



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“

КАТЕДРА „Патологоанатомия“

д-р Красимир Тодоров Петров

**МОРФОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ, ТУМОРНО ПЪПКУВАНЕ И ИМУННА
СТРОМНА РЕАКЦИЯ И ЗАВИСИМОСТ ОТ МУТАЦИОННИЯ ПРОФИЛ НА
КОЛОРЕКТАЛНИТЕ КАРЦИНОМИ С ЛЯВА И ДЯСНА ЛОКАЛИЗАЦИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен**

„ДОКТОР“

ПЛОВДИВ, 2026 г.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“

КАТЕДРА „Патологоанатомия“

д-р Красимир Тодоров Петров

**МОРФОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ, ТУМОРНО ПЪПКУВАНЕ И ИМУННА
СТРОМНА РЕАКЦИЯ И ЗАВИСИМОСТ ОТ МУТАЦИОННИЯ ПРОФИЛ НА
КОЛОРЕКТАЛНИТЕ КАРЦИНОМИ С ЛЯВА И ДЯСНА ЛОКАЛИЗАЦИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен**

„ДОКТОР“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1 Медицина

Докторска програма: „Патологоанатомия и цитопатология“

Научен ръководител:

1. Доц. д-р Иван Недков Иванов, д.м.
2. Проф. д-р Наталия Чилингирова, д.м.

Официални рецензенти:

1. Проф. д-р Юлиан Руменов Ананиев, д.м.
2. Доц. д-р Зорница Веселинова Горчева, д.м.

ПЛЕВЕН, 2026 г.

Текстът на дисертацията обхваща 205 стандартни страници, като в него са представени 48 таблици, 16 фигури и 31 снимки.

Библиографската справка съдържа общо 294 източника – 164 публикувани през последните 10 години и 3 цитирания на публикации български автори.

Авторът е задочен докторант към Катедра „Патологоанатомия“, Факултет по Медицина, Медицински университет – Плевен.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на разширен Катедрен съвет на катедра „Патологоанатомия“, Факултет по Медицина, Медицински университет – Плевен, състоял се на 17.03.2026 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 23.06.2026 г. от 13:00 часа в зала „Амброаз Паре“ на МУ- Плевен, ул. Климент Охридски 1.

Научно жури в състав:

Председател: Доц. д-р Маргарита Димитрова Влахова, д.м.

Членове:

1. Проф. д-р Юлиан Руменов Ананиев, д.м.
2. Доц. д-р Зорница Веселинова Горчева, д.м.
3. Доц. д-р Кони Ванчо Иванова-Танева, д.м.

Резервни членове:

1. Проф. д-р Добромир Димитров Димитров, д.м.
2. Доц. д-р Мария Стоянова Колева-Иванова, д.м.

Материалите по защитата са на разположение на сайта на МУ-Плевен: www.mu-pleven.bg.

Забележка: Номерирането на приложените фигури, таблици и снимки е извършено съобразно текста на автореферата и не съвпада с номерацията в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ | 6 |
| УВОД | 7 |
| ЦЕЛ | 9 |
| ЗАДАЧИ | 9 |
| МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 10 |
| ИЗВАДКА ПАЦИЕНТИ..... | 10 |
| Първа група - Подзадача №3А – ендоскопски материали от колоректален карцином: | 10 |
| Втора група - Подзадача №3В – резекционни материали от колоректален карцином: | 10 |
| МЕТОДИ | 12 |
| По Задача №1:..... | 12 |
| По Задача №2:..... | 12 |
| По Задача №3:..... | 15 |
| По Задача №4:..... | 16 |
| По Задача №5:..... | 17 |
| Статистически анализ на получените резултати..... | 18 |
| РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗВЪРШЕНИТЕ ПРОУЧВАНИЯ..... | 20 |
| ПЪРВА ПАЦИЕНТСКА ИЗВАДКА | 20 |
| По Задача №1:..... | 20 |
| По Задача №2:..... | 25 |
| По Подзадача №3А | 25 |
| ВТОРА ПАЦИЕНТСКА ИЗВАДКА | 35 |
| По Задача №1:..... | 35 |
| По Задача №2: Важни туморни характеристики с прогностично значение | 39 |
| По Подзадача №3В: Перитуморен бъдинг определен в резекционни материали от.. | 48 |
| колоректален карцином | 48 |
| По Задача №4: Важни предиктивни и прогностични биомаркери при колоректалните | 51 |
| карциноми- MMR..... | 51 |
| По Задача №5: Мутации на някои гени в КРК, изследвани чрез NGS | 64 |
| ДИСКУСИЯ – ПЪРВА ПАЦИЕНТСКА ИЗВАДКА | 70 |

| | |
|---|----|
| ДИСКУСИЯ – ВТОРА ПАЦИЕНТСКА ИЗВАДКА..... | 72 |
| ИЗВОДИ | 82 |
| ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД..... | 83 |
| Теоретични приноси | 83 |
| Методологични приноси | 83 |
| Практико-приложни приноси | 84 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ | 84 |
| ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 87 |
| УЧАСТИЕ И ДОКЛАДВАНЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ..... | 87 |
| КУРСОВЕ И СПЕЦИАЛИЗАЦИИ ПО НАУЧНАТА СПЕЦИАЛНОСТ | 88 |
| УЧАСТИЕ В НАУЧНО- ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ..... | 89 |

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

| Съкращение | Пълно наименование |
|------------|--|
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| CLR | Crohn-like lymphoid reaction |
| СК АЕ1/АЕ3 | Панцитокератин |
| dMMR | deficient mismatch repair |
| ECIS | European Cancer Information System |
| EMVI | Extramural venous invasion |
| FFPE | Formalin-fixed paraffin-embedded |
| H&E | Hematoxylin and Eosin |
| IMVI | Intramural venous invasion |
| ITBCC | International Tumor Budding Consensus Conference |
| КРК | Колоректален карцином |
| LVI | Lymphovascular invasion |
| MMR | Mismatch repair |
| NGS | Next-generation sequencing |
| PNI | Perineural invasion |
| pMMR | proficient mismatch repair |
| PTB | Peritumoral budding |
| ROC | Receiver Operating Characteristic |
| SPSS | Statistical Package for the Social Sciences |
| TNM | Tumor, Node, Metastasis класификация |
| WHO | World Health Organization |

В „Digestive System Tumours - 5th ed.“ на „WHO classification of tumours series“ аденокарциномите на дебелото черво и ректума са определени като втори по честота при жените и трети по честота при мъжете злокачествени заболявания. Поставя се акцент и върху нарастване на честотата на колоректалните карциноми в по-млада възраст.

Актуалните данни на European Cancer Information System (ECIS) за България за 2022 г., показват очаквани нови случаи на заболели от карциноми на колон и ректум – 5086 и смъртни случаи от колоректални карциноми за същата година – 2759. Това поставя тези неоплазми на първо място по заболяемост и на второ място като причина за смъртност от злокачествени заболявания и при двата пола.

Данните за Европейския съюз демонстрират изразени диспропорции по отношение на общите грижи, касаещи раковите заболявания. Те се изразяват както в различия вътре в самите страни, така и между отделните държави. В рамките на ЕС, само България и Румъния не са разработили или са в начален стадий на разработване на скринингови програми за карциномите на колон и ректум. В страните с действащи профилактични програми за КРК са обхванати от 4% (за Кипър) до 76% (за Дания) от пациентите.

Преодоляването на тези различия в дългосрочен план изисква: подобро здравно образование и обучение, изисквания за продължителна квалификация на медицинския персонал, иновации, свързани с ранно откриване, диагностика и терапия на раковите заболявания. Трябва да се отчитат и обществените нагласи при разработването на националните програми за контрол на злокачествените заболявания, изграждането на базите данни за адекватно оценяване на грижите за раковоболните.

Очаква се към 2035 г. смъртността от злокачествени заболявания да надвиши смъртността от сърдечносъдови заболявания. Това налага насочване на вниманието на обществото като цяло, и в частност на здравните специалисти от различни нива и научни области, върху различните аспекти на немедицинските и медицинските грижи, свързани с КРК – профилактика, ранна, прецизна и съвременна диагностика, персонализирано лечение с използване на съвременни научни подходи за предвиждане и прогнозиране на очакваните потенциални ефекти при конкретните пациенти, финансово и друго подпомагане на пациентите и техните семейства.

Значимостта и относителният дял, който заема колоректалния карцином по отношение на заболяемост и смъртност в глобален и национален мащаб, определиха насоките на нашите научни интереси и практически усилия в рамките на настоящото проучване.

ЦЕЛ

Да се проучат МОРФОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ, ТУМОРНО ПЪПКУВАНЕ И ИМУННА СТРОМНА РЕАКЦИЯ И ЗАВИСИМОСТ ОТ МУТАЦИОННИЯ ПРОФИЛ НА КОЛОРЕКТАЛНИТЕ КАРЦИНОМИ С ЛЯВА И ДЯСНА ЛОКАЛИЗАЦИЯ.

ЗАДАЧИ

1. Целенасочено проучване, анализ и оценка на определени аспекти на епидемиологичните данни на пациентите – пол, възраст, първична туморна локализация - десностранни, левостранни и ректални; хистоморфологична оценка и описване на характеристиките на КРК - хистологичен субтип, туморен грейдинг, патологично стадиране и др.

2. Хистоморфологична оценка и анализ на лимфоваскуларната и периневралната инвазия; на статуса на лимфните възли и на конкретни характеристики на перитуморната стромна имунна реакция.

3. Изследване, морфологична оценка, градиране и анализ на перитуморното пъпкуване (РТВ):

- Подзадача 3А - в ендоскопски колоректални биопсии и определяне на факторите, които повлияват този процес.

- Подзадача 3В - в резекционен материал с КРК.

4. Изследване, оценка и анализ на MMR туморен статус в резекционни материали от КРК.

5. Изследване и анализ на някои най-чести мутации на колоректалните карциноми в конкретната извадка пациенти.

ИЗВАДКА ПАЦИЕНТИ

Това изследване е проведено ретроспективно и включва две групи пациенти, селектирани както следва:

Първа група – Подзадача №3А – ендоскопски материали от колоректален карцином:

Осъществихме случаен ретроспективен подбор на 100 пациента с колоректален карцином, диагностициран чрез ендоскопско изследване за периода – 2020 – 2022 г.

Материалите са предоставени от архива на Отделението по обща и клинична патология към УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен.

Подборът е извършен съгласно предварително дефинирани критерии за включване и изключване - Таблица 1.

| Критерии за подбор на пациенти – Подзадача №3А | |
|--|---|
| Критерии за включване в проучването | Критерии за изключване от проучването |
| Пациенти с първичен КРК | Метастази в дебелото или правото черво от други първични тумори (по клинични данни) |
| Предоперативна ендоскопска биопсия | Проведена предоперативна терапия |
| | Други първични колоректални тумори, различни от КРК |
| | Рецидив на КРК |
| | Биопсичен материал получен с друг метод, освен ендоскопия |
| | Биопсични материали с риск от изчерпване |

Таблица 1. Критерии за подбор и включване на пациенти в първи етап на проучването - Подзадача №3А.

Втора група – Подзадача №3В – резекционни материали от колоректален карцином:

Осъществихме случаен ретроспективен подбор на 100 пациента с доказан постоперативно, върху резекционен материал, колоректален аденокарцином в периода 2020 – 2023 г.

Материалите са предоставени от архива на Отделението по обща и клинична патология към УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен.

Подборът е извършен съгласно предварително дефинирани критерии за включване и изключване – Таблица 2.

| Критерии за подбор на пациенти – Подзадача №3В | |
|---|---|
| Критерии за включване в проучването | Критерии за изключване от проучването |
| Пациенти с първичен КРК | Метастатични тумори на дебело или право черво |
| Биопсичен резекционен материал с карцином на колон и ректум | Невроендокринни тумори/карциноми |
| Малка група пациенти, подложени на предоперативна лъчетерапия или химиотерапия, са включени целенасочено в проучването. | Доброкачествени тумори |
| | Мезенхимни тумори |

Таблица 2. Критерии за подбор и включване на пациенти във втори етап на проучването - Подзадача №3В.

Всички пациенти са предоставили писмено информирано съгласие в съответното болнично звено.

Проучването е проведено в съответствие с Декларацията от Хелзинки и е одобрено от Етичната комисия на Медицински университет – Плевен, протокол № 50/1 май 2020 г. и ОН: 635- КЕНИД/6 ноември 2020 г. преди неговото започване.

Данните на пациентите са анонимни и са използвани без идентифицираща информация.

Събраните данни – пол, възраст, локализация на тумора, хистологичен тип и степен на диференциация, туморен бъдинг, причини за невъзможност за отчитане и всички допълнителни параметри са обобщени и записани в създадена за целта протоколна форма.

МЕТОДИ

В зависимост от типа на провежданите изследвания използвахме и прилагаме различни методи, съобразно спецификата на всяка конкретна задача, а именно:

ПО ЗАДАЧА №1:

- Анализ на медицинската документация за определяне на нужните за нашето проучване епидемиологични данни на пациентите – пол и възраст.
- Анализ на медицинската документация на пациентите, както и макроскопска оценка на резекционните биопсични материали за определяне на първичната туморна локализация в колон и ректум.
- Хистологично изследване на биопсични материали за определяне на хистологичния субтип на туморите и туморния грейдинг.

ПО ЗАДАЧА №2:

- Анализ и оценка на лимфоваскуларна инвазия (LVI).

В клиничните препоръки на CAP се посочва необходимостта от оценка и съобщаване поотделно на:

- Инвазия на малки съдове – отговаряща на ангажиране на лимфни съдове, капиляри, посткапилярни венули:
- Инвазия на големи съдове, отговаряща на венозна инвазия - интра и екстрамурална (IMVI и EMVI).

Характеристиките на тези типове инвазия, начинът за хистологична оценка и прогностичната им стойност са отразени в Таблица 3:

| IMVI и EMVI – характеристики и прогностична стойност | | |
|--|---|---|
| Параметър | IMVI (Intramural venous invasion) | EMVI (Extramural venous invasion) |
| Анатомична дефиниция | Венозна инвазия в стената: субмукоза и/или muscularis propria | Венозна инвазия извън muscularis propria, в периколична или периректална мастна тъкан |

| | | |
|--|--|---|
| Обща прогностична тежест | Неблагоприятен фактор, но с по-нееднозначна и по-слаба прогностична стойност | Добре установен независим неблагоприятен прогностичен фактор |
| Независим прогностичен фактор | Доказателствата са ограничени и непоследователни между проучванията | Доказан в множество мултивариантни анализи |
| Асоциация с метастази | Налице, но по-слаба и вариабилна | Силна асоциация с метастазиране по кръвен път, особено с чернодробни метастази |
| Клинично значение | Допълнителна прогностична информация, особено при ранни стадии (pT1) | Ключов белег за рисковата стратификация и терапевтични решения |
| Диагностични белези | По-трудна за оценка; често изисква оцветяване с еластика. Отчита се най-дълбокото ниво на венозна инвазия. | Пространства, покрити с ендотел, с разпознаваем гладкомускулен слой и/или еластична ламина. Orphan artery и protruding tongue; оцветяването с еластика увеличава детекцията. Добре ограничени туморни нодули, обградени от еластична ламина при оцветяване с хематоксилин-еозин (H&E) или еластика, също се считат за венозна инвазия. Отчита се най-дълбокото ниво на венозна инвазия. |
| Метод за оценка използван в нашето проучване | Изследване на оцветени с H&E препарати | Изследване на оцветени с H&E препарати |

Таблица 3. Характеристики на IMVI и EMVI, начин на хистологична оценка и прогностична стойност.

- Анализ и оценка на периневрална инвазия (PNI).

През 2009 г. Leibig et al. предлагат следното определение за PNI: тумор в непосредствена близост до нерв и ангажиращ най-малко 33% от неговата обиколка или туморни клетки, разположени във всеки от трите слоя на нервната обвивка.

Miyashita et al. изследват интрамуралната перинеурална инвазия, локализирана около Plexus nervosus myentericus (Auerbach). Те определят този начин на туморно разпространение като хоризонтален интрамурален миентеричен път на инвазиране, независимо от наличните други белези на PNI.

В нашето проучване използвахме следния подход при оценката на хистологичните препарати:

- оцветяване с H&E;
- тумор в непосредствена близост до нерв ангажиращ най-малко 33% от неговата обиколка;
- туморни клетки, разположени във всеки от трите слоя на нервната обвивка епиневриум, периневриум, ендоневриум;
- за перинеурална инвазия приемахме инвазията в plexus nervosus myentericus (Auerbach)
- отразяване в TNM стадирането – PNI+/-
 - Анализ и оценка на статуса на лимфните възли (N)

В TNM Classification of Malignant Tumours 8th ed., издадена през 2017 г., са определени N категориите за метастатичните лимфни възли при колоректалните карциноми. Осъвременен вариант е публикуван в AJCC 8th ed. и WHO Classification of Tumours Online (BlueBooks).

Алгоритъмът за оценка на N статуса на КРК изисква:

- Описване на общия брой лимфни възли;
- Хистоморфологично изследване най-малко на 12 лимфни възела;
- Позитивни лимфни възли извън регионалния басейн се определят като далечни метастази – например илиачни лимфни възли при карцином на ректосигмоидна област се определят като M1A.
 - Микрومتастази – наличие на 10 до 20 туморни клетки и диаметър ≥ 0.2 mm., като е препоръчително те да се включват към стандартните позитивни лимфни възли.
 - Наличие на микрومتастази ≤ 0.2 mm ги определя като N0 (i+)

При оценката на лимфните възли в нашата кохорта от пациенти се придържахме към горепосочения алгоритъм за оценка на N статуса при пациентите с КРК. Ретроспективният характер на изследването наложи известни ограничения, свързани с наличните биопсични протоколи и по-конкретно – описания брой регионални лимфни възли.

- Туморни депозити (ТД) – туморните депозити се дефинират като

отделни туморни възли в зоната на лимфния дренаж на първичния карцином, без наличие на разпознаваема лимфна тъкан, съдова или нервна структура.

Алгоритъм за определяне на туморните депозити:

- За оценката на туморните депозити използвахме стандартно оцветени с Н&Е микроскопски препарати.
- Внимателно изключихме наличието на перитуморна лимфоидна тъкан, капсула, маргинален синус, ендотел, еластична мембрана, гладкомускулна стена, периферен нерв.
- Определихме общия брой на туморни депозити.
- Стадирахме наличните туморни депозити съгласно TNM- класификацията.
 - Анализ и оценка на конкретни характеристики на перитуморната

стромна имунна реакция

Терминът Crohn-like lymphoid reaction или CLR е въведен за пръв път през 1990 г. от Graham и Appelman за обозначаване на дискретни лимфоидни агрегати, локализирани обикновено в muscularis propria или в периколичната мастна тъкан, извън границите на инвазивния туморен фронт. Морфологичният спектър на CLR варира от дискретни лимфоцитни агрегати до добре формирани лимфни фоликули с ясно дефинирани герминативни центрове (третични фоликули).

Методът на Graham и Appelman класифицира CLR в три степени: „интензивна“ – с повече от 3 агрегата и поне 1 от тях да е с герминативен център – Grade 2; „лека“ – 2 или по-малко агрегата – Grade 1 и „липсваща“ – липсват лимфоцитни агрегати – Grade 0.

В нашето проучване, поради лесната приложимост и липсата на необходимост за прилагане на морфометрични параметри, предпочетохме използването на оригиналния метод на Graham и Appelman с описаните по-горе степени: „intense or marked“, „mild“ и „absent“, като оценката се извършваше в близост до, но не и в инвазивния туморен фронт.

ПО ЗАДАЧА №3:

- Анализ и оценка на перитуморния бъдинг (Peritumoral budding, PTB)

Оценката на перитуморния бъдинг е извършена върху Н&Е препарати, съгласно алгоритъма на ITBSS. Сканирани са десет полета с обектив с увеличение 10× за идентифициране на инвазивния фронт и hotspot зоната. PTB е преброен в hotspot зоната с обектив 20×, като резултатът е разделен на нормализиращ фактор за изчисляване на броя на пъпките в площ 0.785 mm² (в конкретния случай нормализиращият фактор е 0.810).

Отчитане и класификация по групи:

Vd1 (нисък): 0 – 4 туморни пъпки;

Vd2 (междинен): 5 – 9 туморни пъпки;

Vd3 (висок): ≥ 10 туморни пъпки.

ИХХ за СК е използвана за единични биопсични материали с демонстрационна цел.

ПО ЗАДАЧА №4:

- Имунохистохимично изследване на MMR статус и панцитокератин (СК AE1/AE3)

Изследвани са туморни резекционни препарати и ендоскопски биопсии, фиксирани в 10% буфериран формалин и включени в парафин (FFPE).

Имунохистохимичните изследвания са проведени автоматизирано, чрез Dako Agilent Autostainer Link 48, с визуализационна система EnVision FLEX, High pH (Link), HRP Rabbit/Mouse (K800021-2). Епитопната демаскировка (HIER) е извършена в DAKO PT Link (PT100/PT101).

– Изследвани са MMR протеините и панцитокератин (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, СК AE1/AE3)

– MMR статусът е определен чрез имунохистохимично изследване на четирите основни протеина на mismatch repair системата с готови за употреба (ready-to-use) моноклонални антитела на Dako/Agilent.

Оцветяването за MMR се оценява само по ядрена експресия в туморните клетки.

Контроли:

Вътрешни позитивни контроли: нормална колоректална мукоза, стромални клетки и лимфоцити върху същия срез.

Външни негативни контроли: съгласно комплекта на производителя.

Критерии за интерпретация:

– pMMR (запазена експресия): ядрено оцветяване в $>10\%$ от туморните клетки при позитивни вътрешни контроли.

– dMMR (липса на експресия): липса на ядрено оцветяване в туморните клетки при запазена експресия в контролните клетки.

Субклонална експресия не е анализирана.

При dMMR случаи е извършена корелация между липсващите протеини и мутационния профил (NGS) с цел оценка на вероятност за Lynch синдром, без провеждане на допълнителни молекулярни тестове.

Прилагахме класическия алгоритъм за изследване с четири антитела- MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 за MMR дефицит.

– Имунохистохимично изследване на СК АЕ1/АЕ3 в ендоскопски биопсични материали:

При ендоскопски биопсии е приложено имунохистохимично изследване за доказване на епителен произход чрез панцитокератин, като използваното стандартизирано готова за употреба антитяло.

Позитивната реакция се отчита като дифузно цитоплазмено и/или мембранно оцветяване в епителни/туморни клетки, използвано като потвърждение на карциномна епителна диференциация в малки биопсични фрагменти.

ПО ЗАДАЧА №5:

- Методи на генетичен анализ

Генетичният анализ е извършен и анализиран от екипа на Научноизследователска лаборатория за прецизна и геномна медицина на Център за компетентност по персонализирана медицина, 3D и телемедицина, роботизирана и минимално инвазивна хирургия „ Леонардо да Винчи“ при МУ гр. Плевен. Използвана е Next-Generation Sequencing (NGS) технология.

Предоставени са представителни туморни блокчета от формалин фиксиран и парафин включен материал (FFPE), получени след оперативна резекция. Извличането на ДНК е извършено съгласно протоколите на производителя на използвания NGS панел.

Използван е TruSight Tumor 15 панел (Illumina Inc., San Diego, USA), който обхваща анализ на мутации в 15 ключови гена, свързани с онкогенезата:

AKT1, BRAF, EGFR, ERBB2 (HER2), FOXL2, GNA11, GNAQ, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET, TP53.

Секвенирането е проведено на платформа Illumina NextSeq 550, съгласно указанията на производителя.

Интерпретацията на резултатите е извършена от специалисти по медицинска генетика и медицинска биоинформатика, като са отчитани клинично значимите варианти.

Проведен е допълнителен анализ при dMMR случаи

При случаите с дефект в mismatch repair (dMMR) е направена корелация между:

- липсващите MMR протеини (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6),
- установените мутации,

– вероятността за наличие на Lynch синдром.

В рамките на проучването не са извършвани допълнителни генетични тестове за потвърждаване на Lynch синдром, като изследователският екип не е повлиявал диагностично-терапевтичния процес.

- Статистическа обработка на генетичните данни

Данните от генетичните изследвания са обработени със софтуер и с методи описани в следващата секция.

Статистически анализ на получените резултати

Резултатите получени при изпълнението и отчитането на всяка една от гореизброените задачи бяха обработени статистически с помощта на IBM SPSS Statistics v24.0 (Chicago, Illinois, USA).

Получените от нас сурови данни са представени основно като категориални променливи (локализация на тумора, хистологичен тип, степен на диференциация, стадий, LVI, PNI, MMR статус, степен на туморен бъдинг, имунна реакция, наличие на мутации) и непараметрични количествени показатели (възраст).

За оценка на връзките между тези категориални променливи е използван χ^2 (Chi-square) тест за независимост. При таблици с малки очаквани стойности е прилагана Monte Carlo апроксимация на χ^2 теста. Стойности на $p < 0.05$ са приемани за статистически значими.

При анализ на връзките между категориални променливи освен χ^2 тест за независимост се изчисляваше и коефициентът на Cramer's V за определяне на силата на асоциацията.

За сравнение на количествени показатели между повече от две групи, когато разпределението не отговаря на нормалност, е използван непараметричният тест на Kruskal-Wallis.

В случаите на сравнение на пропорции между две групи (напр. честота на мутации между половете) е използван двупропорционален Z-тест.

Извършена е нормализация на данните при анализ на разпределенията по локализация с цел уеднаквяване на мащабите и избягване на непропорционално влияние на отделни променливи. Нормализацията е извършвана чрез представяне на относителни дялове (проценти) с цел сравнимост между групи с различна численост. Нормалността на разпределението на количествените променливи е оценявана чрез теста на Shapiro–Wilk.

Анализът включва изследване на статистически зависимости между: локализация на първичния тумор и клинично-патологични характеристики – степен на туморен бъдинг и степен/стадий на тумора, LVI, PNI, лимфен статус, перитуморна имунна реакция (Crohn-

like) и останалите прогностични фактори – MMR статус, хистологичен тип, мутационен профил.

Този статистически подход позволява оценка на асоциативни зависимости между морфологични, имунологични и генетични параметри, но поради ретроспективния характер на проучването и размера на извадката не е прилаган многовариантен регресионен анализ.

При 2×2 контингентни таблици с ниски очаквани честоти се прилагаше точният тест на Fisher, а при по-големи таблици – Monte Carlo апроксимация. Допълнително за Aggressive Score бе използван логистичен регресионен анализ и проведен ROC-анализ за оценка на дискриминативната способност (описан в Приложение 1).

Проведен е и описателен статистически анализ, като категориалните променливи са представени чрез абсолютни честоти и относителни дялове (%), а количествените показатели чрез медиана и интерквартилен диапазон.

РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗВЪРШЕНИТЕ ПРОУЧВАНИЯ

В настоящия раздел представяме резултатите от проведеното от нас проучване, които са публикувани в научни статии в рецензирани списания.

Изследвани са две отделни пациентски кохорти, съобразно целите и задачите на нашето проучване.

ПЪРВА ПАЦИЕНТСКА ИЗВАДКА

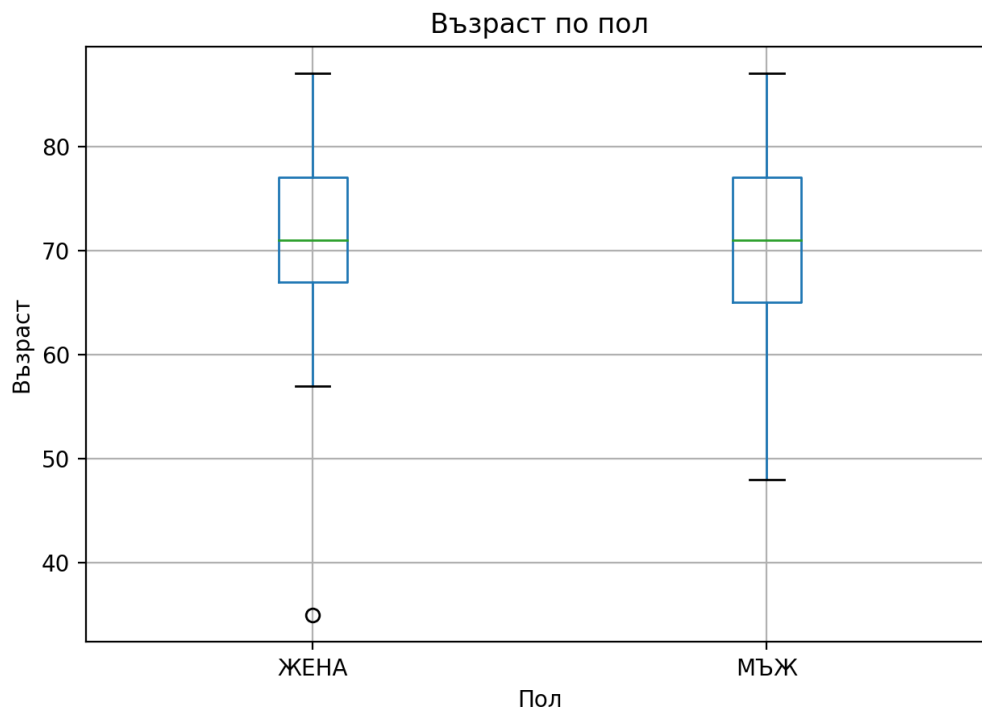
При първата пациентска извадка проведохме изследване, морфологична оценка, градиране и анализ на перитуморното пъпкуване (РТВ) в ендоскопски колоректални биопсии и определихме факторите, които повлияват този процес.

Резултатите, които отчетохме при тази група пациенти с колоректален карцином, доказан чрез ендоскопски биопсии, са както следва:

ПО ЗАДАЧА №1:

Разпределение по пол в извадката пациенти е (n, %): МЪЖ: 63 (63.0%) ; ЖЕНА: 37 (37.0%);

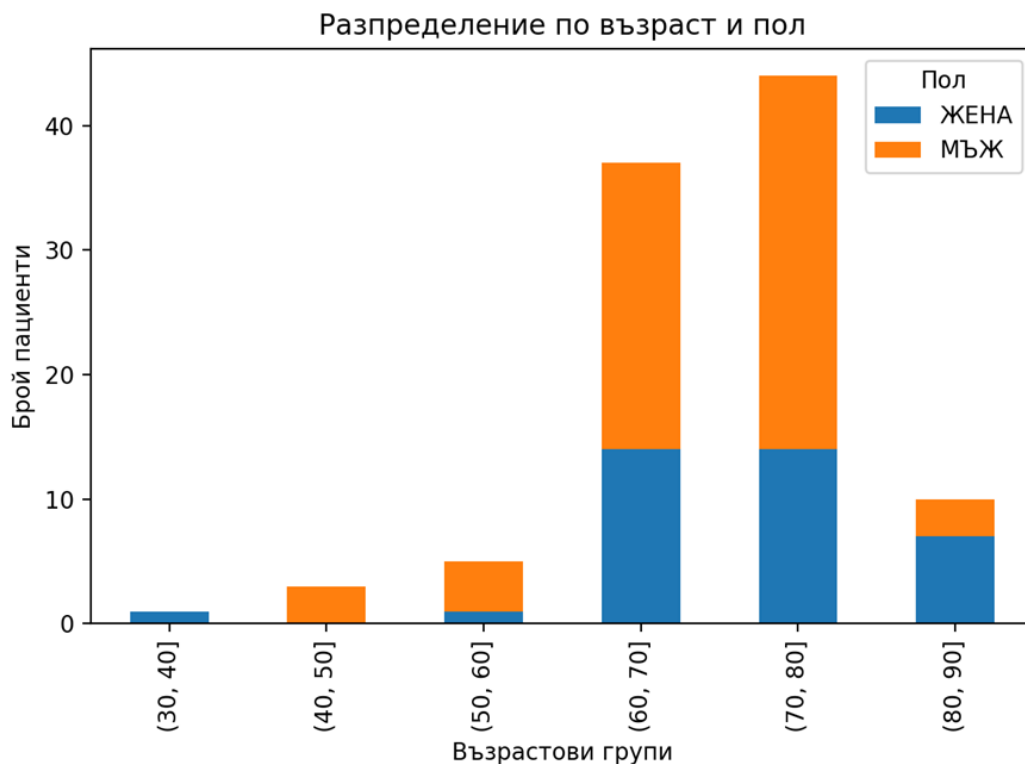
Разпределение на пациентите по пол и възраст – Фигура 1:



Фигура 1. Разпределение на пациентите по пол и възраст.

Средна възраст: 70.9 ± 9.1 ; медиана 71.0 (IQR 65.0 – 77.0). В изследваната група най-младата пациентка е на 35 години, а най-възрастната – на 87 години. Наличието на единични пациенти в по-ниските възрастови групи (1 пациентка 30 – 40 г.; 2 пациенти 40 – 50 г. – общо 3 пациента под 50 г.) не променя съществено средната възраст, поради силната концентрация на случаи в интервала 60 – 80 години, което се потвърждава от медианата и интерквартилният размах.

Във всяка възрастова група половото разпределение на пациентите беше следното – Фигура 2:

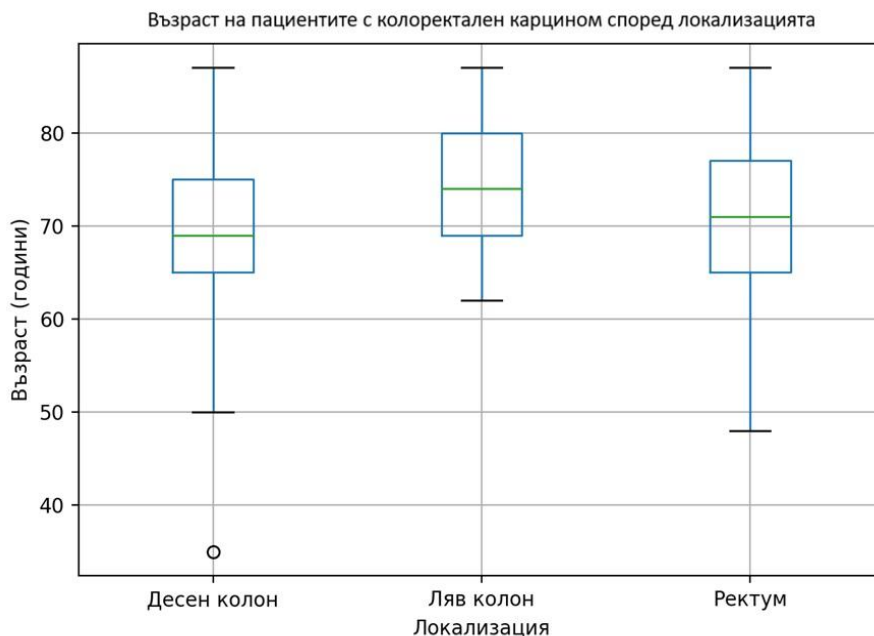


Фигура 2. Разпределение по пол в различните възrastови групи.

Първичната локализация на туморите в ляв колон, десен колон и ректум е съответно: (n = 100)

- Ляв колон: 24 (24.0%)
- Десен колон: 29 (29.0%)
- Ректум: 47 (47.0%)

На Фигура 3 е отразено разпределението на пациентите според възраст и локализация на тумора. Вохplot анализът показва най-висока медианна възраст при туморите на левия колон и най-широк възrastов диапазон при десностранните карциноми. Въпреки това, липсва статистически значима разлика при Kruskal-Wallis теста. (Kruskal-Wallis H = 4.21, df = 2, p = 0.122)



Фигура 3. Възрастово разпределение на пациентите според първичната локализация на аденокарциномите на ляв, десен колон и ректум.

Разпределението на карциномите съобразно локализацията – ляв колон, десен колон и ректум, пол и възраст е както следва – Таблица 6:

| Локализация | Пол | n | Мин. | Макс. | Средна | Медиана |
|-------------|------|----|------|-------|--------|---------|
| Десен колон | ЖЕНА | 15 | 35.0 | 87.0 | 67.9 | 68.0 |
| Десен колон | МЪЖ | 14 | 50.0 | 80.0 | 69.5 | 71.0 |
| Ляв колон | ЖЕНА | 8 | 64.0 | 85.0 | 76.9 | 78.5 |
| Ляв колон | МЪЖ | 16 | 62.0 | 87.0 | 72.8 | 72.0 |
| Ректум | ЖЕНА | 14 | 61.0 | 87.0 | 73.3 | 72.0 |
| Ректум | МЪЖ | 33 | 48.0 | 86.0 | 69.4 | 71.0 |

Таблица 6. Анализ по възраст, пол и локализация.

Карциномите на десен колон са със сравнително равномерно разпределение по пол и са с най-широк възрастов диапазон. Тук попада и най-младият пациент от извадката. Хетерогенността на туморите на десен колон ясно личи от начина на разпределение в тази група. Туморите на ляв колон се срещат при по-възрастни пациенти, особено при жените, които формират най-възрастната подгрупа в изследването. Ректалните карциноми

показват ясно превалиране при мъжете, като мъжете са с по-ниска минимална възраст. Това отговаря на епидемиологичните данни за ректалния карцином.

Резултатите от анализа на статистическите данни са следните:

Kruskal-Wallis тест (възраст × локализация)

Непараметричният тест на Kruskal-Wallis не показва статистически значима разлика във възрастта между пациентите с тумори на десния колон, левия колон и ректума – Kruskal-Wallis $H = 4.21$, $df = 2$, $p = 0.122$; $p > 0.05$.

χ^2 тест (пол и локализация)

χ^2 анализът не установи статистически значима връзка между пола и анатомичната локализация на тумора – $\chi^2 = 3.885$; $df = 2$; $p = 0.1434$; $p > 0.05$. Силата на асоциацията измерена чрез Cramer's V е 0.197, което показва слаба асоциация между пола и локализацията на тумора. Въпреки по-честото засягане на ректума при мъжете, тази разлика не достига статистическа значимост.

Mann-Whitney U тест (възраст и пол по локализация)

При сравнение на възрастта между мъже и жени в рамките на всяка анатомична локализация не се установиха статистически значими разлики: десен колон (Mann-Whitney $U = 27.5$, $p = 0.8318$; мъже $n = 12$, жени $n = 5$), ляв колон, включително colon transversum ($U = 137.0$, $p = 0.7483$; мъже $n = 16$, жени $n = 16$) и ректум ($U = 187.5$, $p = 0.3163$; мъже $n = 33$, жени $n = 14$). Това позволява обединяване на половете при последващи анализи без риск от системно изкривяване.

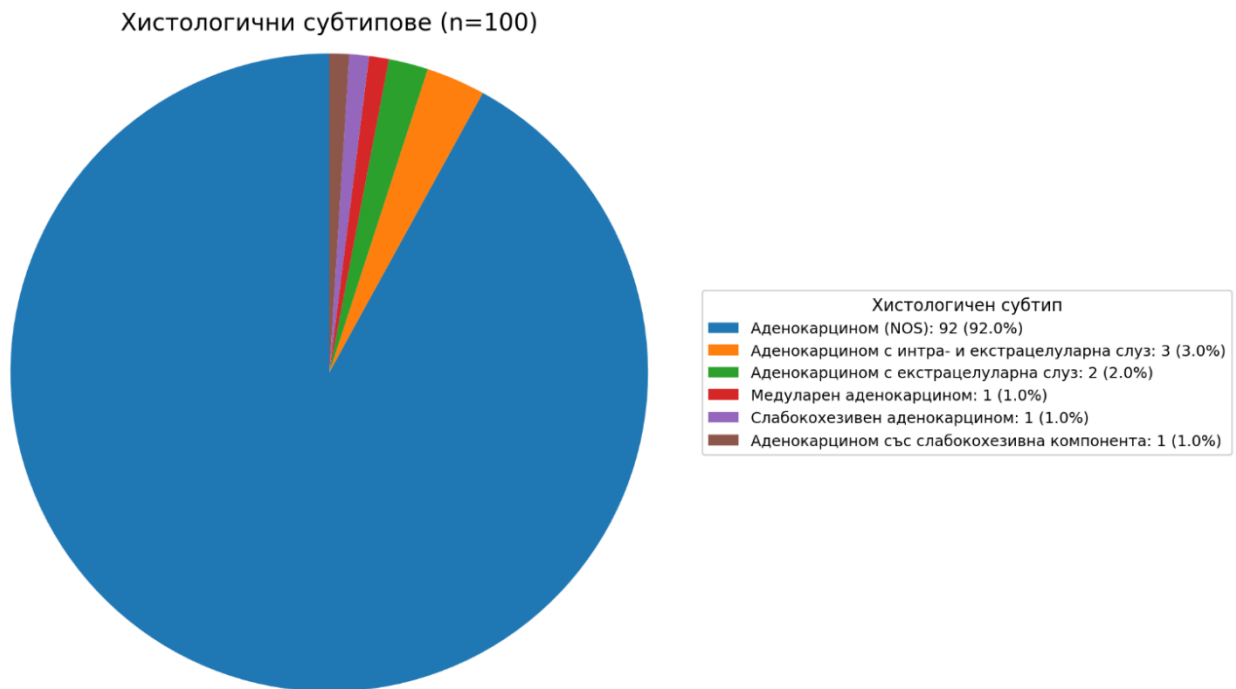
Според хистологичния грейдинг се наблюдава преобладаване на умерено диференцирани тумори в изследваната група (G2) – 73 пациенти (73%), следван от високостепенните тумори (G3) – 17 пациенти (17%) и нискостепенните тумори (G1) – 10 пациенти (10%), без статистически значима разлика между ляв колон, десен колон и ректум.

Разпределението на туморите според техния грейд и локализацията е отразено в Таблица 7.

| Туморен грейд | Десен колон | Ляв колон | Ректум |
|---------------|-------------|-----------|--------|
| G1 | 3 | 1 | 6 |
| G2 | 21 | 16 | 36 |
| G3 | 6 | 7 | 4 |

Таблица 7. Разпределението на туморите според техния грейд и локализация.

Анализът на хистологичния субтип показва ясно преобладаване на аденокарцином без специфични характеристики (92%). Останалите случаи включват муцинозни, медуларни и слабокохезивни варианти, всеки от които е представен при малък брой пациенти(8%). При статистически анализ на диференциацията на туморите и възрастта на пациентите не се открива статистически значима разлика – (Kruskal-Wallis $H = 0.79$, $df = 2$, $p = 0.673$). Хистологичните субтипове на изследваните карциноми са отразени в следващата Фигура 4:



Фигура 4. Хистологичните субтипове на изследваните карциноми.

Патологичното стадиране на туморите в тази извадка пациенти е ирелевантно и не е извършвано.

ПО ЗАДАЧА №2:

В тази група пациенти типът на биопсичния материал не позволява и не сме имали за цел изследването на лимфоваскуларна, периневрална и интраневрална инвазия, лимфни възли; и оценка на перитуморната стромна имунна реакция и такива не са извършвани.

ПО ПОДЗАДАЧА №3А

Извършихме изследване и анализ на възможността за морфологична оценка и

градиране на перитуморния бъдинг (РТВ) в ендоскопски колоректални биопсии и определяне на факторите, които повлияват този процес.

Изследването и градирането на перитуморния бъдинг (РТВ) се извършиха по алгоритъма приет от ITBCC, описан в секция „Материали и методи“.

От общата извадка от 100 пациента перитуморният бъдинг беше отчетен само при 12 пациента (12%).

Разпределението на отчетен/неотчетен РТВ в зависимост от различни фактори е отразено на следващите таблици:

Разпределението на отчетен/неотчетен РТВ по пол е отразено на Таблица 8.

| Пол | Отчетен | Неотчетен | Дял отчетен (%) |
|------|---------|-----------|-----------------|
| ЖЕНА | 4 | 33 | 10.8 |
| МЪЖ | 8 | 55 | 12.7 |

Таблица 8. РТВ отчетен/неотчетен разпределен по пол.

Разпределението по пол не показва статистически значима разлика: ($\chi^2 = 0.27$, $df = 1$, $p = 0.603$). Cramer's $V = 0.052$, което показва много слаба асоциация между пола и отчетения туморен бъдинг.

Възрастовото разпределение е като следва от Таблица 9.

| Бъдинг | n | Средна \pm SD | Медиана | IQR | Min–Max |
|-----------|----|-----------------|---------|-----------|---------|
| Неотчетен | 88 | 70.1 \pm 9.1 | 71.0 | 65.0–77.0 | 35–87 |
| Отчетен | 12 | 76.1 \pm 7.9 | 77.0 | 70.8–83.2 | 64–86 |

Таблица 9. Възрастово разпределение на РТВ- отчетен/неотчетен.

Възраст: отчетен vs неотчетен

Статистическият анализ показва – Mann-Whitney $U = 326.0$, $Z = -2.07$, $p = 0.038$. Пациентите с отчетен бъдинг са по-възрастни (медиана 77 г. срещу 71 г.; Mann-Whitney U : $p < 0.05$).

На Таблица 10 е отразено разпределението на отчетен/неотчетен туморен бъдинг според локализацията.

| Локализация | Отчетен | Неотчетен | Дял отчетен (%) |
|-------------|---------|-----------|-----------------|
| Десен колон | 2 | 27 | 6.9 |
| Ляв колон | 3 | 21 | 12.5 |
| Ректум | 7 | 40 | 14.9 |

Таблица 10. Разпределение на отчетен/неотчетен перитуморен бъдинг според локализацията.

По локализация: Статистическото изследване показва, че разликата не е статистически значима ($\chi^2 = 1.11$, $df = 2$, $p = 0.574$; $p > 0.05$). Cramer's V = 0.105, което показва слаба асоциация между локализацията и отчетения перитуморен бърдинг.

На Таблица 11 и Таблица 12 са показани съответно разпределението на отчетения/неотчетения туморен бърдинг според хистологичния субтип и диференциацията на туморите:

| Субтип | Отчетен | Неотчетен | Общо |
|--|---------|-----------|------|
| Аденокарцином | 10 | 82 | 92 |
| Аденокарцином с интра и екстрацелуларна слузопродукция | 1 | 2 | 3 |
| Аденокарцином със слабокохезивна компонента | 1 | 0 | 1 |
| Аденокарцином с екстрацелуларна слузопродукция | 0 | 2 | 2 |
| Медуларен аденокарцином | 0 | 1 | 1 |
| Слабокохезивен аденокарцином | 0 | 1 | 1 |

Таблица 11. Разпределението на отчетения/неотчетения туморен бърдинг според хистологичния субтип.

| Грейд | Неотчетен | Отчетен |
|-------|-----------|---------|
| G1 | 10 | 0 |
| G2 | 64 | 9 |
| G3 | 14 | 3 |

Таблица 12. Разпределението на отчетения/неотчетения туморен бърдинг според туморния грейд (G).

Отчетеният бърдинг се среща най-често при G2, но това отразява доминирането на G2 в кохортата. Няма статистически значима асоциация между грейд и отчетен бърдинг ($\chi^2 = 1.08$, $df = 2$, $p = 0.58$).

От изложените дотук данни и статистически анализ можем да направим следния извод: Възрастта е независим фактор, асоцииран с отчетен туморен бърдинг.

Туморният грейд не корелира нито с възрастта, нито с бърдинга.

Локализацията не модифицира тази връзка значимо.

Няма статистически значима корелация между хистологичен субтип на карциномите и техния грейд и отчитането на перитуморния бърдинг.

Систематизирахме факторите, които определят възможността за отчитането на перитуморния бъдинг в ендоскопските биопсии от КРК на изследваните пациенти по следния начин – Таблица 13:

| Категория на биопсичния материал | Бъдинг неотчетен | Отчетен бъдинг | Общо |
|---|---------------------|-------------------|---------------|
| Оптимални за оценка | 0 (0%) | 10 (10%) | 10 (10%) |
| Технически артефакти затрудняващи оценката* | 55 (55%) | 1 (1%) | 56 (56%) |
| Предизвикателства, свързани с туморните характеристики ** | 33 (33%) | 1 (1%) | 34 (34%) |
| Общо | 88 (88%) | 12 (12%) | 100 (100%) |

Таблица 13. Фактори определящи възможността за отчитане на перитуморния бъдинг.

Легенда:

* Технически артефакти: фрагментиран материал, оскъден биопсичен материал.

** Тумор-свързани характеристики: обширна некроза, липса на инвазивен фронт, ниска или висока степен на диференциация, слабокохезивна морфология, изразено възпаление.

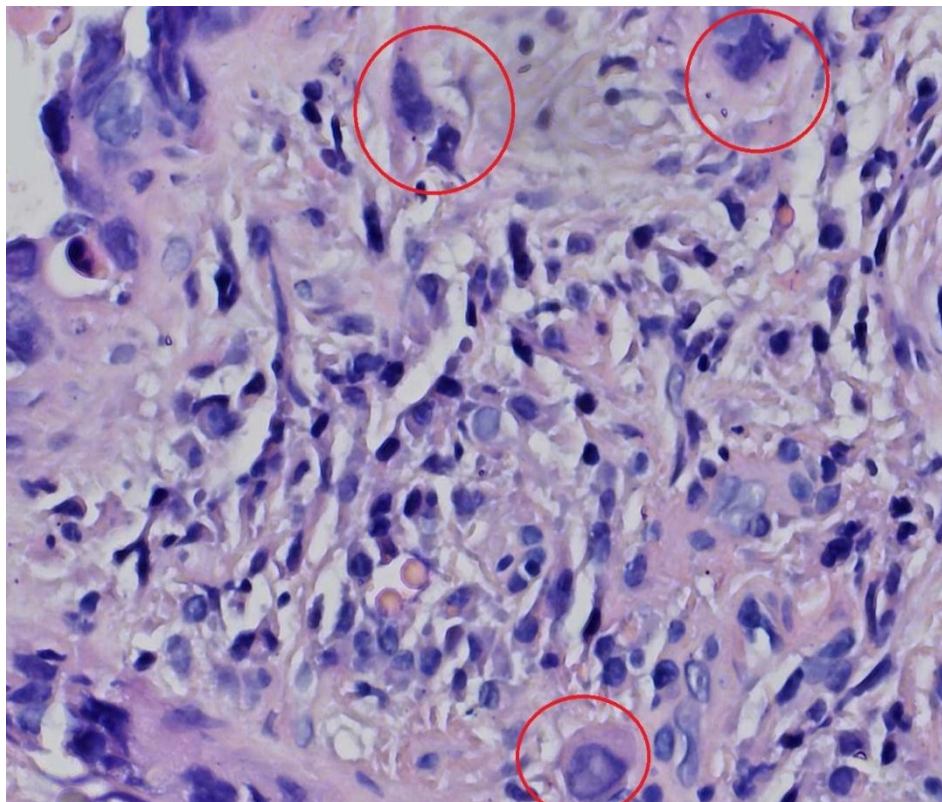
При последващото субдефиниране на факторите, определящи отчитането на туморен бъдинг в ендоскопски биопсии от КРК се получиха следните резултати, отразени в Таблица 14.

| Фактори, влияещи върху оценката на РТВ | BD0 | BD1 | BD2 | BD3 | Общо |
|--|-----|-----|-----|-----|------|
| Оптимален материал | 0 | 3 | 5 | 2 | 10 |
| Липса на инвазивен фронт | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| Високодиференциран тумор | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| Изразено възпаление | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Некроза | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| Нискодиференциран тумор | 7 | 0 | 1 | 0 | 8 |
| Оскъден материал | 12 | 0 | 0 | 0 | 12 |
| Слабокохезивен тумор | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Фрагментиран материал | 43 | 0 | 0 | 1 | 44 |
| Общо | 88 | 3 | 6 | 3 | 100 |

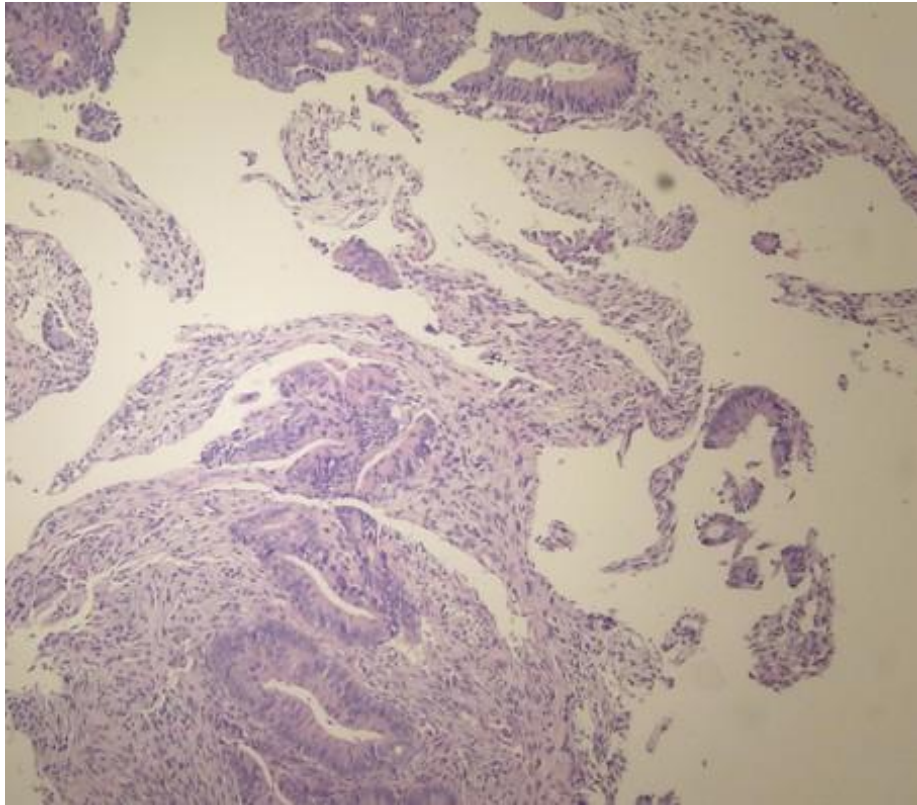
Таблица 14. Фактори повлияващи оценката на РТВ в ендоскопски биопсии от КРК.

Възможност за отчитане на РТВ (BD1 – BD3) се наблюдава само в 12% от случаите (12/100), като в 10/12 това е при наличие на оптимален материал; артефактите или други неблагоприятни туморни характеристики водят до преобладаващ BD0.

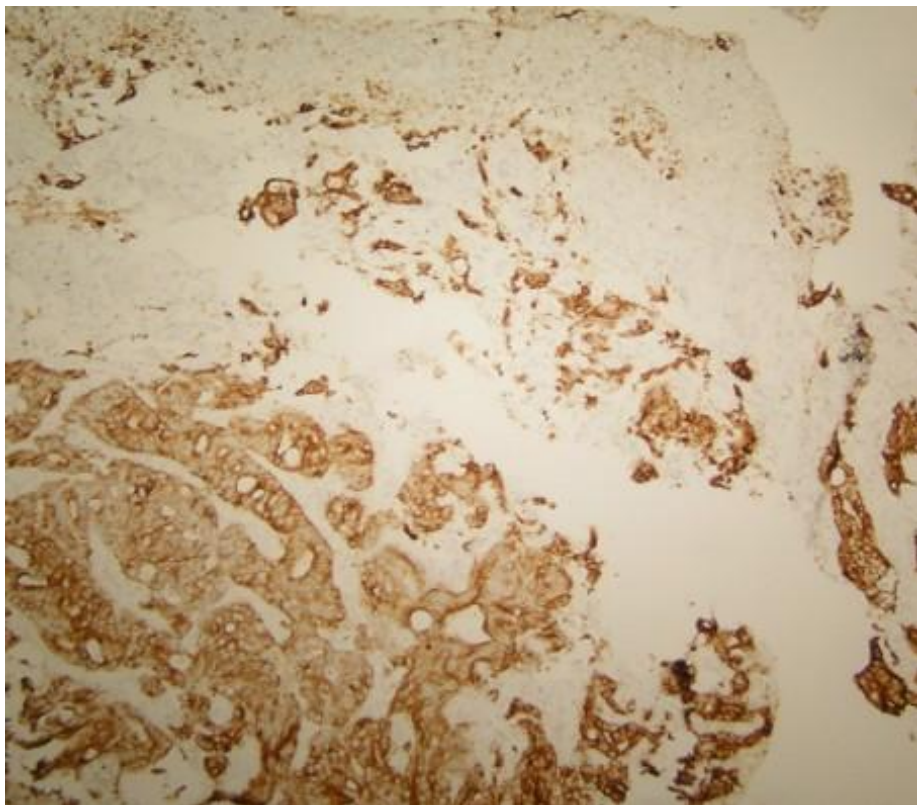
В следващите снимки на микроскопски слайдове представяме основните морфологични модели, които предопределят невъзможността за адекватно отчитане на перитуморен бъдинг в предоперативни ендоскопски биопсии от колоректален карцином – Снимка 1 – 11.



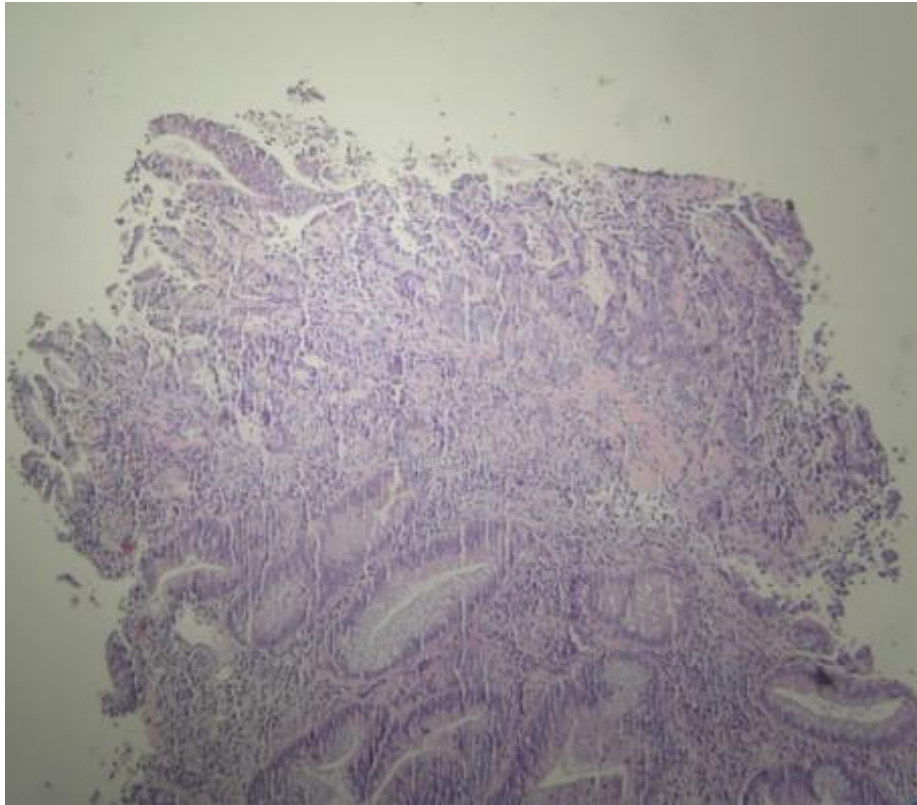
Снимка 1. Туморен бъдинг. оцв. Н&Е; ув. 40х.



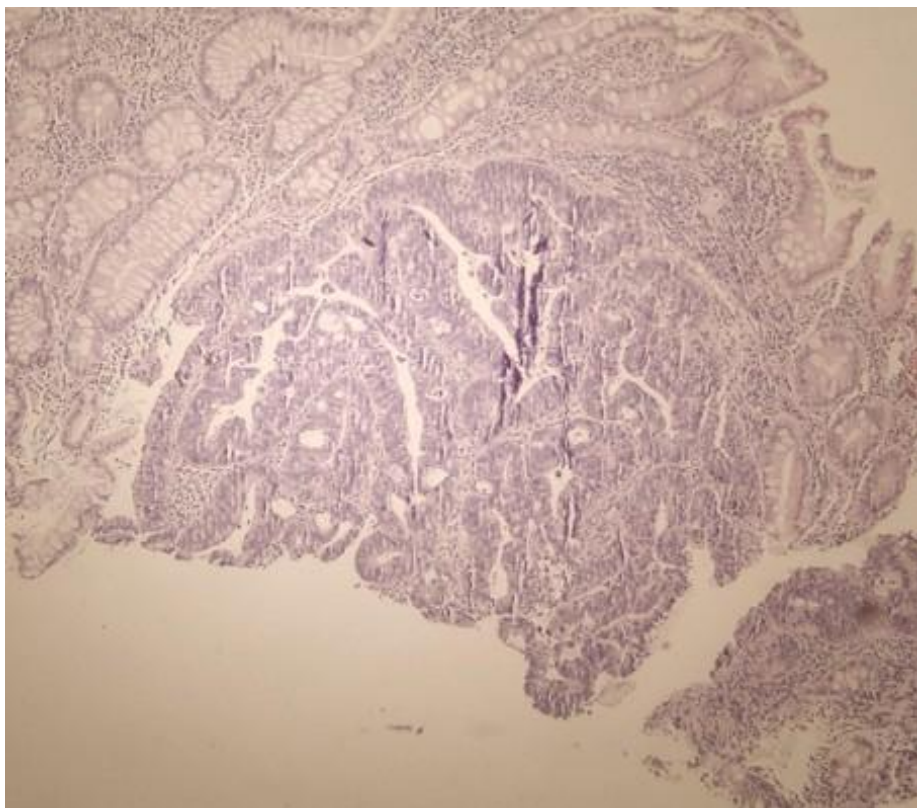
Снимка 2. Микроскопска картина на фрагментиран материал от ендоскопска биопсия с КРК. Невъзможно отчитане на РТВ. оцв. Н&Е; ув. 20х.



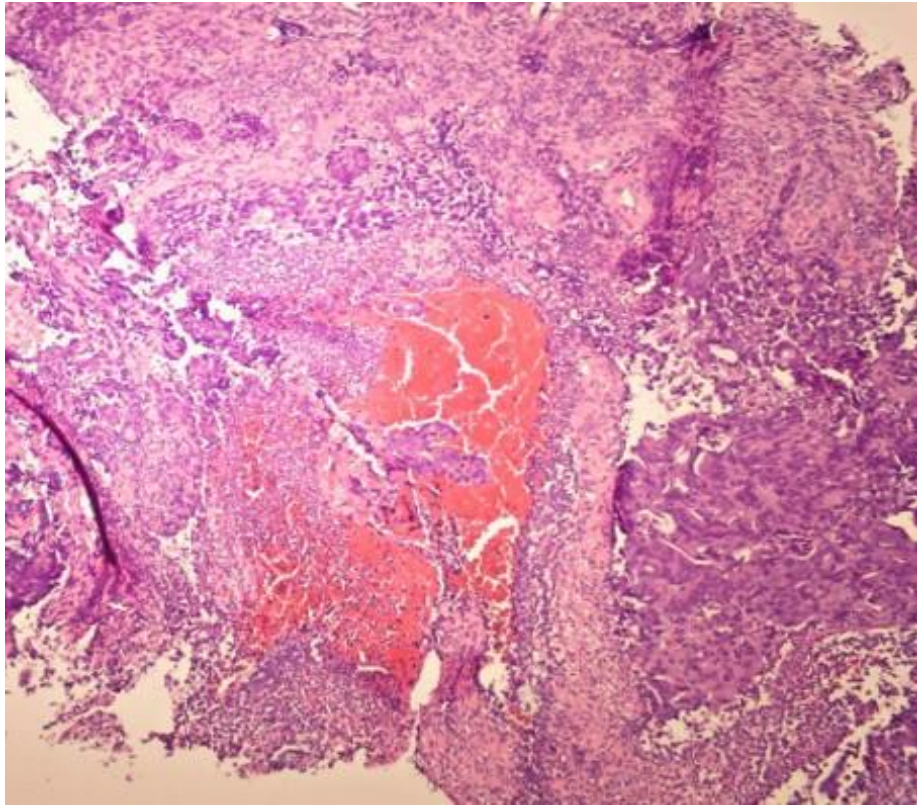
Снимка 3. Фрагментиран материал с некроза. ИХХ СК АЕ1/АЕ3. ув. 20х.



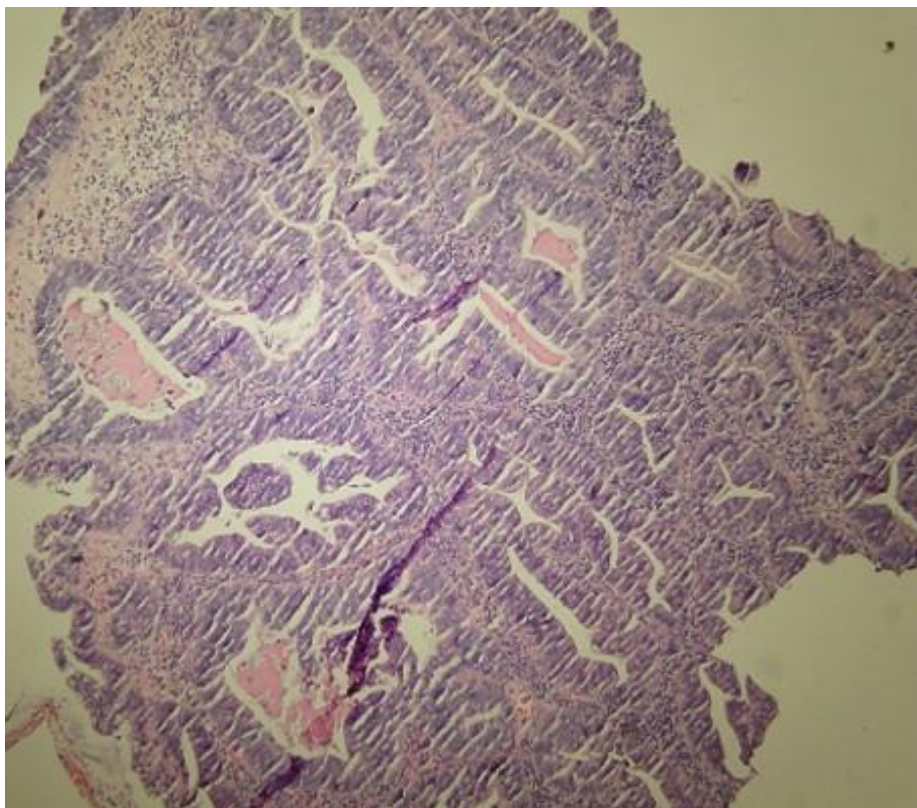
Снимка 4. Оскъден, периферно разположен фрагментиран туморен паренхим. оцв. Н&Е; ув. 20х.



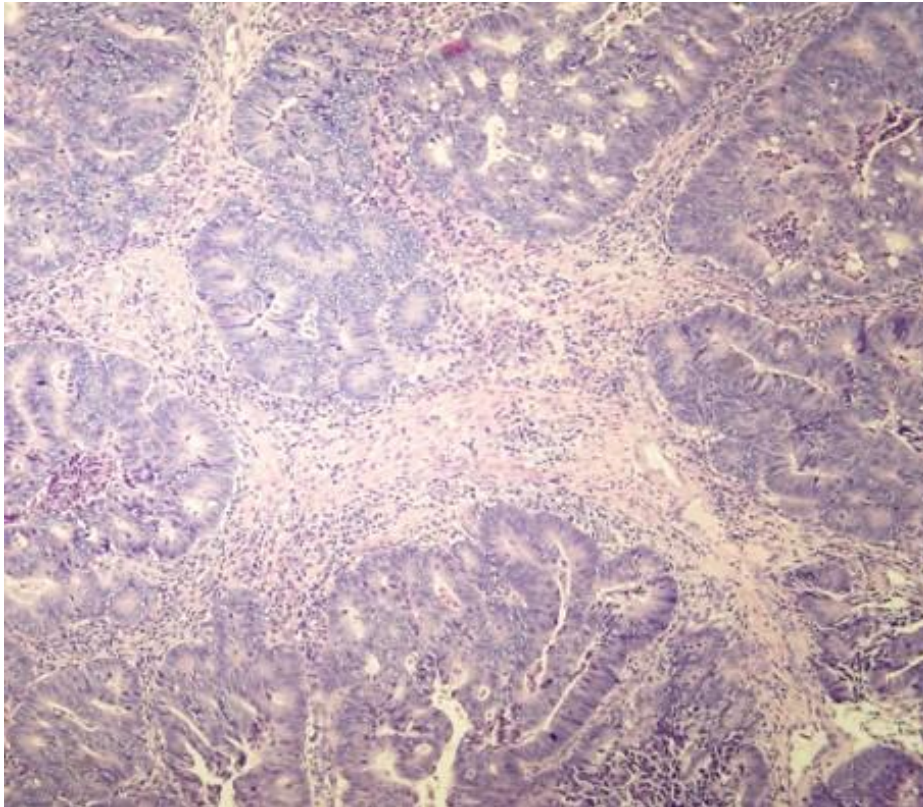
Снимка 5. Оскъден биопсичен туморен материал без инвазивен фронт. оцв. Н&Е; ув. 20х.



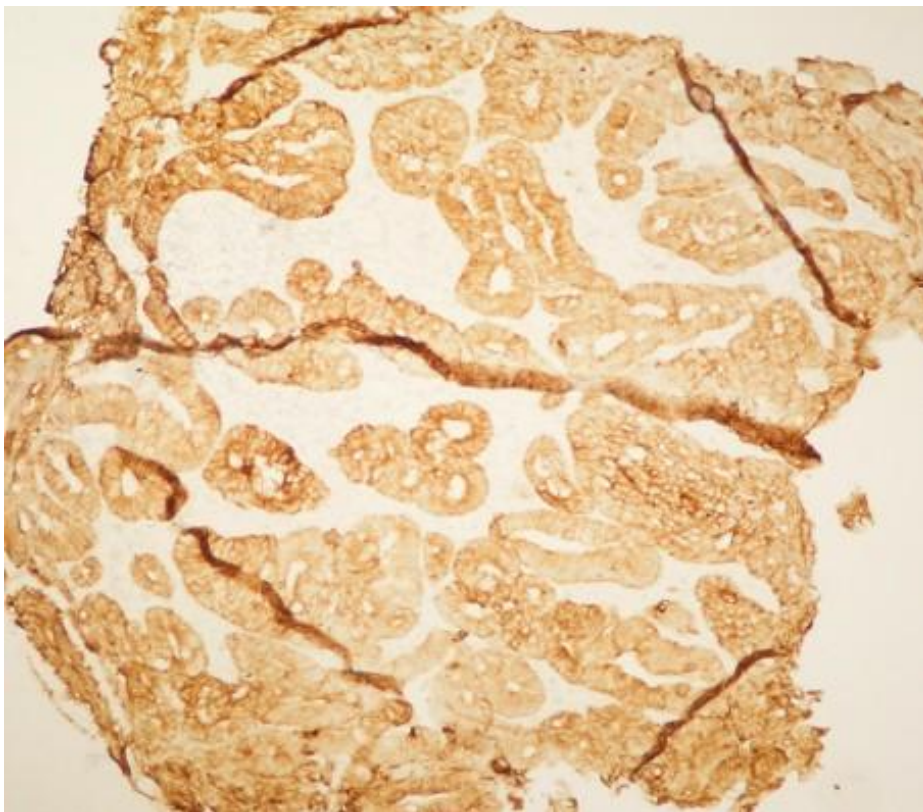
Снимка 6. Биопсичен материал с изразена некроза и възпаление. оцв. Н&Е; ув. 20х.



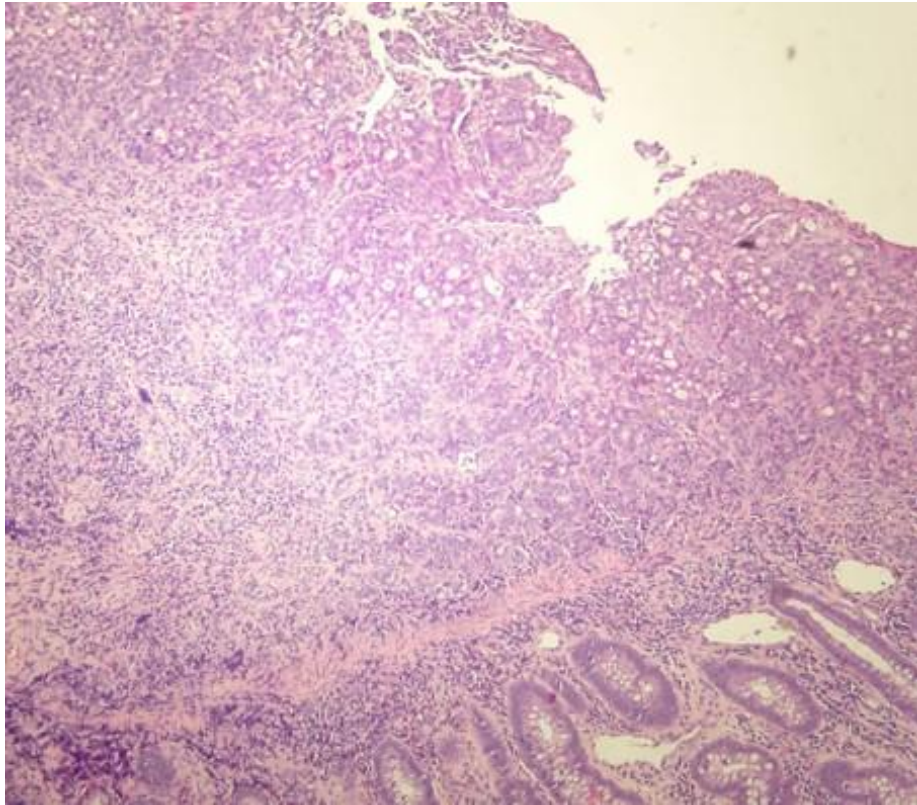
Снимка 7. Биопсичен материал с изразени артефакти при обработката. оцв. Н&Е; ув. 20х.



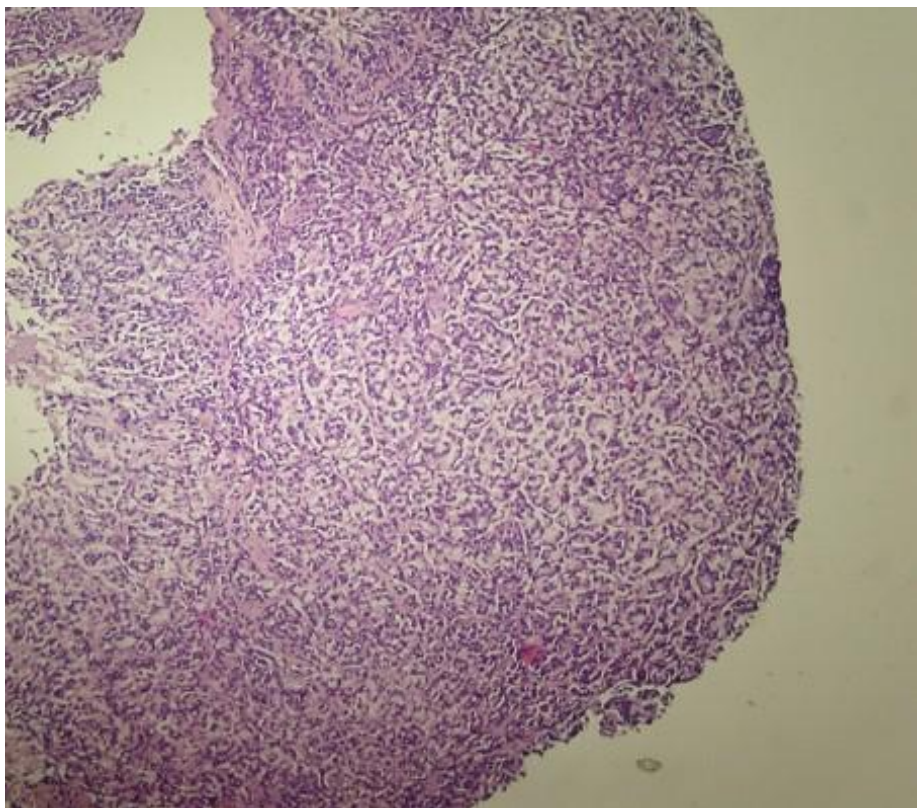
Снимка 8. Материал от високодиференциран аденокарцином на колон - G1. Липсва туморен бѐдинг. оцв. Н&Е; ув. 20х.



Снимка 9. Биопсичен материал от високодиференциран аденокарцином на колон - G1, без туморен бѐдинг. IXX-CK AE1/AE3. ув. 20х.



Снимка 10. Нискодиференциран дебелочревен карцином с изразено възпаление. оцв. Н&Е; ув. 20х.



Снимка 11. Слабокохезивен дебелочревен карцином. оцв. Н&Е; ув. 20х.

Основният фактор, определящ възможността за оценка на туморния бъдинг, е качеството и представителността на биопсичния материал, а не биологичните характеристики на тумора.

При оптимален биопсичен материал туморният бъдинг може да бъде надеждно оценен, докато при наличие на технически артефакти или неблагоприятни морфологични характеристики оценката в преобладаващата част от случаите е невъзможна.

ВТОРА ПАЦИЕНТСКА ИЗВАДКА

Втората извадка беше представена отново от 100 пациента с доказан постоперативно, на резекционен материал, колоректален аденокарцином в периода 2020 – 2023 г.

ПО ЗАДАЧА №1:

- Епидемиологични данни

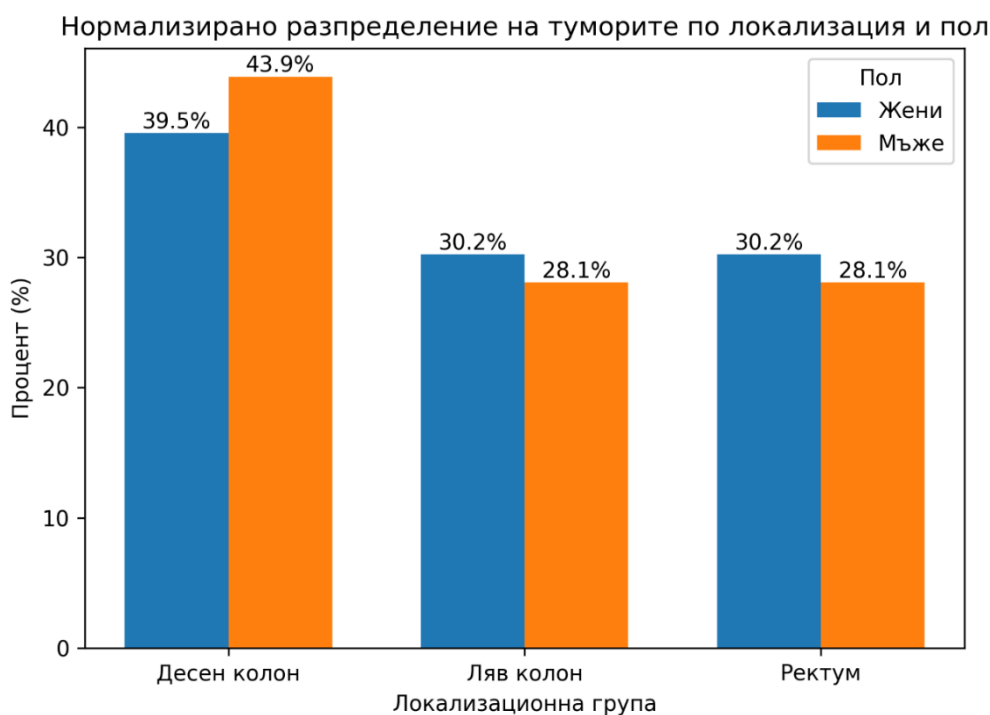
Разпределение по пол и възраст

В проучването са включени 100 пациента, от тях: мъже 57 (57%), жени 43 (43%).

Средната възраст на пациентите е 69.23 ± 8.94 г. с медиана 70.0 г. и възрастов диапазон 45 – 88 години.

- Локализация на първичния тумор

След консолидиране на локализациите за ляв колон, десен колон и ректум, се получиха следните резултати: за жени и мъже най-честа е локализацията в десния колон (39.5% при жените и 43.9% при мъжете), докато в ляв колон и ректум карциномите показват сходни относителни дялове. Разпределението по анатомична локализация е практически сходно при двата пола и е отразено на Фигура 5.



Фигура 5. Нормализирано разпределение на туморите при двата пола съобразно първичната локализация.

При анализ на локализацията в трите локализационни категории (десен колон, ляв колон, ректум) не се установи статистически значима асоциация ($\chi^2 = 0.19$; $df = 2$; $p = 0.91$), което потвърждава липсата на зависимост между пола и анатомичното разпределение на колоректалния карцином в изследваната кохорта.

В Таблица 15 е представена медианната възраст и възрастовия диапазон на пациентите според анатомичната локализация на тумора, както и стратификация по пол. Общата медианна възраст на изследваната кохорта е 70.0 години (диапазон 45 – 88 години), като не се наблюдава разлика между мъжете и жените (медиана 70.0 години и за двата пола). При сравнение на възрастта между отделните анатомични сегменти не се установява статистически значима разлика (Kruskal-Wallis $H = 1.53$; $df = 2$; $p = 0.465$ при групиране в десен колон, ляв колон и ректум). Стратификацията по пол в рамките на отделните локализации също не показва съществена разлика във възрастовите разпределения, като диапазоните при мъжете и жените се припокриват значително. Поради единичния случай във fl. hepatica, се проведе и тест с изключване на този сегмент от анализа по възраст, с цел избягване на статистическа нестабилност. След изключването Kruskal-Wallis тестът показва $H = 3.25$; $p = 0.777$).

| Локализация | Медианна възраст (пациенти) | Диапазон (пациенти) | Общо пациенти | Медианна (мъже) | Диапазон (мъже) | Общо мъже | Медианна (жени) | Диапазон (жени) | Общо жени |
|--------------|-----------------------------|---------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------------|-----------|
| Ascendens | 70.5 | 55–88 | 14 | 71.0 | 67–88 | 7 | 61.0 | 55–75 | 7 |
| Cecum | 71.5 | 56–86 | 16 | 71.5 | 57–86 | 10 | 71.5 | 56–83 | 6 |
| Descendens | 75.0 | 48–81 | 6 | 76.0 | 57–81 | 4 | 61.5 | 48–75 | 2 |
| Fl. hepatica | 68.0 | 68–68 | 1 | 68.0 | 68–68 | 1 | — | — | 0 |
| Fl. lienalis | 69.5 | 61–78 | 4 | 71.0 | 68–78 | 3 | 61.0 | 61–61 | 1 |
| Rectum | 71.0 | 45–86 | 29 | 72.5 | 45–86 | 16 | 68.0 | 57–77 | 13 |
| Sigmoideum | 68.0 | 48–77 | 19 | 68.0 | 57–77 | 9 | 68.5 | 48–76 | 10 |
| Transversum | 65.0 | 57–84 | 11 | 65.0 | 57–84 | 7 | 73.0 | 61–75 | 4 |
| Общо | 70.0 | 45–88 | 100 | 70.0 | 45–88 | 57 | 70.0 | 48–83 | 43 |

Таблица 15. Медианна възраст и възрастов диапазон според туморната локализация и пол.

От изложеното дотук следва, че не се наблюдават статистически значими зависимости между пол, възраст и анатомична локализация на колоректалните карциноми.

- Хистологичен туморен субтип

При анализа на групираниите хистологични субтипове спрямо анатомичната локализация (десен колон, ляв колон и ректум) не се установява статистически значима връзка между двете променливи ($\chi^2 = 19.937$; $df = 18$; $p = 0.336$).

Допълнителният стратифициран анализ по пол също не демонстрира значими различия: мъже: $\chi^2 = 12.826$; $p = 0.685$; жени: $\chi^2 = 8.573$; $p = 0.380$.

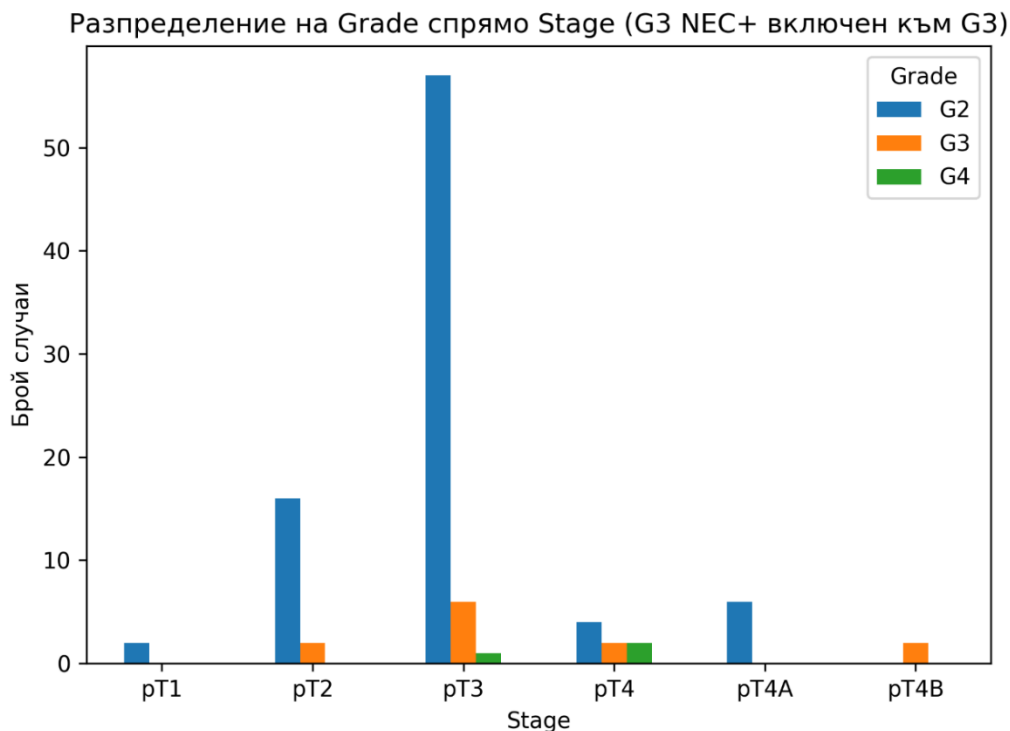
Получените резултати показват, че разпределението на хистологичните субтипове е сходно между различните анатомични локализации и не се влияе от пола на пациентите в изследваната кохорта.

- Туморен грейд (G) и туморен стадий (T)

При анализа на връзката между анатомичната локализация (десен колон, ляв колон и ректум) и туморния грейд не се установи статистически значима зависимост ($\chi^2 = 9.53$; $df = 6$; $p = 0.146$). Стратифицираният анализ по пол също не демонстрира значими различия: при мъжете: $\chi^2 = 4.38$; $df = 6$; $p = 0.626$, а при жените: $\chi^2 = 7.88$; $df = 4$; $p = 0.096$. След обединяване на редките хистологични категории при мъжете резултатът остава статистически несигнификантен ($\chi^2 = 3.60$; $df = 4$; $p = 0.463$), което потвърждава липсата на зависимост между туморната локализация и степента на диференциация.

По отношение на туморния стадий (pT) не се установи статистически значима връзка с локализацията ($\chi^2 = 15.46$; $df = 10$; $p = 0.116$). Анализът по пол потвърди липсата на статистически значима зависимост (мъже: $\chi^2 = 10.70$; $df = 8$; $p = 0.219$, а при жени: $\chi^2 = 14.44$; $df = 10$; $p = 0.154$).

При директно сравнение между степента на диференциация (G) и туморния стадий (pT) се установява статистически значима връзка ($\chi^2 = 35.27$; $df = 15$; $p = 0.0023$), което показва очакваната биологична зависимост между по-ниската диференциация и по-напреднал стадий, което е отразено и схематично на Фигура 6.



Фигура 6. Разпределение на туморен Grade(G) спрямо туморен Stage(T).

- Статус на лимфните възли

В пациентската кохорта не се установяват статистически значими различия в нодалния статус (N) според локализацията на първичния тумор (десен колон, ляв колон и ректум) в

цялата извадка (χ^2 : 11.811; p-value: 0.621; df = 14), това остава валидно и при проведен отделно анализ по пол: мъже (χ^2 : 12.821; p-value: 0.382; df = 12; жени (χ^2 : 8.376; p-value: 0.869; df = 14).

При сравнение между лимфния статус и степента на туморна диференциация (Grade), след обединяване на категорията G3 NEC+ към G3, χ^2 анализът отново не демонстрира статистически значима връзка (χ^2 : 19.163; p-value: 0.159; df = 14). Допълнително, при анализа на връзката между лимфния статус и туморния стадий (pT) не се установяват статистически значими различия (χ^2 : 35.678; p-value: 0.436; df = 35).

В обобщение, получените резултати показват, че в настоящата кохорта ангажирането на лимфните възли не демонстрира статистически значима асоциация с локализацията на тумора, степента на диференциация или дълбочината на туморна инвазия.

ПО ЗАДАЧА №2: ВАЖНИ ТУМОРНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ С ПРОГНОСТИЧНО ЗНАЧЕНИЕ

- Лимфна и васкуларна инвазия (LVI)

В нашето проучване, поради малката извадка от пациенти, при които се установява лимфоваскуларна инвазия (26 от 100 пациенти; 26%), не сме си поставяли за цел сепариранията им оценка. Също така, малката извадка и niskият процент на пациенти с установена LVI, не ни позволиха да разгледаме отделно интрамуралната (IMVI) и екстрамуралната (EMVI) васкуларна инвазия. По тази причина сме ги разгледали обобщено.

В отделните туморни локализации – десен колон, ляв колон и ректум се установи следната картина на лимфоваскуларната инвазия:

- десен колон: негативни – 28; позитивни – 14;
- ляв колон: негативни – 22; позитивни – 7;
- ректум: негативни – 24, позитивни – 5.

Статистическият анализ на връзката между лимфоваскуларната инвазия (LVI) и локализацията на първичния тумор (десен колон, ляв колон и ректум) не установява статистически значима зависимост ($\chi^2 = 2.382$; df = 2; p = 0.304), силата на асоциацията, измерена чрез Cramer's V, е 0.154, което показва слаба асоциация между LVI и локализацията на тумора. Въпреки относително по-високия абсолютен брой положителни случаи при десностранните тумори, тази разлика не достига статистическа значимост. Получените резултати са както следва: 33% (14/42) от десностранните тумори имат LVI+;

24% (7/29) при левия колон и 17% (5/29) при ректум. Наблюдава се тенденция към по-висока честота на LVI при тумори локализиращи в десен колон, но извадката не е достатъчно голяма, за да докаже статистическа разлика.

Резултатите от изследването на зависимостите между лимфоваскуларната инвазия (LVI) и туморната диференциация (G), туморният стадий (T) и нодалния статус (N) са отразени в Таблици 16, 17 и 18:

| Стадий | LVI отрицателна | LVI положителна |
|--------|-----------------|-----------------|
| pT1 | 2 | 0 |
| pT2 | 17 | 1 |
| pT3 | 49 | 15 |
| pT4 | 3 | 5 |
| pT4A | 2 | 4 |
| pT4B | 1 | 1 |

Таблица 16. LVI и туморен стадий (pT).

| Grade | LVI отрицателна | LVI положителна |
|-------|-----------------|-----------------|
| G2 | 69 | 16 |
| G3 | 5 | 7 |
| G4 | 0 | 3 |

Таблица 17. LVI и туморна диференциация (G)

| N статус | LVI отрицателна | LVI положителна |
|----------|-----------------|-----------------|
| N0 | 52 | 7 |
| N1 | 4 | 1 |
| N1a | 3 | 1 |
| N1b | 5 | 7 |
| N1c | 4 | 3 |
| N2 | 4 | 0 |
| N2a | 1 | 3 |
| N2b | 1 | 4 |

Таблица 18. LVI и N статус.

Статистическият анализ на тези данни показва:

Налице е статистически значима връзка между LVI и туморния стадий (pT) ($\chi^2 = 16.13$; $df = 5$; $p = 0.0065$; Cramer's $V = 0.40$), като честотата на LVI нараства с увеличаване на дълбочината на инвазия. Това показва, че по-напредналите тумори имат по-висока вероятност за съдова инвазия.

Установява се силно статистически значима връзка между LVI и степента на туморна диференциация (Grade) ($\chi^2 = 17.33$; $df = 2$; $p = 0.00017$; Cramer's $V = 0.42$), като нискодиференцираните тумори по-често демонстрират лимфоваскуларна инвазия. Това потвърждава ролята на LVI като маркер за биологична агресивност.

Най-силната асоциация се наблюдава между LVI и лимфния нодален статус (N) ($\chi^2 = 27.75$; $df = 7$; $p = 0.00024$; Cramer's $V = 0.53$), което показва силна зависимост между наличието на лимфоваскуларна инвазия и метастазите в лимфни възли.

Липсата на статистически значима директна връзка между туморния стадий и лимфния нодален статус в настоящата извадка вероятно се дължи на хетерогенност в категориите и възможни ограничения в данните, докато LVI се явява по-пряк морфологичен индикатор за метастатичен потенциал.

Лимфоваскуларна инвазия и хистологичен туморен субтип

При сравнителното изследване на тези два параметъра се получиха следните резултати: $\chi^2 = 15.91$; $df = 9$; $p = 0.0687$. Статистическият анализ на връзката между лимфоваскуларната инвазия и хистологичния субтип не демонстрира статистически значима зависимост. Поради наличието на редки хистологични категории с ниска честота, приложимостта на класическия χ^2 тест е ограничена, поради което резултатът следва да се интерпретира предпазливо. Наблюдава се гранична тенденция към асоциация, която би могла да достигне статистическа значимост при по-голяма извадка.

- Перинеурална инвазия (PNI)

Данните за статистическите зависимости, които наблюдавахме по отношение на PNI и първична туморна локализация, хистологичен субтип, грейд (G), stage (pT), лимфоваскуларна инвазия и нодален статус са отразени в следващите Таблици 19, 20, 21, 22, 23, 24:

В Таблица 19 е отразена перинеуралната инвазия съотнесена към първичната туморна локализация – десен колон, ляв колон и ректум.

| Категория | PNI- | PNI+ |
|-------------|------|------|
| Десен колон | 26 | 16 |

| | | |
|-----------|----|----|
| Ляв колон | 20 | 9 |
| Ректум | 19 | 10 |

Таблица 19. Периневралната инвазия съотнесена към първичната туморна локализация.

Не се установява статистически значима връзка между PNI и анатомичната локализация ($\chi^2 = 0.381$; $df = 2$; $p = 0.8267$; $p > 0.05$), Cramer's $V = 0.062$, което показва много слаба асоциация.

Таблица 20 показва PNI и хистологичен субтип на КРК.

| Категория | PNI- | PNI+ |
|--|------|------|
| Аденокарцином NOS с муциозна компонента | 0 | 1 |
| Adenocarcinoma NOS с интра и екстрацелуларна продукция на муцин | 0 | 1 |
| Аденокарцином NOS | 54 | 23 |
| Аденокарцином NOS с муциозна и слабокохезивна компоненти | 0 | 1 |
| Медуларен карцином | 0 | 2 |
| MiNEN | 1 | 0 |
| Муцинозен карцином | 6 | 5 |
| Серетиран аденокарцином | 3 | 1 |
| Синхронни аденокарциноми – Cecum – муцинозен, Rectum – Аденокарцином NOS | 1 | 0 |
| Недиференциран карцином | 0 | 1 |

Таблица 20. PNI и хистологичен субтип.

Не се установява статистически значима асоциация между PNI и хистологичния субтип. Поради редки категории резултатът следва да се интерпретира предпазливо ($\chi^2 = 13.815$; $df = 9$; $p = 0.1291$), Cramer's $V = 0.372$, което показва умерена асоциация.

Таблица 21 – PNI и туморна диференциация (G).

| Грейд | PNI (-) | PNI (+) | Общо |
|-------|---------|---------|------|
| G1 | 9 | 1 | 10 |
| G2 | 49 | 24 | 73 |
| G3 | 9 | 8 | 17 |
| Общо | 67 | 33 | 100 |

Таблица 21. PNI и туморна диференциация(G).

Анализът на връзката между периневралната инвазия (PNI) и степента на туморна диференциация (G) показва тенденция към по-често наличие на PNI при по-слабо диференцирани тумори. Най-висок относителен дял на PNI се наблюдава при G3 карциномите, докато при добре диференцираните тумори (G1) периневралната инвазия се среща рядко. При статистическия анализ не се установява статистически значима асоциация между туморния грейд и наличието на PNI ($\chi^2 = 4.11$; $df = 2$; $p > 0.05$). Силата на връзката, оценена чрез коефициента на Cramer's V , е 0.20, което показва слаба асоциация между двата показателя.

Таблица 22 – резултати от периневрална инвазия и туморен стадий (pT).

| Категория | PNI– | PNI+ |
|-----------|------|------|
| pT1 | 2 | 0 |
| pT2 | 15 | 3 |
| pT3 | 41 | 23 |
| pT4 | 4 | 4 |
| pT4A | 1 | 5 |
| pT4B | 2 | 0 |

Таблица 22. PNI и туморен стадий (pT).

Установява се статистически значима връзка между PNI и pT стадия ($p < 0.05$) ($\chi^2 = 11.790$; $df = 5$; $p = 0.03778$), което подкрепя PNI като маркер за локално напреднало заболяване.

Таблица 23. PNI и лимфоваскуларна инвазия(LVI).

| Категория | LVI– | LVI+ |
|-----------|------|------|
| PNI– | 58 | 7 |
| PNI+ | 16 | 19 |

Таблица 23. PNI и лимфоваскуларна инвазия (LVI).

Налице е силна асоциация между PNI и LVI ($p < 0.05$). Комбинацията PNI+ и LVI+ очертава по-агресивен морфологичен фенотип. ($\chi^2 = 20.187$; $df = 1$; $p = 7.0 \times 10^{-6}$; $p < 0.001$), Cramer's V = 0.449, което показва умерена до силна асоциация.

Таблица 24. PNI и нодален статус (N).

| Категория | PNI– | PNI+ |
|-----------|------|------|
| N0 | 45 | 14 |
| N1 | 3 | 2 |
| N1a | 3 | 1 |
| N1b | 3 | 9 |
| N1c | 6 | 1 |
| N2 | 2 | 2 |
| N2a | 2 | 2 |
| N2b | 1 | 4 |

Таблица 24. PNI и нодален статус (N).

PNI е статистически значимо асоциирана с N статуса ($\chi^2 = 18.527$; $df = 7$; $p = 0.009806$; $p < 0.05$), с по-висока честота на PNI+ при някои N+ категории, Cramer's V = 0.430, което показва умерена до силна асоциация.

Получените резултати показват, че перинеуралната инвазия (PNI) е свързана повече с показатели за туморна агресивност и дисеминационен потенциал, отколкото с анатомичната локализация или хистологичния субтип. Установената статистически значима връзка между PNI и pT стадия подкрепя PNI като маркер за локално напреднало

заболяване, тъй като по-дълбоката инвазия увеличава вероятността за ангажиране на периневралните пространства. Граничната тенденция между PNI и Grade ($p \approx 0.057$) е биологично правдоподобна и предполага, че по-ниската диференциация може да благоприятства инвазивни модели на растеж, но размерът на извадката и дисбалансът между категориите ограничават мощността за формално доказване.

При изследване на взаимодействието между PNI и LVI и PNI и N статуса, наблюдавахме асоциация между PNI и LVI ($p < 0.001$), което насочва към наличие на инвазивни фенотипове – съдова/лимфна инвазия и периневрално разпространение, вероятно споделящи общи механизми, свързани с нарушена клетъчна адхезия, ремоделиране на стромата и миграция. Значимата връзка между PNI и N статуса ($p < 0.05$) допълнително подкрепя PNI като индикатор за метастатичен риск.

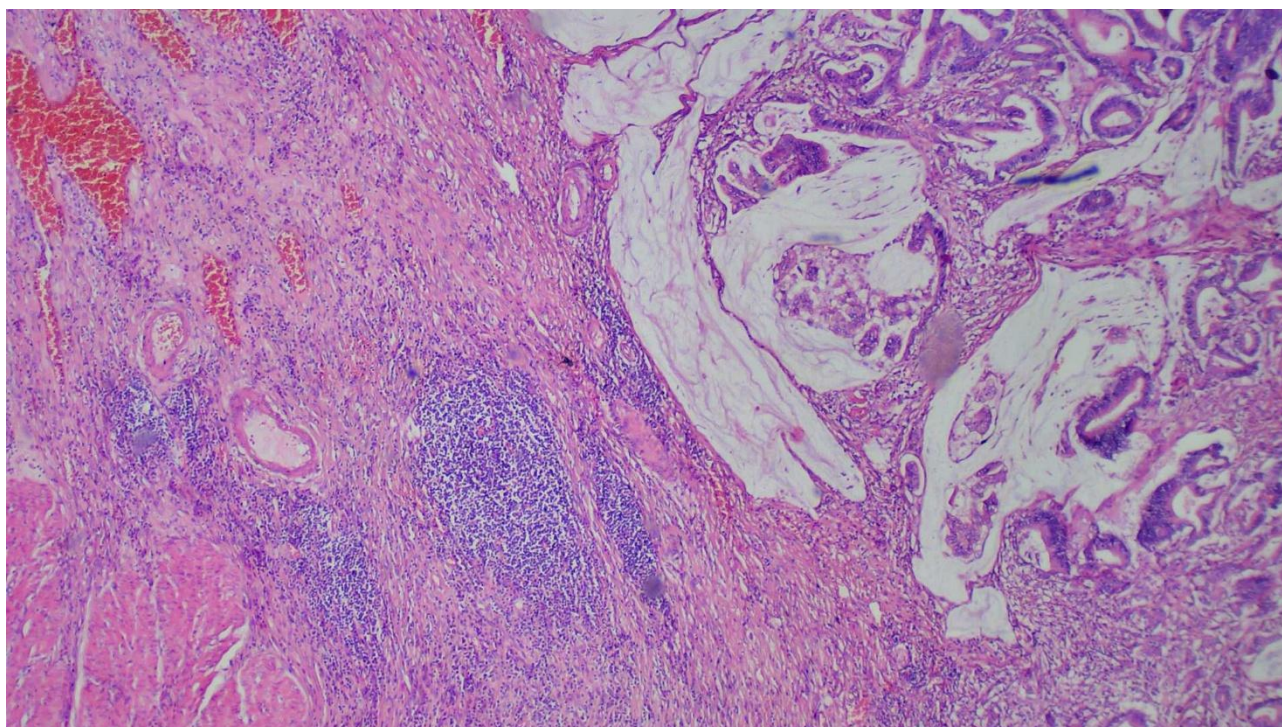
- Aggressive Score

С оглед на установената биологична връзка между периневралната инвазия, лимфоваскуларната инвазия и ниската степен на диференциация, се опитахме да конструираме композитен морфологичен индекс (Aggressive Score), целящ интегрирана оценка на инвазивния потенциал. Комбинираният Aggressive Score, който представлява сбор от стойностите на три показателя – PNI+; LVI+ и висок туморен Grade, демонстрира статистически значима асоциация с N позитивност ($p = 0.003$), което има потенциална практическа стойност: вместо интерпретация на изолирани находки, интегрираният морфологичен профил може да предостави по-устойчива стратификация на риска. Данните за методологията и изчисления Aggressive Score в нашата извадка са отразени в Приложение 1. Aggressive Score е изследователски индекс, а не официален клиничен прогностичен модел и е необходимо потвърждение на неговата приложимост в независимо изследване на по-голяма пациентска кохорта.

- Перитуморен имунен отговор

В нашето проучване се съсредоточихме върху оценката на „Crohn-like“ имунната реакция наблюдавана при колоректалните карциноми.

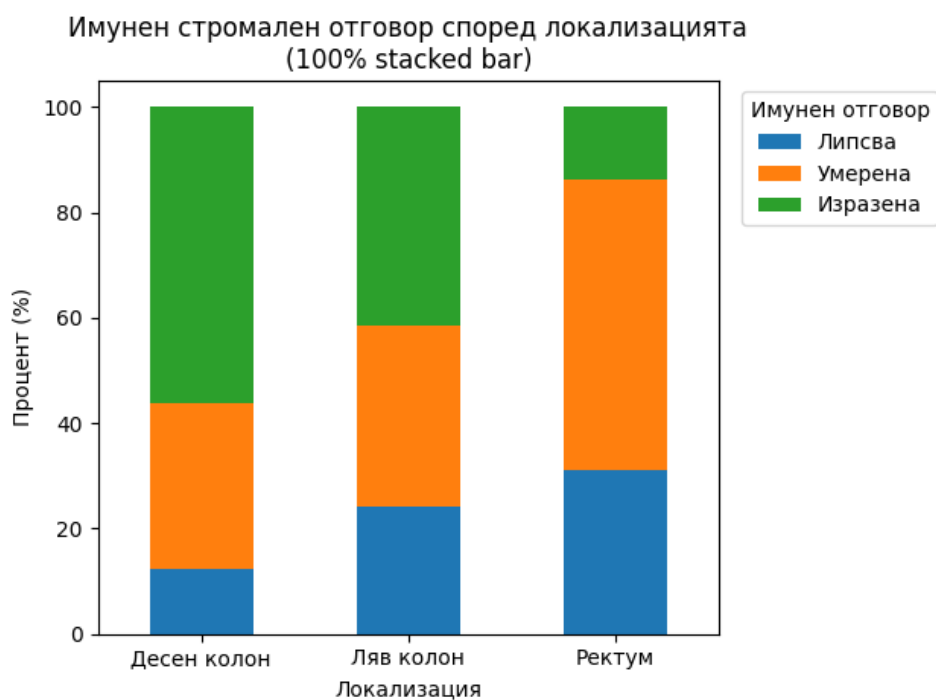
На Снимка 12 е показан пример за „Crohn-like“ възпалителна перитуморна реакция.



Снимка 12. Crohn-like възпалителна перитуморна реакция. оцв. Н&Е, ув. 10х.

Перитуморен имунен отговор и първична туморна локализация

На Фигура 7 е представено графично изображение на разпределението на различните степени на перитуморния имунен отговор спрямо локализацията на карциномите в десен колон, ляв колон и ректум.



Фигура 7. Перитуморен имунен отговор от Crohn-like тип и първична туморна локализация – десен колон, ляв колон, ректум.

В абсолютни стойности, отчетената перитуморна стромна възпалителна реакция е представена на Таблица 25:

| Локализация | Липсва | Умерена | Изразена |
|-------------|--------|---------|----------|
| Десен колон | 5 | 13 | 24 |
| Ляв колон | 7 | 10 | 12 |
| Ректум | 9 | 16 | 4 |

Таблица 25. Абсолютни стойности на разпределението на перитуморната стромна възпалителна реакция (определена полуколичествено) спрямо първичната туморна локализация.

Проведеният статистически анализ показва ($\chi^2 = 14.05$; $df = 4$; $p = 0.0071$), че е налице статистически значима асоциация между интензитета на имунния стромален (Crohn-like) отговор и анатомичната локализация на тумора ($p < 0.05$), Cramer's $V = 0.265$, което показва умерена асоциация между локализацията на тумора и интензитета на имунната реакция. Десностранныите карциноми показват най-висок дял на изразена имунна реакция, докато ректалните тумори се характеризират предимно с умерена реакция и значително по-нисък процент изразен отговор.

Перитуморен имунен отговор и хистологичен субтип на колоректалните карциноми.

Статистическият анализ на зависимостта между перитуморния стромален имунен отговор от „Crohn-like“ тип и хистологичния субтип на тумора, след клинично обосновано обединяване на редките хистологични варианти в обща категория, показва липса на статистически значима асоциация ($\chi^2 = 9.84$; $df = 6$; $p = 0.132$). Вероятната причина е доминирането на аденокарцином NOS и малкият брой случаи в редките хистологични варианти, което ограничава стабилността на многокатегориалния χ^2 анализ.

При сравнителното изследване и статистическа оценка на зависимостите между перитуморната „Crohn-like“ стромна възпалителна реакция и показаните в таблицата други туморни характеристики се получиха следните резултати – Таблица 26:

| Анализ | χ^2 | df | p-value | Статистическа значимост |
|--|------------------|--------|-----------|-------------------------|
| Имунна реакция vs Tumor Grade (G1 – 2 vs G3) | $\chi^2 = 1.742$ | df = 2 | p = 0.418 | Липса на значимост |

| | | | | |
|---------------------------------------|------------------|---------|-----------|--------------------|
| Имунна реакция vs Stage (pT) | $\chi^2 = 5.411$ | df = 15 | p = 0.988 | Липса на значимост |
| Имунна реакция vs N статус (N0 vs N+) | $\chi^2 = 0.923$ | df = 2 | p = 0.630 | Липса на значимост |
| Имунна реакция vs LVI | $\chi^2 = 2.713$ | df = 3 | p = 0.438 | Липса на значимост |
| Имунна реакция vs PNI | $\chi^2 = 3.715$ | df = 3 | p = 0.294 | Липса на значимост |

Таблица 26. Зависимости между перитуморната „Crohn-like“ стромна реакция и G, pT, N, LVI, PNI.

В настоящата кохорта перитуморната стромна имунна реакция не показва статистически значима връзка с нито един от класическите прогностични фактори: Grade, pT, N статус, LVI, PNI. Това предполага, че в тази извадка имунният отговор вероятно представлява самостоятелен морфологичен феномен, който не е директно свързан с традиционните параметри на туморна агресивност.

ПО ПОДЗАДАЧА №3В: ПЕРИТУМОРЕН БЪДИНГ ОПРЕДЕЛЕН В РЕЗЕКЦИОННИ МАТЕРИАЛИ ОТ КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ

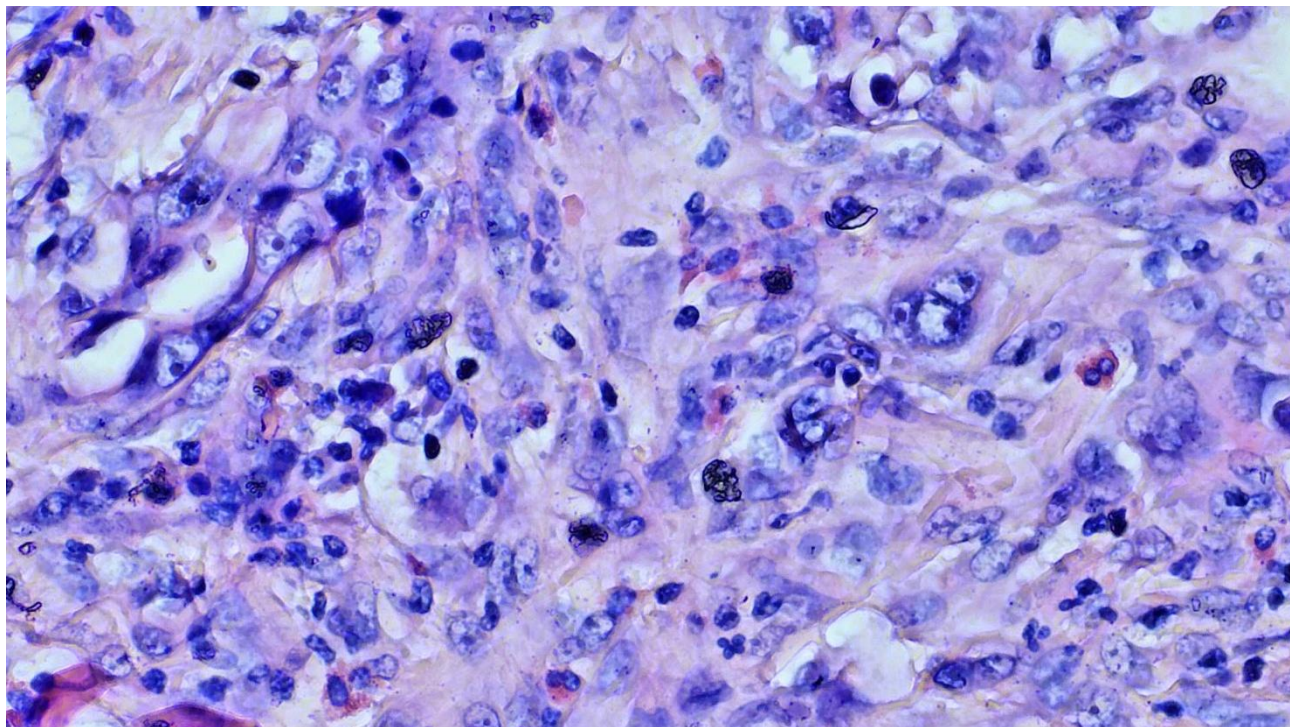
В нашето проучване целта на изследването беше определянето на перитуморния бъдинг (РТВ) в инвазивния туморен фронт. Получените резултати за РТВ и корелациите с различни туморни характеристики като туморна диференциация (G), стадий (pT), лимфоваскуларна инвазия (LVI), нодален статус (N), и периневрална инвазия (PNI) са отразени в Таблица 27:

| Туморен грейд (G) | Vd1 (Брой пациенти) | Vd2 (Брой пациенти) | Vd3 (Брой пациенти) |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| G2 | 35 | 3 | 1 |
| G3 + G3 NEC | 29 | 1 | 0 |
| G4 | 21 | 8 | 2 |

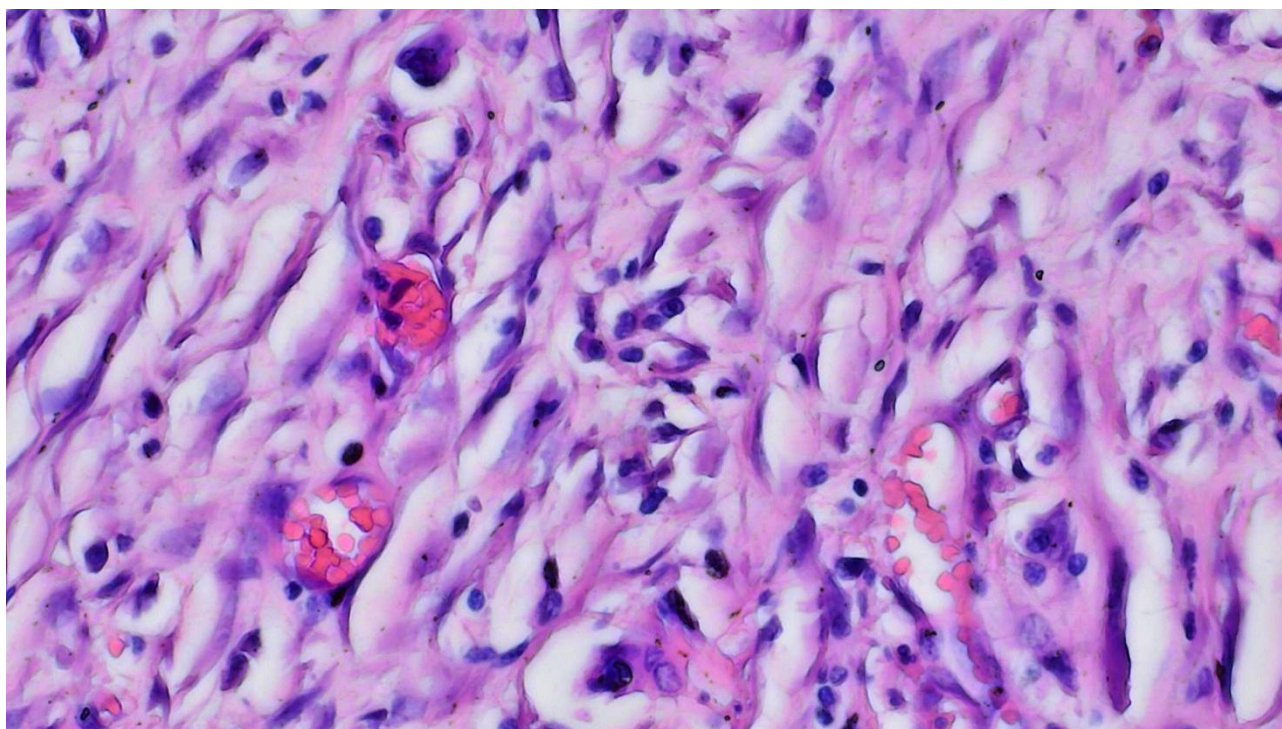
| Туморен стадий (pT) | Vd1 (Брой пациенти) | Vd2 (Брой пациенти) | Vd3 (Брой пациенти) |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| T1 | 1 | 0 | 1 |
| T2 | 7 | 5 | 6 |
| T3 | 24 | 22 | 18 |
| T4 | 4 | 1 | 3 |
| T4A | 1 | 2 | 3 |
| T4B | 2 | 0 | 0 |

Таблица 27. Перитуморен бъдинг разпределен по грейд спрямо степените на туморна диференциация (G) и стадиране (T)

Примери за перитуморен бъдинг са представени на Снимки 13 и 14:



Снимка 13. Перитуморен бъдинг- единични туморни клетки в инвазивния фронт на тумора. оцв. Н&Е, ув. 40х.



Снимка 14. Перитуморен бѐдинг. оцв. Н&Е, ув. 40х.

Резултатите от статистическата обработка, касаещи тези показатели, са следните:

| | | |
|----------------------------------|-----------------------------|------------|
| Туморна диференциация (G) и РТВ: | $\chi^2 = 14.39$; df = 6; | p = 0.0255 |
| Туморен стадий (pT) и РТВ: | $\chi^2 = 7.36$; df = 10; | p = 0.6908 |
| LVI и РТВ: | $\chi^2 = 8.59$; df = 2; | p = 0.0137 |
| PNI и РТВ: | $\chi^2 = 5.59$; df = 2; | p = 0.0611 |
| N статус и РТВ: | $\chi^2 = 19.93$; df = 14; | p = 0.1325 |

Статистическият анализ потвърждава връзка между туморната диференциация (G) и перитуморния бѐдинг, както и между лимфоваскуларната инвазия и РТВ. Не е наблюдавана статистически значима връзка между РТВ и стадия на тумора (pT), статуса на лимфните възли (N) или периневралната инвазия (PNI). Връзката между по-високите степени на перитуморен бѐдинг и лимфоваскуларната инвазия подкрепя концепцията, че бѐдингът на тумора отразява агресивен инвазивен фенотип при колоректален карцином. Липсата на връзка със стадия pT и статуса на лимфните възли (N) предполага, че перитуморният бѐдинг е резултат на специфично биологично туморно поведение, което не е напълно обяснено от конвенционалните TNM параметри. Граничната стойност на p за PNI, показва възможно биологично взаимодействие, което може да изисква по-големи кохорти за валидиране. Като цяло, перитуморният бѐдинг остава надежден морфологичен маркер, свързан предимно с туморната диференциация и лимфоваскуларната

дисеминация, но за разлика от други изследвания не сме в състояние да потвърдим директно връзката с нодалния статус.

ПО ЗАДАЧА №4: ВАЖНИ ПРЕДИКТИВНИ И ПРОГНОСТИЧНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛНИТЕ КАРЦИНОМИ – MMR

От предиктивните и прогностичните биомаркери, които касаят колоректалните карциноми, в нашето проучване изследвахме MMR статуса на КРК и най-честите мутации (съобразно включените в TruSight Tumor 15 панел).

- Оценка на MMR статус

В Таблица 28 са обобщени резултатите, получени при статистическата обработка на данните за статуса на MMR на колоректалните карциноми и различните епидемиологични и туморни характеристики:

| Анализ | χ^2 | df | p (Pearson) | p (Monte Carlo) | p (използван) |
|----------------------------------|----------|----|-------------|-----------------|---------------|
| MMR и Пол | 0.160 | 1 | 0.689 | неприложимо | 0.689 |
| MMR и Локализация | 20.279 | 2 | 0.000039 | неприложимо | 0.000039 |
| MMR и Хистологичен субтип | 27.872 | 9 | 0.001 | 0.002 | 0.002 |
| MMR и Грейд | 10.841 | 2 | 0.004 | неприложимо | 0.004 |
| MMR и pT стадий | 2.702 | 5 | 0.746 | 0.803 | 0.803 |
| MMR и Нодален статус | 0.990 | 1 | 0.320 | неприложимо | 0.320 |
| MMR и LVI | 0.237 | 1 | 0.627 | 0.556 | 0.556 |
| MMR и PNI | 0.191 | 1 | 0.662 | неприложимо | 0.662 |
| MMR и Перитуморна имунна реакция | 4.177 | 2 | 0.124 | 0.151 | 0.151 |

| | | | | | |
|--------------------------|-------|---|-------|-------------|-------|
| MMR и Перитуморен бѳдинг | 0.648 | 2 | 0.723 | неприложимо | 0.723 |
|--------------------------|-------|---|-------|-------------|-------|

Таблица 28. Статистически зависимости между MMR статус и различните епидемиологични и туморни характеристики при КРК.

Статистическата обработка показва няколко значими резултата. В последващото изложение ще ги разгледаме и коментираме поотделно:

MMR и пол- Таблица 29:

Разпределение: n (%)

| | dMMR | pMMR |
|------|-----------|------------|
| Жена | 9 (20.9%) | 34 (79.1%) |
| Мъж | 9 (15.8%) | 48 (84.2%) |

Таблица 29. MMR и пол. Резултат: $\chi^2 = 0.160$; $df = 1$; $p = 0.6895$

Асоциацията между MMR статуса и разглежданата променлива не е статистически значима ($\chi^2 = 0.160$; $df = 1$; $p = 0.689$); Pearson χ^2 тест с корекция за непрекъснатост на Yates), Cramer's $V = 0.040$, което показва много слаба асоциация.

MMR и локализация- Таблица 30:

Разпределение: n (%)

| | dMMR | pMMR |
|-------------|------------|-------------|
| Десен колон | 16 (38.1%) | 26 (61.9%) |
| Ляв колон | 2 (6.9%) | 27 (93.1%) |
| Ректум | 0 (0.0%) | 29 (100.0%) |

Таблица 30. MMR и Локализация. Резултат: $\chi^2 = 20.279$; $df = 2$; $p = 0.000039$

Асоциацията между MMR статуса и първичната туморна локализация е силно статистически значима ($\chi^2 = 20.279$; $df = 2$; $p < 0.0001$). Стандартен Pearson χ^2 тест, Cramer's $V = 0.450$, което показва умерена до силна асоциация.

Анализът на разпределението на туморите според MMR статуса показва ясно изразена зависимост между молекулярния профил и анатомичната локализация.

- dMMR (deficient mismatch repair)

По-голямата част от dMMR туморите – 88.9% (n=16) са локализиращи в десния колон. Само 11.1% (n=2) се намират в левия колон, а ректалните са 0% (n=0). Това подчертава характерната десностранна локализация на dMMR карциномите и потвърждава добре известната биологична връзка между микросателитната нестабилност и десния колон.

- pMMR (proficient mismatch repair)

Туморите в pMMR групата са сравнително равномерно разпределени между трите локализации: десен колон (31.7%), ляв колон (32.9%) и ректум (35.4%). Ректалните карциноми са представени почти изключително в pMMR групата, което подчертава различния биологичен профил на тези тумори.

Статистическият анализ потвърждава наличието на силна и статистически значима асоциация между MMR статуса и туморната локализация: $\chi^2 = 20.279$; $df = 2$; $p < 0.0001$. Тези резултати показват, че разпределението на туморите не е случайно и че MMR статусът е тясно свързан с ембриологично и биологично различните сегменти на дебелото черво.

MMR и хистологичен субтип – Таблица 31:

Разпределение: n (%)

| | dMMR | pMMR |
|--|------------|------------|
| Аденокарцином NOS с муциозна компонента | 0 (0.0%) | 1 (100.0%) |
| Аденокарцином NOS с интра и екстрацелуларна муцинова продукция | 0 (0.0%) | 1 (100.0%) |
| Аденокарцином NOS | 8 (10.4%) | 69 (89.6%) |
| Аденокарцином NOS с муциозна и слабокохезивна компоненти | 0 (0.0%) | 1 (100.0%) |
| Медуларен карцином | 2 (100.0%) | 0 (0.0%) |
| MiNEN | 1 (100.0%) | 0 (0.0%) |
| Муциозен карцином | 6 (54.5%) | 5 (45.5%) |
| Сератен аденокарцином | 1 (25.0%) | 3 (75.0%) |
| Синхронни тумори – Сесим-муциозен, | 0 (0.0%) | 1 (100.0%) |

| | | |
|---------------------------|----------|------------|
| Rectum- Аденокарцином NOS | | |
| Недиференциран карцином | 0 (0.0%) | 1 (100.0%) |

Таблица 31. MMR и Хистологичен субтип. Резултат: $\chi^2 = 27.872$; $df = 9$; p (Pearson) = 0.0010; p (Monte Carlo) = 0.0016

Асоциацията между MMR статуса и хистологичните субтипове на КРК е статистически значима. (Резултат: $\chi^2 = 27.872$; $df = 9$; p (Pearson) = 0.0010; p (Monte Carlo) = 0.0016). Използвана е Monte Carlo permutation поради малки очаквани стойности ($E < 5$). Cramer's $V = 0.528$, което показва силна асоциация.

MMR и грейд (G)- Таблица 32:

Разпределение: n (%)

| Грейд | dMMR n (%) | pMMR n (%) |
|-------|--------------|--------------|
| G2 | 11 (61.1%) | 74 (90.2%) |
| G3 | 5 (27.8%) | 7 (8.5%) |
| G4 | 2 (11.1%) | 1 (1.2%) |

Таблица 32. MMR и туморен грейд (G). Резултат: $\chi^2 = 10.841$; $df = 2$; $p = 0.004424$.

Асоциацията между MMR статуса и туморния грейд (G) е статистически значима ($\chi^2 = 10.841$; $df = 2$; $p = 0.004424$), Cramer's $V = 0.329$, което показва умерена асоциация.

MMR и pT стадий- Таблица 33:

Разпределение: n (%)

| | dMMR | pMMR |
|------|------------|------------|
| pT1 | 0 (0.0%) | 2 (100.0%) |
| pT2 | 2 (11.1%) | 16 (88.9%) |
| pT3 | 12 (18.8%) | 52 (81.2%) |
| pT4 | 2 (25.0%) | 6 (75.0%) |
| pT4A | 1 (16.7%) | 5 (83.3%) |
| pT4B | 1 (50.0%) | 1 (50.0%) |

Таблица 33. MMR и pT. Резултат: $\chi^2 = 2.702$; $df = 5$; p (Pearson) = 0.7457; p (Monte Carlo) = 0.8026.

Асоциацията между MMR статуса и pT не е статистически значима ($\chi^2 = 2.702$; $df = 5$; p (Pearson) = 0.7457; p (Monte Carlo) = 0.8026), Cramer's V = 0.164, което показва слаба асоциация. Използвана е Monte Carlo permutation поради малки очаквани стойности ($E < 5$).

MMR и нодален статус- Таблица 34:

Разпределение: n (%)

| | dMMR | pMMR |
|----|------------|------------|
| N+ | 5 (12.2%) | 36 (87.8%) |
| N0 | 13 (22.0%) | 46 (78.0%) |

Таблица 34. MMR и нодален статус.

Асоциацията между MMR и N статуса не е статистически значима ($\chi^2 = 0.990$; $df = 1$; $p = 0.3198$). Pearson χ^2 тест с корекция за непрекъснатост на Yates), Cramer's V = 0.099, което показва слаба асоциация.

MMR и LVI- Таблица 35:

Разпределение: n (%)

| | dMMR | pMMR |
|------|------------|------------|
| LVI+ | 6 (23.1%) | 20 (76.9%) |
| LVI- | 12 (16.2%) | 62 (83.8%) |

Таблица 35. MMR и LVI.

Асоциацията между MMR статуса и LVI не е статистически значима ($\chi^2 = 0.237$; $df = 1$; p (Pearson) = 0.6265; p (Monte Carlo) = 0.5557), Cramer's V = 0.049, което показва много слаба асоциация. Използвана е Monte Carlo permutation поради малки очаквани стойности ($E < 5$).

MMR и PNI са отразени в Таблица 36:

Разпределение: n (%)

| | dMMR | pMMR |
|------|------------|------------|
| PNI+ | 5 (14.3%) | 30 (85.7%) |
| PNI- | 13 (20.0%) | 52 (80.0%) |

Таблица 36. MMR и PNI.

Асоциацията между MMR статуса и PNI не е статистически значима ($\chi^2 = 0.191$; $df = 1$; $p = 0.6624$), Cramer's V = 0.044, което показва много слаба асоциация. Стандартен Pearson χ^2 тест.

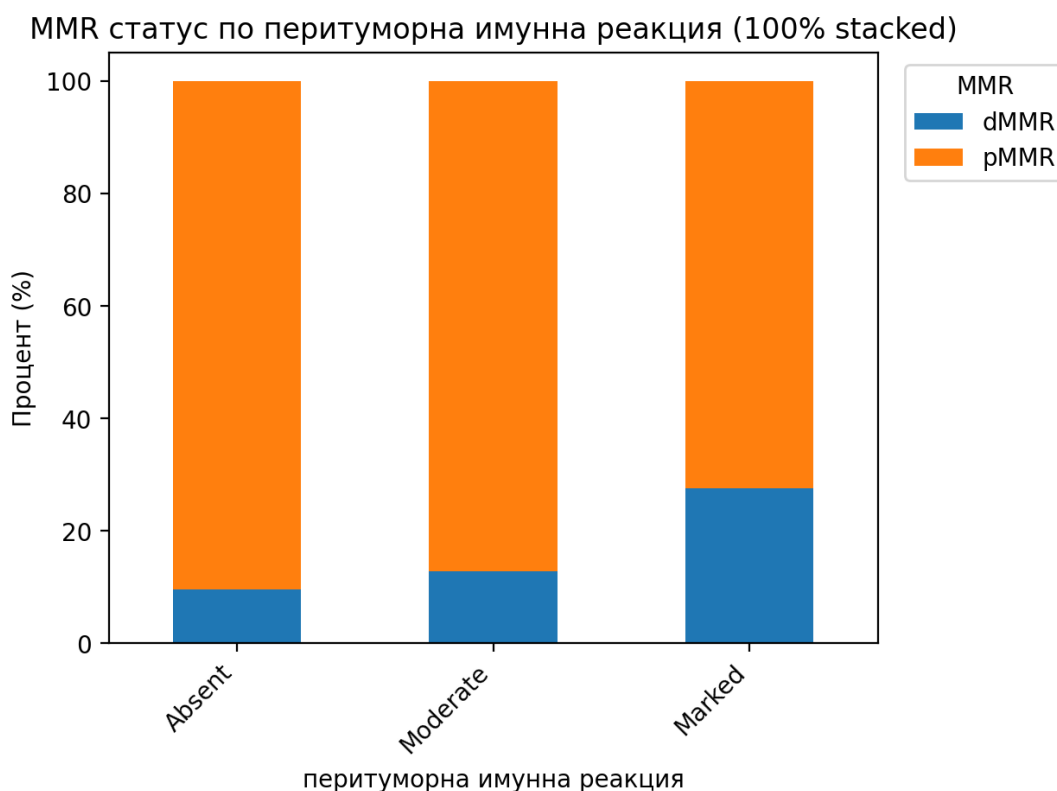
MMR и перитуморна имунна реакция- Таблица 37:

Разпределение: n (%)

| | dMMR | pMMR |
|----------|------------|------------|
| Absent | 2 (9.5%) | 19 (90.5%) |
| Marked | 11 (27.5%) | 29 (72.5%) |
| Moderate | 5 (12.8%) | 34 (87.2%) |

Таблица 37. MMR и Перитуморна имунна реакция Резултат: $\chi^2 = 4.177$; $df = 2$; p (Pearson) = 0.1239; p (Monte Carlo) = 0.1512.

Асоциацията между MMR статуса и „Crohn-like“ перитуморната стромна възпалителна реакция не е статистически значима ($\chi^2 = 4.177$; $df = 2$; p (Pearson) = 0.1239; p (Monte Carlo) = 0.1512), Cramer's $V = 0.204$, което показва слаба до умерена асоциация. Използвана е Monte Carlo пермутация поради малки очаквани стойности ($E < 5$). Визуално тези данни са представени на Фигура 8:



Фигура 8. MMR и перитуморна имунна реакция.

MMR и перитуморен бъдинг (РТВ)- Таблица 38:

Разпределение: n (%)

| | dMMR | pMMR |
|-----------|-----------|------------|
| Bd1 (0+1) | 8 (20.5%) | 31 (79.5%) |
| Bd2 | 4 (13.3%) | 26 (86.7%) |
| Bd3 | 6 (19.4%) | 25 (80.6%) |

Таблица 38. MMR и Перитуморен бъдинг .Резултат: $\chi^2 = 0.648$; $df = 2$; p (Pearson) = 0.7232.

Асоциацията между MMR статуса и РТВ не е статистически значима ($\chi^2 = 0.648$; $df = 2$; $p = 0.7232$). Cramer's V = 0.080, което показва слаба асоциация. Стандартен Pearson χ^2 тест.

Таблица 39 обобщава пациентите с dMMR статус и генните мутации на BRAF V600E, самостоятелно или в комбинации с други мутации в контекста на Синдрома на Линч. В проучването не сме разполагали с пълни възможности за дефинитивно уточняване на случаите суспектни за наследствен тип колоректален карцином:

| Пациент | MMR | MLH1 | PMS2 | MSH6 | MSH2 | BRAF V600E мутация | Мутации и комбинации | Синдром на Lynch |
|---------|------|------|------|------|------|--------------------|----------------------|------------------|
| 10 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF + TP53 | Не се подозира |
| 16 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF + TP53 | Не се подозира |
| 19 | dMMR | d | d | d | p | BRAF V600E | BRAF + TP53 | Не се подозира |
| 20 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF + TP53 | Не се подозира |
| 33 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF | Не се подозира |
| 52 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF + PIK3CA | Не се подозира |
| 56 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF | Не се подозира |
| 58 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF | Не се подозира |

| | | | | | | | | |
|----|------|---|---|---|---|------------|----------------------|--------------------|
| 60 | dMMR | d | d | p | p | Няма данни | TP53 | <i>Подозира се</i> |
| 65 | dMMR | p | p | d | d | Няма данни | Няма данни | <i>Подозира се</i> |
| 67 | dMMR | p | p | d | p | Няма данни | PIK3CA + TP53 + KRAS | <i>Подозира се</i> |
| 75 | dMMR | d | p | p | d | Няма данни | Няма данни | <i>Подозира се</i> |
| 84 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF | Не се подозира |
| 88 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF + AKT1 | Не се подозира |
| 92 | dMMR | d | d | p | p | Няма данни | NRAS + TP53 | <i>Подозира се</i> |
| 94 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF + PIK3CA | Не се подозира |
| 95 | dMMR | d | d | p | p | BRAF V600E | BRAF + TP53 | Не се подозира |
| 96 | dMMR | d | d | p | p | Няма данни | PIK3CA | <i>Подозира се</i> |

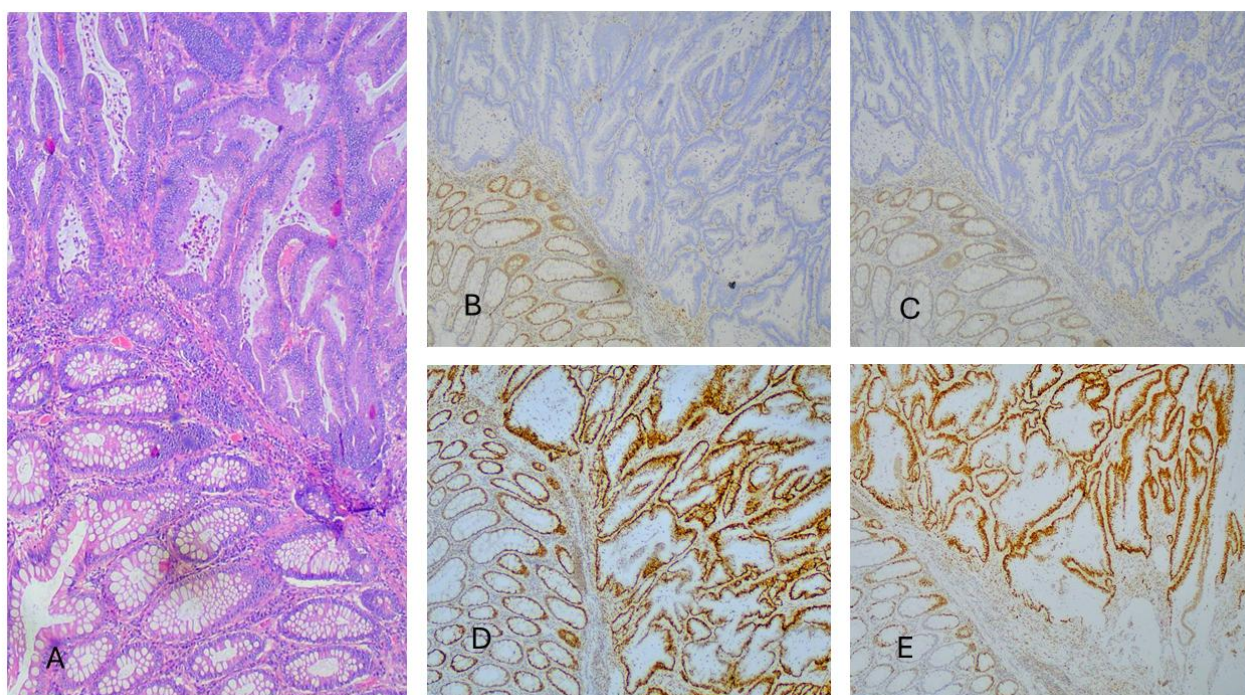
Таблица 39. dMMR статус, съответстващи MLH1, PMS2, MSH6 и MSH2 резултати; основни генни мутации и комбинации; връзка със синдром на Lynch. „d“ – дефицитна експресия; „p“ – запазена (профицитна) експресия.

Таблицата показва, че в преобладаващата част от случаите е налице загуба на експресия на MLH1 и PMS2, което корелира с наличието на BRAF V600E мутация и липса на клинично съмнение за Lynch синдром. Този модел е типичен за спорадичен dMMR, свързан с MLH1 промоторна хиперметилация. В по-малката част от случаите се наблюдава запазена експресия на MLH1/PMS2 и изолирана загуба на MSH2/MSH6 или други комбинации без BRAF мутация, при които е налична суспекция за Lynch синдром. Този профил е по-характерен за наследствена етиология. Останалите налични мутации (напр. TP53, PIK3CA, KRAS, NRAS) са признак на молекулярна хетерогенност в рамките на dMMR групата, но не променят основния извод: dMMR туморите в изследваната кохорта са доминиращо спорадични и ограничен брой случаи имат молекулярни критерии

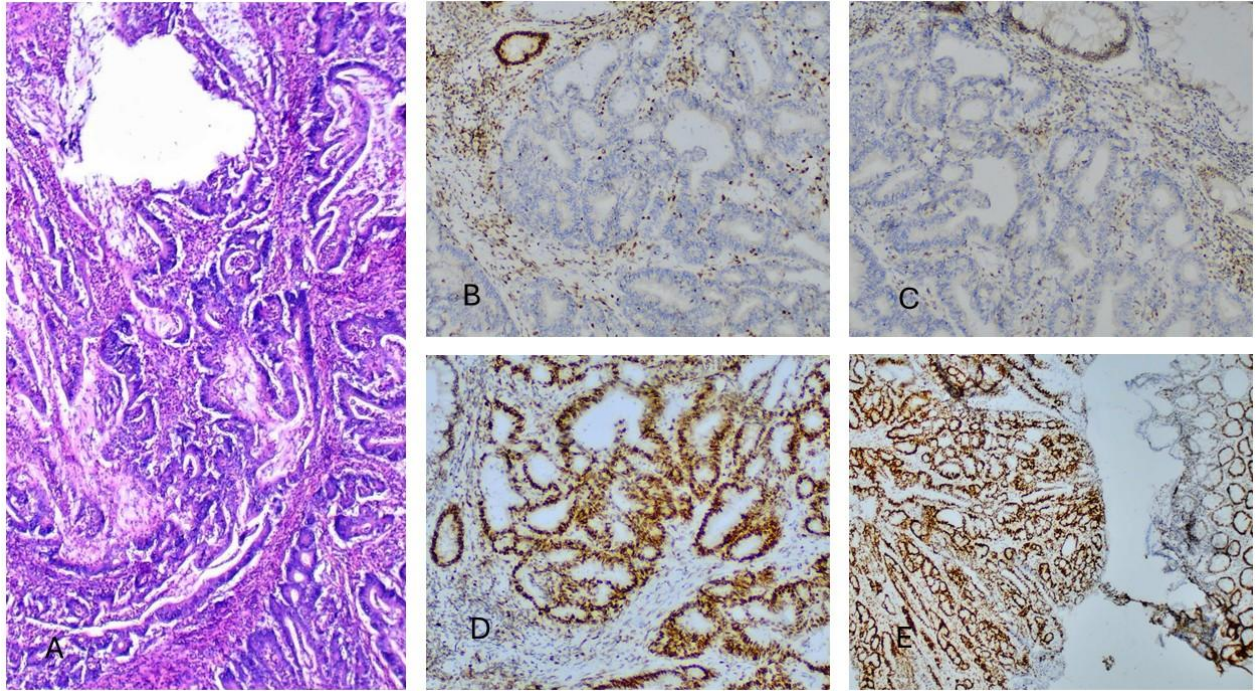
насочващи към Lynch синдром. Налице е ясно разграничение между спорадичен и потенциално наследствен dMMR профил.

В настоящата кохорта MMR статусът беше анализиран в контекста на основните клиничко-морфологични характеристики на колоректалния карцином, включително анатомична локализация, туморен грейд (G), pT стадий, нодален статус (N), лимфоваскуларна инвазия (LVI), периневрална инвазия (PNI) и перитуморен бѐдинг. Най-съществената и статистически значима връзка на MMR статуса е с първичната туморна локализация. dMMR туморите показват ясно изразена доминантност в десния колон, докато pMMR туморите са значително по-равномерно разпределени между десен колон, ляв колон и ректум. Тази находка напълно съответства на утвърдените молекулярно-патогенетични концепции за различията между десностранните и левостранните колоректални карциноми, както и на описаната връзка между микросателитната нестабилност и проксималната локализация. По отношение на останалите прогностични показатели не се установиха статистически значими асоциации с MMR статуса.

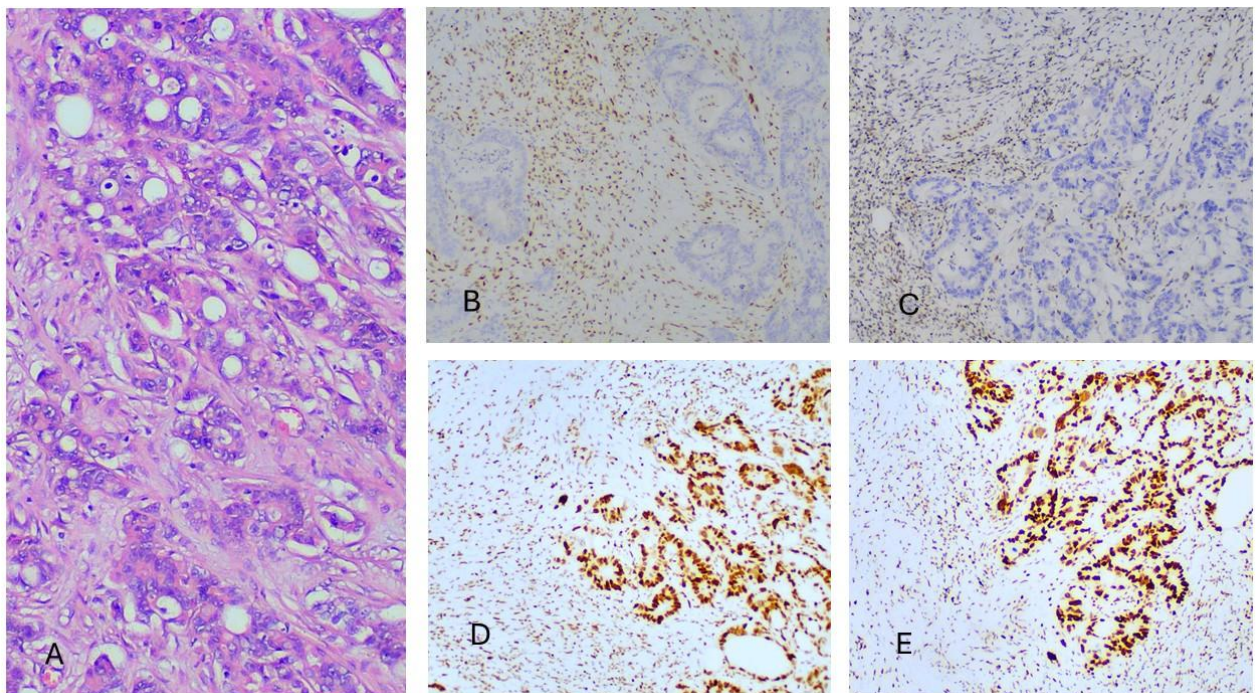
Примери на различни хистологични субтипове на колоректални карциноми и с различен MMR статус са представени на следващите микроскопски Снимки 15 – 24:



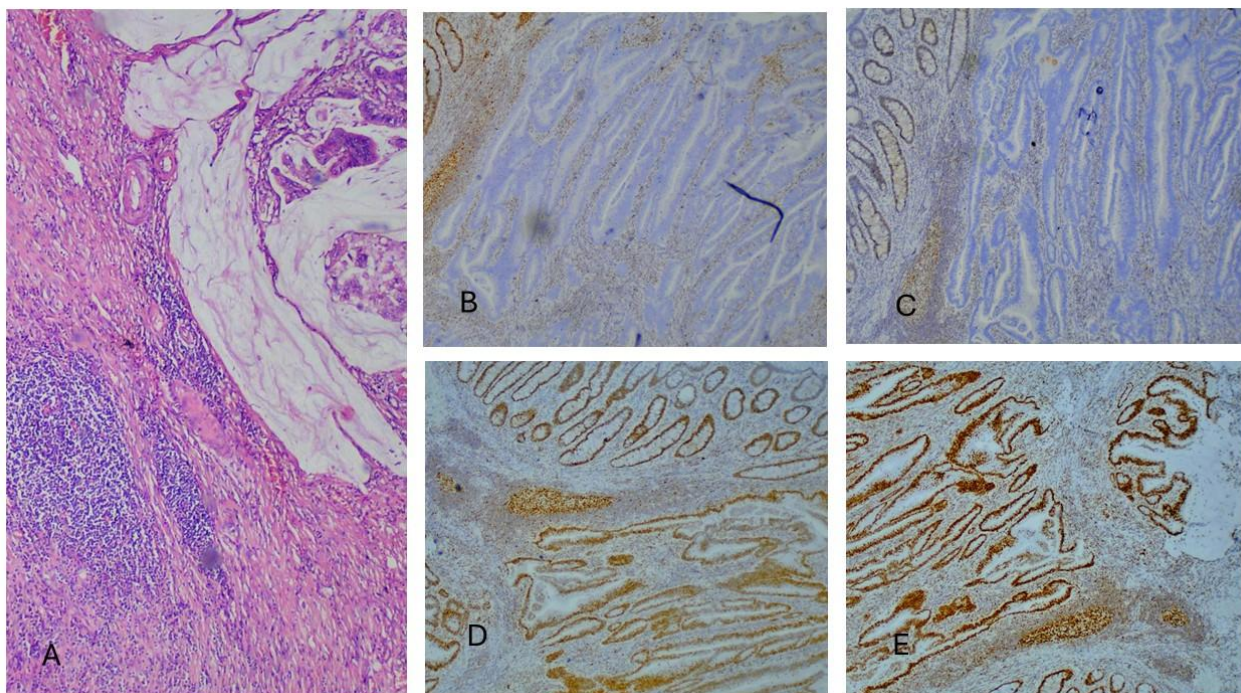
Снимка 15. Аденокарцином G2 – NOS. А – Хистологичен препарат – оцв. Н&Е; В – dMLH1; С – dPMS2; D – pMSH2; Е – pMSH6. ув. 10х.



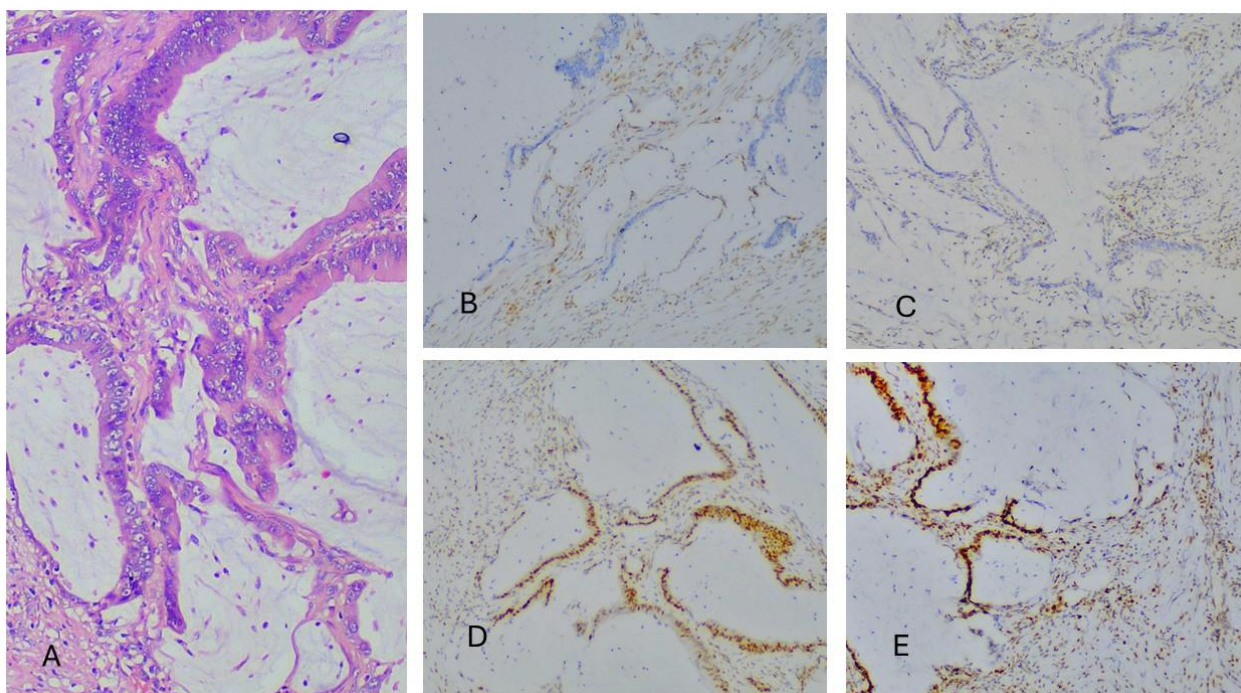
Снимка 16. Аденокарцином G2 – NOS. А- Хистологичен препарат – оцв. Н&Е; В – dMLH1; С – dPMS2; D – pMSH2; Е – pMSH6. ув. 10х.



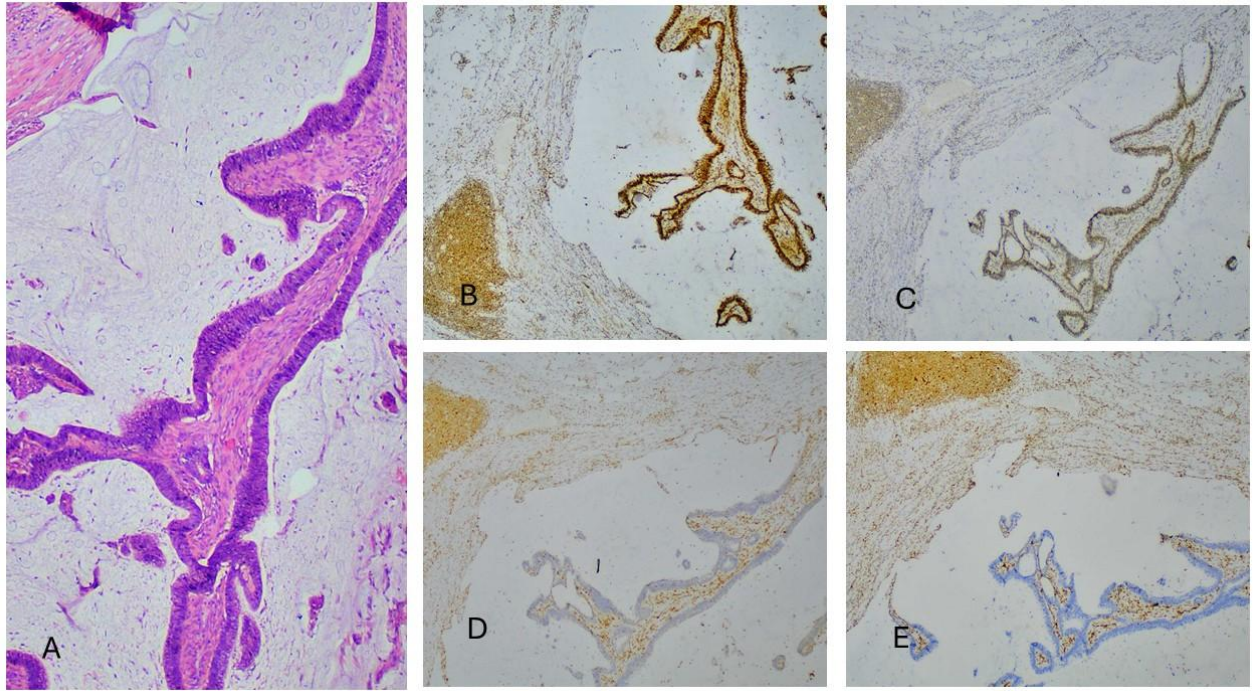
Снимка 17. Аденокарцином G3 – NOS. А – Хистологичен препарат – оцв. Н&Е; В – dMLH1; С – dPMS2; D – pMSH2; Е – pMSH6. ув. 10х.



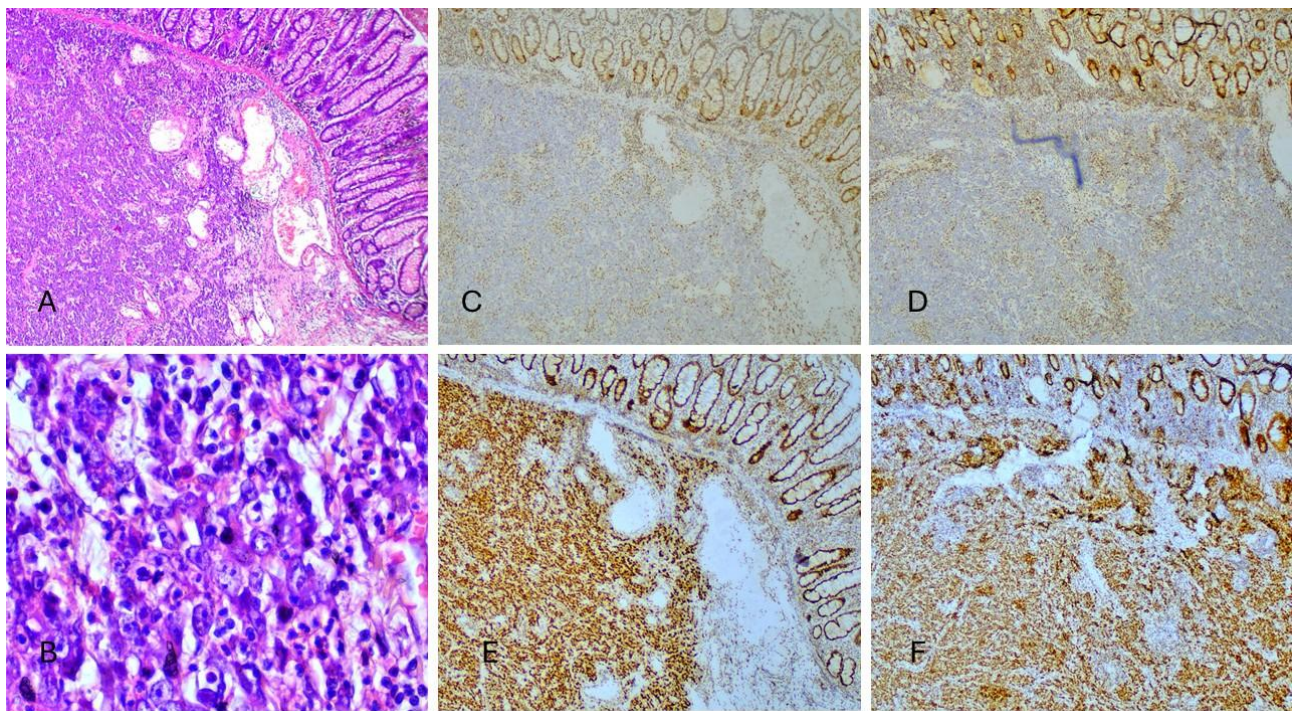
Снимка 18. Аденокарцином G2 – NOS с муциозна компонента и изразена Crohn-like възпалителна реакция. А – Хистологичен препарат – оцв. Н&Е; В – dMLH1; С – dPMS2; D – pMSH2; E – pMSH6. ув. 10x.



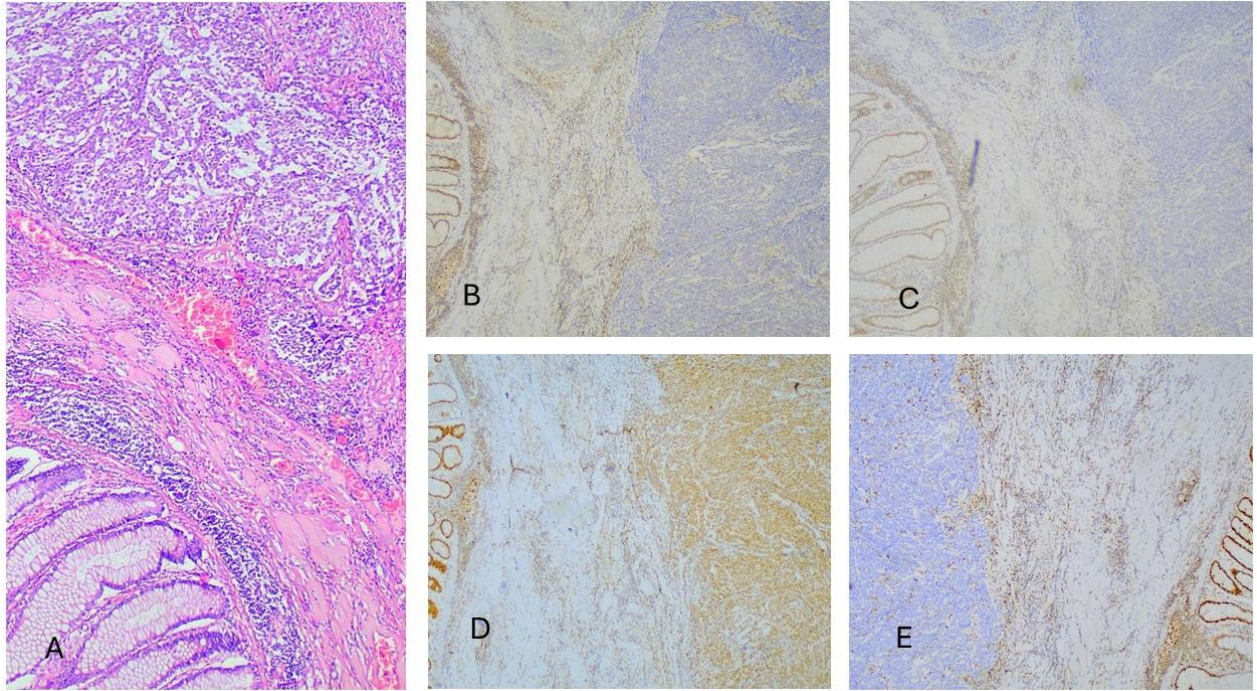
Снимка 19. Муцинозен карцином G2 – екстрацелуларна слюзпродукция. А – Хистологичен препарат – оцв. Н&Е; В – dMLH1; С – dPMS2; D – pMSH2; E – pMSH6. ув. 10x.



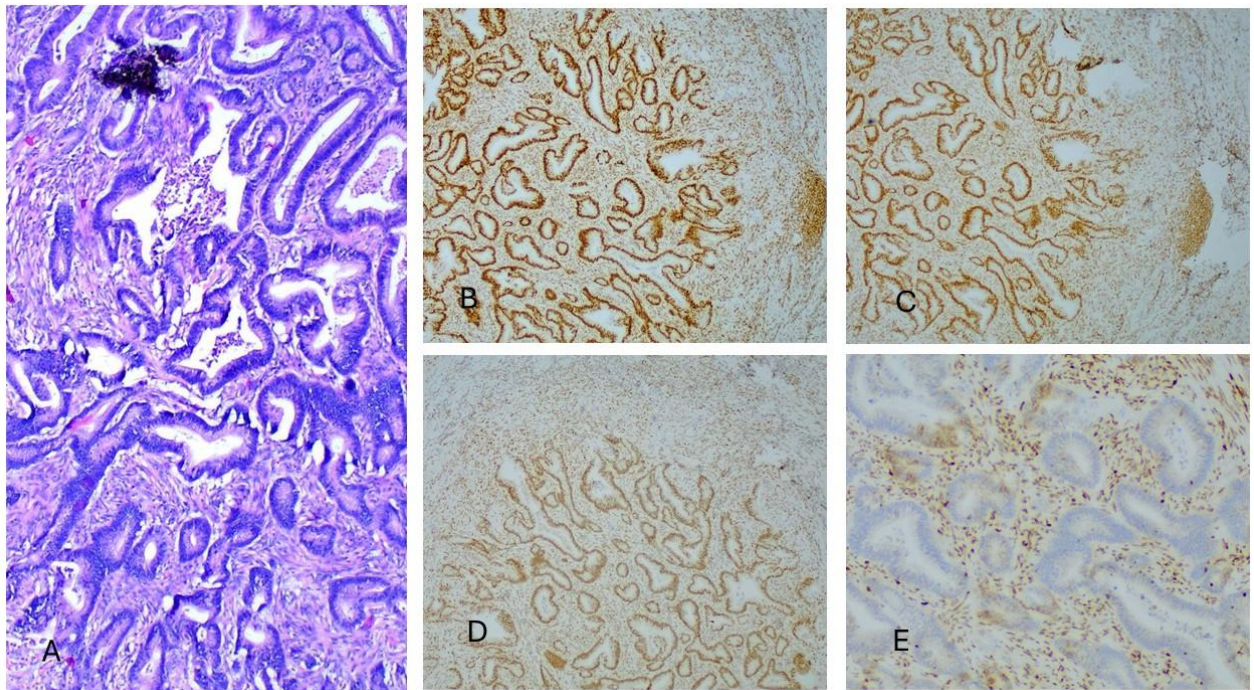
Снимка 20. Муцинозен карцином G2 – екстрацелуларна слузопродукция. А – Хистологичен препарат – оцв. Н&Е; В – pMLH1; С – pPMS2; D – dMSH2; E – dMSH6. ув. 10x.



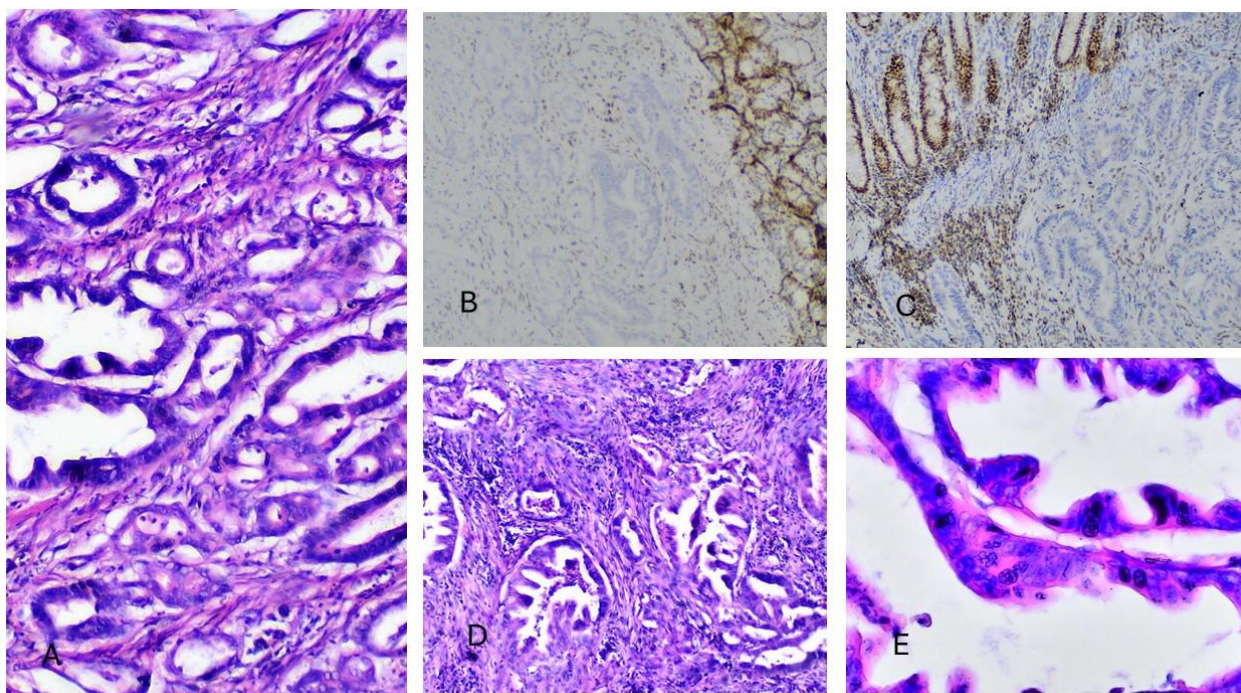
Снимка 21. Медуларен карцином. А и В – Хистологичен препарат – оцв. Н&Е, ув. 10x, 40x; С – dMLH1; D – dPMS2; E – pMSH2; F – pMSH6. ув. 10x.



Снимка 22. MiNEN. А – Хистологичен препарат – оцв. Н&Е; В – dMLH1; С – dPMS2; D – pMSH2; Е – dMSH6. ув. 10х.



Снимка 23. Аденокарцином G2 – NOS. А – Хистологичен препарат – оцв. Н&Е; В – pMLH1; С – pPMS2; D – pMSH2; Е – dMSH6 – изолиран дефицит. ув. 10х.



Снимка 24. Серетиран аденокарцином G2. А, D, E – Хистологичен препарат – оцв. Н&Е, ув. 10х, 40х; В – dMLH1; С – pMS2. ув. 10х.

ПО ЗАДАЧА №5: МУТАЦИИ НА НЯКОИ ГЕНИ В КРК, ИЗСЛЕДВАНИ ЧРЕЗ NGS

В нашето проучване беше направено изследване на мутациите при колоректалните карциноми чрез Next-Generation Sequencing (NGS). Използвахме панела на Illumina – „TruSight Tumor 15“. Гените включени в този панел са: AKT1, BRAF, EGFR, ERBB2(HER2), FOXL2, GNA11, GNAQ, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET, TP53.

В извадката от 100 пациента, данни от NGS изследването са налични за 88 от тях, като 38 са жени и 50 мъже. За останалите 12 пациента липсват конкретни данни, което е свързано с технически причини, липса на достатъчно туморен материал в парафиновото блокче и др.

Получените резултати от 88 те пациента показват следното:

Мутационен профил и пол – Таблица 40:

| Параметър | Жени n= 38 | | Мъже n= 50 | |
|-----------|----------------|-------|----------------|-------|
| | Абсолютен брой | % | Абсолютен брой | % |
| TP53 | 29 | 76.3% | 33 | 66.0% |
| KRAS | 15 | 39.5% | 22 | 44.0% |

| | | | | |
|--------|---|-------|---|-------|
| BRAF | 8 | 21.1% | 9 | 18.0% |
| PIK3CA | 4 | 10.5% | 7 | 14.0% |
| NRAS | 2 | 5.3% | 2 | 4.0% |

Таблица 40. Разпределение на мутациите, определени чрез NGS, по пол.

- В настоящата извадка TP53 е най-често срещаната мутация и при двата пола. При жените TP53 се установява в 76.3% от случаите, следван от KRAS (39.5%), BRAF (21.1%), PIK3CA (10.5%) и NRAS (5.3%). При мъжете TP53 също е доминираща мутация (66.0%), последвана от KRAS (44.0%), BRAF (18.0%), PIK3CA (14.0%) и NRAS (4.0%). Наблюдава се сходен мутационен профил между половете, без съществено различие в йерархията на честотата на отделните гени.

- Мутационен профил и първична туморна локализация – десен колон, ляв колон, ректум.

В Таблица 41 е отразено разпределението на мутациите съобразно локализацията на първичния тумор – десен колон, ляв колон и ректум. NGS данни са налични при n = 88 пациенти (десен колон n = 36, ляв колон n = 26, ректум n = 26).

| Локализация (NGS n) | TP53 | KRAS | BRAF | PIK3CA | NRAS | AKT1 |
|---------------------|------|------|------|--------|------|------|
| Десен колон (n=36) | 20 | 14 | 14 | 7 | 1 | 2 |
| Ляв колон (n=26) | 21 | 9 | 3 | 3 | 1 | 0 |
| Ректум (n=26) | 21 | 14 | 0 | 1 | 2 | 0 |

Таблица 41. Абсолютен брой пациенти с мутация по ген и локализация в десен колон, ляв колон и ректум.

За 12 от пациентите липсва информация за мутации. Забележка: Да се има предвид, че при повечето тумори се откриват мутации в 2 и повече гена.

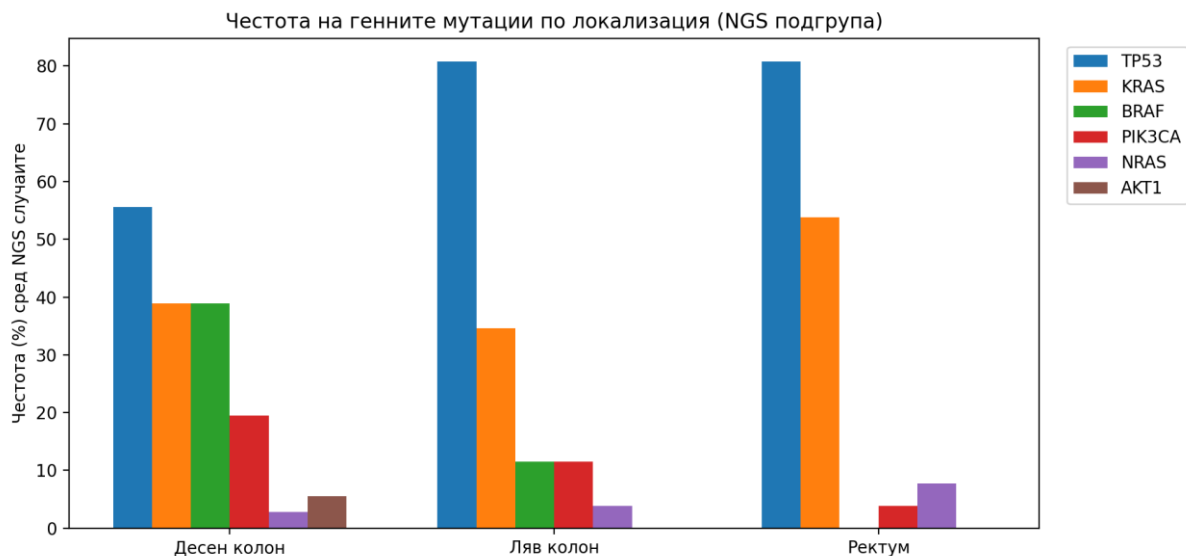
Таблица 42 показва резултатите от статистическите тестове за разпределение на мутациите спрямо първичната туморна локализация:

| Ген | χ^2 | df | p (Pearson) | min очаквана | p (Monte Carlo) |
|------|----------|----|-------------|--------------|-----------------|
| TP53 | 6.497 | 2 | 0.038837 | 7.682 | |
| KRAS | 2.222 | 2 | 0.329208 | 10.932 | |

| | | | | | |
|--------|--------|---|----------|-------|----------|
| BRAF | 16.082 | 2 | 0.000322 | 5.023 | |
| PIK3CA | 3.389 | 2 | 0.183645 | 3.250 | 0.636039 |
| NRAS | 0.882 | 2 | 0.643402 | 1.182 | 0.973167 |
| AKT1 | 2.956 | 2 | 0.228085 | 0.591 | 0.657356 |

Таблица 42. Резултати от статистическите тестове за разпределение на мутациите спрямо първичната туморна локализация в десен колон, ляв колон и ректум.

Визуално разпределението по честота е отразено на Фигура 9:



Фигура 9. Честота (%) на мутациите по локализация.

Най-ясно изразена асоциация с локализация се наблюдава за BRAF: честотата е най-висока при туморите на десен колон (38.9%), значително по-ниска при туморите на ляв колон (11.5%) и липсва при ректалните (0%). Това се потвърждава от Pearson χ^2 тест ($p = 0.000322$). За останалите гени не се установява убедителна статистически значима зависимост от локализацията в тази NGS подгрупа.

Десен колон: Туморите на десен колон са с най-голям общ брой мутации (48 бр.) – TP53, KRAS, BRAF, PIK3CA и AKT1. Мутациите в BRAF са по-чести в тази локализация в сравнение с останалите. KRAS мутациите са с по-ниска честота и съвпадат с тези при ректалните карциноми. Високата честота на BRAF мутации в десния колон съответства на добре познатите молекулярни характеристики на колоректалния карцином и насочва към спорадичен път на карциногенеза, а не към синдром на Lynch.

Ляв колон: В ляв колон туморите са с по-нисък общ брой мутации (37 бр.) сравнено

с десния колон. Доминиращите мутации са в TP53 и KRAS, като PIK3CA също се среща, но с по-ниска честота.

Ректум: Ректалните карциноми имат общо 38 бр. мутации, като TP53 е с най-висока честота и не се установяват BRAF мутации, което представлява съществено разграничение. Профилът на ректалните карциноми се различава значително от този на десностранный тумори, които по-често демонстрират BRAF мутации, а наличието на KRAS и NRAS мутации при ректалните тумори очертава мутационен спектър, по-характерен за спорадични форми на колоректален карцином, отколкото за наследствени синдроми като Lynch.

- Мутации и хистологичен субтип на колоректалните карциноми

При направените анализи се установи

BRAF и хистологичен субтип: Pearson χ^2 тест: $\chi^2 = 18.019$; $df = 8$; $p = 0.0211$. В този анализ трябва да се има предвид, че много от мутациите в различните хистологични субтипове са с ниска честота. Поради тази причина допълнително анализирахме с Monte Carlo пермутация, който показва липса на статистически значими резултати – $p = 0.3366$.

Допълнително осъществихме групиране на хистологичните подтипове в три групи: аденокарцином NOS, муцинозни варианти (всички муцинозни варианти) и редки варианти (напр. медуларен карцином и слабокохезивен), което доведе до резултатите в Таблица 43:

| Хистологична група | BRAF+ | Общо (n) | BRAF (%) |
|--------------------|-------|----------|----------|
| Аденокарцином NOS | 8 | 70 | 11.4% |
| Муцинозни варианти | 5 | 9 | 55.6% |
| Редки варианти | 0 | 9 | 0.0% |

Таблица 43. BRAF мутации спрямо обединени хистологични субгрупи – аденокарцином NOS, муцинозни хистологични варианти, редки хистологични варианти

Получените резултати показаха следното: Pearson χ^2 тест: $\chi^2 = 11.820$; $df = 2$; $p = 0.0027$; Monte Carlo апроксимация (при редки клетки): $p = 0.0031$.

Най-висока честота на BRAF мутация се наблюдава при муцинозните варианти (55.6%), следвани от Аденокарцином NOS (11.4%). В групата редките варианти не се установяват BRAF мутации. Получените резултати показват, че BRAF мутацията е статистически свързана с муцинозната морфология в настоящата NGS подизвадка.

Останалите изследвани мутации – TP53, KRAS, PIK3CA, NRAS, AKT1, не показваха статистически значими зависимости с хистологичните субтипове. Оттук следва изводът, че разпределението на BRAF мутацията спрямо обединени хистологични групи показва статистически значима асоциация. Тези данни подкрепят връзката между BRAF мутацията и муцинозната морфология при колоректален карцином.

При изследване на зависимости на други туморни характеристики по отношение на мутационния статус в NGS подизвадката (n = 88) само BRAF мутациите показват статистически значима зависимост ($\chi^2 = 9.640$; df = 2; p = 0.0081) с туморния грейд (G). При съпоставяне на мутационния статус на различните гени в пациентската извадка, не се установяват статистически значими асоциации между повечето изследвани мутации и туморния стадий (pT). Единствено NRAS показва граничен резултат в тази категория, който обаче не достига статистически значими стойности ($\chi^2 = 10.626$; df = 5; p = 0.0593). По отношение на нодалните метастази (N статус) само TP53 показва гранични, но статистически незначими резултати ($\chi^2 = 5.988$; df = 2; p = 0.0501). Подобни гранични резултати за BRAF мутациите се получават и при съпоставянето с LVI ($\chi^2 = 3.603$; df = 1; p = 0.0577).

Граничен и близък до статистически значим е и резултатът за PIK3CA и PNI ($\chi^2 = 3.664$; df = 1; p = 0.0556).

- Перитуморна имунна Crohn-like реакция съотнесена към мутации.

Анализът на връзката между стромната перитуморна имунна реакция и генетичните мутации показва статистически значима асоциация единствено за NRAS ($\chi^2 = 7.21$; df = 2; p = 0.027). Това предполага възможна връзка между NRAS мутационния статус и характеристиките на туморната имунна микросреда. За останалите гени (TP53, KRAS, BRAF, PIK3CA, AKT1) не се установи статистически значима зависимост (p > 0.05).

- Перитуморен бъдинг и генни мутации:

Bd1 (Bd0 + Bd1): Мутациите в TP53 и KRAS са най-чести, а с умерена честота са BRAF и PIK3CA. Подобна е и честотата съпоставена с Bd2.

Bd3 е с най-висока честота на TP53, следван от KRAS, BRAF и някои PIK3CA мутации.

- Генни мутации определени чрез NGS и MMR статус на колоректалните карциноми.

При статистическата обработка се получиха следните резултати:

TP53: $\chi^2 = 3.931$; df = 1; p = 0.0474; Cramer's V = 0.198 – статистически значим

KRAS: $\chi^2 = 10.283$; df = 1; p = 0.00134; Cramer's V = 0.321 – статистически значим

BRAF: $\chi^2 = 38.900$; $df = 1$; $p < 0.0001$; Cramer's V = 0.624 – статистически значим

PIK3CA: $\chi^2 = 2.794$; $df = 1$; $p = 0.0946$; Cramer's V = 0.167 – без статистическа
зависимост

NRAS: $\chi^2 = 0.131$; $df = 1$; $p = 0.7174$; Cramer's V = 0.036 – без статистическа
зависимост

AKT1: $\chi^2 = 1.393$; $df = 1$; $p = 0.2379$; Cramer's V = 0.118 – без статистическа
зависимост

Тези резултати показват силна връзка между тези специфични мутации и MMR статуса на колоректалните тумори, което предполага, че KRAS и BRAF мутациите са свързани с определени MMR статуси. Последното може да е от значение при избор на метод на лечение.

Туморният бъдинг е стандартизирана морфологична проява на туморната агресивност, отразяващ сложните взаимодействия между паренхимните туморни клетки, туморната строма и имунния отговор на гостоприемника. Концепцията свързваща растежната активност на тумора, клетъчната дисоциация и прогнозата на пациентите, датира от наблюденията на Broders et al. още от 1920 г. По-късно Imai въвежда термина „tumor sprouting“ в контекста на стомашния карцином, подчертавайки биологичното значение на единични туморни клетки и малки клетъчни групи в инвазивния фронт. Тези ранни наблюдения поставят основите на съвременното разбиране за туморния бъдинг. В съвременните изследвания туморният бъдинг се разглежда като хистологичен корелат на епително-мезенхимния преход (EMT), характеризиращ се с редуцирана клетъчна адхезия, повишена миграционна способност и инвазивен потенциал на туморните клетки. Този феномен обяснява връзката между туморния бъдинг и неблагоприятния клиничен изход, установена в редица проучвания.

Туморният бъдинг е утвърден като неблагоприятен прогностичен фактор не само при КРК, но и при редица други злокачествени заболявания, включително карциноми на хранопровода, стомаха, жлъчните пътища, устната кухина, белия дроб, пикочния мехур, маточната шийка и млечната жлеза.

Въпреки утвърденото прогностично значение, оценката на туморния бъдинг в предоперативни ендоскопски биопсии остава силно ограничена. Множество автори подчертават проблеми, свързани с малкия обем на материала, фрагментацията, некрозата, възпалението, липсата на инвазивен фронт и крайните степени на диференциация. Нашите резултати напълно кореспондират с тези данни. В настоящата извадка туморният бъдинг е бил оценен само в 12% от случаите, докато при 88% от биопсиите това не е било възможно. Най-честите ограничаващи фактори са фрагментацията на материала (43%), оскъдният биопсичен материал (12%), туморната некроза (10%), добре диференцираните тумори (8%), нискодиференцираните тумори (7%), липсата на инвазивен фронт (6%) и изразеното възпаление (1%). Това ясно показва, че невъзможността за отчитане на перитуморен бъдинг в ендоскопски биопсии е преди всичко методологичен, а не биологичен проблем. Следва да се подчертае, че тези фактори не представляват независими биологични променливи, а структурни и технически ограничения на биопсичния материал. Поради това тяхното статистическо моделиране като предиктори за

неотчитане на РТВ би било методологично некоректно и с ограничена интерпретативна стойност.

Отчетеният туморен бъдинг се наблюдава почти изключително при биопсии с оптимално качество, което подчертава ключовото значение на адекватното вземане на биопсичния материал. Наличието на инвазивен туморен фронт представлява задължително условие за надеждна оценка, поради което статистическото моделиране на причините за неотчитане е методологично некоректно, тъй като тези фактори представляват детерминистични ограничения.

Не се установява значима връзка между перитуморния бъдинг и пола или локализацията на първичния тумор. Интересно е, че пациентите с отчетен туморен бъдинг са със статистически по-висока възраст. Въпреки това, поради ограничения размер на извадката, този резултат следва да се интерпретира предпазливо и изисква потвърждение в по-големи серии. Възможно е наблюдаваната възрастова разлика да отразява индиректно по-напреднал стадий на туморно развитие или по-добро морфологично представяне на инвазивния фронт при по-възрастни пациенти, както и промени в имунната туморна среда, но подобна хипотеза остава спекулативна и не може да бъде потвърдена въз основа на настоящото изследване.

Допълнителни проучвания показват, че възпроизводимостта на оценката на туморния бъдинг е значително по-ниска в биопсичен материал в сравнение с резекционни препарати. Rogers et al. демонстрират ограничено интеробзерверно съгласие при оценка на туморния бъдинг в биопсии, като възпроизводимостта се подобрява значително при резекционен материал. И Rogers et al. и Giger et al. съобщават, че съответно в 20% и 17% от ендоскопските предоперативни биопсии от колоректален карцином е възможно отчитането на туморен бъдинг. (в двете публикации се оценява интратуморния бъдинг). Нашите резултати за възможността за оценка на перитуморен бъдинг в КРК в ендоскопски биопсии са значително по-ниски – само 12%. Логичното обяснение на този факт се състои в следното: ендоскопският биопсичен материал, поради малкия си обем, не представя напълно инвазивния туморен фронт, което ограничава възможността за отчитането на РТВ и затруднява отдиференцирането на ИТВ от РТВ. Това методологично несъответствие между биопсичен и резекционен материал допълнително ограничава директната съпоставимост на резултатите и подчертава, че туморният бъдинг е параметър, първоначално разработен и валидиран за оценка върху резекционни препарати.

Zlobec et al. предлагат нова система за оценка на туморния бъдинг (ТВ), която включва допълнителна категория, обозначена като „нулев“ бъдинг. В тяхното проучване е

установено, че при над 10% от колоректалните карциноми се наблюдава този нов „0“ бъдинг скор. В настоящото изследване също беше наблюдавано наличие на случаи с BD = 0, въпреки това, съгласно актуалните препоръки на International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC), всички случаи с „нулев“ бъдинг бяха класифицирани в категория BD1. Тази нова система за градиране на туморния бъдинг не е широко приета и внедрена в клиничната практика. Тя предполага по-цялостен подход към оценката на туморния бъдинг, като обхваща по-широк спектър от модели на туморна дисоциация, включително случаи без бъдинг активност. Както при всяка нова концепция, са необходими допълнителни проучвания, валидиране и постигане на експертен консенсус, преди подобни модификации да бъдат интегрирани рутинно в клиничната практика.

В заключение, настоящото изследване потвърждава, че оценката на туморния бъдинг в ендоскопски колоректални биопсии е силно ограничена от технически и морфологични фактори. Въпреки че туморният бъдинг остава изключително важен прогностичен маркер при резекционен материал, рутинната му оценка в ендоскопски биопсии следва да се извършва с повишено внимание и ясното съзнание за методологичните и техническите ограничения.

ДИСКУСИЯ – ВТОРА ПАЦИЕНТСКА ИЗВАДКА

Във втората част на проучването бяха изследвани общо 100 пациента, като демографските данни показват лек превес на мъжете — 57 пациенти (57%) спрямо 43 жени (43%). Съотношението на изследвани мъже: жени е приблизително 1.33:1 със средна възраст на пациентите около 70 години. Тези резултати съответстват на глобалните демографски данни за колоректалния карцином, тъй като неговата честота нараства с възрастта. Нашите данни съвпадат с данните, публикувани от Siegel и сътр., които указват, че вероятността за възникване на инвазивен карцином (в частта колон и ректум) е съответно: 2.7% за мъже и 2.2% за жени във възрастта от 65- 84 г. и 1.8% за мъже и 1.7% за жени над 85 г. възраст. White и сътр. установяват възрастово-полови различия в честотата на колоректалните карциноми в кохорта от английски пациенти и отбелязват, че честотата на заболяемост над 45 г. възраст е значително по-висока при мъже, отколкото при жени, като това различие е най-изявено във възрастовата група 70 –74 години, със съотношение на мъже към жени 1.7:1. Joо и сътр. съобщават за липса на полово-възрастови различия по отношение възрастта за първоначално диагностициране на

колоректален карцином при мъже спрямо жени, в същото време обаче, диагностицирането на КРК при асимптоматични пациенти е почти 49% при мъже срещу 42% при жени.

Много автори проучват различията, свързани с пол, възраст и локализация на първичните карциноми на дебело черво и ректум. Тези изследвания се основават на данните, публикувани от Vufill и сътр., които анализират характеристиките на колоректалния карцином според ембрионалния произход на различните анатомични участъци на дебело черво и ректум. Впоследствие множество автори споделят подобни наблюдения, касаещи локализационните характеристики на колоректалните карциноми. В нашето проучване ние също категоризирахме туморните локализации в три групи: дясно дебело черво, ляво дебело черво и ректум, като получените от нас резултати показаха липса на статистически значими зависимости между пол и локализация на тумора ($\chi^2 = 2.95$; $df = 7$; $p = 0.89$) във всяка отделна анатомична локализация, както и липса на такива при обединяването на десностранна, левостранна и ректална туморни локализации ($\chi^2 = 0.19$; $df = 2$; $p = 0.91$). И двата подхода потвърждават липсата на зависимост между пол и анатомичното разпределение на колоректалния карцином в изследваната от нас кохорта пациенти. От изложеното дотук следва, че ние не наблюдаваме статистически значими зависимости между пол, възраст и анатомична локализация на колоректалните карциноми.

Спрямо хистологичните субтипове на колоректалния карцином, нашето изследване установи следното разпределение: Аденокарцином NOS – $n = 77$ (77%); Муцинозен аденокарцином – $n = 11$ (11%); Серетиран аденокарцином – $n = 4$ (4%); Медуларен карцином – $n = 2$ (2%); Други – $n = 6$ (6%) (Категория „Други“ включва: недиференциран карцином, MiNEN, синхронни тумори, аденокарцином с муциозна компонента, аденокарцином с муциозна и poorly cohesive компонента и аденокарцином с интра и екстрацелуларна слузопродукция).

Тези данни съответстват приблизително на публикуваните данни в литературата, според които конвенционалният аденокарцином е доминиращият хистологичен тип при колоректалния карцином- над 70 – 80% в много кохорти, а останалите типове КРК са сравнително по-редки.

Муциозния аденокарцином в нашата серия е представен в около 11% от случаите и е в рамките на описваните в литературата 10 – 15%. Тази относителна стабилност между различни популации, вероятно отразява добре дефинираните диагностични критерии (>50% екстрацелуларен муцин).

Серетирият аденокарцином в нашето изследване представлява 4%, което е по-ниско от съобщаваните в редица публикации стойности около 7 – 12%. Това несъответствие може да се обясни с няколко фактора:

- вариабилност в хистологичните критерии и различия в субективната оценка;
- различно разпределение на проксимални спрямо дистални тумори;
- особености на пациентската кохорта.

Медуларният карцином е наблюдаван в около 2% от пациентите в нашата кохорта, като тази честота е на горната граница на публикуваните литературни данни. Това е рядък туморен вариант и установената честота в нашето проучване е възможно да се дължи на специфичен молекулярен профил на КРК при селектираните от нас пациенти – MSI/dMMR тумори или на непреднамерен ефект на селекция.

Редките варианти – MiNEN, недиференциран карцином, смесени хистологични субтипове – муцинозни/слабокохезивни и синхронни форми на карциноми са наблюдавани общо в около 6% от пациентите, честота описвана в различни публикации.

Анализът на групирани хистологични субтипове спрямо анатомичната локализация (десен колон, ляв колон и ректум) не установи статистически значима връзка между двете променливи ($\chi^2 = 19.937$; $df = 18$; $p = 0.336$). Допълнителният анализ по пол също не демонстрира статистически значими зависимости (мъже: $\chi^2 = 12.826$; $p = 0.685$; жени: $\chi^2 = 8.573$; $p = 0.380$). Получените резултати показват, че разпределението на хистологичните е сходно между различните анатомични локализации и не се влияе съществено от пола на пациентите.

Туморен грейд (Grade) и pT стадий

Степента на диференциация (G) е морфологичен маркер за биологично туморно поведение и е инструмент за прогнозиране и клинична стратификация, като представлява и неразделна част от алгоритмите при вземането на персонализирани онкотерапевтични решения.

В настоящата кохорта не се установява статистически значима връзка между анатомичната локализация (десен колон/ляв колон/ректум) и туморния грейд ($\chi^2 = 9.53$; $df = 6$; $p = 0.146$), включително и при стратификация по пол (мъже: $\chi^2 = 4.38$; $df = 6$; $p = 0.626$; жени: $\chi^2 = 7.88$; $df = 4$; $p = 0.096$).

При директно сравнение между Grade и pT се установява статистически значима асоциация ($\chi^2 = 35.27$; $df = 15$; $p = 0.0023$) и този резултат съответства на очакваната зависимост между по-ниската диференциация, по-инвазивен туморен растеж и по-голяма дълбочина на инфилтрация. Възможното обяснение на тази зависимост е, че по-ниската

степен на диференциация се съпътства от промени в клетъчната адхезия, архитектурата на жлезите, степента и вида на взаимодействие между тумор и строма, както и определени модели на инвазия. Литературните данни показват, че агресивните инвазивни фенотипове (вкл. туморен бъдинг/EMT) са свързвани с по-неблагоприятни характеристики и прогноза.

Лимфен нодален статус (N)

Нодалният статус е основен компонент на TNM системата и сурогатен маркер за регионално туморно разпространение. В изследваната от нас пациентска кохорта не се установяват статистически значими различия в N статуса според локализацията ($\chi^2 = 11.811$; $df = 14$; $p = 0.621$), включително при анализ по пол (мъже: $\chi^2 = 12.821$; $df = 12$; $p = 0.382$; жени: $\chi^2 = 8.376$; $df = 14$; $p = 0.869$). Липсата на асоциация между локализация и N статус може да отразява комбинация от фактори: хетерогенност на категориите N, различен, възможно и недостатъчен обем на лимфната дисекция, както и ограничена предиктивна роля при редките туморни подкатегории. В нашия случай това означава, че локализацията сама по себе си не е достатъчна за прогнозиране на регионална лимфна дисеминация.

Лимфоваскуларна инвазия (LVI)

Лимфоваскуларната инвазия е ключов прогностичен морфологичен параметър, отразяващ както локалната инвазивност, така и метастатичния туморен потенциал. Множеството диагностични предизвикателства и варибилността при патологичната оценка, са довели до създаване на по-обективни критерии за LVI в КРК, част от тях базирани на Delphi консенсусни подходи. В настоящата кохорта LVI е положителна при 26/100 пациенти (26%). По локализационни групи: десен колон – 14; ляв колон – 7; ректум – 5. Наблюдава се тенденция за по-висока честота на LVI при десностранни тумори, но без статистическа значимост ($\chi^2 = 2.382$; $df = 2$; $p = 0.304$). В същото време, LVI показва значими асоциации с ключови маркери на агресивност и дисеминационен потенциал: pT стадий ($\chi^2 = 16.13$; $df = 5$; $p = 0.0065$; Cramer's V = 0.40), Grade ($\chi^2 = 17.33$; $df = 2$; $p = 0.00017$; Cramer's V = 0.42) и N статус ($\chi^2 = 27.75$; $df = 7$; $p = 0.00024$; Cramer's V = 0.53), като последната, най-силно изразена, асоциация между LVI и N статуса подкрепя концепцията за LVI като директен морфологичен субстрат на лимфогенна дисеминация и практически оправдава системното и внимателно търсене и докладване на LVI във всички резекционни препарати.

Периневрална инвазия (PNI)

Периневралната инвазия е маркер за инвазивен фенотип и в редица тумори е асоциирана с по-неблагоприятен ход. В нашето изследване PNI не показва зависимост от

локализацията на първичния тумор ($\chi^2 = 0.381$; $df = 2$; $p = 0.8267$), а също така липсва статистически значима асоциация с хистологичните субтипове на колоректалните карциноми ($\chi^2 = 13.815$; $df = 9$; $p = 0.1291$), като интерпретацията е ограничена от редки категории. За разлика от горното, PNI показва значими връзки с туморния pT стадий ($\chi^2 = 11.790$; $df = 5$; $p = 0.03778$), LVI ($\chi^2 = 20.187$; $df = 1$; $p < 0.001$) и N статуса ($\chi^2 = 18.527$; $df = 7$; $p = 0.009806$). Тези зависимости подкрепят PNI като маркер за локално напреднало заболяване и повишен риск от метастазиране. Изразената силна асоциация на PNI с LVI предполага концентрация на инвазивни характеристики при част от туморите, вероятно дължащи се на общи механизми на миграция и ремоделиране на стромата. От практическа гледна точка, комбинацията PNI+ и LVI+ е особено алармираща морфологична туморна характеристика.

Перитуморен имунен отговор („Crohn-like“ лимфоидна реакция)

„Crohn-like“ лимфоидната реакция се разглежда като морфологичен индикатор за активен имунен отговор и наличие на третични имунни лимфни структури. Литературните данни показват влияние върху стадирането при десностранните колоректални карциноми, докато по-съвременни публикации акцентират върху имунологичната и потенциално терапевтична значимост на наличния имунен отговор. Наблюдавани са и връзки с TIL и преживяемост, а критериите за оценка на този тип имунен отговор са обект на валидиране. В настоящата кохорта „Crohn-like“ перитуморният стромален имунен отговор е оценяван полуколичествено (липсващ/умерен/изразен). Налице е статистически значима асоциация между интензитета на имунния отговор и анатомичната локализация ($\chi^2 = 14.05$; $df = 4$; $p = 0.0071$). Десният колон показва най-висок дял на изразена реакция (липсва 5; умерена 13; изразена 24), а ректумът – преобладаващо умерена реакция и нисък дял изразен отговор (липсва 9; умерена 16; изразена 4). В същото време не се демонстрират статистически значими връзки между „Crohn-like“ реакцията и класическите прогностични параметри: Grade ($\chi^2 = 1.742$; $df = 2$; $p = 0.418$), pT ($\chi^2 = 5.411$; $df = 15$; $p = 0.988$), N статус ($\chi^2 = 0.923$; $df = 2$; $p = 0.630$), LVI ($\chi^2 = 2.713$; $df = 3$; $p = 0.438$) и PNI ($\chi^2 = 3.715$; $df = 3$; $p = 0.294$).

Резултатите в нашето изследване подкрепят тезата, че перитуморният имунен отговор е по-тясно свързан с биологията на анатомичния сегмент, отколкото с морфологичните маркери на агресивност. Това е съвместимо с представата за различия в молекулярната и имунната микросреда в проксимален и дистален колон и с концепцията, че тези лимфоидни структури са отражение на локалния имунен антитуморен отговор.

В заключение можем да отбележим, че нашата кохорта пациенти демонстрира ясна вътрешна консистентност на морфологичните прогностични фактори: туморната диференциация (G) е асоциирана с pT; LVI е силно свързана с pT, G и N; PNI е асоциирана с pT, LVI и N; а „Crohn-like“ перитуморният имунен отговор е зависим от локализацията, но не и от G/pT/N/LVI/PNI. Тези резултати подчертават ролята на LVI и PNI като обективни маркери за инвазивност и метастатичен риск и подкрепят необходимостта от стандартизирано и подробно докладване на тези параметри.

Перитуморен бъдинг (РТВ)

Перитуморният бъдинг е валидиран морфологичен маркер при колоректалните карциноми, който е показател за инвазивност и метастатичен потенциал. В контекста на настоящото проучване, ТВ е разглеждан като интегрален компонент на инвазивния фенотип и е интерпретиран паралелно с pT, статуса на лимфните възли, LVI, PNI, туморен грейд и перитуморния имунен отговор. Поради високата клинична стойност и доказаната независима прогностична сила, ТВ е предмет на международна стандартизация и се препоръчва за рутинно изследване.

Докладваните от нас резултати показаха значими асоциации между LVI/PNI и pT/N/грейд и РТВ следва да се разглежда като допълващ „инвазивен индикатор“, който би могъл да хвърли светлина върху различията в клиничното поведение на част от туморите с еднакъв pT или еднакъв грейд, като именно РТВ може да улови субпопулацията от клетки с най-висок миграционен потенциал. Това кореспондира с клиничните наблюдения, че ТВ е свързан с по-агресивни патологични характеристики и по-лоша прогноза. Например при pT3/pT4 тумори, наличието на висок РТВ подсилва рисковия профил на туморите, особено ако е съчетан с LVI+ и/или PNI+; при стадий II (N0) високият РТВ може да е основание за по-агресивно проследяване и обсъждане на адювантна терапия.; при биопсични материали РТВ може да насочи към по-задълбочено предоперативно стадиране и вземане на адекватни клинични решения. РТВСС препоръчва оценката на РТВ да се извършва върху H&E оцветени препарати, но в определени ситуации с ограничена видимост на бъдинг клетките – плътен възпалителен инфилтрат, значима стромална реакция или артефакти, панцитокератиновата имунохистохимия може да повиши чувствителността за детекция на бъдинг клетките и да улесни преброяването. Някои автори демонстрират възможността за по-комплексна и точна оценка на РТВ чрез оцветяване за СК, но подчертават и риска от „overcalling“ поради различията между H&E-базирани и ИНС-базирани методи. Нашият анализ показва, че високият туморен бъдинг не представлява изолиран хистологичен феномен, а е съставна част на инвазивни туморни характеристики, включващи дълбочина

на туморната инфилтрация, лимфоваскуларна инвазия (LVI), периневрална инвазия (PNI) и регионална лимфна дисеминация. Не се установява зависимост от анатомичната локализация (десен колон, ляв колон, ректум).

Статистически значима е асоциацията между степента на туморния бъдинг и pT стадия. Туморите с pT3 – pT4 показват по-висока честота на изразен бъдинг. Значими са и зависимостите между високият туморен бъдинг и наличие на LVI. Бъдинг клетките са дисоциирани туморни единици с повишена миграционна способност, докато LVI доказва навлизане в съдови структури. Комбинацията ТВ+ и LVI+ очертава подгрупа пациенти с изразен туморен инвазивен потенциал. Не установихме статистически значима връзка между висок туморен бъдинг и положителен нодален статус. Туморният бъдинг може да се разглежда като морфологичен предиктор за регионална лимфна дисеминация и индикатор за микрометастатична активност, на базата на асоциацията на pTV и LVI. Значима е и асоциацията между висок бъдинг и наличие на периневрална инвазия. Комбинацията ТВ+ и PNI+ подсказва активен инвазивен фронт, използващ различни анатомични структури за прогресия.

Налице е тенденция към по-висок бъдинг при по-висок грейд, но бъдингът не е еквивалентен на степента на диференциация. Той добавя независима прогностична информация отвъд класическото градиране.

В настоящата кохорта не установихме статистически значима зависимост между туморния бъдинг и интензитета на перитуморния имунен отговор. Това предполага, че инвазивният фенотип в рамките на изследваните случаи не е пряко модулиран от количествено оценен стромален имунен инфилтрат.

В рамките на един интегриран туморен модел, най-неблагоприятният морфологичен профил включва висок бъдинг, pT3/pT4, LVI+, PNI+ и N+. Тези параметри формират консистентен комплекс на агресивност, при който туморният бъдинг заема централна роля като индикатор на активния инвазивен фронт.

В нашата пациентска кохорта туморният бъдинг потвърждава ролята си като независим маркер на агресивност и допълва pT, N и LVI при стратификацията на риска. Рутинното му докладване е обосновано от наблюдаваните статистически зависимости.

В заключение, туморният бъдинг е стандартизируем и клинично значим параметър, който отразява активния инвазивен фронт на КРК. Съгласно ITBCC и последващи консенсуси, ТВ следва да се докладва рутинно, тъй като добавя независима прогностична информация отвъд pT, грейда и нодалния статус.

Mismatch repair (MMR)

В настоящата кохорта честотата на dMMR (18%) попада в диапазона 10 – 20%, което съответства на международните популационни данни. Нашият анализ демонстрира силна статистически значима асоциация между dMMR статус и десностранна локализация ($p < 0.001$), което е в пълно съответствие с публикуваните серии, показващи че 70 – 80% от MSI-H карциномите са локализирани проксимално от fl. lienalis. Този модел отразява различната ембриологична, микробиомна и молекулярна среда на проксималния колон. В литературата се приема, че десностранните тумори по-често следват serrated pathway с MLH1 хиперметилация и CIMP-high профил.

По отношение на MMR и хистологичен субтип в нашата кохорта dMMR туморите демонстрират по-висока честота на муцинозни и медуларни варианти, като това съответства на WHO класификацията (2019), според която медуларният карцином е тясно асоцииран с MSI фенотип. В свои изследвания Yamauchi et al. съобщават за статистически значима връзка между MSI и муциозна морфология. Следователно наблюдаваната зависимост в нашата серия се подкрепя и от международните данни.

Нашето изследване не установява стабилна статистическа зависимост между MMR статус и туморен грейд. В литературата MSI-H туморите често са описвани като слабо диференцирани, но парадоксално с по-добра прогноза в ранни стадии. Това подчертава биологичната уникалност на dMMR карциномите – морфологично агресивни, но имунологично „видими“ за организма.

Не установихме статистически значима връзка между MMR статус и pT категория. Подобни резултати са публикувани и в TCGA анализа, където MSI не показва директна зависимост от дълбочината на инвазия. MMR статусът отразява молекулярния път на канцерогенеза, а не степента на локална инфилтрация.

MMR и нодален статус – в настоящото изследване не се наблюдава категорична зависимост между MMR статус и N стадий. Литературните данни са противоречиви – някои серии показват по-ниска честота на нодална дисеминация при MSI-H, докато други не установяват независим ефект след мултивариантен анализ, като възможното обяснение е повишената имунна активност при dMMR тумори, която ограничава ранната лимфогенна дисеминация.

Анализът на MMR статуса и установените чрез NGS мутации на колоректалните карциноми, при пациентите в нашата кохорта показва, че е налице силна асоциация между dMMR и BRAF V600E мутация ($p < 0.001$), което потвърждава спорадичния MSI път чрез MLH1 промоторна хиперметилация. Комбинацията dMMR + BRAF практически изключва Lynch синдром и има директно значение за генетичното консултиране. По отношение на

останалите установени от нас мутации – KRAS мутациите са по-чести при pMMR тумори, което съответства на класическия CIN път, като също така TP53 мутациите доминират в тази група, което подкрепя концепцията за хромозомна нестабилност като алтернативен механизъм.

Туморната имунна среда показва по-изразена перитуморна лимфоидна инфилтрация в настоящата серия при dMMR туморите, което се обяснява с високата туморна мутационна тежест и увеличен неоантигенен товар на MSI-H туморите, обуславящи активирана CD8+ T-клетъчна реакция. С този факт се обяснява и високият терапевтичен отговор към PD-1 инхибитори (ORR ~40–50%) при метастатичен MSI-H колоректален карцином.

Данните относно MMR статуса на колоректалните карциноми, изложени дотук, са тясно свързани с клиничното значение на тази туморна характеристика – MMR статусът има двойна прогностична и предиктивна стойност. При стадий II, dMMR туморите се асоциират с по-добра преживяемост и ограничена полза от 5-FU монотерапия. В метастатичен контекст dMMR е един от най-силните предиктивни биомаркери за имунотерапия.

В заключение, MMR статусът представлява централна молекулярна ос при колоректалния карцином. В настоящата кохорта той демонстрира очакваните асоциации с локализация, мутационен профил и имунна реакция, като потвърждава валидността на молекулярната стратификация. Интегрирането на изследването за MMR в рутинната диагностика е задължително както от прогностична, така и от терапевтична гледна точка.

Мутационен статус на колоректалните карциноми

KRAS мутациите показват очакваната асоциация с pMMR фенотипа и класическия хромозомно нестабилен (CIN) път и водят до активация на MAPK сигналния път и стимулират клетъчната пролиферация. Не показват стабилна зависимост с локализация или стадий, което подкрепя ролята им като ранно инициращо събитие в аденом-карцином последователността. От терапевтична гледна точка KRAS е утвърден предиктор за липса на отговор към анти-EGFR терапия.

NRAS мутациите са редки и не демонстрират статистически значими асоциации, което съответства на метаанализите.

BRAF V600E показва значима асоциация с dMMR статуса и десностранна локализация, както и с муцинозните хистологични субтипове. Този модел напълно съответства на serrated pathway концепцията. BRAF-позитивните тумори са свързани с по-

неблагоприятна прогноза при метастатично заболяване, като таргетната терапия подобрява преживяемостта.

TP53 мутациите доминират в pMMR групата и отразяват CIN пътя на канцерогенеза и са най-честата генетична алтерация при КРК. Техните ефекти се отразяват в нарушаване на апоптозата и повишена геномна нестабилност.

Наблюдава се тенденция към асоциация с метастази в лимфните възли, но получените от нас резултати са гранични и интерпретацията изисква предпазливост.

PIK3CA и AKT1 представляват компоненти на PI3K/AKT сигналната ос. Честотата им в настоящата серия съответства на международните данни, без значими зависимости с туморния стадий или първичната туморна локализация. Литературните данни подчертават потенциалната чувствителност към аспиринова адювантна терапия.

Съпоставка с литературата потвърждава, че мутационният профил в изследваната от нас кохорта следва двата основни биологични модела: MSI/dMMR/BRAF и CIN/KRAS/TP53, което потвърждава валидността на резултатите и значението на молекулярната стратификация в клиничната практика.

ИЗВОДИ

- Колоректалните карциноми в изследваната от нас пациентска кохорта са с ясно изразена хистопатологична и молекулярна хетерогенност, отразяваща съвременните концепции за поетапност и стъпаловиден модел на карциногенезата.
- Наблюдавахме съществена зависимост между туморната диференциация и дълбочината на инвазия (pT), като по-високият грейд корелира със статистически значими по-напреднал туморен стадий и по-висока честота на лимфогенна дисеминация.
- Метастазите в лимфните възли се асоциират с неблагоприятни морфологични туморни характеристики – висока степен на туморно дедиференциране, наличие на лимфоваскуларна инвазия (LVI), периневрална инвазия (PNI), което потвърждава ролята на изброените туморни характеристики, като ключови прогностични фактори при колоректалните карциноми.
- Лимфоваскуларната инвазия (LVI) е свързана с по-висок туморен стадий (pT), позитивен лимфен нодален статус и повишена туморна агресивност, като се утвърждава като независим маркер за неблагоприятна прогноза.
- Периневралната инвазия (PNI) е асоциирана също с по-напреднал туморен стадий (pT) и по-висока честота на регионална туморна дисеминация, което подкрепя концепцията за нейната роля като допълнителен индикатор за биологична агресивност.
- Дефицитът в mismatch repair системата (dMMR) в изследваната от нас група пациенти е в границите на публикуваните международни данни и демонстрира характерни морфологични и клиничко-патологични асоциации, съответстващи на познатия имунохистохимичен и молекулярен профил на тези тумори.
- Мутационният статус (KRAS, BRAF, TP53 и др.) корелира с локализацията, хистологичния субтип и стадия на заболяването, което подчертава значението на молекулярните туморни характеристики при определяне на терапевтичното поведение.
- Перитуморният имунен отговор („Crohn-like“ стромната възпалителна реакция) и степента на перитуморен бъдинг (PTB) показват съществени взаимовръзки с прогностичните показатели, което потвърждава ролята на туморната среда в прогресията на колоректалния карцином.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Теоретични приноси

Дисертационният труд представя цялостен морфологичен и молекулярен анализ на кохорта пациенти с колоректален карцином, който систематизира взаимодействията между класическите хистопатологични фактори и съвременните молекулярни маркери.

Подробно са анализирани връзките между туморната диференциация (G), pT стадия, лимфния нодален статус, LVI, PNI и перитуморния бъдинг (PTB), като са показани техните комплексни прогностични взаимоотношения.

Потвърдена е ролята на dMMR туморния статус като биологично обособен подтип с характерни клиничко-патологични особености в рамките на изследваната популация.

Извършен е задълбочен анализ на мутационния профил на колоректалните карциноми в изследваната кохорта пациенти и показано неговото взаимодействие с морфологичните параметри, като това допринася за по-прецизното разбиране на молекулярната класификация на заболяването.

За целите на нашето изследване, разработихме и направихме опит да приложим интегрален морфологичен индекс – Aggressive Score, който обединява няколко утвърдени прогностични маркера в единна оценъчна система за биологична туморна агресивност: туморен грейд (G), лимфоваскуларна инвазия (LVI) и периневрална инвазия (PNI), който показва корелации с високите pT стадии и неблагоприятни туморни морфологични характеристики. Този интегративен показател би предоставил допълнителни прогностични инструменти, но изисква проучване при по-големи кохорти от пациенти.

Методологични приноси

Приложен е интегративен подход, комбиниращ морфологичен, имунохистохимичен и молекулярно-генетичен анализ, което позволява комплексна оценка на туморната биология.

Използвани са съвременни статистически методи за оценка на асоциации и зависимости между прогностичните фактори, осигуряващи обективност и надеждност на резултатите.

Направихме опит да въведем допълнителна количествена система за оценка на комбинирания прогностичен риск чрез интеграция на морфологични туморни параметри.

Практико-приложни приноси

Резултатите имат директна клинична стойност за прецизиране на прогностичната оценка и терапевтичната стратификация на пациентите с колоректален карцином.

Получените от нас резултати подкрепят рутинното включване на оценката на перитуморния бърдинг (PTB), LVI, PNI и MMR статуса в стандартизирания патологичен протокол.

Предложихме научно-практически обоснован метод за извършването на сецирането на биопсичните резекционни материали от КРК, обоснован с необходимостта за адекватна оценка на различните прогностични фактори при тази група тумори, а по-специално за пълната оценка на LVI, IMVI и EMVI.

Aggressive Score би могъл да се използва като допълнителен прогностичен инструмент за клинична стратификация на пациентите с колоректален карцином.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Методика за прилагане и статистическа оценка на Aggressive Score при колоректален карцином:

1. Теоретична обосновка

Aggressive Score представлява изследователски индекс, конструиран с цел интегрирана оценка на морфологичните маркери за туморна агресивност при колоректален карцином (КРК). Индексът е комбинация от три утвърдени неблагоприятни прогностични фактора: периневрална инвазия (PNI), лимфоваскуларна инвазия (LVI) и ниска степен на диференциация (G3/G4).

2. Дефиниции и стойности на включените параметри

PNI (Perineural invasion): 0 = липсва; 1 = налична.

LVI (Lymphovascular invasion): 0 = липсва; 1 = налична.

Grade: 0 = G1/G2; 1 = G3/G4.

3. Формула за практическо изчисление:

$Aggressive\ Score = PNI\ (0/1) + LVI\ (0/1) + Grade\ (0/1).$

Минимална стойност = 0. Максимална стойност = 3.

4. Интерпретация на получените стойности

Score 0 – липса на агресивни морфологични характеристики.

Score 1 – наличие на един неблагоприятен фактор.

Score 2 – наличие на два неблагоприятни фактора.

Score 3 – наличие на трите неблагоприятни фактора – високорисков профил.

5. Разпределение на стойностите, получени за Aggressive Score, в изследваната кохорта (n = 100)

Score 0 – 53 случая; Score 1 – 25 случая; Score 2 – 15 случая; Score 3 – 7 случая.

6. Статистически анализ

Асоциациите между Aggressive Score и клинично-патологичните параметри бяха изследвани чрез χ^2 тест за независимост. При наличие на клетки с малък очакван брой наблюдения беше използвана Monte Carlo апроксимация. Стойности на $p < 0.05$ бяха приемани за статистически значими. За оценка на силата на асоциацията беше изчисляван коефициентът на Cramer's V.

7. Aggressive Score и N статус

Установена бе статистически значима асоциация между по-висок Aggressive Score и лимфна нодална позитивност ($\chi^2 = 13.916$; $df = 3$; $p = 0.003$), Cramer's V = 0.373. Резултатите показват прогресивно увеличаване на честотата на N+ с повишаване на Score.

8. Aggressive Score и pT стадий

Не се установи статистически значима зависимост между Aggressive Score и бинаризирания pT стадий (pT1 – 2 срещу pT3 – 4) ($\chi^2 = 5.950$; $df = 3$; $p = 0.114$), Cramer's V = 0.244, което показва слаба до умерена асоциация. В тази кохорта индексът демонстрира по-тясна връзка с лимфния статус, отколкото с локалната дълбочина на инвазия.

9. Логистичен модел и дискриминативна способност:

Беше проведен логистичен регресионен анализ с изход N позитивност. Сравнението между модел, включващ отделните морфологични фактори, и модел, включващ Aggressive Score, показва съпоставима дискриминативна способност (AUC 0.749 срещу 0.737). В нашето проучване, поради ограничения размер на извадката, не е извършена вътрешна валидизация на резултатите чрез bootstrap метод. Това представлява потенциално ограничение на анализа, тъй като подобен подход би позволил по-прецизна оценка на стабилността и възпроизводимостта на получените статистически резултати.

10. Ограничения

Aggressive Score представлява изследователски индекс и не е част от TNM системата или международни консенсуси. Необходима е външна валидираща кохорта за потвърждаване на неговата клинична приложимост (> 200 пациента).

11. Заключение

Интегрирането на PNI, LVI и степента на диференциация в единен морфологичен индекс предоставя предварителен инструмент за стратификация на риска при пациенти с колоректален карцином. Методиката е лесно възпроизводима и базирана на рутинни хистопатологични параметри.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Petrov K, Ivanov I, Popovska S, Betova T, Kamburova Z. Colorectal Cancer: A Brief and Simplified Analysis of a Complex Disease. *Medicina*. 2024 Dec 10;60(12):2034. doi:10.3390/medicina60122034
2. Petrov KT, Ivanov I, Betova T, Tsvetkova R, Trifonov R, Popovska S. A study of tumor budding and the factors, affecting interpretability of peritumoral budding, based on endoscopic colorectal biopsies from the left and right sided colorectal carcinoma. *JBCR*. 2024 Jun 10;17(1):19–33. doi:10.3897/jbcr.e126655
3. Kamburova Z, Popovska S, Kovacheva K, Petrov K, Nikolova S. Familial Lynch syndrome with early age of onset and confirmed splice site mutation in MSH2: A case report. *Biomed Rep*. 2022 Mar 14;16(5):39. doi:10.3892/br.2022.1522
4. Dimitrov G, Kamburova Z, Petrov K, Dimitrov D, Popovska S. Precision oncology in Bulgaria: a prospective study of metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2026;47:101128. doi:10.1016/j.ctarc.2026.101128

УЧАСТИЕ И ДОКЛАДВАНЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Петров КТ, Иванов И, Бетова Т, Поповска С, Николова З, Иванов В. – Нискостепенна муцинозна неоплазма на апендикс (LAMN) с руптура: Клиничен случай. – Национална конференция по патология, Златни пясъци, 01–04.06.2023.
2. Поповска С, Камбурова З, Дамянова П, Петров К, Бетова Т, Горчева З, Ковачева Н. – Роля на патолога за идентифициране на Lynch syndrome. – XIII национален конгрес по патология, 10–12.09.2021, Бургас.
3. Поповска С, Петров К, Камбурова З, Нанков В. – Случай с аденокарцином на гастроезофагеална връзка и синхронен карцином на колон асценденс – морфологично молекулни корелации и MMR статус. – Национална конференция по патология, 01–04.06.2023.
4. Бетова Т, Петров К, Поповска С, Иванов И, Маринова П, Трифонов Р, Петрова Е, Стефановска М. – Колоректален карцином с първична изява като кожна метастаза: клиничен случай. – Национална конференция по патология: Патология от ново поколение.

КУРСОВЕ И СПЕЦИАЛИЗАЦИИ ПО НАУЧНАТА СПЕЦИАЛНОСТ

1. 13th International Pathology Course – "Victor Babes" National Institute of Pathology; Romanian division of the IAP; Digestive Pathology Association – 6–7.11.2020, Bucharest, Romania.
2. 14th Course of Digestive Pathology – "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy / ENGIP – European Society of Pathology – 05–06.11.2021, Bucharest, Romania.
3. ÖGPath-Pannonian Online Course: Pathology of the Large Bowel – 07–08.05.2021 – Austrian Society of Pathology.
4. Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease: Practical Aspects – virtual, 20.09.2022.
- 15th Course of Digestive Pathology – "Carol Davila" University / ENGIP – 04–05.11.2022, Bucharest, Romania.
5. Продължаващо медицинско обучение: Стандарти, правила и предизвикателства в клиничната патология – 1–4 юни 2023, кк. „Златни пясъци”.
6. 16th Course on Digestive Pathology – "Victor Babes" National Institute of Pathology / Romanian division of IAP – 03–04.11.2023, Bucharest, Romania.
7. Pannonian Online Course: Pathology of the Stomach – 12–13 May 2023, Czech Medical Chamber.
8. London GI Pathology Update – 1–2.06.2023, London, Great Britain.
9. London GI Pathology Update – 10–12.04.2024, London, Great Britain.
10. 17th Digestive Pathology Course – «Victor Babes» National Institute of Pathology; Romanian division of the IAP, Bucharest, 1–2 ноември 2024.
11. 18th Digestive Pathology Course – Bucharest, 7–8 ноември 2025.
- Weekend of Gastrointestinal Pathology 2025 – The University of Miami, 26–27 април 2025.
12. Biannual Meeting of the Pannonian Working Group of GI Pathology – Zagreb, 16–17 май 2025.
13. London GI Pathology Update Course – London, 29 април – 2 май 2025.
14. The 37th European Congress of Pathology – Vienna, 6–10 септември 2025.
15. Biannual Meeting of the Pannonian Working Group of GI Pathology – Zagreb, 16–17 май 2025.
16. London GI Pathology Update Course – London, 29 април – 2 май 2025.

УЧАСТИЕ В НАУЧНО- ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

1. №18/2020 – Проучване на ИХХ експресия на MMR протеините, аспекти на антитуморния имунен отговор при колоректален карцином с лява и дясна локализация.
2. №20/2023 – Клиникопатологични корелации при ендометриален карцином по отношение на имунохистохимичната експресия на протеините на системата MMR и на туморсупресорните гени p53 и PTEN.
3. “Център за компетентност по персонализирана медицина, ЗД и телемедицина, роботизирана и минимално инвазивна хирургия“, с рег. № BG05M2OP001-1.002-0010, финансиран от „Оперативна програма наука и образование за интелигентен растеж“