти по-често засягане. Подобно разпределение се описва и от дуги епидемиологични проучвания (Ridge C et al., 2014; Protzel C et al., 2012). Освен че женският пол се засяга значително по-рядко, нашите данни показват, че средната обща преживяемост при жените с мБКК е по-висока - $26,83 \pm 15,28$ месеца, отколкото при мъжете, при които тя е $13,00 \pm 11,83$ месеца, без да има статистически значима зависимост между пола и преживяемостта на пациентите. Все пак, много автори потвърждават, че женският пол се асоциира с по-малък риск както за развитие на БКК, така и за настъпване на усложнения. В основата на тази зависимост вероятно стои фактът, че тубуларните епителни клетки и туморните клетки при БКК притежават андрогенни и естрогенни рецептори (ER) (Bennett N et al., 2014). Преди няколко години, Yu C-P et al. (2013) изследват експресията на ER в клетъчни линии от БКК и откриват по-интензивна експресия на ER β в сравнение с клетъчни линии от карцином на млечната жлеза. Те съобщават също, че след активирането на ER β в туморни клетъчни линии, се намалява клетъчната пролиферация и се индуцира апоптоза и освен това пролиферацията на БКК-клетъчни линии значително намалява след аплицирането на 17- β -естрадиол. На база тези данни би могло да се обясни различната честота на БКК при мъже и при жени, а ER β може да се ползва като вероятен прогностичен маркер за прогресията на БКК, както и да бъде основа за нови насоки в лечебната практика.

5.1.2. Прогностична роля на големината на тумора (Т-стадий) и степента на диференциация – ядрен грейд по Fuhrman

Големина на тумора (Т-стадий): При направения паралел по отношение големината на тумора при неметастатичните БКК и при тези с метастази установяваме сигнификантна разлика - при неметастатичен БКК 50% от туморите са в стадий Т1, докато при тези с метастази почти половината – 46% са в стадий Т3 ($\chi^2=22.0247$; $p=0.000047$). Налице е права връзка – по-големите тумори се асоциират с наличието на метастази. Нашите резултати потвърждават твърденията на други автори. Според Thompson R et al. (2010), туморният размер е сигнификантно асоцииран със синхронни метастази, а рискът от развитие на метастатична болест при тумори с размери <3 см е практически незначителен. Подобни са заключенията и на Kunkle D et al. (2007), според които има значителна права връзка между големината на тумора и установените метастази към момента на диагностициране. Според същите автори, с нарастването на тумора с 1 см, вероятността за метастази се увеличава с 22%. На противоположно мнение са Klatter T et al. (2008), които съобщават за 1 208 пациенти с малък размер на тумора (≤ 4 см), от които 72 са с метастази при поставянето на диагнозата. Същите автори отбелязват, че 7% от пациентите са с големина на тумора <2см. Според тях не съществува статистически значима връзка между размера на тумора и риска от метастазиране и в този смисъл използването на големината на тумора като единствен и независим прогностичен фактор би било неуместно. Въпреки че при преценяването на преживяемостта в зависимост от Т-стадия в нашите резултати се отчете статистически значима връзка, ние отчитаме, че в туморната морфология на БКК има и други компоненти и препоръчваме те да бъдат анализирани комплексно, като се вземат предвид и пола, възрастта, степента на диференциация, наличието на туморни некрози и саркоматоидни изменения. В опита си да комбинират няколко прогностични фактора в интегрирани системи, и с цел да се постигне по-висока прогностична значимост от доста време се предлагат различни схеми, включващи морфологични и клинично-лабораторни показатели. Такива са интегрираната система за стадиране на Калифорнийския университет (University of California at Los Angeles Integrated Staging System (UCLA ISS) (Zisman A et al., 2001); система базирана на туморен стадий, големина на тумора, степен на диференциация и наличие на некроза (tumor stage, size, grade, and necrosis - SSIGN score) (Frank I et al., 2002); номограма на Kattan M et al. (2001), в която се включва хистологичен тип, големина на тумора, TNM класификация и клинична симптоматика, за да се оцени вероятността от преживяемост без рецидив след 5 години; постоперативен модел на Karakiewicz P et al. (2007a); прогнозен модел за пациенти с метастатичен БКК (Motzer R et al., 2002; Motzer R et al., 2008). Тези прогнозни схеми все още не са напълно комплексни, част от тях са само за неметастатични тумори, а и повечето не вземат предвид молекулните характеристики на БКК.

В резултатите от нашето проучване прави впечатление, че преживяемостта на пациентите с мБКК и Т2-стадий е по-голяма от тези с тумори в Т1-стадий. Това би могло да се обясни с допълнителните клинично-лабораторни особености, както от страна на тумора, така и от страна на пациента, като например: наличие на вече настъпила клинична симптоматика при диагностицирането на БКК, придружаващи заболявания, локализация и брой на органни метастази. През 2004 година Patard J et al. представят проучване, обхващащо 1771 пациента от шест академични центъра в Европа и САЩ, в което включват пациенти само в стадий Т1 и Т2 и анализират

прогностичното значение, както на големината на тумора, така и на симптомите при диагностицирането им. В резултат оформят 4 групи в зависимост от риска: 1). T1a – тумор с големина ≤ 4 см, без симптоми; 2). T1b – тумор ≤ 4 см, със симптоми, или > 4 см, без симптоми; 3). T2a – тумор > 4 см; или ≤ 7 см, без симптоми и 4). T2b – тумор > 7 см, със симптоми. Според техните резултати с най-висока преживяемост и най-нисък риск за настъпване на смърт са пациентите в първата група, и респективно – с най-висок риск и ниска преживяемост са пациентите от последната група. Въз основа на тези данни, можем да допуснем, че и в нашето проучване по-лошата прогноза на пациентите с малък размер на тумора се влияе от други допълнителни фактори.

Понастоящем размерът на тумор (pT) представлява една от основните прогностични променливи. Заедно с това, обаче, значение имат и други показатели, които са както клиничко-лабораторни, така и специфични морфологични особености на туморната тъкан. Добавянето на допълнителни характеристики към TNM стадия може да доуточни прогнозата, да стратифицира пациентите, както и да оптимизира тяхното лечение и проследяване.

Степен на диференциация (Fuhrman grade): При сравняването от нас две групи пациенти установихме, че при пациентите с метастатичен БКК значително преобладават случаите с FG3 (42,5%), докато при пациентите с неметастатичните БКК преобладават случаите с FG2 (51,03%). Също така при кростабулационното разпределение се наблюдава статистически значима права връзка между степента на диференциация и наличие на метастази ($\chi^2=9.7019$; $p=0.023331$). Резултатите от нашето проучване също показват, че средната продължителност на живота в месеци при пациенти с метастатичен БКК значително намалява с увеличаване на FG от 1 до 4. Подобни данни са публикувани и от други автори. Kus E et al. (2009) установяват, че процентът на преживяемост на пациентите намалява с увеличаването на FG. В проучване включващо 82 пациента с БКК в стадий I Gelb A et al. (1993) показват, че ядрената оценка и размерът на тумора са независими фактори за преживяемост. По подобен начин, Taştekin E et al. (2012) доказват, че с покачване на FG, рискът за смърт се увеличава, а продължителността на живот значително намалява. Според Fukatsu A et al. (2013) пациентите с БКК и FG 4 имат по-лоша прогноза по отношение на DFS и OS, а някои от пациентите с БКК и FG3 са с установени органни метастази още при диагностицирането им. Пациенти с тумори, при които се наблюдава висок FG трябва да бъдат внимателно проследявани, като е препоръчително категоризацията на ядрата и поставянето на оценката да се извършва прецизно, без да се допуска, както свръх-диагностика, така и да не се омаловажават ядрените хистологични белези. Това би могло да се избегне, ако се спазва строго протокола за хистологична обработка на материалите, за да не се допусне качеството им да доведе до заблуждаване на патолога, както и да бъдат изработени адекватен брой препарати, за да не се пропускат туморни участъци с по-ниска ядрена диференциация.

Все повече автори се опитват да докажат, че е по-удачно използването на дву- (FG1–2 и FG3–4) или тристепенна (FG1–2, FG3 и FG4) скала при оценката на ядрата на БКК (Shim M et al., 2014; Ficarra V et al., 2009). Така тя би била по-опростена, би се постигнало по-хомогенно разпределение на пациентите и евентуално биха се избегнали несъвпаденията при интерпретацията от различни патолози, без да се променя прогностичното значение. Според Ficarra V et al. (2009) разликата в 5-годишната преживяемост между пациенти с FG3 и FG4 е по-значителна и с по-голямо клинично значение, отколкото разликата в преживяемостта между FG1 и FG2. От морфологична гледна точка, липсват категорични данни дали е по-подходящо да се

използва система в две или в три степени. Определянето на FG изисква да се направи оценка на няколко хистологични маркера - ядрен размер, ядреният полиморфизъм и проминентността на нуклеоли, като липсва еднозначно мнение за параметъра, който трябва да се използва в случай на хетерогенност в една и съща неоплазма. Въпреки че някои патолози са склонни да записват най-високата степен, която се наблюдава на поне едно поле при най-голямо увеличение, липсва съгласуван стандарт по този въпрос. В нашето проучване при обединяването на FG в две степени – ниска (FG1 и FG2) и висока (FG3 и FG4) се наблюдава значителна разлика в общата преживяемост – $39,66 \pm 33,15$ месеца при ниска степен и $22,84 \pm 19,94$ месеца при висока степен, при ниво на сигнификантност $p < 0,05$. В своето проучване Lang H et al. (2005) показват сходни резултати, свивайки скалата за степен на диференциация до дихотомна и показвайки, че по този начин се свеждат до минимум разликите в субективното отчитане от патолозите, без да се губи информация относно преживяемостта. Въз основа на натрупаните данни и все по-честото поддръжници на опростяването на четиристепенната скала, в близкото бъдеще се очаква преразглеждане на използваната в момента FG система.

5.1.3. Прогностично значение на туморната некроза и саркоматоидната компонента в туморната тъкан при БКК

Туморна некроза: Резултатите в нашето проучване ясно показват корелацията между наличието и площта на туморните некрози и оформянето на метастази ($\chi^2=38.1018; p < 0.00001$). При изследването на корелационните връзки в групата пациенти с неметастатични БКК между туморните некрози и саркоматоидна компонента, въпреки слабо доловимата тенденция, не се установи статистически значима връзка. Такава не се установява и между ТН и степента на диференциация. Връзка се установи единствено между площта на туморните некрози и големината на тумора (Т-стадия) ($p < 0,05$). Получените от нас резултати са отчасти в съответствие с данните на други автори. Minervini A et al. (2008) анализират група от неметастатични БКК и доказват, че наличието на ТН не се асоциира нито с Т-стадия, нито с по-висока експресия на пролиферативен маркер Ki67. Нещо повече, наблюдаваната от тях туморна некроза не корелира с експресията на pVHL и HIF-1 α – протеини, които имат ключова роля в регулацията на клетъчния отговор при хипоксия. В същото проучване, при проведен мултивариантен анализ се установява, че туморната некроза не е независим прогностичен фактор, а ниската преживяемост при тези пациенти се дължи предимно на други прогностични фактори, като ядрен грейд и туморен стадий. Подобни данни съобщават и Sorbellini M et al. (2005) за кохорта от пациенти с неметастатичен БКК. В своето изследване те не приемат туморната некроза за независим прогностичен фактор за риск от настъпване на рецидив. От своя страна Sengupta S et al. (2005) представят данни за значителна връзка между наличието на ТН и агресивен клинично-патологичен профил, както и за по-честа асоциация между ТН и клинични и лабораторни прояви на тумора. Подобни данни представят и Lam J et al. (2005), които анализират 311 пациенти, от които 40% са с метастази и доказват статистически значима връзка между ТН и напреднал клиничен стадий, ниска степен на диференциация и голям размер на тумора. При мултивариантен анализ туморната некроза, според тях, не се приема за независим прогностичен фактор относно преживяемостта, което е противоположно на докладваните данни от Frank I et al. (2002). В тяхното изследване, обаче, едва 15 % от пациентите са с метастази.

При изготвения от нас непараметричен анализ на метастатичните БКК ние не установихме корелация между Т-стадия и площта на некрозите ($p > 0,05$). При изготвения от нас мултивариантен анализ за оценката на риска в същата група пациенти, статистическите данни сочат, че туморната некроза не е независим прогностичен фактор по отношение на преживяемостта. От получените от нас резултати може да заключим, че наличието на ТН е с различно прогностично значение при БКК с и без метастази. Туморните некрози имат неблагоприятно влияние по отношение биологичното поведение при локални (неметастатични) БКК и е препоръчително то да бъде отбелязвано и взимано под внимание при изграждане на рисковия клинично-морфологичен профил на пациента. При прогресията на БКК и оформяне на метастази, обаче, влиянието на ТН като прогностичен фактор намалява. Няколко обстоятелства могат да обяснят защо некрозата изглежда по-значима за локализираните, отколкото за метастатични тумори. Туморите с хистологично установена коагулационна некроза обикновено са по-агресивни, нарастват бързо, при което темповете на ангиогенеза са недостатъчни за адекватно кръвоснабдяване и се оформят некрози. В този аспект не е изненадващо, че такива тумори често метастазират. Според Sabo E et al. (2001) туморната некроза компресира и разрушава туморните съдове, като по този начин улеснява разпространението на туморни клетки. Наличието на метастази от своя страна е свързано с по-лоша прогноза, в сравнение със случаите с локализиран в бъбрека тумор. За тези пациенти влиянието на ТН върху биологичното поведение на тумора е вече незначително на фона на доста по-рискови и категорични фактори - наличието на метастази. Затова установяването на ТН не се приема за независим прогностичен фактор за по-ниска преживяемост при пациенти с метастатичен БКК.

Доскоро некрозата се считаше за пасивен процес и нерегулирана форма на клетъчна смърт. Преди няколко десетилетия стана ясно, че некрозата може да функционира и като един алтернативен програмиран начин на клетъчна смърт, предизвикана от същите клетъчни сигнали, които индуцират апоптозата (Proskuryakov S et al., 2010). Настоящи данни показват, че ТН може да има двойно тълкуване – от една страна, при възникване след противотуморна терапия тя може да осигури благоприятен за пациента отговор, поради разрушаване на туморните клетки и активиране на имунния отговор от тях; от друга страна некрозата, възникнала по време на развитието на тумора, може да доведе до по-агресивни и по-бързо растящи тумори (Proskuryakov S et al., 2010),

В обобщение, коагулационната ТН се явява прогностичен маркер с добър потенциал главно при неметастатичен БКК. Ето защо е уместно рутинно да бъде отчетено наличието или отсъствието ѝ при докладване на патологичния отговор. Оценяването ѝ се извършва лесно, без значителни усилия от патолога, при положение че се изследват адекватен брой хистологични блокчета. Уместно е оценките на туморната некроза да се включат като прогнозна променлива в използваните прогностични модели. По-нататъшното изследване на механизмите на туморната некроза ще доведе до по-доброто познаване на туморната биология и ще подобри прогнозата, проследяването и лечението на пациенти с БКК.

Саркоматоидна компонента: В нашето проучване установихме корелацията между наличието на саркоматоидна компонента и наличието на метастази ($\chi^2=14.2547$; $p=0.00016$). Ние открихме, че при метастатичните случаи включени в проучването почти в половината (45%) се наблюдават саркоматоидни изменения и наблюдавахме статистически значима, правопрпорционална положителна

кростабулационна връзка между наличието на саркоматоидна компонента и високия ядрен грейд ($p=0,01$). Освен това при изготвяне на survival-анализ на пациенти с мБКК наблюдавахме, че когато СК присъства в туморната тъкан общата преживяемост е значително по-ниска ($21,66\pm 20,59$ месеца), от тази при тумори, в които тя не се наблюдава ($39,86\pm 31,97$ месеца) ($p=0,04$). Нашите резултати са в съответствие с тези на други автори, изследващи значението на СК. Според de Peralta-Venturina M et al. (2001) наличието на СК е маркер за по-лоша прогноза на БКК и се наблюдава тенденция саркоматоидните изменения да се откриват в по-напреднал стадий на болестта. Аналогични са и резултатите на Dall'Oglio M et al. (2005), според които пациентите с БКК и саркоматоидни изменения в туморната тъкан, са в напреднал клиничен стадий, в 87% са и с изявена клинична симптоматика, а пациентите с висок FG (3 и 4) достигат 3-годишна преживяемост в 40% от случаите. В своето проучване de Peralta-Venturina M et al. (2001) също доказват връзката на СК със стадия (63% за в III-ти стадий и 25% са в IV-ти стадий), а при изготвяне на Kaplan-Meier survival анализ доказват статистически значимо намаляване на DFS при налична саркоматоидна компонента в $>50\%$ от площта на тумора. Противоположни на нашите резултатите и тези на de Peralta-Venturina M et al. са данните от Shuch B et al. (2012), които смятат, че процентът на саркоматоидна компонента в БКК не се асоциира с размера на тумора, стадия, некрозите или наличието на лимфни или органни метастази. Според тях се наблюдава асоциация единствено с преживяемостта на пациентите. Относно това как влияе на лечението наличието на СК в тумора Golshayan A et al. (2009) твърдят, че само пациенти с оскъдно наличие на СК ($<20\%$), и то при светлоклетъчния хистологичен тип, отговарят положително на приложената таргетната терапия с анти-VEGF препарати.

Към днешна дата не е дефиниран точно прогностичния праг на саркоматоидната компонента, като тя не е приета за независим прогностичен фактор. Въпреки това, СК е включена в препоръките на International Society of Urologic Pathology (ISUP) за определяне на степен на диференциация на туморите като добавка към оценяването на формата, големината и полиморфизма на ядрата (Delahunt B et al., 2013). Наблюдава се тенденция по-лошите прогностични фактори (напреднал стадий, ниска диференциация, наличие на метастази) да се асоциират с хистологични промени по типа на СК. От една страна е възможно в туморите изначало да е заложено да протичат по-индолентно, докато при други да е генетично закодирано по-агресивно биологично поведение. Другият вариант е в хода на самата туморна прогресия да настъпват допълнителни генетични мутации, които да превключват към „по-малигнен“ фенотип. В опит да изяснят геномиката на тумори със СК Bi M et al. (2016) и Malouf G et al. (2016) изследват настъпилите мутации и посочват най-честите гени, които се засягат. Наред с познатите генни мутации характерни за БКК (като мутация във *VHL*), те наблюдават по-голяма честота на гени характерни и за други тумори: Bi M et al. регистрират мутации в *p53*, *BRCA1 associated protein-1 (BAP1)*, *FAT atypical cadherin 1 (FAT1)*, а Malouf G et al. допълнително в *JAK2*, *PTEN*, *CDKN2A* и *NF2*. Това показва, че СК действа по един дивергентен път в хода на туморната прогресия. От изброените мутации според Malouf et al. в 19% от случаите със СК има мутация и на *NF2*. Този ген кодира тумор-супресорен протеин Merlin (Mer), чиято загуба според Hernandez J et al. (2017) е с главно значение за прехода на един БКК от локален в метастатичен. Merlin е част от активаторите на Hippo-пътя, който чрез негативна регулация държи YAP в неактивна форма в цитоплазмата на клетката. В нашето проучване също откриваме корелация между представянето на СК и високата експресия на YAP-1. Предвид, че YAP-1 е ключов фактор в един път контролиращ

клетъчната пролиферация, можем да заключим, че в хода на усилен растеж в туморната тъкан настъпват мутации водещи до качествени изменения.

5.2. Особенности в метастатичното разпространение на БКК

Важна особеност в биологичното поведение на БКК, е че има изразена склонност да метастазира по хематогенен път - през бъбречната вена или през паравертебралния венозен плексус на Батсън, позволяващ разпространение на тумора както в каудална, така и в краниална посока (Brook R et al., 2014). Според някои автори, по-голямата честота на органични метастази се обуславя от наличието на лимфо-венозни анастомози между първичния тумор и сентинелния лимфен възел (Karmali R et al., 2014). В свое проучване Baldewijns M et al. (2009) доказват пониската лимфангиогенна активност при БКК и с това обясняват ниския процент (7-17%) метастази в лимфни възли при пациенти с този тип тумори.

Въпреки, че е логична зависимостта по-големият туморен размер да се асоциира с наличие на метастази и по-висок TNM-стадий, при БКК такава зависимост не се смята за абсолютна. Klatter T et al. (2008) показват, че няма значителна връзка между размера на тумора и риска от наличие на синхронни метастази, както и не успяват да определят този граничен размера на тумора, от който риска за метастазиране нараства. В нашето проучване при повечето от случаите с метастатичен БКК, туморът в авансирал. Независимо от това, дори при тумори, класифицирани според големината си като T1 са налични синхронни метастази (при 2-ма от пациентите далечни множествени; при 4-ма – далечни единични; при 1 – метастази в лимфен възел).

Независимо, че вече са известни основните генетични и молекулни характеристики на БКК, сравнявайки първичните огнища и метастазите се установява хетерогенност в биологията на туморите. Едно от първите подробни проучвания, свързани с туморната хетерогенност, е това на Gerlinger M et al. (2012). Те изследват мутациите в първичните карциноми и в метастазите при само четири случая и установяват значителна вариабилност в нарушаването на mTOR-сигналния път в различните метастазни огнища. С развитието на новите имуно-терапевтични стратегии, се наблюдава и значителен интерес относно експресията на PD-L1 в туморните метастази. Неотдавнашно изследване от Dana Farber Cancer Institute сравнява тъкани, получени от 53 първични БКК и 76 съответни метастази (Callea M et al., 2015) и демонстрират хетерогенност на експресията на PD-L1, както в рамките на първичните тумори – по-висока е експресията му в зони с висок ядрен грейд, така и по отношение на експресията му в тъканите от метастази. В около 20% от случаите след доказване на позитивна експресия в първичното огнище, тази експресия не се наблюдава в метастазите.

Все още няма единодушно мнение за биологичните механизми, които водят до метастази на БКК. Grange C et al. (2011) предполагат, че образуването от туморните клетки екзосоми (или микровезикули) могат да са в основата на хематогенната дисеминация. Тези микровезикули се произвеждат основно от CD105-позитивни туморни клетки и активират нормалните ендотелни клетки, придават им ангиогенен фенотип и стимулират техния растеж и ангиогенезата. Иммунната среда може също да играе критична роля в еволюцията на метастазите. В някои проучвания е установено, че неутрофилната инфилтрация в белите дробове (придружена от секреция на неутрофилни хемокини) е причина за потискане на белодробните метастази на БКК

(López-Lago M et al., 2013). И обратно, загубата на неутрофилни хемокини в белия дроб се придружава от повишаване на белодробните метастази. Други имунни клетки например myeloid derived suppressor cells (MDSCs) показват про-ангиогенен ефект и предизвикват разпространение на БКК в предклинични модели (Finke J et al., 2011). Отвъд тези макромолекулни събития са идентифицирани няколко молекулни медиатори, които участват в процеса на метастазиране. Смята се, че при светлоклетъчни карциноми с налична мутация във *VHL* CUB-domain-containing protein (CDCP1) тя може да води до развитие на метастази (Razorenova V et al., 2011). CDCP1 се регулира чрез HIF-зависими пътища и води до активирането на протеин-киназа C-d (PKCd), което на свой ред увеличава клетъчната миграция. Експресията на MUC1, мембранно-свързан гликопротеин, също е HIF-зависима и е установено, че MUC1 значително намалява клетъчната инвазия и миграция в лабораторни клетъчни модели (Aubert S et al., 2009).

По данни на National Inpatient Sample, обхващащо 11 157 пациенти с метастатичен БКК за периода 1998-2007 (Bianchi M et al., 2012) най-честото място за метастази е белия дроб (45%), костите (30%) и лимфните възли (22%). Чернодробните метастази са 20%, а мозъчните – около 9%. В нашето проучване данните са приблизително сходни, като предпочитано място за метастазиране е белия дроб (57,99%), следвано от кости (18%), черен дроб (20%) и мозък (12%).

Различни анализи, изследващи БКК, посочват специфичните характеристики на различните метастатични локализации. Международният консорциум за консултиране на бази данни (IMDC) при оценка на 2027 пациенти с мБКК посочва, че чернодробните метастази се наблюдават при по-голяма част от пациентите с нисък риск по IMDC критерии (International mRCC Database Consortium (IMDC) (McKay R et al., 2014). Освен това, рискът за смърт при пациенти с костни метастази е 1,4 (95% CI 1.22-1.62), а при пациенти с чернодробни метастази - 1.42 (95% CI 1.17-1.73). По отношение на пациентите с мозъчни метастази според данните на Vickers M et al. (2013) от изследваните 705 пациента за периода 2005-2011 г. 106 са били идентифицирани с мозъчни метастази, от които само 12% са попаднали в благоприятната рискова група по IMDC. Повечето пациенти (90%) имат церебрални метастази, докато по-малка подгрупа (17%) имат церебеларни метастази. Както може да се предполага, по-големият брой мозъчни метастази е свързан с по-лоша прогноза. Посочват се, все пак, няколко локализации, които са свързани с по-благоприятен ход. Има няколко съобщения, които показват, че пациентите с метастази само в белия дроб имат по-добра прогноза, в сравнение с останалите локализации (Hegde U et al., 2013; Nishida H et al., 2011). В контраст с тези данни са получените от нас резултати, които показват, че с най-ниска преживяемост са пациентите с белодробни метастази. Интерес представлява фактът, че метастазите в панкреаса също се смятат за локализация с благоприятна прогноза за пациентите. В ретроспективно проучване на 228 пациенти с панкреатични метастази Sarathi K et al. (2017) представят следните резултати: средната обща преживяемост при пациенти с панкреатични метастази е 39 месеца в сравнение с 26 месеца при пациентите без ($p < 0,010$). В нашето проучване не се установиха пациенти с такава локализация на метастазите, но в публикувани от нас данни са посочени по-редки метастатични локализации – в лигавица на гингива и в глутеален мускул (Спасова С et al., 2016).

Разбирането на биологията на метастазите при БКК със сигурност ще доведе до напредък в системната му терапия. Освен вече действащата в клиничната практика употреба на VEGF и mTOR-инхибиторите, потенциалното участие на имунните

клетки в генерирането на метастази може да бъде в основата на адювантно лечение чрез инхибиране на PD-1 или PD-L1. Подобни проучвания вероятно ще се появят в близко бъдеще. След като БКК се разпространява предимно хематогенно е важно да се отбележи, че различната локализация на метастазите може да обуславя и различна прогноза за пациентите. Понастоящем липсват достатъчно доказателства, за да се предприеме индивидуален терапевтичен подход в зависимост от локализацията на метастазата, въпреки че има обнадеждаващи данни за повишаване на преживяемостта при пациенти с костни метастази при добавяне на Cabozantinib към терапията (McKay R et al., 2014).

5.3. Прогностично значение на Neuropilin-1 и YAP-1 при метастатичен бъбречноклетъчен карцином

При изследване на мембранната експресия на NP-1 в групата на метастатичните БКК се установи висока експресия на анти тялото при 42,11% от пациентите (n=21), а при 57,99% (n=29) се наблюдава ниска експресия. Не се установи корелация между експресията и останалите морфологични показатели, но се установи връзка между експресията и преживяемостта на пациентите. Нашите данни доказват, че високата експресия на NP-1 е свързана с повишен риск за смъртност и с намалена обща преживяемост. Това е в съответствие и с резултатите, публикувани от други автори. Cetin B et al. (2015) показват сходни резултати, но при изследване на експресията на изоформата NP-2. Те посочват, че продължителността на общата преживяемост е значително понижена при пациенти със свръхекспресия на NP-2 в сравнение с тези с ниски нива на експресия (OS 13 срещу 26 месеца, p=0.023). Според Cao Y et al. (2013) за разлика от NP-1, неговата splice-форма NP-2 няма отношение към туморогенезата при БКК, както и не взема участие при клетъчната миграция и инвазия. Според същия автор в проучване от 2008 г. (Cao Y et al., 2008) при намаляване активността на NP-1 в клетките на БКК се наблюдава забавен туморен растеж и значително намаляване способността за миграция и инвазия на туморните клетки в сравнение с тази на контролните клетъчни групи.

Традиционно NP-1 е описван като ко-рецептор, който потенцира сигнализацията на VEGF в ендотелната клетка. Освен това, той е доказан и като ко-рецептор за сигнални пътища извън ангиогенезата, отключвани от много други растежни фактори (transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), hepatocyte growth factor (HGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and epidermal growth factor receptor (EGFR) (Neufeld G et al., 2017). Експресията на маркера в карциномните клетки показва, че като ко-рецептор взема участие и в туморната морфогенеза и участието му не се ограничава само до фактор за образуване на съдове. Невропилиновата експресия и функцията му в епителните клетки са по-малко проучени в сравнение с ендотелните клетки и невроните.

Все повече изследвания сочат NP за обещаваща мишена при антитуморната терапия. Фактът, че NP се експресира и от нормалните тъкани предполага, че терапията с анти-NP агенти може да има неблагоприятни странични ефекти. В предклинични модели на изследване се смята, че терапията с анти-NP е значима, само когато се използва в комбинация с анти-VEGF терапия (Pan Q et al., 2007).

При имунохистохимичното изследване за YAP-1 се установи, че високите нива на експресия се свързват с по-лоша прогноза и намалена преживяемост при пациентите с БКК. В нашето изследване не наблюдаваме кростабулационна корелация между

високата му ядрена експресия и T-стадия и FG. В БКК имуноекспресията на YAP-1 е проучена само от няколко автори. Сао J et al. (2014) изнасят данни, че 63,3% (19/30) от пациентите със сБКК са с позитивна експресия на YAP-1, докато в нормалните тъкани е била едва 33,3% (10/30). Те наблюдават корелация между високата експресия на YAP-1 в туморната тъкан и по-ниската диференциация и напреднал стадий на заболяването. За разлика от тях, Ну Х et al. (2017) съобщават за ниска имунореактивност на протеина YAP-1 в тъканни среди на 75 пациента със сБКК, която корелира с по-голям размер на тумора и по-напреднал клиничен стадий. В последното проучване, обаче, не са предоставени данни за преживяемостта на пациентите. Подобни данни представят и Godlewski J et al. (2018) – те изследват 54 пациента с БКК и не установяват корелация между експресията на YAP-1 с демографските и клиничко-морфологичните данни. Те наблюдават експресия предимно с ядрена локализация, като в по-голям процент се наблюдава умерена до изразена интензивност 35/54 (64,8%), а слаба до липсваща е налице в 19/54 (35,2%) от случаите.

В нашето проучване установихме високи нива на корелация между експресията на NP-1 и YAP-1. Вероятно тези два маркера имат своето свързващо звено. Според Wang X et al. (2017) главният ефектор на Hippo-пътя YAP работи като един от сигналните медиатори след сигнализирането на VEGF-VEGFR2 по време на ангиогенеза. Те доказват, че комплексът YAP/TAZ е от съществено значение за развитието на съдовете – при експериментална делеция на YAP в ендотела на миши ембриони се стига до нарушена васкуларизация и загиване на ембриона. Освен това показват, че VEGF активира YAP/TAZ чрез ефектите си върху актиновия цитоскелет и че активираният YAP/TAZ индуцира от своя страна транскрипционна програма за последващ контрол и ремоделиране на цитоскелета и така се създава захранващ цикъл, който при необходимост осигурява ангиогенен отговор. Липсата на YAP/TAZ също така води до промяна на клетъчното разпределение на VEGFR2 поради нарушаване на пренасянето му от апарата на Golgi до цитоплазмената мембрана (Wang X et al., 2017). Тези наскоро предложени данни подкрепят идеята, че подобна роля имат и NP и YAP и в туморните клетки. Такава връзка между NP като ко-рецептор и Hippo-пътя се установява при експериментални проучвания в туморни клетки от мамарна тъкан (Elaimy A et al., 2018). Сходни данни наскоро са публикувани и от Grun D et al. (2017), които чрез експериментални методи доказват, че комплексът VEGF-A/NP-1/GIPC1 предизвиква промени по сигналната верига на Hippo-пътя при плоскоклетъчен карцином, за да осигури стабилизиране на YAP и осъществяване на неговата транскрипционна активност. Всичко това води до пролиферация и оцеляване на туморните клетки. В достъпната литература подобни данни за бъбречноклетъчния карцином не се откриват, но вероятно в туморната генеза на БКК сигналните пътища на двата маркера, изследвани от нас, се пресичат. В условия на хипоксия, от една страна, се индуцира ангиогенезата, чрез експресия на рецептори и ко-рецептори (NP) върху ендотелните клетки, но и експресия на NP върху туморните клетки. Едновременно с това хипоксията води до увеличаване на плътността на екстрацелуларния матрикс (Gilkes D et al., 2013). Състоянието на матрикса е един от контролните механизми на Hippo-пътя от една страна и увеличената му ригидност води до активиране на YAP. От друга страна, може да се очаква, че подобно на ендотелните клетки VEGF/VEGFR/ NP модулира ядрената експресия на YAP.

Корелацията между NP и YAP може да се разглежда и по отношение на трансформирането на епителните клетки в мезенхимни и наличие на саркоматоидна компонента в туморния паренхим. Доказано е, че NP играе роля на ко-рецептор при

взаимодействието на TGF β със своите рецептори TGF β RI и TGF β RII (Glinka Y et al., 2011). Активирането на този път довежда до фосфорилиране на Smad2 и Smad3, които образуват тример със Smad4. Полученият комплекс се пренася в ядрото и взаимодейства с транскрипционните фактори, един от които е YAP. YAP взаимодейства с TEAD в ядрото, за да препрограмира генната експресия и да индуцира епително-мезенхимен преход, характеризира се със загуба на междуклетъчните връзки, нарушаване на апикално-базалния поляритет, както и придобиване на характерна мезенхимна подвижност (Shao D et al., 2014). В допълнение, YAP антагонизира свързването на E-cadherin чрез регулиране структурата на актиновия цитоскелет, което също допринася за EMT (Bai H et al., 2016).

Изследваните от нас два маркера, участващи в процеса на ангиогенеза и на клетъчна пролиферация се оказва, че имат много по-разнообразни функции в хода на развитието и прогресията на туморите. Освен това те не са изолирани помежду си, а често са част от общи каскадни пътища. Като резултат на тяхната нарушена регулация и свръхактивност се наблюдават основните белези, характерни за туморните клетки. Двата маркера – NP и YAP дават сериозна заявка да бъдат, както добри прогностични маркери, така и мишени за терапевтична стратегия в опита да се спре прогресията на БКК.

6. Заключение

Въз основа на анализа на клинично-патологичните показатели, както и на оценката на експресията на NP-1 и YAP-1 може да се определят основните рискови профили на пациентите с БКК. При БКК без метастази от значение за прогресията на тумора е:

- ✓ големината на тумора
- ✓ степента на диференциация, определена според полиморфизма на ядрата
- ✓ наличието на туморни некрози
- ✓ наличие на саркоматоидна компонента
- ✓ доказване на ангажиране на бъбречната вена

Тези показатели са особено значими при пациенти от мъжки пол и във възрастовия интервал 40-60 г.

Пациентите с повишен риск за ниска преживяемост при метастатичен БКК са със следните клинично-морфологични и имунохистохимични характеристики:

- ✓ наличие на по-голям размер на тумора
- ✓ ниска степен на диференциация (висок FG 3 и 4)
- ✓ наличие на саркоматоидна компонента
- ✓ наличие на белодробни метастази
- ✓ наличие на повече от една далечна органна метастаза
- ✓ висока имунохистохимична мембранна експресия на Neuropilin-1
- ✓ висока имунохистохимична ядрена експресия на YAP-1

Процесите на ангиогенеза и клетъчна пролиферация са ключови за възникването и прогресирането на туморите. В проучването на сигналните пътища, които участват, както и в разбирането на начините им на регулация, има сериозен напредък. В изясняването на сложните взаимодействия между участващите в тях молекули има все още много неизвестни и са необходими насочени и задълбочени изследвания върху по-голям брой пациенти. Това би предоставило информация за изграждане на по-добри терапевтични стратегии за лечение на пациентите със злокачествени заболявания и в частност пациентите с бъбречноклетъчен карцином.

7. Изводи

Въз основа на настоящото проучване бихме могли да направим следните изводи:

1. Факторите, увеличаващи вероятността за метастазирание при локален БКК са големината на тумора, степента на диференциация, площта на туморните некрози, наличието на саркоматоидна компонента и ангажирането на бъбречната вена от туморния процес.
2. Големината на тумора, саркоматоидната компонента и степента на диференциация определена по Fuhrman и разделена на две степени (FG1-2 и FG3-4) са прогностични фактори за намалена обща преживяемост при пациенти с мБКК.
3. Наличието и площта на туморната некроза имат значение като прогностичен фактор при локализиран БКК, но при пациенти с метастатичен тяхното влияние намалява.
4. Белодробната локализация на метастазите при пациенти с БКК е с лоша прогноза и се свързва с намалена обща преживяемост.
5. Експресията на NP-1 не корелира с изследваните клинично-морфологичните показатели при пациенти с мБКК.
6. Експресията на YAP-1 корелира с наличието на саркоматоидна компонента в тумора при мБКК.
7. Установява се корелация между експресията на NP-1 и YAP-1 – в мнозинството от случаите високата експресия на NP-1 съвпада с високата експресия на YAP-1.
8. Въпреки прогностичното значение, предиктивната стойност на YAP-1 и NP-1 все още е непотвърдена, както в достъпната литература, така и в резултатите в настоящото изследване.
9. При висока експресия на NP-1 и YAP-1 при пациенти с мБКК рискът за смъртност се увеличава съществено.
10. Високата мембранна експресия на Neuropilin-1 и високата ядрена експресия на YAP-1 са лоши прогностични фактори и се асоциират с по-ниска преживяемост при пациенти с м БКК

8. Приноси на дисертационния труд

8.1. Научни приноси с оригинален характер:

- Осъществен е сравнителен анализ на морфологичните показатели при пациенти с метастатичен и неметастатичен бъбречноклетъчен карцином в региона.
- Извършен е анализ на имунохистохимичната експресия на ко-рецептор NP-1 при метастатичен БКК
- Извършен е анализ на имунохистохимичната експресия на транскрипционен фактор YAP-1 при метастатичен БКК.

8.2. Научни приноси с практическо-приложен характер:

- Потвърждава се значението на големината на тумора, степента на диференциация, наличието и площта на туморна некрози и саркоматоидна компонента като прогностични фактори за прогресията на БКК и намалена обща преживяемост.
- Аргументирана е потенциалната прогностична стойност на високата мембранна експресия на NP-1 за ниска обща преживяемост при собствена извадка от пациенти с метастатичен бъбречноклетъчен карцином
- При същите пациенти е оценена потенциалната прогностична стойност на високата ядрена експресия на YAP-1 за ниската обща преживяемост при пациенти с метастатичен бъбречноклетъчен карцином
- За първи път и нас е анализирана паралелно експресията на NP-1 и YAP-1 във връзка с хистологичните показатели и общата преживяемост при пациенти с БКК.
- Определени са параметри в профила на пациентите с повишен риск за намалена преживяемост и смърт от БКК на базата на клинично-морфологичните характеристики и имунохистохимичната експресия на NP-1 и YAP-1.

Публикации, свързани с дисертационния труд:

1. **С. Спасова, П. Генов.** Корелация между туморната коагулационна некроза и клинично-патологични параметри при светлоклетъчен карцином на бъбрека. Варненски медицински форум, т.8, бр.1, 2018, стр.29-34.
2. **С. Спасова, Н. Стефанова, Д. Малинова.** Морфологичен анализ на метастатичното разпространение при светлоклетъчен карцином на бъбрека. Сборник с научни съобщения „Наука и младост“. 2016; стр.286 – 291.
3. **S. Spasova, P. Ghenev, I. Donev et al.** Expression of Neuropilin-1 in renal cell carcinoma. Под печат. „Сборник-статии от Националната конференция 15 години фармация - МУ Пловдив“.

Участия в научни форуми

1. **S. Spasova, P. Ghenev.** Histologic tumor necrosis as a prognostic indicator for clear cell renal carcinoma. Journal of Biomedical Clinical research.2014; Vol.7 (1); supl.2: 37-38 p.
2. **S. Spasova, P. Ghenev.** Xp11.2 translocation renal cell carcinoma: a case report and a review of literature. Journal of Biomedical Clinical research.2014; Vol.7 (1); supl.2: 38 p.
3. **С. Спасова, Н. Стефанова, П. Генов.** Анализ на пункционните бъбречни биопсии в Клиниката по обща и клинична патология – Варна за 10-годишен период. Извънредна национална конференция по патология, ВМА-София, 1.06.-2.06. 2012 г. П-11; 21 стр.

Изказвам сърдечна благодарност на:

- *Научния си ръководител доц. д-р Петър Генов, д.м. за ценните професионални напътствия, търпението и отзивчивостта по време на разработването на дисертационния труд.*
- *На проф. Ангел Ангелов и проф. Иван Щерев за полезните съвети, идеи и помощта при подготовката и оформлението на дисертационния труд.*
- *Колегите ми, д-р Ина Кобакова и д-р Надежда Стефанова, за предадените знания и опит при осъществяването на настоящия проект и безусловната им приятелска подкрепа.*
- *На целия екип на Клиника по обща и клинична патология, които бяха неизменна част от практическата ми работа, както и за разбирането и колегиалната атмосфера, важни за професионалното и научното ми развитие.*
- *На всички мои учители, които допринесоха за цялостното ми професионално развитие и увлечение в науката.*
- *На семейството ми, и специално на съпруга ми, за обичта, търпението и подкрепата през годините.*