



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ, ПАТОЛОГИЯ И
АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ**

**ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ЕКСПРЕСИЯТА НА PD-L1 ПРИ
УРОТЕЛЕН КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР КАТО
ОСНОВА ЗА ТЕРАПЕВТИЧНА СТРАТЕГИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

на

д-р РОСЕН АЛЕКСАНДРОВ СПАСОВ

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Морфология (шифър: 01.06.26)

Научен ръководител:

проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор

София, 2024 г

Представеният Дисертационен труд е написан на 136 страници и съдържа 49 фигури и 8 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 224 заглавия, от които 1 на кирилица и 223 на латиница.

Експерименталната работа е извършена в лабораториите на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН и в Лабораторията по обща и клинична патология и съдебна медицина на УМБАЛ ”Лозенец”.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на разширено заедание на секция “Патология”, ИЕМПАМ-БАН, проведено със заповед на Директора на ИЕМПАМ-БАН №РД-09-70 от 17.12.2024г.

Защитата на Дисертационния труд ще се състои на 09.04.2025 г от 10:00 часа в заседателната зала на ИЕМПАМ-БАН (гр.София, ул.”Акад.Г. Бончев”, бл.25) на открито заседание на Научно жури, назначено със заповед №НО-05-05-2 от 21.01.2025 г на директора на Института, в състав:

Председател на научното жури:

Проф. д-р Ренета Александрова Тошкова, доктор (ИЕМПАМ - БАН)

Вътрешни членове:

Проф. д-р Ренета Александрова Тошкова, доктор (ИЕМПАМ - БАН) – рецензия

Проф. д-р Димитър Стефанов Кадийски, дмн (ИЕМПАМ - БАН) – становище

Външни членове:

Проф. д-р Галина Куртева, дм (УМБАЛ»Св.Екатерина» - София) - становище

Проф. д-р Емил Иванов Сапунджиев, дмн (ЛТУ – София) – рецензия

Проф. д-р Лъчезар Колев Сурчев, дмн (Тракийски университет - Стара Загора) - становище

Благодаря на ръководството на ИЕМПАМ-БАН – на проф.Светлозара Петкова, проф. д-р Димитър Кадийски, доц.Ивелин Владов, доц.Емилия Петрова и научния секретар доц.д-р Катерина Димитрова за оказаната административна подкрепа и проявеното разбиране.

Огромна благодарност бих искал да изкажа на проф. д-р Ренета Тошкова за безценната помощ и напътствия при обобщаването на получените резултати.

За безкомпромисното ни професионално сътрудничеството във всички изследвания и безрезервната лична подкрепа за цялостната реализация на този Дисертационен труд, вдъхновен и посветен на съвместната ни работа - благодаря на съпругата ми гл.ас. д-р Здравка Петрова.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	18
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	19
IV. РЕЗУЛТАТИ и ОБСЪЖДАНЕ.....	24
IV.1. Патоморфологичен и клиничен анализ на пациенти с уротелни карциноми на пикочен мехур.....	24
IV.1.1. Изследване на съотношението между първични уротелни карциноми и техните рецидиви.....	24
IV.1.2. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур по пол	25
IV.1.3. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур по възраст.....	26
IV.1.4. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур според степента на диференциране(Grade).....	26
IV.1.5. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур според степента на туморна инвазия.....	30
IV.1.6. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур според стадия на заболяването.....	41
IV.1.7. Имунохистохимично изследване на експресията на PD-L1 при уротелни карцином....	42
IV.1.8. Експресия на CD8 в тумор-инфилтрации Т-лимфоцити (TILs) и CD68 при тумор-асоциираните макрофаги (TAMs).....	46
IV.1.9. Сравнително изследване на морфологични промени при апоптоза	55
IV.1.10. Изолиране на ДНК от FFPE туморни тъкани	57
V. ОБОБЩЕНИЕ	59
VI. ИЗВОДИ.....	62
VII. ПРИНОСИ.....	63
VIII. СПИСЪК С НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	64
IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	65

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

КПМ - Карцином на пикочния мехур

УК – Уротелен карцином

PD-1 – Протеин за програмирана клетъчна смърт

PD-L1 и PD-L2 – Лиганди на протеина за програмирана клетъчна смърт

СЗО – Световна здравна организация;

WHO (World Health Organization) - Световна здравна организация

ICIs (Immune Check-point Inhibitors) – Инхибитори на имунните контролни точки

МІСВС – мускуло-инвазивен карцином на пикочния мехур

NMIBC – не-мускуло-инвазивен карцином на пикочния мехур

ИХХ – Имунохистохимично изследване

LG (Low Grade) – Ниска степен на малигненост

HG (High Grade) – Висока степен на малигненост

FDA (United States Food and Drug Administration,) – Американската агенция, отговорна за разрешаване на използване на медикаменти

EMA (European Medicines Agency) – Европейска агенция по лекарствата

Ki-67 – ядрен протеин, маркер за пролиферативна активност

X&E – Оцветяване с хематоксилин и еозин

BCG – Bacillus Calmette-Guérin – БЦЖ

CPS (Combinated Positive Score) – Комбиниран положителен резултат (скор)

TUR – Трансуретрална резекция;

МА – мета-анализ

I. ВЪВЕДЕНИЕ

В условията на все още нарастващата в световен мащаб заболяемост и смъртност от онкологични заболявания, четирите стълба на съвременната медицинска онкология (хирургия, лъчетерапия, химиотерапия и таргетна терапия) се нуждаят от персонализиране на терапевтичните стратегии с участие на индивидуалния антитуморен отговор на пациента.

Развитието на съвременния терапевтичен подход към малигненните неоплазми се основава на интегрирането на туморната имунология, чиито достижения разкриват комплексните механизми на онкогенезата и туморната прогресия, протичащи при сложни междуклетъчни и молекулярни взаимодействия на неопластичните клетки с имунната система.

Туморната имунология има дълга история и нейното развитие се стимулира от необходимостта да се разработят иновативни и високоефективни подходи за имунологично унищожаване на злокачествени клетки. Ограничената ефикасност на хирургията, химиотерапията и лъчетерапията също допринасят за ускореното развитие антитуморната имунотерапия, тъй като тези лечения не елиминират всички туморни клетки, не се справят с имunosупресивния характер на заболяването и могат допълнително да увредят имунния отговор на пациента, отслабвайки устойчивостта му към формиране на малигнени неоплазми.

Мултидисциплинарният анализ на взаимодействието между имунната система и тумора в предклинични и клинични условия разкрива, че тя е тясно преплетена както с туморогенезата, така и с резултатността на лечението. От една страна, неоплазмите са проява на дефекти в имунитета, тъй като злокачествените клетки успяват да избягат от разпознаването и елиминирането на имунната система. Хроничните инфекции и възпаления, свързани с ограничени или поляризиращи имунни отговори, също допринасят за канцерогенезата и туморната прогресия. Иmunният отговор на гостоприемника и прогресията на тумора отразяват нарушения както на геномно ниво, така и на ниво протеини, а регулаторните мрежи са динамични във времето и отразяват терапевтичния резултат.

Съвременната имунотерапия разкрива потенциала си с широк спектър от терапевтични подходи. В края на 1990-те/началото на 2000-те години е доказано, че свързването на трансмембрания протеин на програмираната клетъчна смърт PD-1, открит върху активирани Т- и В-лимфоцити и макрофаги и неговия лиганд PD-L1,

разположен на повърхността на туморни клетки, води до имunosупресивен ефект. Това откритие се превръща в една от най-обещаващите терапии чрез използването на моноклонални антитела за блокиране на свързването между PD-1 и неговия лиганд PD-L1. Резултатът от инхибиторното свързване на имунните контролни точки е възстановената функционалност на Т-клетъчно медираната антитуморна активност.

През последното десетилетие имунотерапията революционизира лечението на карцинома на пикочния мехур. Уротелният карцином е хетерогенно заболяване и отделните му хистологични типове имат различни молекулярни характеристики и клинични резултати. Въпреки това, имунотерапията, използваща инхибитори на имунни контролни точки (ИИК, Immune Check-point Inhibitors - ICIs), прави революция в лечението на болестта. ICIs блокират сигналния път, който инхибира активността на Т-клетките и насърчава растежа на тумора, предотвратявайки изчерпването на Т-лимфоцитите и позволявайки на имунната система да разпознава и атакува туморните клетки по-ефективно. Двете най-разпознаваеми имунни контролни точки са рецепторът на програмирана клетъчна смърт-1 (PD-1) и Т-лимфоцитният цитотоксичен антиген-4 (CTLA-4). Терапията с инхибитори на имунни контролни точки е одобрена от Американската администрация по храните и лекарствата (FDA) и включва PD-1 инхибитори (nivolumab, pembrolizumab и cemiplimab), PD-L1 инхибитори (atezolizumab, durvalumab и avelumab) и CTLA4 инхибитор (ipilimumab). За лечение на уротелен карцином от 2011 г е одобрен CTLA4 блокерът ипилимумаб, докато ниволумаб и пембролизумаб (PD-1 инхибитори) са одобрени за лечение на уротелен карцином през 2014 г като самостоятелно средство или в комбинация с друга имунотерапия или с химиотерапия и лъчева терапия, като в момента се провеждат няколко клинични изпитвания за оптимизиране на приложението им. Европейската агенция за лекарства дава одобрение за лечение на уротелни карциноми с PD-L1 инхибиторите от 2017 година (atezolizumab) и durvalumab от 2023 година.

Експресията на лиганда на рецептора на програмираната смърт-1 (PD-L1) се използва за подбор на пациенти и анализ на отговорите към анти-PD-1/L1 антитела. Тя се регулира по различни начини и това определя различното значение на неговото присъствие или отсъствие. Позитивността на PD-L1 е желателна само в контекста на лечение, насочено към взаимодействието PD-1–PD-L1, тъй като при отсъствието на тази терапия това може да бъде механизъм за имунно бягство, който е полезен само за туморните клетки. Необходимо е рационалните решения за използването на терапия с

анти-PD-1/L1 антитела самостоятелно или в комбинация с други терапии да се основават на оценката и на други сигурни прогностични маркери.

1.1. Същност и значимост на проблема

Карциномът на пикочния мехур (КПМ) е сред водещите фактори за глобална смъртност, причинена от онкологични заболявания. Свързан е със значителна загуба на качеството на живот на пациентите при повишени разходи за медицински грижи. През 2023г. КПМ заема четвърто място сред засегнатите от рак мъже, включвайки 6% от новодиагностицираните случаи и допринасяйки за 4% от смъртните случаи, причинени от злокачествени заболявания [*Cancer Stat Facts: Bladder Cancer, 2023*]. Повечето злокачествени заболявания на пикочния мехур са уротелни карциноми и се класифицират като не-мускулно инвазивен карциноми на пикочния мехур (NMIBC) - около 75% и мускулно-инвазивни карциноми на пикочния мехур (MIBC) - около 25%. MIBC обикновено се диагностицира *de novo*, но може да възникне при 10-20% от случаите на NMIBC, които в крайна сметка прогресират. MIBC е по-агресивно болестно състояние и се свързва с 5-годишна преживяемост от 60% за пациенти с локализирано заболяване и <10% за пациенти с отдалечени метастази. КПМ се характеризира със значителна морфологична и молекулярна хетерогенност. Съвременната класификация на туморите на пикочния мехур, възприета от СЗО през 2022 г, интегрира хистологични и молекулярно-биологични характеристики и дава възможност за по-прецизна класификация на злокачествените заболявания с отчитане на прогнозата и избора на терапевтични цели. Това поставя необходимост от разработване и диагностично валидиране на сигурни биомаркери като основа за прилагане на прецизната медицина в клиничното управление на пациенти с КПМ. Прогностичните биомаркери дават информация за хода на заболяването независимо от терапията, а предиктивните (предсказващи) биомаркери предвиждат очаквания ефект от различните лечения. За да бъдат приложени в клиничната практика, биомаркерите трябва да бъдат валидирани, точни, възпроизводими и лесно приложими.

Лигандът на протеина за програмирана клетъчна смърт PD-L1 (CD274) се експресира главно на повърхността на туморни клетки и антиген-представящи клетки при различни солидни малигнени тумори като плоскоклетъчен карцином на главата и шията, меланом, карциноми на щитовидната жлеза, тимуса, хранопровода, белия дроб, гърдата, стомашно-чревен тракт, черен дроб, панкреас, бъбрек, пикочен мехур, яйчници и кожа.

При КПМ PD-L1 се използва като прогностичен биомаркер, тъй като повишената му с 20–30% експресия корелира с напреднал стадий на заболяването и по-лоша прогноза),

но той се прилага и като предиктивен (предсказващ) маркер за отговор на анти-PD-1 и анти-PD-L1 терапия [Aggen D., 2017]. Експресията на PD-L1 се използва като предиктивен биомаркер при пациенти с КПМ, неподходящи за терапия с цисплатина, при които трябва да бъде направен избор между монотерапия с инхибитори на имунни контролни точки (ICIs) и химиотерапия, базирана на карбоплатина. За пациенти с тумори с ниска експресия на PD-L1 предварителната монотерапия с ICI може да бъде вредна според данните за ранната смъртност в проучванията IMvigor130 и KEYNOTE-361 [Galsky M., 2020; Powles T., 2021].

Извършените мета-анализи на проспективни проучвания показват, че като цяло експресията на PD-L1 е свързана с терапевтичен отговор към ICIs при пациенти с метастатичен РПМ [Rui X., 2019; Litchfield K., 2020]. Но също така се отчита независим от степента на експресия на PD-L1 терапевтичен отговор към ICI. Освен това дори при PD-L1-позитивни пациенти, нивата на отговор към един ICI агент са ниски и варират от 20% до 40% в рандомизираните проучвания [Galsky M., 2020; Powles T., 2021]. Въпреки че повечето проучвания анализират данните, използвайки предварително определена граница за експресия на PD-L1 при имунохистохимично изследване, резултатите не показват последователно подобрени отговори при по-висока експресия на PD-L1. Това разхождане в резултатите се отчита въпреки предварително уточнените и уеднаквени cut-off стойности за отчитане на експресията на PD-L1, но с използване на различни диагностични платформи - при клиничните изпитвания на пембролизумаб и ниволумаб е използвана диагностичната платформа DAKO, а при дурвалумаб и атезолизумаб са използвани имунохистохимичните тестове на Ventana. Друга разлика е че при изпитванията с пембролизумаб и ниволумаб е приложено отчитане на експресията на PD-L1 в туморните клетки, докато при проучването IMvigor е била отчитана и реакция в имунни клетки, инфилтриращи тумора. Използани са и различни гранични стойности за експресия на PD-L1. Тези съществени различия са причина за вариабилността в наблюдаваните отговори спрямо различни инхибитори на имунните контролни точки [Mohanty, 2021]. При използването на PD-L1 като самостоятелен биомаркер за оценка на отговора към имунотерапия трябва да се има предвид фокалният характер и интратуморната хетерогенност на експресията на PD-L1, както и динамиката ѝ в хода заболяването и под влияние на прилаганата химиотерапия [Aggen D., 2017]. Поради необходимостта от стандартизиране на експресията на PD-L1 като предиктивен и прогностичен маркер и използването му за мониторинг се разработват нови подходи за

измерването му – например се предлага използване на течна биопсия (откриване и тестване на мигриращи туморни клетки в периферна кръв) и прилагане на имуно-насочващи маркери за позитронно-емисионна томография (ImmunoPET) [Decazes P., 2020; Bensch F., 2018].

Въпреки множеството проведени проучвания, предизвикателства при използването на PD-L1 като биомаркер за прилагане на ICIs при КПМ остават. Стандартизирането на протоколите за тестване на PD-L1, включително критериите за оценяване и техниките за анализ, са от решаващо значение за осигуряване на последователност и надеждност на резултатите в различни проучвания и клинични условия.

Тъй като PD-1/PD-L1 антителата са скъпоструваща терапия и са ефективни само при част от пациентите, от медицинска и икономическа гледна точка е важно да се прилага сигурен и точен придружаващ диагностичен критерий, който може цялостно да отчете имунологичните взаимодействия между тумора и организма на пациента, включително инфилтриращите тумора имунни клетки. Това затвърждава значението на задълбочената патоморфологична оценка на туморите като основа на успешна персонализирана лечебна стратегия.

I.2. Епидемиологични характеристики на карцинома на пикочния мехур

Карциномът на пикочния мехур (КПМ) е сериозен проблем за общественото здраве и водещата причина за смъртност от онкологични заболявания в световен мащаб. Това е десетият най-често срещан злокачествен тумор в света и второто най-често срещано злокачествено заболяване на пикочните пътища в световен мащаб, което представлява 549 000 нови случая и приблизително 200 000 смъртни случая годишно [Lobo N., 2022; Saginala K., 2020], представляващ 3% от всички ракови заболявания, регистрирани в световен мащаб [Cancer Stat Facts: Bladder Cancer, 2023]. Степента на заболяемост и смъртност варира значително в различните региони на света, като най-високите нива на заболяемост са отчетени в Европа и Северна Америка. Заболеваемост и при двата пола е най-висока в Южна Европа (Гърция е с най-висок процент на заболяемост при мъжете в световен мащаб; Испания; Италия), Западна Европа (Белгия и Холандия) и Северна Америка, въпреки че най-високите нива се отчитат в Ливан сред жените. Освен някои професионални експозиции на химически и водни замърсители, пушенето на тютюн е основният рисков фактор за карцином на пикочния мехур и с нарастващото

разпространение на тютюнопушенето сред жените, достигна този сред мъжете, като 50% от случаите на КПМ се дължат на тютюнопушене и при двата пола.

В България карциномът на пикочния мехур е шестият най-често диагностициран злокачествен тумор.

Таблица 1. Регистрирани заболявания от злокачествени новообразувания на пикочния мехур в България (брой случаи).

Източник: НЦОЗА, 2022г.

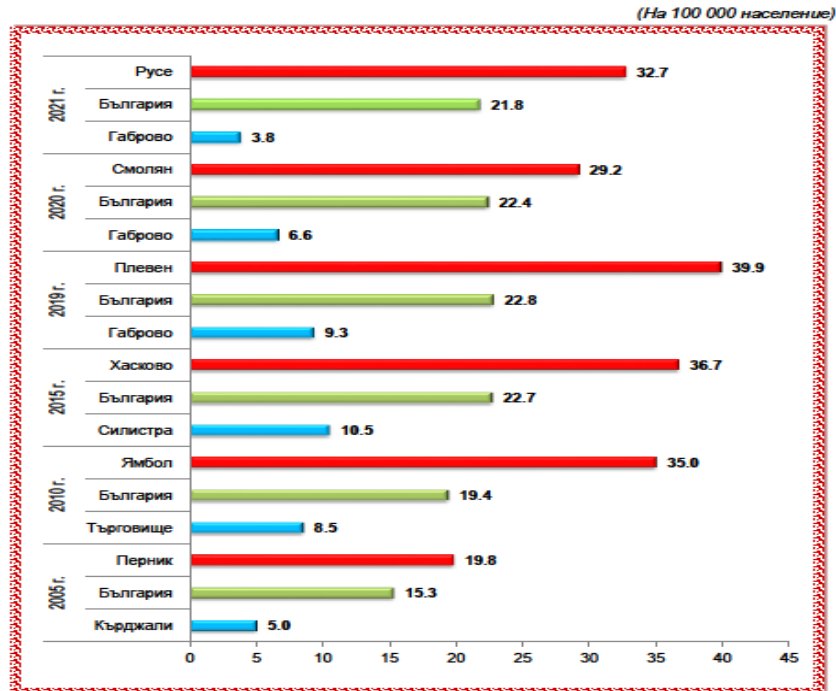
	2019			2020			2021		
	общо	мъже	жени	общо	мъже	жени	общо	мъже	жени
Новооткрити заболявания	14838	10820	4018	15086	10974	4112	15229	11065	4164
Смъртни случаи	607	471	136	627	488	139	598	476	122

Таблица 2. Новооткрити заболявания и смъртни случаи от злокачествени новообразувания на пикочния мехур в България (на 100 000 души население).

Източник: НЦОЗА, 2022г.

	2019			2020			2021		
	общо	мъже	жени	общо	мъже	жени	общо	мъже	жени
Новооткрити заболявания	22,8	34,8	11,5	22,4	34,9	10,6	21,8	34,0	10,3
Смъртни случаи	8,7	13,9	3,8	9,0	14,5	3,9	8,7	14,3	3,0

Новооткрити заболявания от злокачествени новообразувания по области
 Локализация: Пикочен мехур (С67) – МКБ10



Фигура 7. Новооткрити случаи на злокачествени заболявания по области за локализация „пикочен мехур“ (на 100 000 души население). *Източник: НЦОЗА, 2022г.*

Очаква се през 2024 г. да възникнат над 80 000 нови случая с над 16 000 смъртни случая. 5-годишната преживяемост е приблизително 70% за локализирани заболявания, 39,2% за регионално авансирани и <10% при наличие на далечни метастатични огнища [Cancer Stat Facts: Bladder Cancer, 2023]. Заболяването е свързано с по-лоши резултати, особено с далечно разпространение, така че продължаващите усилия за подобряване на възможностите за управление остават от решаващо значение.

1.3. Рискови фактори и карцином на пикочния мехур

Няколко рискови фактора се свързват с развитието на карцином на пикочния мехур, включително възраст, пол, тютюнопушене и професионална експозиция [Cumberbatch M., 2018]. Заболяването е четири пъти по-често при мъжете, отколкото при жените. Наблюдава се нарастване на честотата с напредване на възрастта, тъй като над

90% от диагнозите карцином на пикочния мехур се поставят на възраст 55 и повече години.

Тютюнопушенето е най-важният модифицируем рисков фактор, който представлява около 50% от всички случаи при мъжете и 30% от всички случаи при жените. Доказано е, че пушачите са три пъти по-склонни да развият заболяването, отколкото непушачите [Freedman, 2011]. Кохортно проучване на 422 010 участници с 30-годишно проследяване демонстрира между два и три пъти повишени рискове от КПМ при тютюнопушене (съотношение на риска [HR]: 2,32, 95% доверителен интервал [CI]: 1,98–2,73 при мъже и HR: 2,75, 95% CI: 2,07–3,64 при жени) [Freedman ND, 2011; Jacob L, 2018]. В мета-анализ от 52 проучвания рискът от КПМ е право пропорционален на интензивността на тютюнопушенето до 20 цигари на ден (съотношение на риска [RR]: 2,52, 95% CI: 2,41–2,64 за десет цигари на ден и RR: 3,27, 95% CI : 3,16–3,38 за 20 цигари на ден), но след това има плато. Обратно, рискът от КПМ нараства без плато с продължителността на тютюнопушенето [Zhao X, 2022]. Рискът от КПМ намалява с времето след спиране на тютюнопушенето. В проспективна кохорта от 143 279 жени в постменопауза, рискът от КПМ при бивши пушачи е с 25% по-нисък през първите 10 години след спиране на тютюнопушенето и продължава да намалява с времето. Въпреки това, рисковете от КПМ остават по-високи при бивши пушачи 30 години след отказване от тютюнопушенето, отколкото при никога непушили [Li Y, 2019]. Мета-анализ от 14 проучвания (646 526 участници) демонстрира повишен риск от КПМ при излагане на тютюнев дим през целия живот при непушачи („пасивно пушене“) в сравнение с неизложени непушачи [Yan H, 2018]. Парите от електронни цигари могат да съдържат редица канцерогенни съединения (напр. формалдехид и акролеин). Данни от 22 проучвания откриват множество канцерогенни съединения, свързани с КПМ (вкл. о-толуидин и 2-нафтиламин) в урината на потребители на електронни цигари [Bjurlin M, 2021]. Консумацията на опиум се свързва с повишен риск от КПМ в няколко проучвания. Проспективно кохортно проучване на над 50 000 пациенти със среден период на проследяване от 10 години показва повишен риск от КПМ при употребяващи някога опиум (пушене и поглъщане) в сравнение с неупотребявали никога [Sheikh M, 2020].

Професионалната експозиция на определени химични съединения (полициклични ароматни въглеводороди и ароматни амини) се свързва с повишен риск от рак на пикочния мехур, представляващ приблизително 5-10% от всички случаи [Cumberbatch M., 2018].

Скандинавско кохортно проучване на 14,9 милиона пациенти (включително 111 458 случая на КПМ.) съобщава за най-високи стандартизирани коефициенти на честота (SIRs),

коригирани спрямо пушенето, при коминочистачи, сервитьори, фризьори, готвачи и стюарди, принтери, моряци и шофьори [Hadkhale K, 2019]. Парите от електронни цигари могат да съдържат редица канцерогенни съединения (напр. формалдехид и акролеин). Данни от 22 проучвания откриват множество канцерогенни съединения, свързани с КПМ (вкл. о-толуидин и 2-нафтиламин) в урината на потребители на електронни цигари [Bjurlin M, 2021].

Други рискови фактори включват хронични инфекции на пикочния мехур, фамилна анамнеза, генетично предразположение, конкременти в пикочния мехур, продължителна катетеризация и предхождаща лъчева терапия в областта на таза, доброкачествена простатна хиперплазия, астма, автоимунен васкулит. Хроничната инфекция на пикочния мехур се свързва с повишен риск от плоскоклетъчен карцином, който представлява по-малко от 2% от всички случаи на карцином на пикочния мехур. Генетичната предразположеност също може да играе роля в развитието на карцином на пикочния мехур, тъй като са идентифицирани няколко гена, които са свързани с повишен риск от заболяването. IARC класифицира циклофосфамид и хлорнафазин като имащи достатъчно доказателства за повишен риск от развитие на КПМ [IARC, 2022].

Проучвателните доказателства показват повишени рискове от КПМ при приложено лечение с пиоглитазон [Tang H., 2018; Adil M., 2018], ранитидин [Cardwell C., 2021], левотироксин [Wandell P., 2020] и ангиотензин-2 рецепторни блокери. Не се наблюдава значима връзка за метформин [Hu J., 2018], аспирин [Santucci C., 2021], статини [Guersio V., 2019], инхибитори на ангиотензин-конвертиращия ензим, блокери на калциевите канали или диуретици [Xie Y., 2020]. Има смесени резултати за доклади за андрогенна депривационна терапия [Santella C., 2020] и 5-алфа редуктазни инхибитори [Kim A., 2020; Sathiananthen NJ, 2018]. Общо пет проучвания показват връзка между ниските серумни нива на витамин D и риска от КПМ [Dunn JA, 2019]. Съобщава се за повишен риск от КПМ при висока консумация на витамин B1 в сравнение с ниска консумация само при мъже [Boot I., 2022].

Някои проучвания предполагат, че диетични фактори като повишена консумация на плодове, зеленчуци от семейство Кръстоцветни и кисело мляко могат да имат защитен ефект срещу КПМ. Доказан е и протективен ефект на физическата активност и умерената консумация на алкохол върху риска от карцином на пикочния мехур

1.4. Прогноза, рецидиви и прогресия при карцином на пикочния мехур

Повечето злокачествени заболявания на пикочния мехур са уротелни карциноми и се класифицират като не-мускулно инвазивен карцином на пикочния мехур (NMIBC) или мускулно-инвазивен карцином на пикочния мехур (MIBC), поради различни последици за лечението на пациентите. MIBC обикновено се диагностицира *de novo*, но може да възникне от 10-20% от случаите на NMIBC, които в крайна сметка прогресират. MIBC е по-агресивно болестно състояние и се свързва с 5-годишна преживяемост от 60% за пациенти с локализирано заболяване и <10% за пациенти с отдалечени метастази.

Пациентите с карцином *in situ* на пикочния мехур показват висок риск от рецидив, прогресия и честота на уротелен карцином. Карциномът *in situ* (CIS) на пикочния мехур е високостепенна плоска лезия, ограничена до лигавицата, с профил на генна експресия, подобен на този на мускулно-инвазивен рак на пикочния мехур (MIBC). Без адювантна имунотерапия с BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), до 50% от пациентите с CIS претърпяват прогресия до MIBC. При проведено проучване [Subiela, J., 2023] със средно проследяване от 70,5 месеца, 5 и 10 годишната преживяемост без рецидив (RFS) е 82% и 52%, преживяемостта без прогресия (PFS) е 93,6% и 75,8%, а честотата на уротелен карцином е съответно 1,7% и 2,9%. Повечето събития на рецидив (73,6%) и прогресия (69,1%) са настъпили през първите 3 години от проследяването, докато 38,7% от случаите на уротелен карцином са регистрирани след 5 години от проследяването. Пациентите, които са получили лечение с BCG, имат по-нисък риск от рецидив, прогресия и честота на уротелен карцином [Subiela J., 2023]

При пациенти с високостепенен не-мускулно инвазивен уротелен карцином проучване на Chamie K. (2011) установява, че почти три четвърти от пациентите развиват рецидив след 10 години – 41% без прогресия, докато допълнителни 33% прогресират до миоинвазивен карцином. 40% (981 от 2449) от пациентите с прогресиращ карцином умират от карцином на пикочния мехур. Докато полът и расата не корелират с честотата на рецидивите, те са значително свързани с прогресията и нивата на смъртност, свързана със специфични причини. Жените и чернокожите пациенти са имали по-висока вероятност от прогресиране и в крайна сметка смърт от КПМ, отколкото съответно мъжете и белите. Неблагоприятната прогноза за не-мускулно-инвазивен карцином на пикочния мехур, прогресиращ до миоинвазивно заболяване, подчертава необходимостта от ранно интензивно изследване на тази високорискова популация. [Chamie K, 2011].

Напредването на възрастта е свързано с по-висок процент на смъртност от карцином на пикочния мехур. По-високата специфична за рака смъртност сред възрастните хора може да е резултат или от качеството на грижите, или от реакцията/липсата на такава към провежданото лечение.

Прогнозата на пациентите, диагностицирани с уротелен карцином до голяма степен зависи от правилната хистологична класификация на тумора. Целта на класификацията е да може да идентифицира групи от пациенти според различни показатели и да управлява лечението им по най-полезен за тях начин. Идеалната класификационна система е стабилна, възпроизводима и прозрачна. Трябва да е сравнително лесна за изпълнение както от патолозите, така и от уролозите и онколозите, които я прилагат в процеса на вземане на решение за лечение на пациентите.

1.5. Инхибитори на имунните контролни точки в лечението на карцином на пикочния мехур

През последното десетилетие имунотерапията революционизира лечението на карцинома на пикочния мехур. Той се посочва като тумор, съдържащ най-много соматични мутации [Alexandrov L., 2017] и това го определя като особено подходящ за имунотерапевтично повлияване. Имунотерапията, използваща инхибитори на имунни контролни точки (ИИКТ, Immune Check-point Inhibitors, ICIs), прави революция в лечението на болестта. ICIs блокират сигналния път, който инхибира активността на Т-лимфоцитите и насърчава растежа на тумора, предотвратявайки изтощението на Т-клетките и позволявайки на имунната система да разпознава и атакува туморните клетки по-ефективно. Прицелни протеини за инхибиторите на контролни точки са са PD-1 и неговият лиганд PD-L1 и CTLA-4. Американската администрация по храните и лекарствата (FDA) одобрява няколко ICIs, включително PD-1 инхибитори (nivolumab, pembrolizumab и cemiplimab), PD-L1 инхибитори (atezolizumab, durvalumab и avelumab) и CTLA-4 инхибитор (ipilimumab) . CTLA4 блокерът ипилимумаб е одобрен през 2011 г., докато ниволумаб и пембролизумаб (PD-1 инхибитори) са одобрени за лечение на уротелен карцином през 2014 г. или като самостоятелно средство, или в комбинация с друга имунотерапия или с химиотерапия и лъчева терапия, като в момента се провеждат няколко клинични изпитвания за оптимизиране на приложението им. Европейската агенция за лекарства дава одобрение за лечение на уротелни карциноми с PD-L1 инхибиторите от 2017 година (atezolizumab) и durvalumab от 2023 година. CTLA-4 действа рано в процеса на антитуморния имуен отговор, за да предотврати активирането на Т-лимфоцитите. CTLA-4 инхибиторите

блокират протеина CTLA-4, намиращ се в Т-лимфоцитите, което им позволява да се активират срещу туморните клетки. От друга страна, PD-1 протеини върху Т-лимфоцитите се свързват с PD-L1, често експресиран от туморните клетки. Когато PD-1 се свърже с PD-L1, той изпраща сигнал до Т-лимфоцитите да се деактивират, предотвратявайки атаката на имунната система срещу туморните клетки. Като блокират PD-1, инхибиторите на PD-1 позволяват на Т-лимфоцитите да останат активни, за да продължат да атакува туморните клетки.

ICIs, насочени към PD-1 и PD-L1, са показали значителна клинична ефикасност при лечението на карцином на пикочния мехур, особено при пациенти с висока експресия на PD-L1 [Shitara K.,2020]. След резултатите от проучването IMvigor210, което показва честота на траен отговор от 23% при пациенти с експресия на PD-L1 $\geq 5\%$ [Rosenberg, J., 2024], атезолизумаб, анти-PD-L1 антитяло, стана първата одобрена от FDA имунотерапия за лечение на локално напреднал или метастатичен рак на пикочния мехур през 2016 г. [FDA Review of indications, 2016]. Атезолизумаб значително подобрява общата преживяемост и преживяемостта без прогресия при пациенти с напреднал карцином на пикочния мехур [Bellmunt., 2017], което го прави предпочитано лечение от първа линия, комбинирано с базирана на платина химиотерапия за напреднал или метастатичен карцином на пикочния мехур. След последващи забележителни клинични изпитвания, включително проучването KEYNOTE-045 [Bellmunt J.,2020] и проучването фаза III DANUBE, четири други ICI бяха одобрени от FDA за лечение на карцином на пикочния мехур, включително дурвалумаб, ниволумаб, авелумаб и пембролизумаб [Powles,2020,2021]. Няколко текущи клинични изпитвания оценяват ефикасността на ICI при карцином на пикочния мехур, като монотерапия или в комбинация с други лечения, като химиотерапия или лъчева терапия. В скорошно проучване фаза III, комбинацията от ниволумаб и ипилимумаб демонстрира значително подобрене на общата преживяемост в сравнение с химиотерапията при пациенти с нелекуван преди това метастатичен уротелен карцином [COSMIC- 313].

Доказано е, че нивата на експресия на PD-L1 са свързани с тежестта на карциномите на пикочния мехур. По-рано е установено, че туморите с по-високо съдържание на PD-L1 са по-склонни да бъдат по-злокачествени, с по-висока честота на рецидиви и по-нисък процент на преживяемост [Nakanishi J,2007]. В допълнение, експресията на PD-L1 в туморни клетки е отговорна за повишената резистентност към BCG терапията, която се счита за свързана с потискане на имунната система, тъй като за

ефикасността на BCG е необходима напълно функционираща имунна система [Belmont J., 2017].

Антитуморната имунотерапия насочена към PD-1 или PD-L1 се отчита като високо ефективна при предизвикване на трайни противотуморни имунни отговори с по-малко токсичност при много видове тумори и редица клиницисти и изследователски екипи смятат, че блокадната терапия на PD-1/PD-L1 ще бъде основният метод за имунотерапия при злокачествени заболявания през следващите години и това определя необходимостта от задълбочени проучвания на този сигнален път. Въпреки множеството проведени проучвания, предизвикателства при използването на PD-L1 като биомаркер за прилагане на ICIs при КППМ остават. Стандартизирането на протоколите за тестване на PD-L1, включително критериите за оценяване и техниките за анализ, са от решаващо значение за осигуряване на последователност и надеждност на резултатите в различни проучвания и клинични условия.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

II.1. ЦЕЛ

Да се проучат морфологичните и имунохистохимичните характеристики на експресията на PD-L1 при уротелни карциноми на пикочен мехур и установяване на тяхната зависимост от степента на диференциране.

II.2. ЗАДАЧИ

1. Да се направи характеристика на морфологичните и клинични показатели на уротелни карциноми на пикочен мехур – пол, възраст, наличие на локален рецидив, диференция и стадий
2. Класифициране на туморите според степента на инфилтрация в мускулните слоеве
3. Статистически анализ на разпределението по пол, възраст, стадий, степен на диференциране и дълбочина на туморната инвазия
4. Имунохистохимично изследване експресията на PD-L1 и други маркери при подбрани случаи на карцином на пикочния мехур и метастаични лезии.
5. Установяване на зависимост между степента на туморна инвазия и нивата на експресия на PD-L1.
6. Сравнително изследване на иницирана апоптотична клетъчна смърт при туморни клетъчни линии чрез двойно флуорохромиране с акридиноранж-пропидиев йодид, рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин и имунохистохимично изследване на експресията на PD-L1.
7. Екстракция на туморна ДНК от представителни и редки хистологични варианти на злокачествени тумори на пикочния мехур

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Дисертационният труд е осъществен в секция «Патология» на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей на БАН и в Лабораторията по обща и клинична патология и съдебна медицина на УМБАЛ „Лозенец“.

III.1. Материали

➤ Тъканни проби

В проучването бяха използвани туморни тъкани, фиксирани с формалин и пропити с парафин (FFPE) от 110 диагностицирани уротелни карцинома на пикочния мехур, 1 саркоматоиден вариант на карцином на пикочния мехур, 5 метастатични лимфни възела и 9 костни и мекотъканни метастази.

➤ Туморни клетъчни линии

Постоянните клетъчни линии, върху които са проведени експериментите са предоставени от Банката за клетъчни култури и вируси на ИЕМПАМ-БАН.

HT29 - клетъчна линия с епителна морфология, която е изолирана през 1964 г. от първичен колоректален аденокарцином на 44-годишна пациентка.

HeLa - клетките HeLa са първите безсмъртни човешки клетки, отглеждани в култура и са в основата на значими научни открития. Те са изолирани през 1951 г. от карцином на маточната шийка, получен от 31-годишна пациентка.

LSR-SF-SR - трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с Rous sarcoma virus, щам Schmidt-Ruppin (клетките съдържат онкогена v-src). Използвана е абревиатурата **RST** (Rous Sarcoma Tumor).

III.2 Методи

➤ Тъканна обработка на туморните проби

Изследвани са рутинни трансуретрални биопсични и резекционни хирургични туморни тъканни проби, изпратени в Лабораторията по обща и клинична патология на УМБАЛ „Лозенец“. Тъканите са фиксирани в продължение на 24-48 часа в 10% неутрален буфериран формалин, подложени са на стандартна тъканна обработка, включваща дехидратация в етанол с възходящи концентрации (70%, 90%, 95% - по 1 час), абсолютен етанол (6 часа с трикратна смяна с чист реактив), просветляване в ксилол (3 часа с трикратна смяна с чист реактив) и пропиване с парафин с температура на топене 56-58°C (общо 6 часа с трикратна смяна с чист реактив).

➤ Рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин

От получените парафинови блокчета бяха направени срезове с дебелина 4 μm . Препаратите бяха дехидратирани във възходяща спиртна редица (етанол 70%, 80%, 90%, 100% – 2x5 минути), просветлени в ксилол (2x5 минути) и включени в синтетична среда (Bio Mount Medium, BioGnost, Groatia) с покривни стъкла. Отчитането на патоморфологичните характеристики се извърши със светлинен микроскоп Olympus 35X при увеличение 100x – 400x.

- **Стратифициране на туморите по TNM класификация според дълбочината на туморната инвазия, статуса на регионалните лимфни възли и наличието на далечни метастази** - приложено е Осмото издание на TNM класификацията от 2018 година.

- **Определяне на степента на диференциация (Grading) според СЗО**

Използвана е предложената от Световната здравна организация и Международната асоциация на уропатолозите (ISUP) класификация от 2004 година, според която диференциацията на уротелните карциноми на пикочния мехур се оценява в три степени:

- Grade 1 – високо диференциран уротелен карцином;
- Grade 2 – умерено диференциран уротелен карцином;
- Grade 3 – ниско диференциран уротелен карцином.

- **Определяне стадия на заболяването (Grade) – I, II, IIIA, IIIB, IVA, IVB стадий.**

- **Имунохистохимично изследване на експресията на PD-L1, CD8, CD68, Ki67**

Тъканните проби от уротелни карциноми, лимфни възли (метастатични и свободни от метастази), далечни метастази (костни) бяха изследвани след поставяне на патоморфологична диагноза. От парафиновите блокчета бяха приготвени срезове с дебелина 3 μm и бяха монтирани върху положително заредени адхезивни стъкла. След депарафиниране препаратите бяха подложени на обработка за антигенно разкриване (Retrieval buffer pH 9.0, Leica BioSystems, Великобритания). Във влажна камера при стайна температура след трикратно промиване с PBS, блокиране на ендогенната пероксидаза (10 минути) и блокиране на неспецифичните протеини (10 минути), препаратите бяха инкубирани за 60 минути с 100 μl от съответното моноклонално антитяло срещу PD-L1, clone 73-10; Моноклонално антитяло срещу CD8, clone 4B11; Моноклонално антитяло срещу CD68, clone 514H12; Моноклонално мише антитяло срещу Ki67, clone MM1, Leica Biosystems, UK. Визуализацията на реакцията антиген-антитяло беше извършена чрез имунопероксидазна реакция с полимерно маркиране и DAB хромоген (Novolink Polymer detection Systems RE7140-K, Leica Biosystems, UK). Допълнително беше извършено

контраоцветяване на ядрата с хематоксилин за 1 минута (Hematoxylin Gill II, Leica Biosystems, UK). Препаратите бяха дехидратирани във възходяща спиртна редица, просветлени в ксилол и включени в синтетична среда (Bio Maunt Medium, BioGnost, Croatia) с покривни стъкла.

Отчитането на резултатите се извърши със светлинен микроскоп Olympus BX50 при увеличение 100x – 400x. Като положителна реакция и доказателство за експресия на съответния маркер беше прието интензивното кафяво оцветяване от хромогена диаминобензидин (DAB) според локализацията на маркера - на повърхността на клетъчната мембрана или на клетъчното ядро.

➤ **Култивиране и съхранение на постоянни клетъчни линии**

Клетките от постоянни клетъчни линии бяха замразявани, съхранявани и култивирани съгласно препоръките на American Type Culture collection (ATCC).

Постоянните клетъчни линии бяха култивирани като адхезионни монослойни култури в хранителна среда DMEM с 10% фетален телешки серум, съдържаща 100 U/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин. Култивирането се извършваше в инкубатор (ThermoScientific, HEPA class 100) при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажност. Клетките бяха пасирани 2 пъти седмично с разтвор на 0.05% трипсин и 0,025% EDTA. Всички процедури бяха извършени при стерилни условия в ламинарен бокс клас II.

Методи за оценка на клетъчната морфология

➤ **Инвертна микроскопия на витални клетъчни препарати**

Състоянието на култивираните в матрици клетъчни култури, както и цитопатологичните промени в третираните с изследваните вещества клетки беше контролирано ежедневно с помощта на инвертен светлинен микроскоп (Carl Zeiss Jena, Germany) като бяха оценявани основните морфологични показатели на клетките (форма и размери), степента на клетъчна адхезия, плътността на формирания клетъчен монослой и откриване наличие на евентуални белези за микробно замърсяване.

➤ **Оцветяване с хематоксилин и еозин**

Клетките бяха култивирани в хранителна среда DMEM с 10% FBS (гъстота при посяване 3,0 - 3,5 x 10⁵ клетки/ямка) в 6-ямкови плаки върху стерилни покривни стъкла до образуване на адхерентен клетъчен слой (24 часа). Култивационната среда беше заменена с такава, съдържаща тестовите цитостатици (приложени в различни концентрации) и в отсъствието на тестови вещества - клетъчни контроли. След третиране в продължение на

24/48/72 часа ламелите бяха промивани с PBS, фиксирани в охладен метанол (5 минути) и оцветявани с хематоксилин и еозин. След възходяща дехидратация (70 %, 80 %, 96 % и 100 % етилов алкохол), третиране с ксилол (3 x 5 минути), включване в синтетична среда (Bio-Mount DPX) бяха подготвени трайни микроскопски препарати.

Оценката на цитоморфологичните промени, настъпили след третиране с изследваните цитостатици беше извършена със светлинен микроскоп Leica DM5000B (Leica Microsystem, Germany) и бяха документирани с камера Leica DFC 420 и софтуер Leica Suite 3.1.0 (Leica Microsystem, Germany).

➤ **Оценка на предизвикан тип клетъчна смърт – апоптоза/некроза чрез двойно флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид (АО/PI) (Флуоресцентна микроскопия)**

Третирани с изследваните вещества клетки и нетретирани контроли бяха оцветени с акридин оранж и пропидиев йодид по стандартен протокол. Клетките се посяват върху стерилни покривни стъкла в 6-ямкови плаки с плътност 3×10^5 клетки/. След 24 часа култивационната среда беше заменена с нова, съдържаща различни концентрации на изследваните цитостатици и клетките бяха третирани за различни периоди от време (24/48/72 часа). Разтворите на акридин оранж (1 mg/ml в PBS) и пропидиев йодид (1 mg/ml в бидистирана вода) бяха добавени на капки върху чисти предметни стъкла от 8-10 μ l, смесени в равни пропорции (1:1, vol:vol). Покривните стъкла с култивирани върху тях клетки се измиват с фосфатно-буферен физиологичен разтвор и внимателно се поставят (с клетъчния монослой към боята) върху капката АО/PI. Цитоморфологичните промени бяха наблюдавани с помощта на флуоресцентен микроскоп (Leica DM 5000B, Germany, при I3 Filtercube). Белезите на клетъчна смърт бяха оценени по следния начин: начален стадий на апоптоза - ярко зелено ядро с кондензация на хроматин под формата на плътни зелени области и формиране на характерни апоптотични изпъквания по клетъчната повърхност („apoptotic blebs”); напреднал стадий на апоптоза - оранжево-червено ядро с кондензация на хроматина; късен стадий на клетъчна смърт - тъмночервено оцветени клетки.

➤ **Изолиране на ДНК от туморни тъкани (парафинови срези от FFPE)**

Изолиране на ДНК от туморни тъкани беше извършено с IVD маркиран набор QIAamp DSP за изолиране и пречистване на геномна ДНК от биологични проби, фиксирани с формалин, включени в парафин (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

➤ **Статистически методи**

Всички данни са въведени и обработени с Microsoft®Office Excel (Microsoft Office Professional Edition, Copyright©1985-2024, Microsoft Corporation). Създадените електронни таблици бяха проверени за коректен запис на въведената информация и форматирани по необходимия модел. Дескриптивната статистика на суровите данни и създаването на визуализиращи диаграми беше извършено с Microsoft®Office Excel (Microsoft Office Professional Edition, Copyright©1985-2024, Microsoft Corporation). За статистическия анализ на данните бяха използвани вариационен анализ на количествени променливи - средна стойност, стандартно отклонение, минимум, максимум; Честотен анализ на качествени променливи - абсолютни честоти, относителни честоти (в проценти); Графични изображения – диаграми, хистограми, boxplot.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В проучването бяха използвани туморни тъкани, фиксирани с формалин и пропити с парафин (FFPE) от 110 диагностицирани уротелни карцинома на пикочния мехур, 1 саркоматоиден вариант на карцином на пикочния мехур, 5 метастатични лимфни възела и 9 костни и мекотъканни метастази.



Фигура 1. Дизайн на проучването

IV.1. Патоморфологичен и клиничен анализ на случаи с уротелни карциноми на пикочен мехур

IV.1.1. Изследване на съотношението между първични уротелни карциноми и техните рецидиви

Сред изследваните 111 тумора на пикочен мехур 110 са уротелни карциноми и 1 е саркоматоиден карцином с мезенхимен произход. От тях 87 (78.38%) са първични и 24 (21.62%) са туморни рецидиви.



Фигура 2. Разпределение първични уротелни карциноми и рецидиви

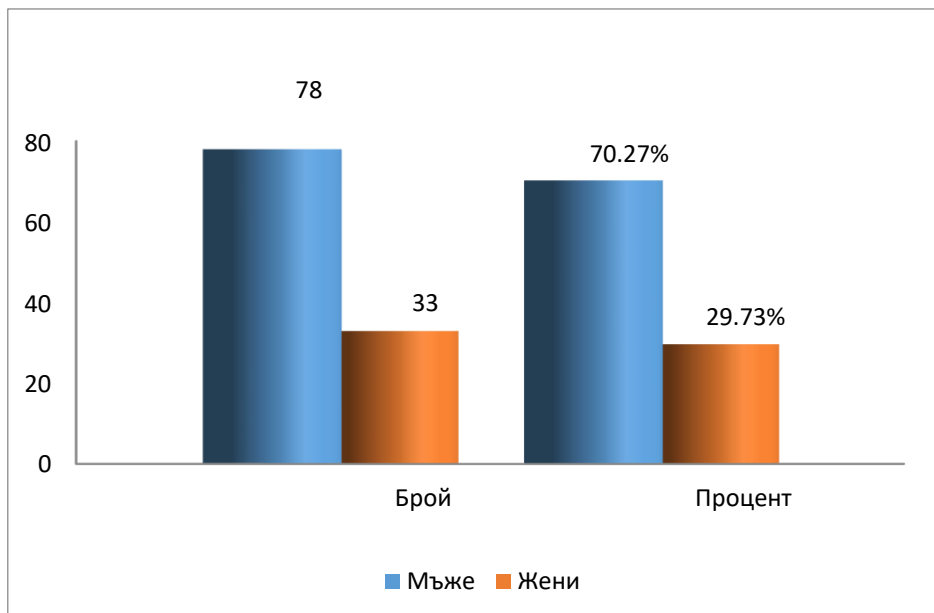
Най-голям дял от туморните рецидиви имат умерено диференцираните карциноми. Те представляват 66.67% от установените рецидиви. Еднакво представени са високо диференцираните и ниско диференцираните рецидиви на уротелни карциноми.



Фигура 3. Разпределение на рецидивиралите тумори според степента на диференциране

IV.1.2. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур по пол

Изследвани са туморни тъкани от пикочен мехур на 111 пациента. Разпределението по пол показва преобладаване на мъжете – 78 случая (70.23%) и 33 случая при жени (29,73%).



Фигура 4. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур по пол

IV.1.3. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур по възраст

Средната възраст на пациентите е 67,53 г (SD 9.22). По-ниска е при жените – 65,82 години срещу 68,5 години при мъжете. Възрастовият интервал е от 53 до 85 години. Един случай на уротелен карцином е при мъж на 40 години.

Таблица 1. Средна възраст на пациенти с уротелен карцином на пикочния мехур разпределение по пол

	Средна възраст	Стандартно отклонение (SD)
Общо	67.53	9.22
мъже	68.25	9.06
жени	65.82	9.39

*z-score =1.33715; p-value = 0.18024.

VI.1.4. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур според степента на диференциране (Grade)

От изследваните 110 уротелни карцинома 28 тумора (26.13%) са ниско диференцирани (G3). Като умерено диференцирани са диагностицирани 61 тумора (54.95%). Високо диференцираните уротелни карциноми са 21 (18.92%).

Таблица 2. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур по степен на диференциране (G) и пол

	G1	G2	G3
Мъже	17,95%	51,78 %	30,77 %
Жени	21,21 %	63,64 %	15,15 %

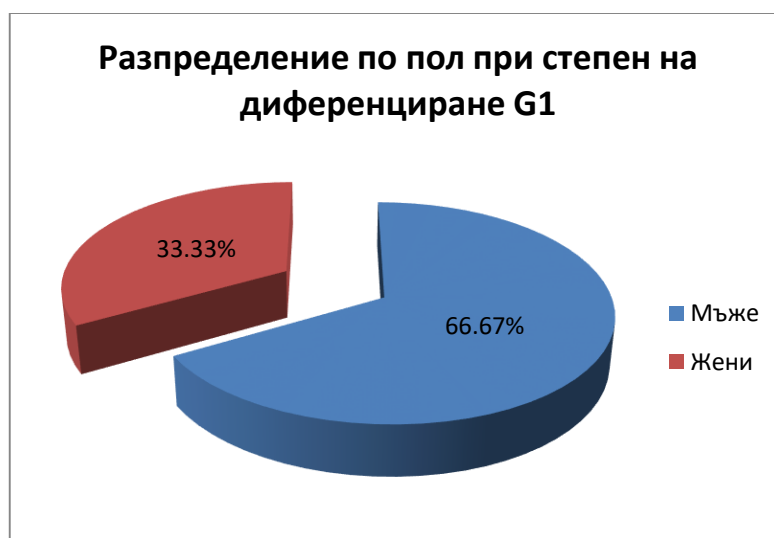


Фигура 5. Разпределение на случаите по степен на диференциране (общо за двата пола)



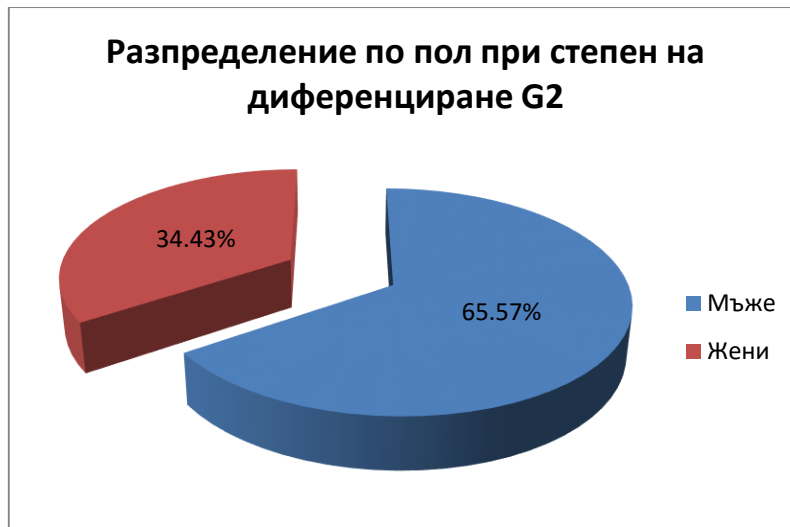
Фигура 6. Разпределение на случаите по степен на диференциране при мъже и жени

Високо диференцираните уротелни карциноми на пикочния мехур (G1) са силно застъпени при мъжкия пол - 66,7 % от тях са установени при мъже.



Фигура 7. Разпределение на случаите по пол при степен на диференциране G1

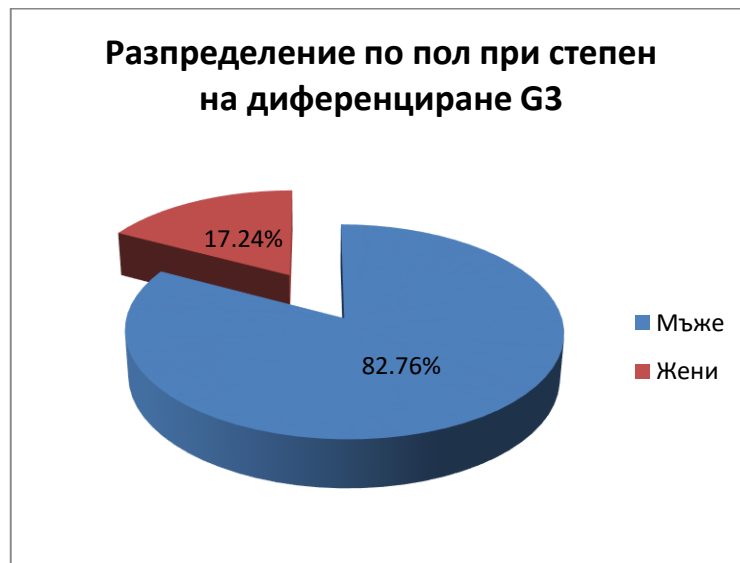
Умерено диференцираните уротелни карциноми на пикочния мехур (G2) са 63 случая, като 65,67% от тях са при мъже. Делът им при жените е значително по-малък – 33,43%.



Фигура 8. Разпределение на случаите по пол при умерено диференцирани карциноми на пикочния мехур (G2).

При умерено и високо диференцираните уротелни карциноми съотношението жени/мъже е приблизително 1:2 в полза на мъжете (33-34% жени и 65-66% мъже).

При ниско диференцираните уротелни карциноми се наблюдава отчетлива разлика между двата пола –31% (24 случая) са установени при мъже, докато 15% (5 случая) са установени при жени.

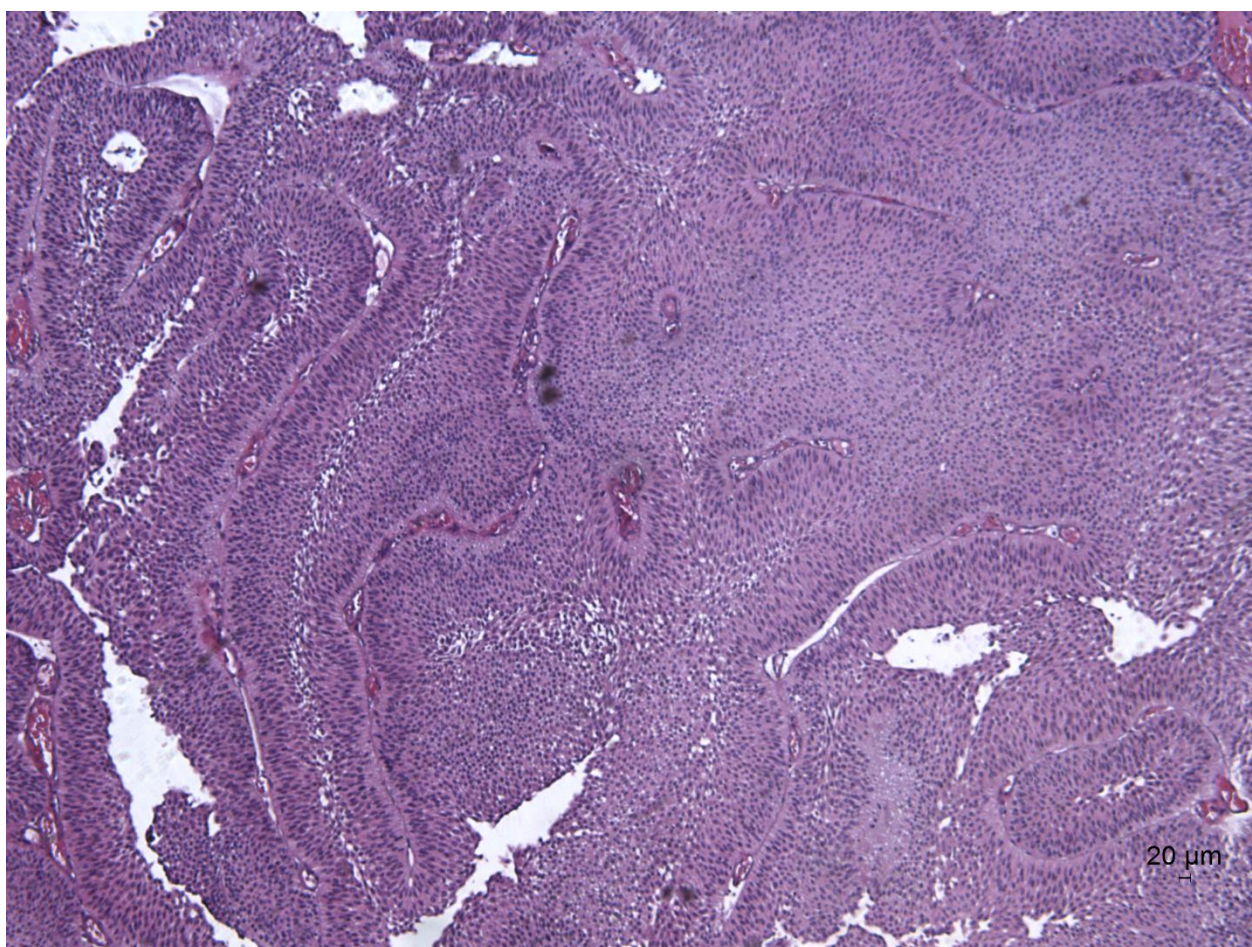


Фигура 9. Разпределение по пол при ниско диференцирани уротелни карциноми на пикочния мехур (степен на диференциране G3).

IV.1.5. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур според степента на туморна инвазия

В зависимост от инфилтрацията на туморния процес, изследваните уротелни карциноми на пикочния мехур бяха класифицирани като pTa, pTis, pT1, pT1a, pT2, pT2a, pT2b, pT2c, pT3, pT3a, pT3b и pT4a.

За уротелни карциноми Ta приемаме неинвазивни папиларни карциноми, които ангажират единствено епителния слой на пикочния мехур. Най-често те имат екзофитен растеж, като формират фини папиларни структури, съдържащи нежна субепителна пластина с капилляри и съединително-тъканни влакна. (Фигура 10).



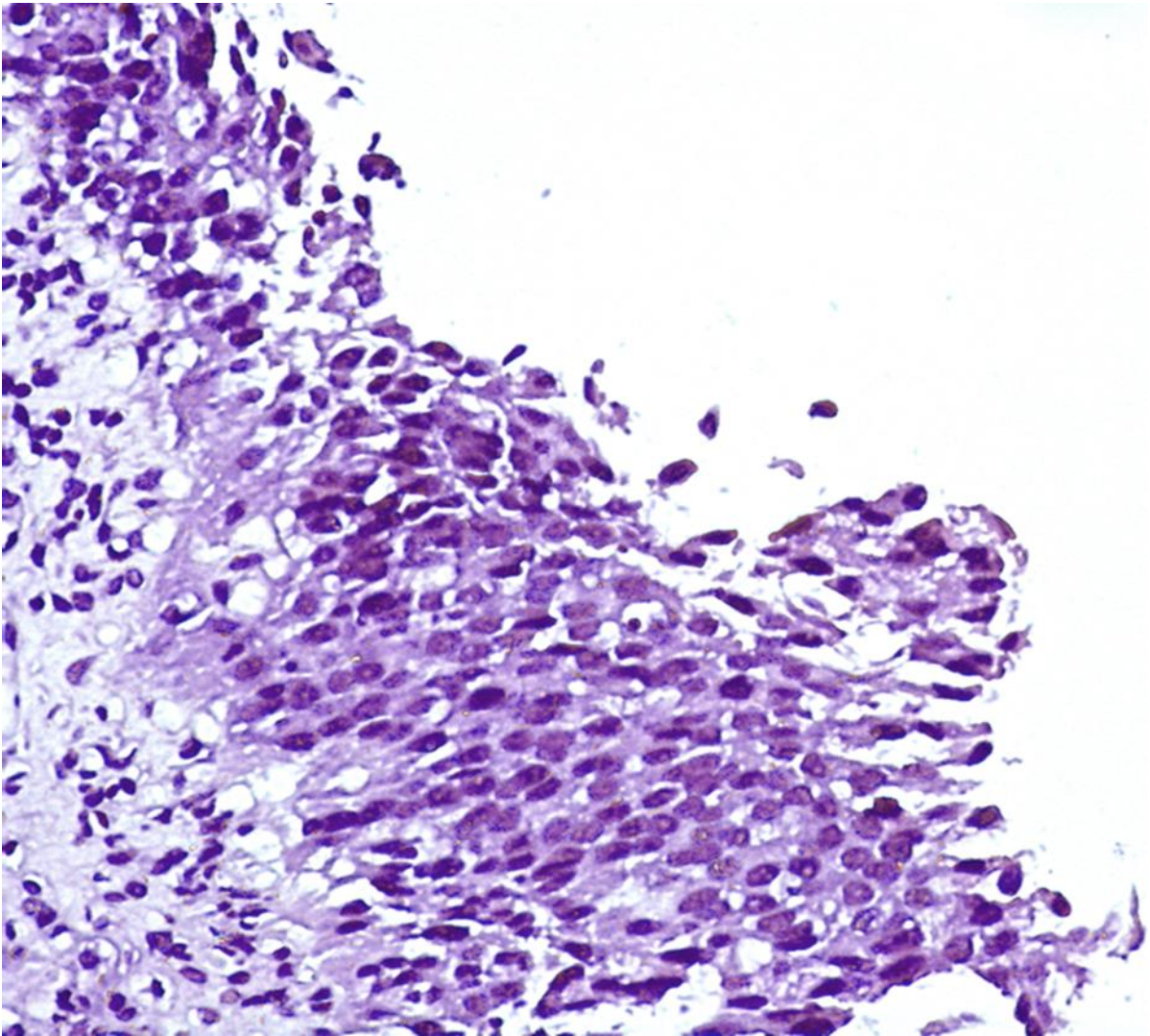
Фигура 10. Папиларен уротелен карцином на пикочния мехур pTa, съдържащ над 8 епителни слоя с лек ядрен атипизъм. Оцветяване с Н&Е, увеличение 100x

Сред изследваните 111 тумора беше открит само 1 случай в стадий pTa (0,9% от изследваните тумори). Това се дължи на факта, че те нямат клинични прояви и се откриват случайно при

трансуретрална цистоскопия. Най-често придружават по-големи уротелни карциноми, които са довели до хематурия.

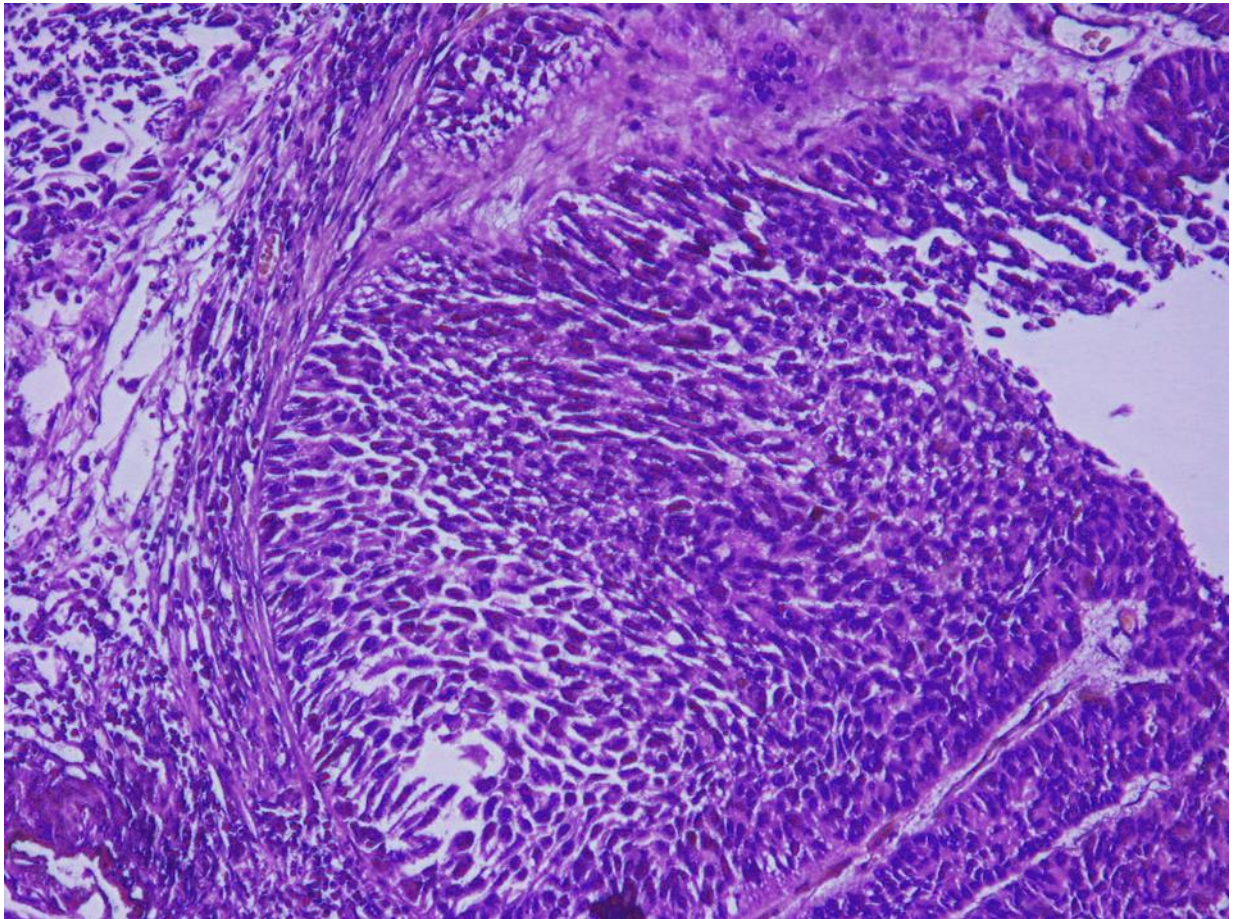
pTis уротелните карциноми на пикочния мехур са карциноми *in situ*, „плоски тумори“, отличаващи се с малка по размери лезия, които нямат папиларен екзофитен растеж, а само умерен към изразен ядрен атипизъм, ангажиращ всички епителни слоеве. (Фигура 11). При тези тумори също няма инвазивни прояви в дълбочина и липсва клинична картина (хематурия).

Те са представени от 5 случая (4.5 %).



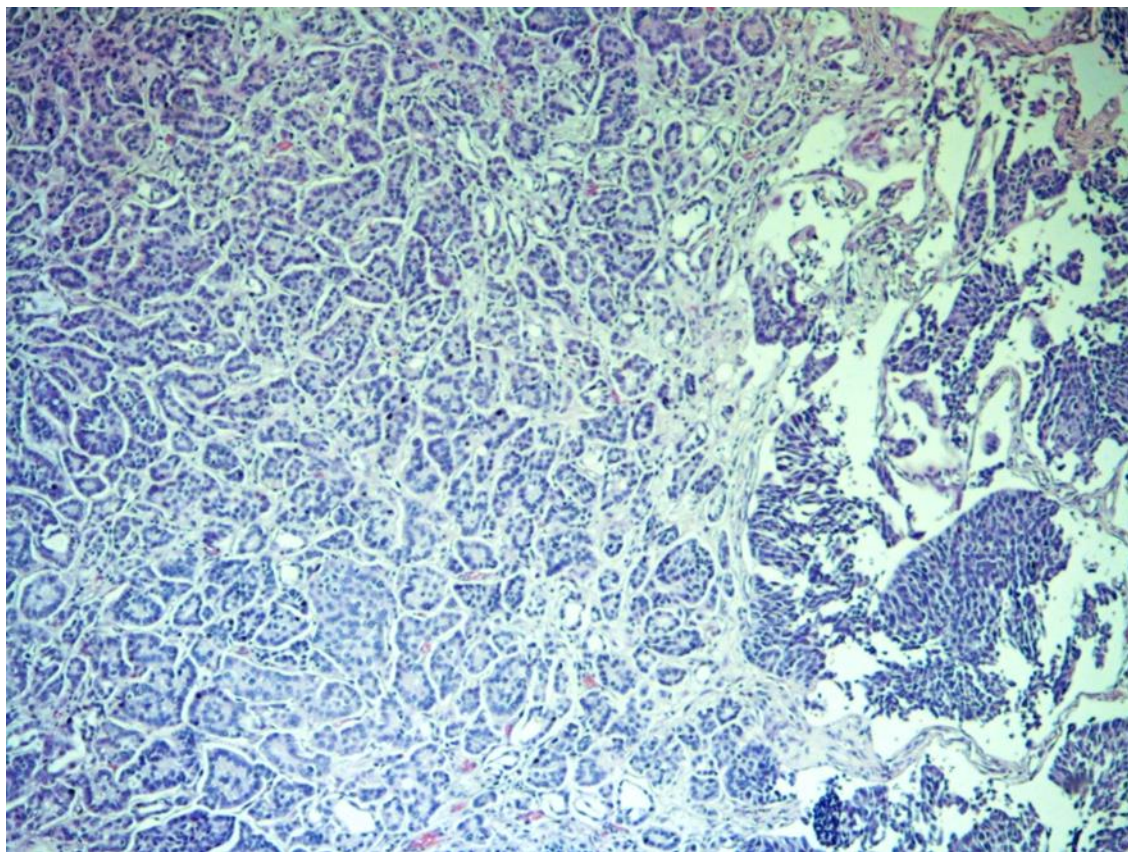
Фигура 11. Карцином *in situ*, „плосък тумор“, Оцветяване с H&E, увеличение 400

Преобладаващият дял от изследваните уротелни карциноми – 65 случая (59,65%) представляват pT1. При тях туморният процес показва екзофитен растеж, но същественото е, че той инфилтрира субепителната съединително-тъканна пластина и собствената мускулна пластина (*Lamina muscularis propria*). Често изпратеният биопсичен материал е силно фрагментиран и това затруднява точната преценка на инфилтративния процес (Фигура 12).



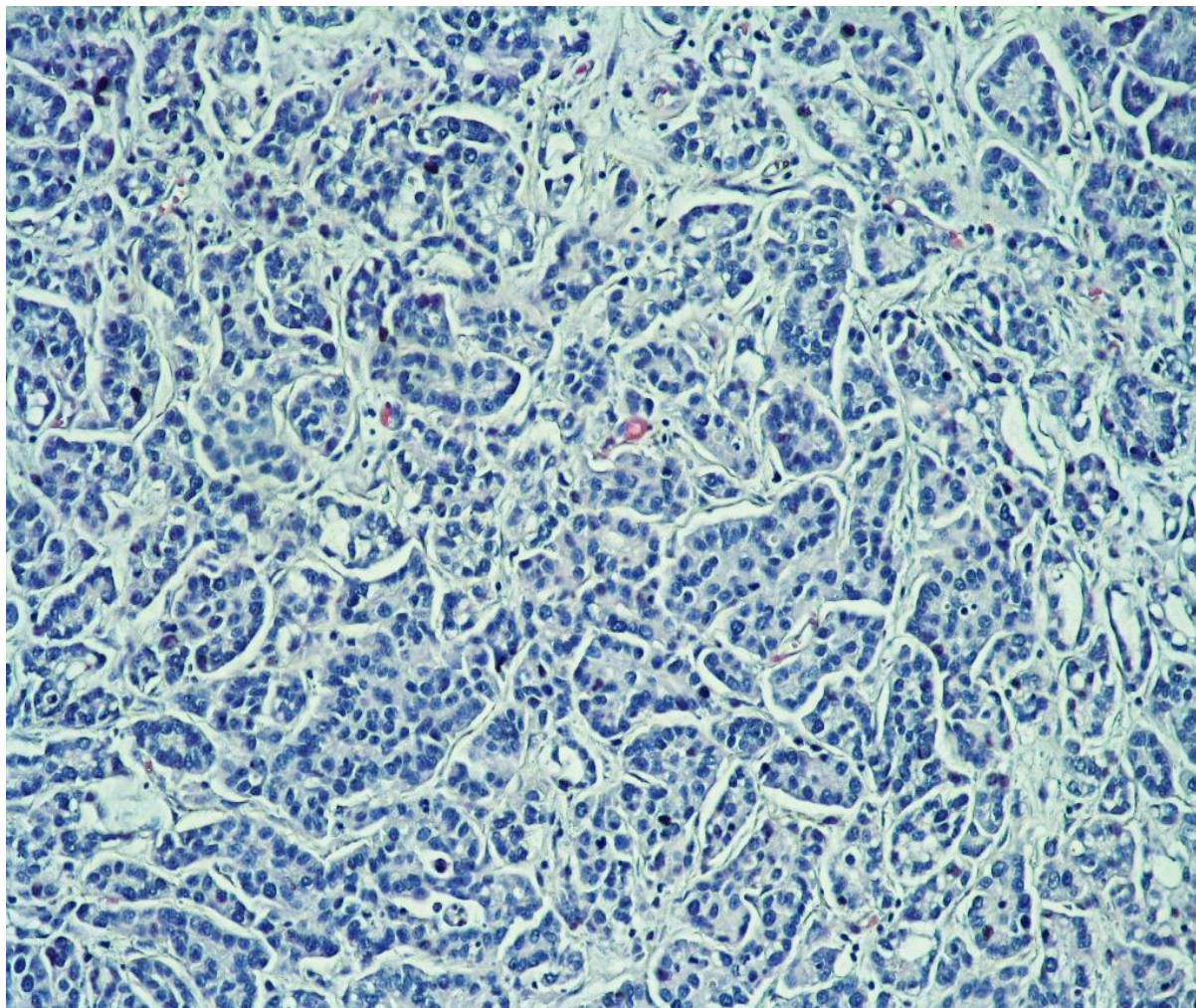
Фигура 12. Инвазивен уротелен карцином на пикочен мехур pT1 с инфилтрация в субепителната съединително-тъканна пластина. Оцветяване с H&E, увеличение 100x

Туморите pT2a са инвазивни уротелни карциноми, които инфилтрират в дълбочина вътрешната половина от дълбоките мускулни слоеве на пикочния мехур. Сред изледваните тумори 8.11% (9 случая) са T2a (Фигура 13).



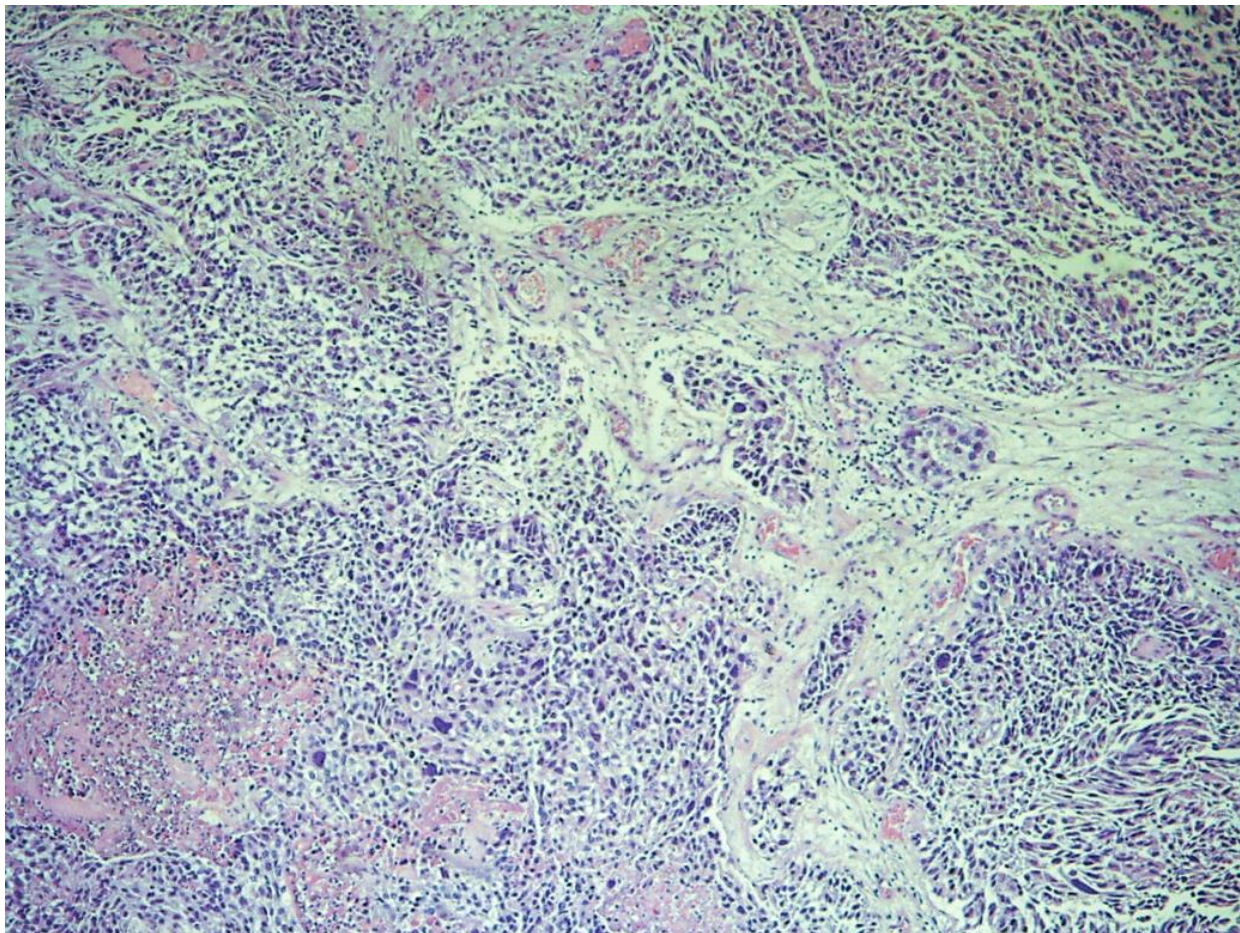
Фигура 13. Уротелен карцином на пикочен мехур pT2a - многофокусна туморна инфилтрация във вътрешната половина на дълбоките мускулни слоеве на пикочния мехур. Оцветяване с Н&Е, увеличение 100x

8 случая (7,21%) отговарят на T2b – тук инфилтрацията в дълбочина ангажира цялата дебелина на дълбоките мускулни слоеве (Фигура 14). Много често тя показва различна степен на проникване при един и същи случай. Класифицирането в определен стадий може да бъде затруднено, но се отчита най-голямата дълбочина на инфилтрация .



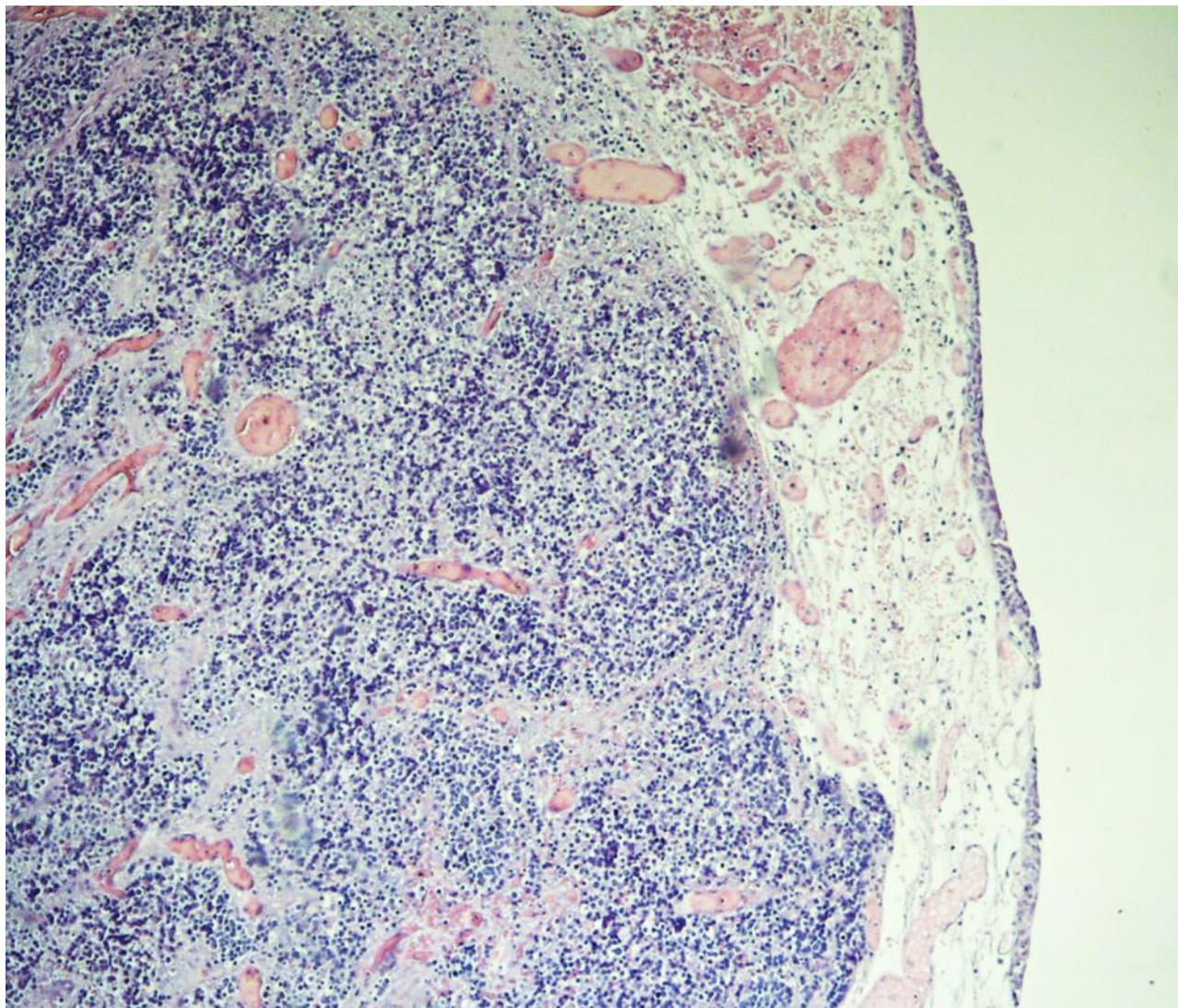
Фигура 14. Уротелен карцином на пикочен мехур pT2b. Оцветяване с Н&Е, увеличение 200х

5 случая (4,5%) са рТ3а – при тях се открива микроскопска инфилтрация извън външната граница на мускулните слоеве на пикочния мехур (Фигура 15). Ангажирани са перивезикални тъкани : мастна и фиброзна тъкан.

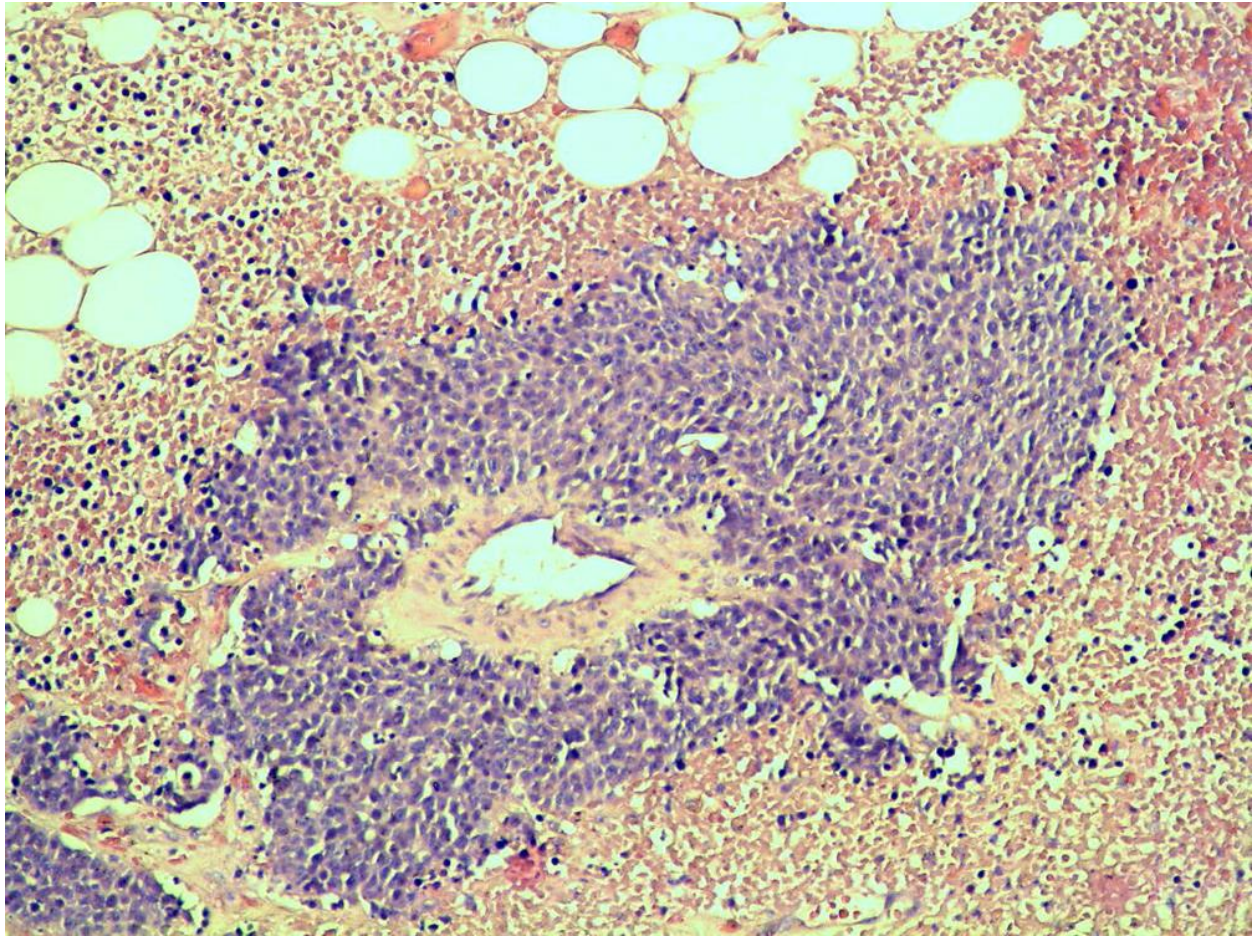


Фигура 15. Уротелен карцином на пикочен мехур рТ3а. Оцветяване с Н&Е, увеличение 100х

1 случай (0.9%) е T3b - при карциномите pT3b инфильтрацията в перивезикалните тъкани е микроскопски и макроскопски видима (Фигура 16-17). При изследване на резециран пикочен мехур могат да се открият както най-високата степен pT3b, така и по-ранни стадии (pT3a и pT2b).

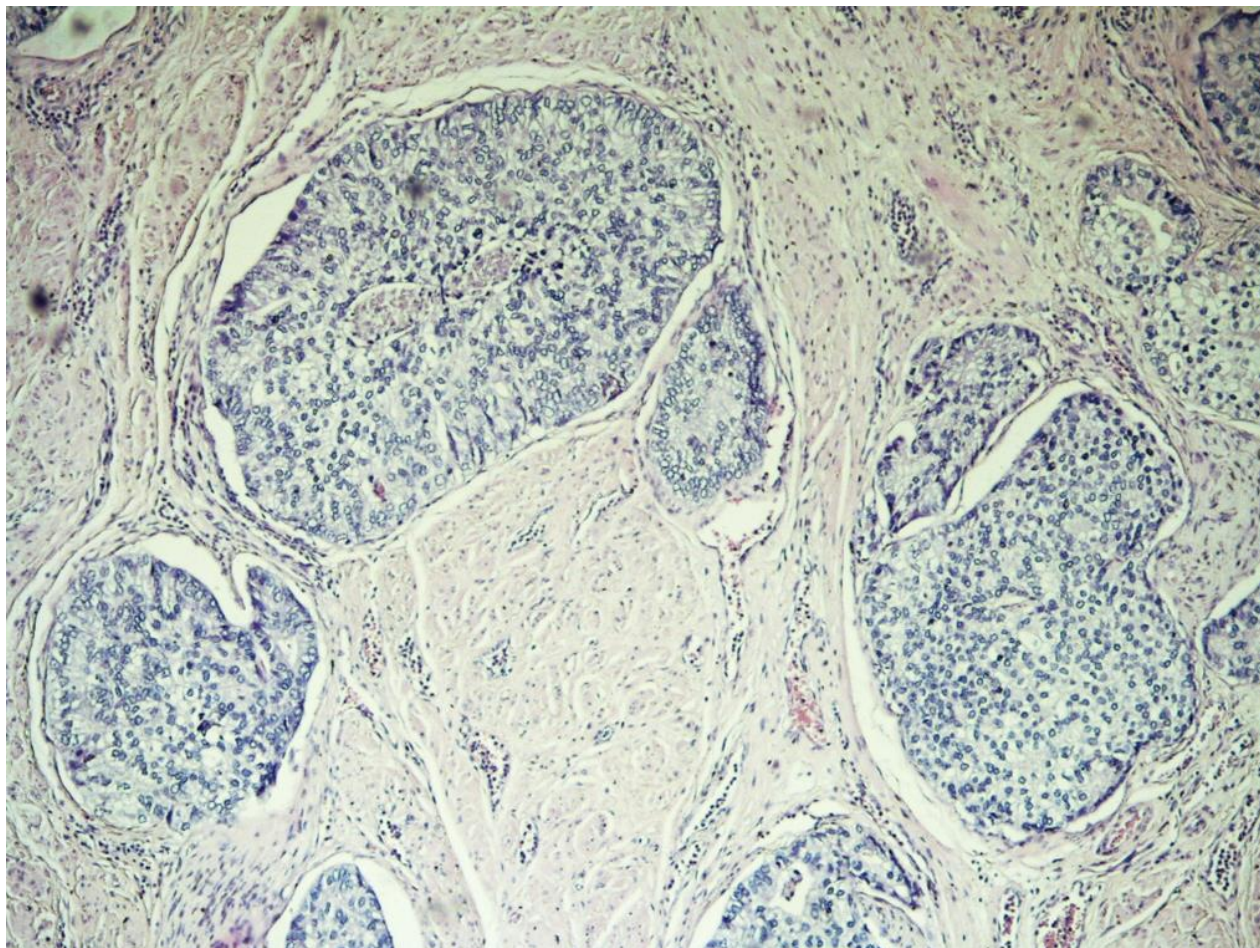


Фигура 16. Уротелен карцином на пикочен мехур pT3b. Оцветяване с H&E, увеличение 100x

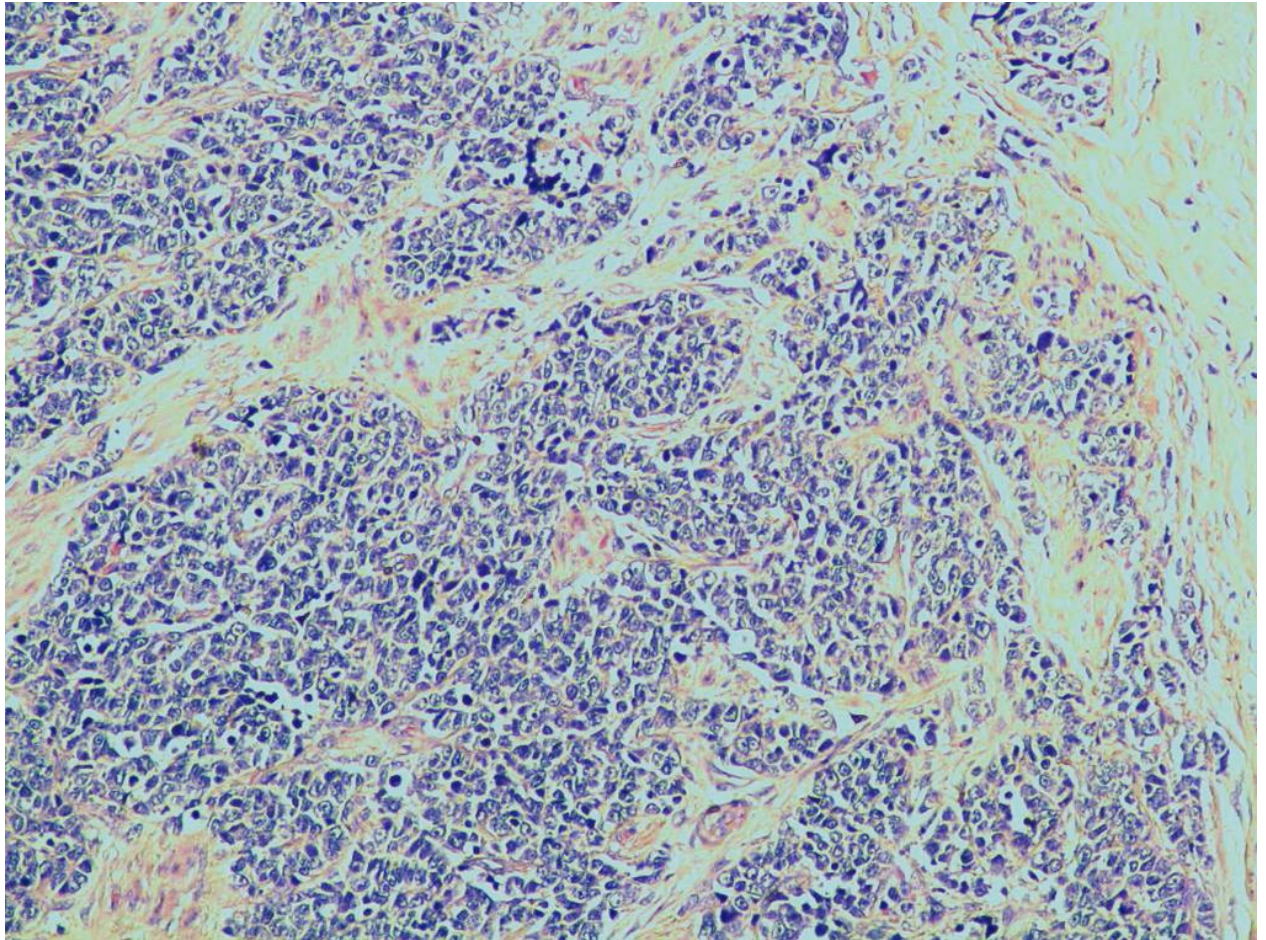


Фигура 17. Умерено диференциран уротелен карцином на пикочния мехур с туморна инвазия в перивезикални мастна и съединителна тъкан.
Оцветяване с Н&Е, увеличение 100х

3 случая (2.7%) са pT4 – туморният процес е инфилтрирал всички мускулни слоеве, перивезикална тъкан и навлиза в съседни органи : простатна жлеза, матка (корпус), ректум, влагалище (Фиг. 18, 19).

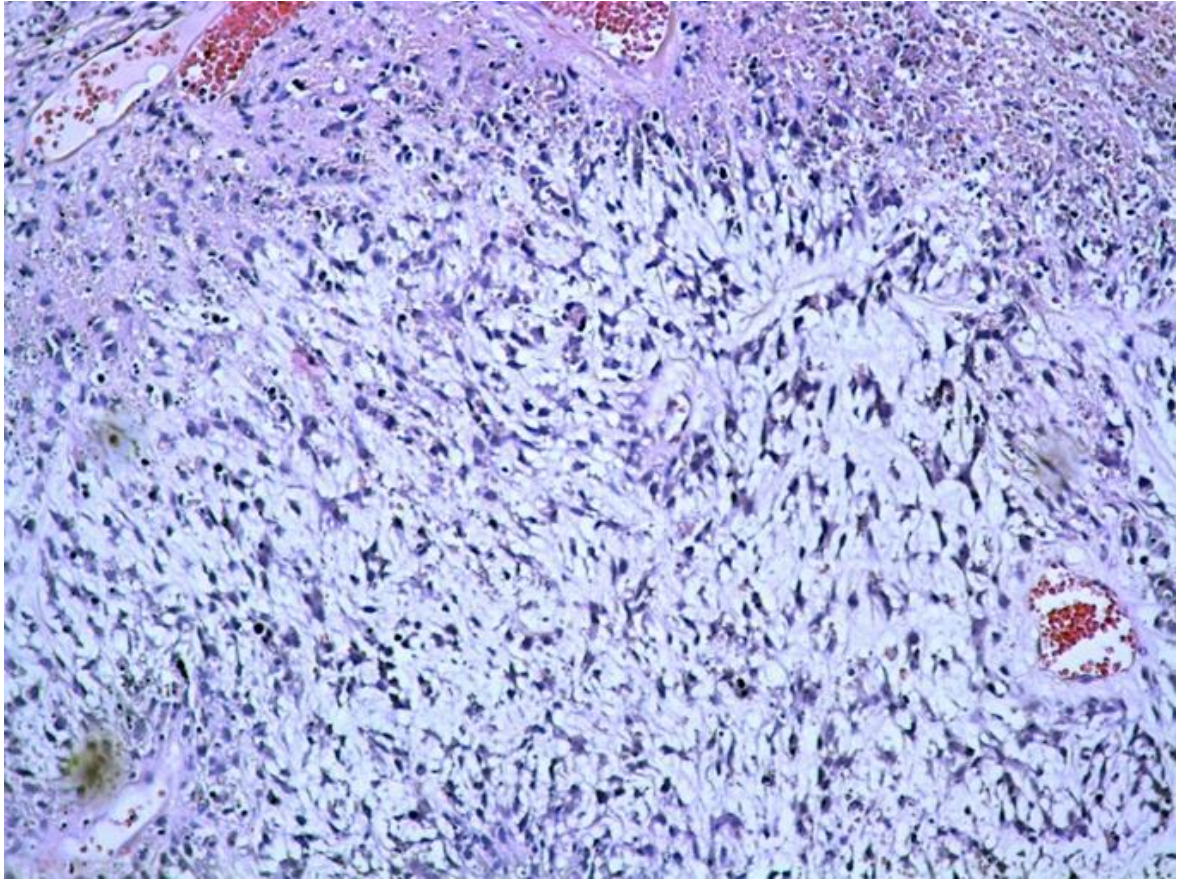


Фигура 18. Инвазивен уротелен карцином на пикочен мехур pT4 с многофокусна инфилтрация в простатна жлеза. Оцветяване с H&E, увеличение 100x



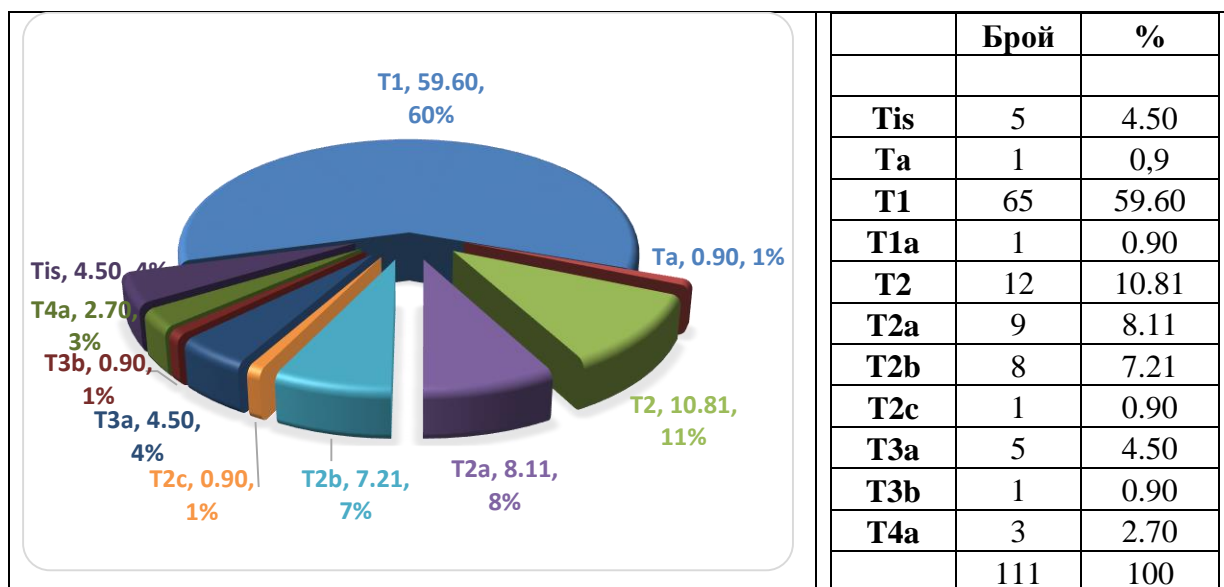
Фигура 19. Инвазивен уротелен карцином на пикочен мехур pT4 с инфилтрация към външните мускулни слоеве на влагалище. Оцветяване с H&E, увеличение 200x

Диагностициран беше и 1 случай на саркоматоиден карцином на пикочен мехур, който инфилтрира всички мускулни слоеве. Неговият произход не е свързан с уротелния епител. (Фигура 20).



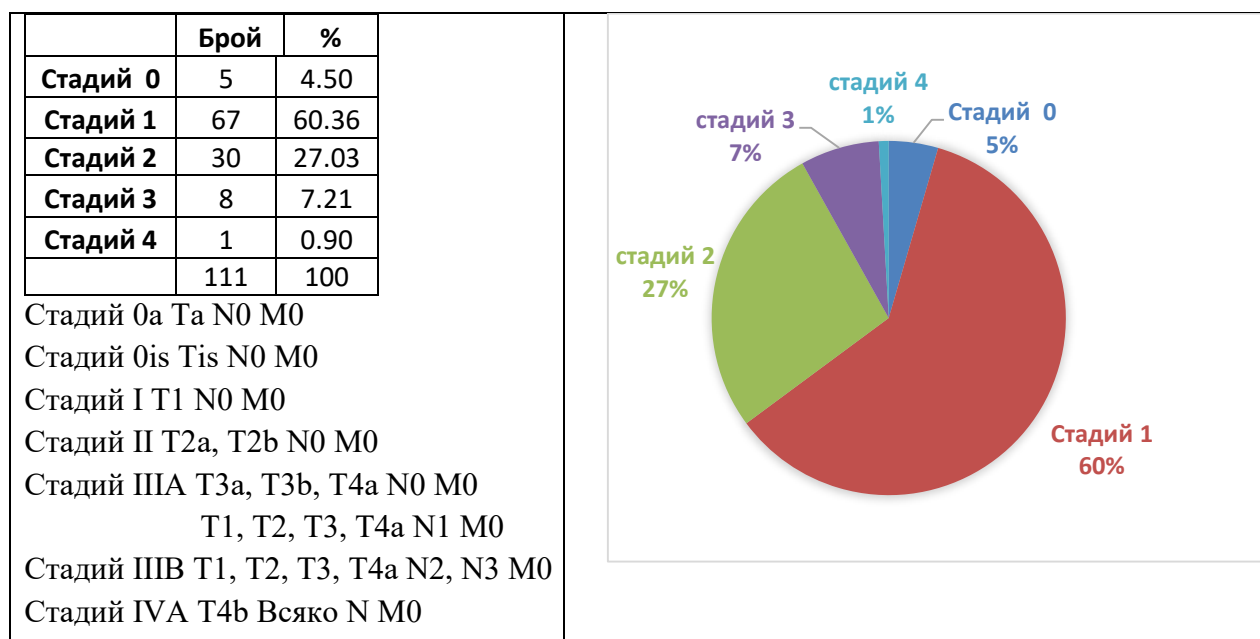
Фигура 20. Саркоматоиден карцином на пикочен мехур pT3 с инфилтрация на всички мускулни слоеве. Оцветяване с H&E, увеличение 200x

Разпределението според степента на туморна инвазия показва най-висок процент от случаите, принадлежащи към група pT1 59,46 % (67 случая). Най-малък (2.7% - 3 случая) е дялът на карциномите с T4 и in situ карциномите (4.5% - 5 случая). Диагностицираните T2 тумори са 27,03% (30 случая) и T3 са 6 случая (5,41%). Резултатите са представени на фигура 21.



Фигура 21. Разпределение на случаите според дълбочината на туморната инвазия

IV.1.6. Разпределение на пациентите с уротелен карцином на пикочния мехур според стадия на заболяването - 60% от уротелните карциноми на пикочния мехур са диагностицирани в Стадий I. Резултатите са представени на Фигура 22.



Фигура 22. Разпределение на случаите според стадия на заболяването

IV.1.7. Имунохистохимично изследване на експресията на PD-L1 при уротелни карциноми

Бяха проведени имунохистохимични изследвания на хистологични препарати от подбрани уротелни карциноми с моноклонално антитяло срещу PD-L1, clone 73-10, Leica Bio Systems, Великобритания. Реакцията се представя като мембранна и/или интрацитоплазматична позитивна оцветка в туморната клетъчна популация и в интратуморните имунокомпетентни (стромни) клетки – лимфоцити и тъканни макрофаги, които имат роля на вътрешна контрола.

Използвана беше препоръчаната от *PD-L1 expression testing guide 2016* скала за отчитане.

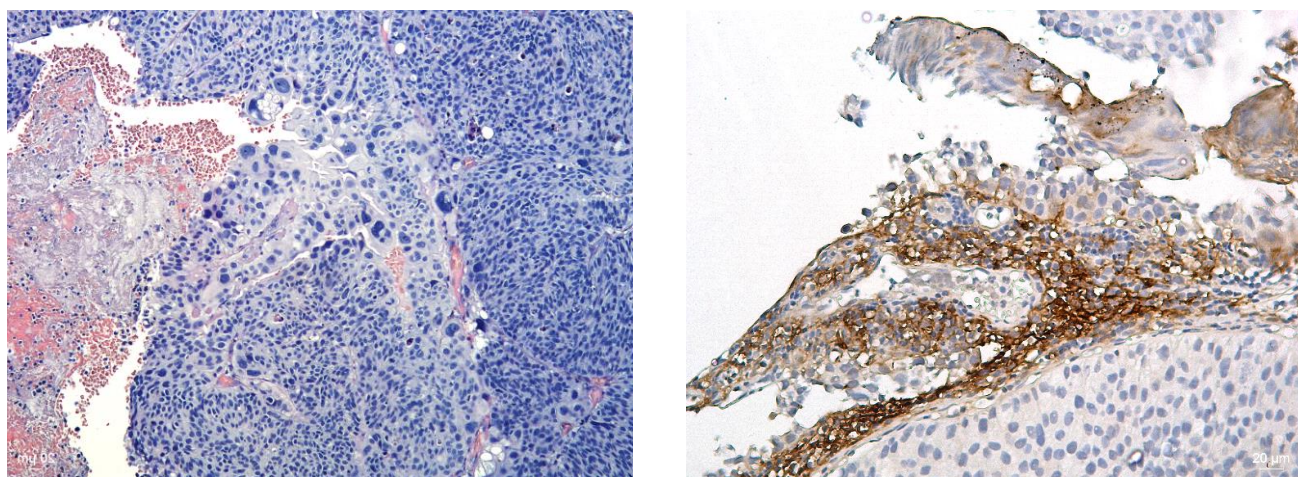
Интерпретация на нивата на експресия на PD-L1:

висока експресия – 50% до 100%;

наличие на експресия 1% до 50%;

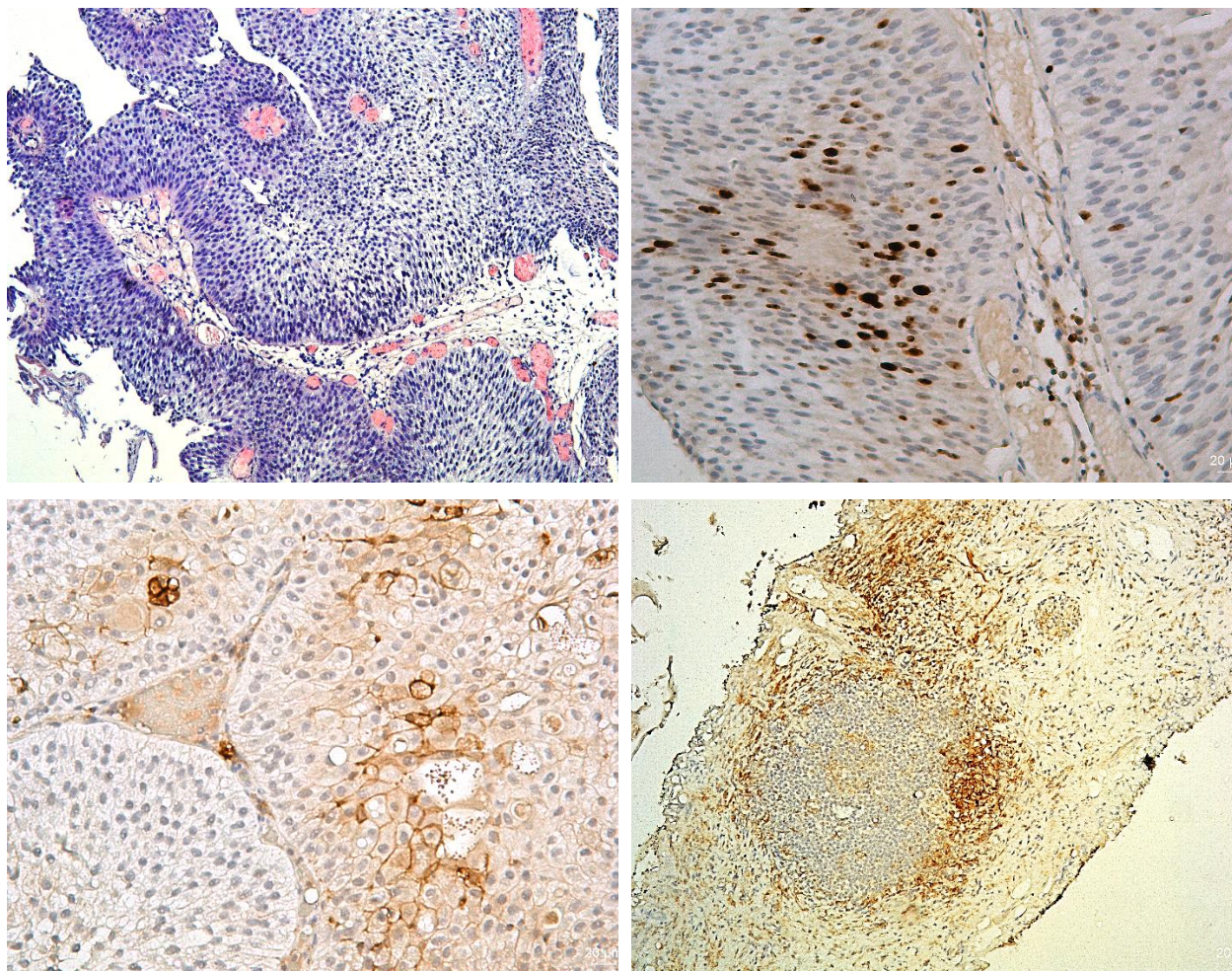
липса на експресия – под 1%

Ниско диференцираните уротелни карциноми се отличават с напълно заличен папиларен епителен строеж. Открива се компактна туморна маса с хиперхромни атипични ядра. Гигантски монструозни клетки с обилие от атипични митози. Добре отчетливи са инфилтративните процеси в подлежащите мускулни слоеве, съчетани с обширни некротични полета и кръвоизливи. При тях се отчитат предимно високи нива на експресия на PD-L1, като положителната реакция не е дифузна и се открива в групи от туморни клетки. Важно е да се отбележи, че хиперекспресия се наблюдава в лимфоцити, макрофаги и дори в стената на съдови лумени.



Фигура 23. Нискодиференциран папиларен уротелен карцином с фокуси на плоскоклетъчна метаплазия, А. Оцветяване с Н&Е, 100х увеличение; Б. ИХХ реакция с моноклонално антитяло PD-L1, DAB хромоген, 200х увеличение. Експресия на PD-L1 < 50%.

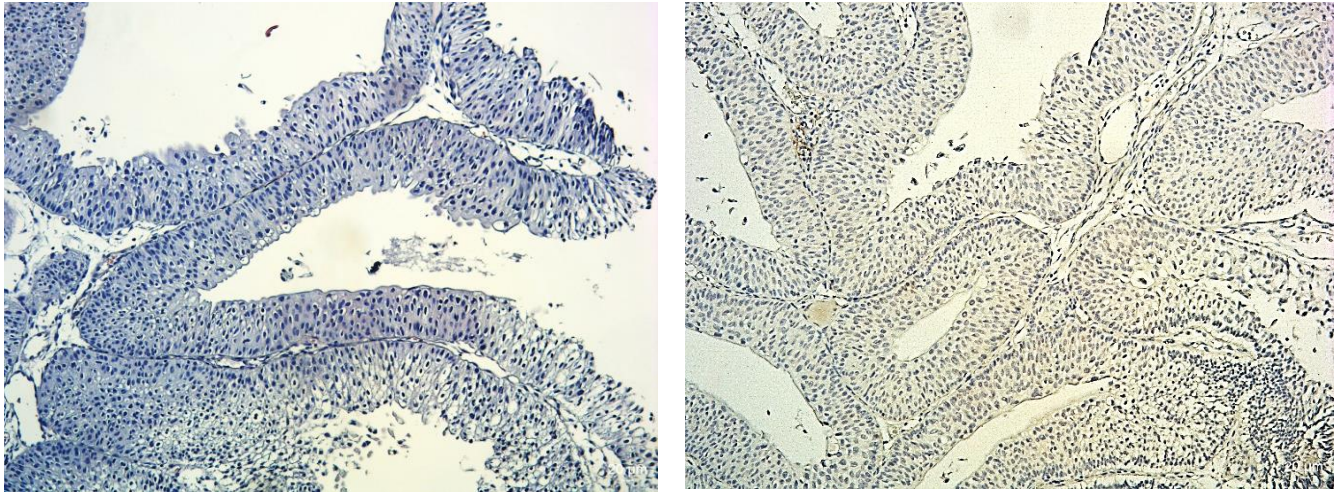
Като основни белези при умерено диференцираните уротелни карциноми на пикочния мехур се откриват силно увеличен брой на епителните слоеве и заличаване на тяхната стратификация. Отчетлив е ядреният атипизъм, откриват се неправилни митози. Някои ядра съдържат 2 и повече ядърца.



Фигура 24. Умерено диференциран папиларен уротелен карцином
А. Оцветяване с Н&Е, 100х увеличение; Б. ИХХ реакция с моноклонално антитяло Ki67,
В. ИХХ реакция с моноклонално антитяло PD-L1, DAB хромоген, 200х увеличение.
Експресия на PD-L1 < 50%. Г. Субепителен лимфен фоликул (негативен) и периферно
разположени хистиоцити, фибробласти и сегментоядрени левкоцити, които са силно
позитивни, ИХХ реакция с моноклонално антитяло PD-L1. 200х увеличение.

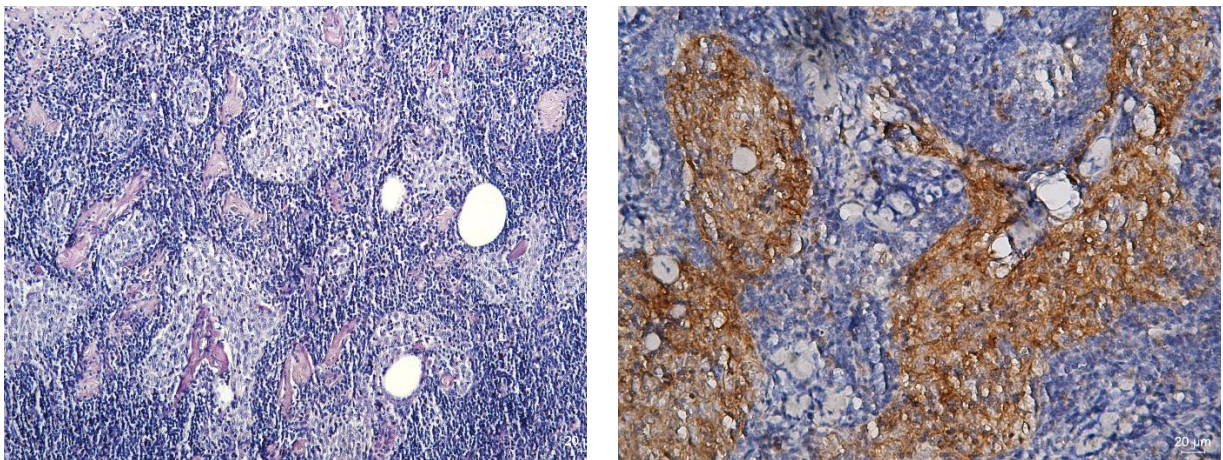
В туморните клетки се наблюдава пълна мембранна експресия на PD-L1 в отделни участъци, а в други туморни сегменти тя напълно липсва, което подчертава хетерогенността на тумора.

При високо диференцираните уротелни карциноми на пикочния мехур се откриват добре ограничени папиларни структури със съхранена базална мембрана, които съдържат 5-7 епителни слоя. Ядреният атипизъм е слабо изразен. В някои участъци туморите са трудно разграничими от нормален уротелен епител. Основният показател са силно нагънатите и разклонени папиларни структури. Експресията на PD-L1 е дифузна и слабо изразена, като се позитивират предимно лимфни и венуларни съдове и от части базални мемрани.



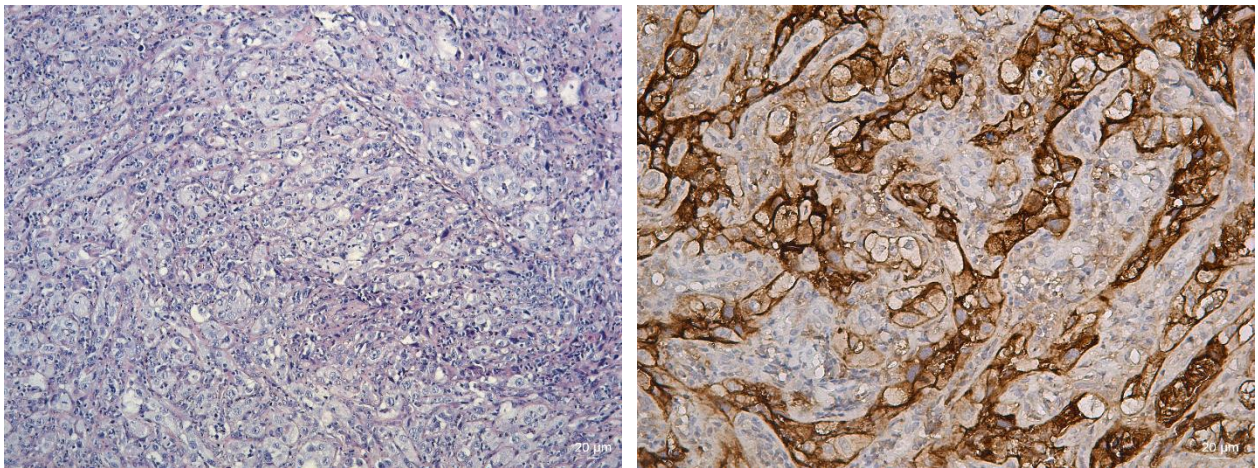
Фигура 25. Високо диференциран папиларен уротелен карцином. А. Оцветяване с Н&Е, 100х увеличение; Б. ИХХ реакция с моноклонално антитяло PD-L1, DAB хромоген, 100х увеличение. Експресия на PD-L1 < 1%.

При 3 уротелни карцинома бяха изолирани лимфни възли с метастатични огнища (синусни и субкапсулни). При тях се установи свръхекспресия на PD-L1 – мембранна и цитоплазмена. (Фигура 26).



Фигура 26. Метастатичен лимфен възел от умерено диференциран уротелен карцином. А. Оцветяване с Н&Е, 100х увеличение; Б. ИХХ реакция с моноклонално антитяло PD-L1, DAB хромоген, 200х увеличение.

Изследваните 9 остеолитични костни метастази от умерено и ниско диференцирани уротелни карциноми показват сходство с първичния тумор. Отчита се огнищна положителна експресия в туморните клетки. При един случай на остеолитична костна метастаза в хумерус от ниско диференциран уротелен карцином се наблюдава картина на напълно заличен многореден епителен строеж, умерен ядрен атипизъм и псевдолобуларен строеж. Експресията на PD-L1 е силно положителна - 100 % мембранна реакция се наблюдава в повлекла от туморни клетки, а между тях се откриват напълно негативни туморни зони.

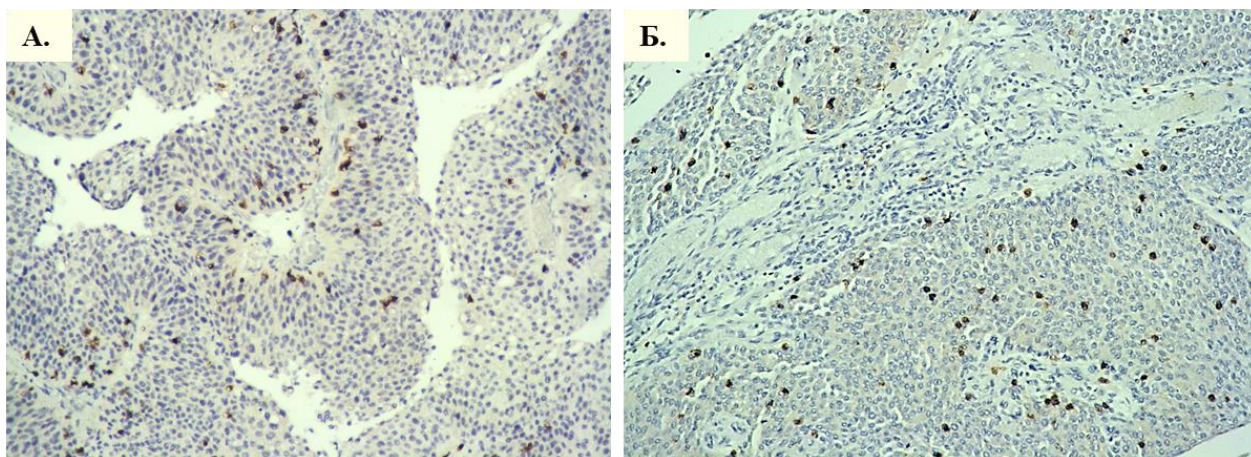


Фигура 27. Остеолитична метастаза (фемур) от ниско диференциран уротелен карцином. А. Оцветяване с Н&Е, 100х увеличение; Б. ИХХ реакция с моноклонално антитяло PD-L1, DAB хромоген, 400х увеличение.

IV.1.8. Експресия на CD8 в тумор-инфилтриращи Т-лимфоцити (TILs) и CD68 при тумор-асоцираните макрофаги (TAMs).

Експресията на CD8 в туморни тъкани от уротелни карциноми на пикочния мехур беше оценена имунохистохимично при използване на мише моноклонално антитяло clone 4B11, Leica Bio Systems, UK. CD8⁺ тумор-инфилтриращи лимфоцити (TILs) бяха открити както в стромалните области, така и интратуморно в гнездата на епителните тумори (Фигура 28).

CD8 е маркер за популацията на цитотоксичните Т-лимфоцити, които участват в унищожаването на туморни и вирусно инфектирани клетки. Експресира се и върху естествени клетки убийци, кортикални тимоцити и дендритни клетки.



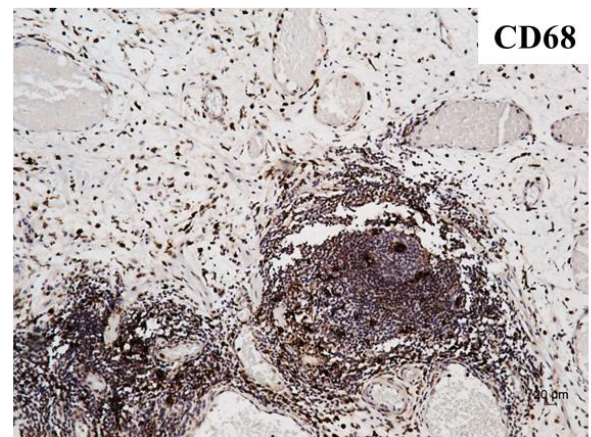
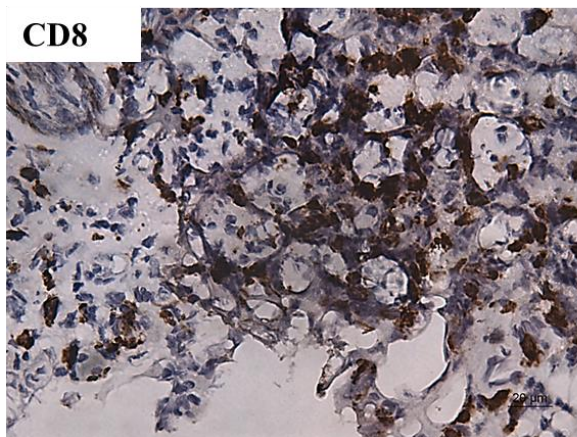
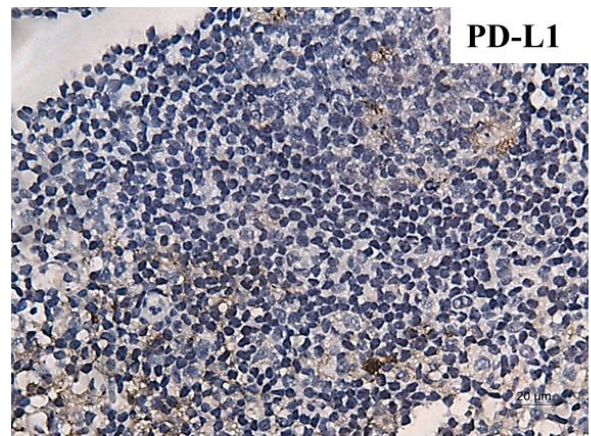
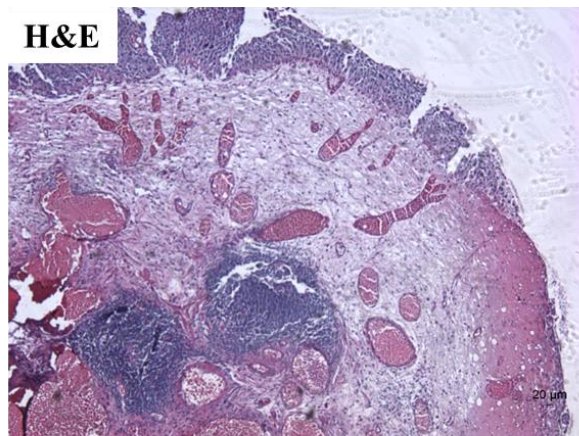
Фигура 28.

А. Високо диференциран уротелен карцином; **Б.** Умерено диференциран уротелен карцином. ИХХ реакция с моноклонално антитяло CD8, DAB хромоген, 400x увеличение.

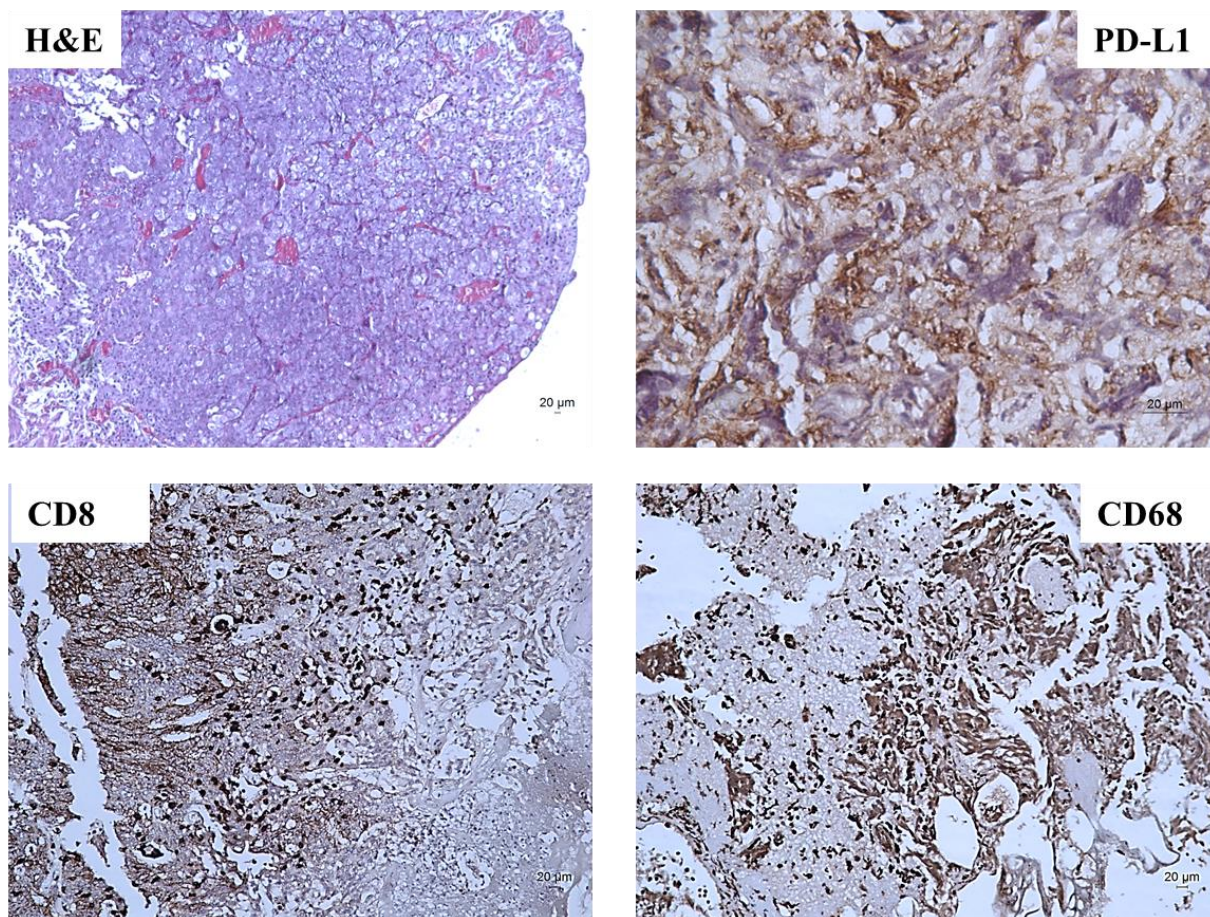
Високата интратуморна CD8+Т-лимфоцитна плътност се свързва с по-добра обща преживяемост и специфична за заболяването преживяемост при инвазивен уротелен карцином на пикочния мехур [Sheila, 2015]. Имунохистохимичното оцветяване за интратуморни CD8 Т –лимфоцити в тъканни проби от 69 пациенти с уротелен карцином [Sharma, 2020] показва, че пациентите с напреднал РПМ (pT2, pT3 или pT4) и по-голям брой CD8 TILs в тумора (≥ 8) имат по-добра преживяемост без заболяване и общата преживяемост в сравнение с пациентите с КПМ в подобен стадий и по-малко интратуморни CD8+TILs. Тази установена зависимост определя степента на интратуморна инфилтрация от CD8+ TILs като важен прогностичен индикатор при напреднал уротелен карцином на пикочния мехур.

Тумор-инфилтриращите цитотоксични Т лимфоцити (TILs), включително CD8+ TILs, са свързани с благоприятни клинични резултати при множество тумори. Степента на инфилтрация на тумора със CD8+ Т-лимфоцити е важен прогностичен индикатор при напреднал уротелен карцином. Метаболитната регулация, функционалното състояние, подтипът и пространственото разпределение на CD8+ Т клетки играят различни роли в туморния имунитет. CD8+ TIL са критична детерминанта за отговора на лечението с инхибитори на имунните контролни точки поради прякото им участие в разрушаването на туморни клетки.

Висока плътност на CD8+лимфоцитна инфилтрация (наличие на ≥ 60 CD8+ интраепителни лимфоцита на поле при голямо увеличение в над 50% от тумора) се наблюдава в приблизително 80% от случаите. Плътността на CD8 не корелира с експресията на PD-L1.



Фигура 29. Неинвазивен папиларен карцином на пикочния мехур рТа. Оцветяване с Н&Е, ИХХ реакция с моноклонално антитяло CD8, CD68 PD-L1, DAB хромоген, увеличение 200х-400х

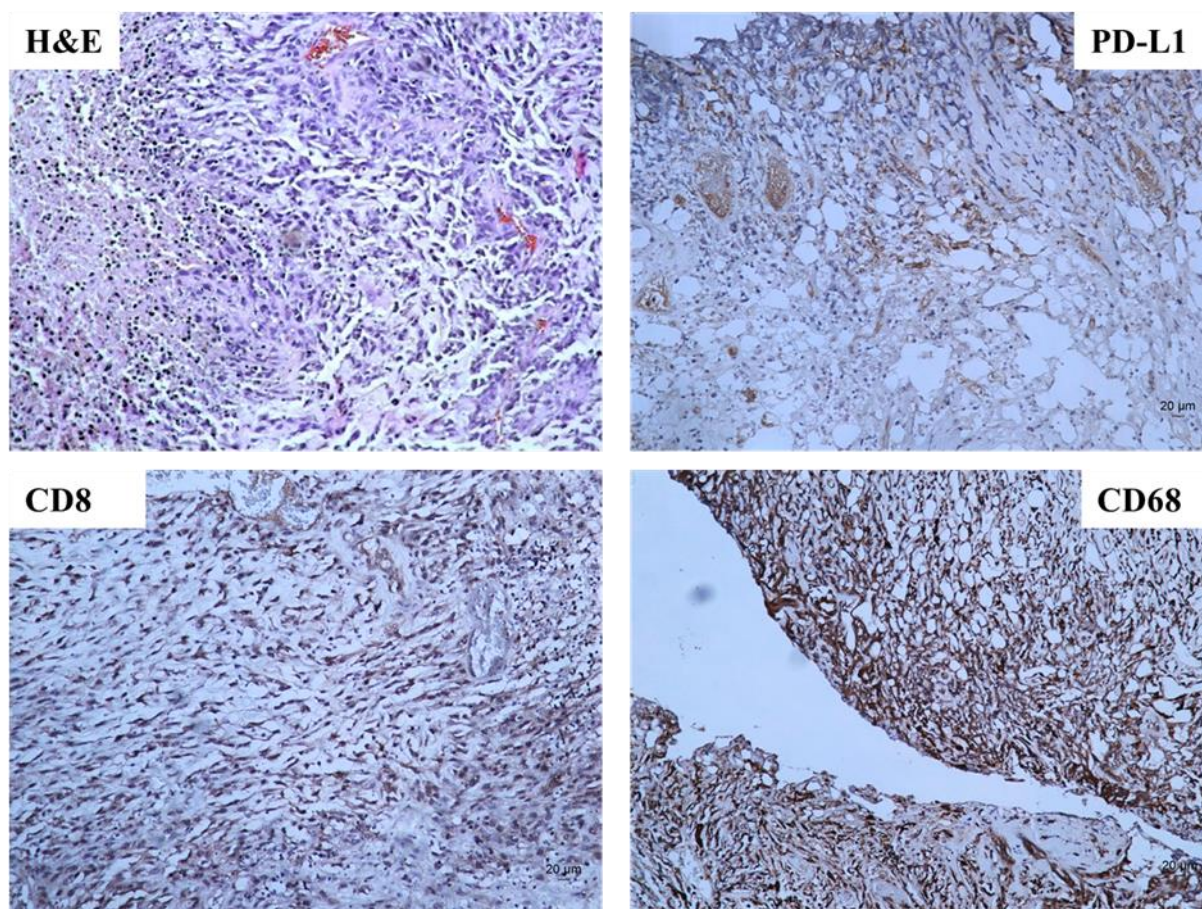


Фигура 30. Нискодиференциран уротелен карцином с плоскоклетъчна метаплазия, T2b. Оцветяване с H&E, IXX реакция с моноклонално антитяло CD8, CD68 и PD-L1, DAB хромоген, увеличение 200x.

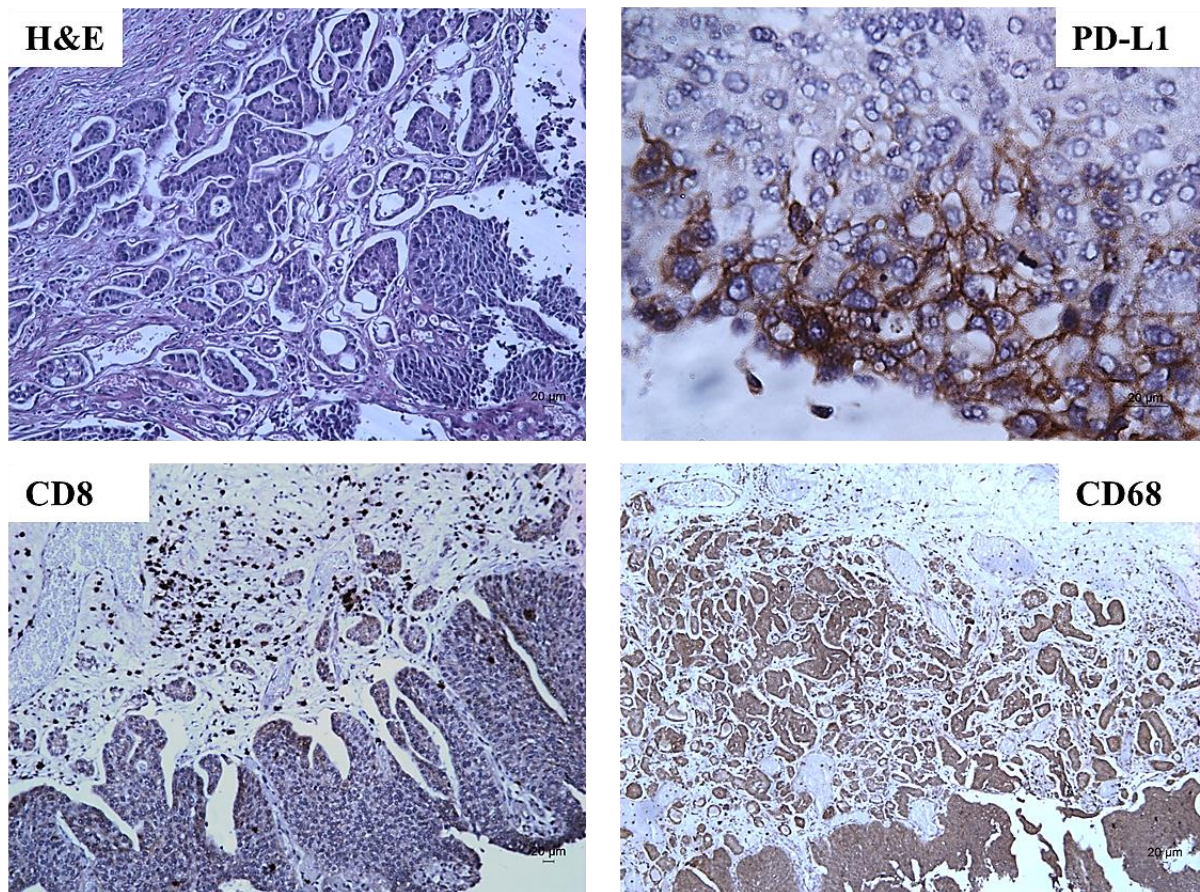
Тумор-асоцираните макрофаги (TAMs) бяха идентифицирани имунохистохимично чрез експресията на панмакрофаговия маркер CD68, като беше използвано мише моноклонално антитяло (clone 514H12, Leica BioSystems, UK). Висок брой макрофаги, беше наблюдаван при тумори с по-висока pT категория и степен.

Тумор-асоцираните макрофаги, произхождащи от моноцити в периферна кръв и привлечени от хемокини, са основен компонент на левкоцитния инфилтрат в туморите. Пластичността и разнообразието са универсални характеристики на мононуклеарните фагоцити, които могат да имат или защитна, или стимулираща тумора роля, в зависимост от сигналите от средата. TAMs обикновено са ориентирани към насърчване на туморен растеж и ангиогенеза, потискане на адаптивния имунитет и имат важна роля в миграцията на туморни клетки, инвазията и метастазите. Въпреки това, макрофагите

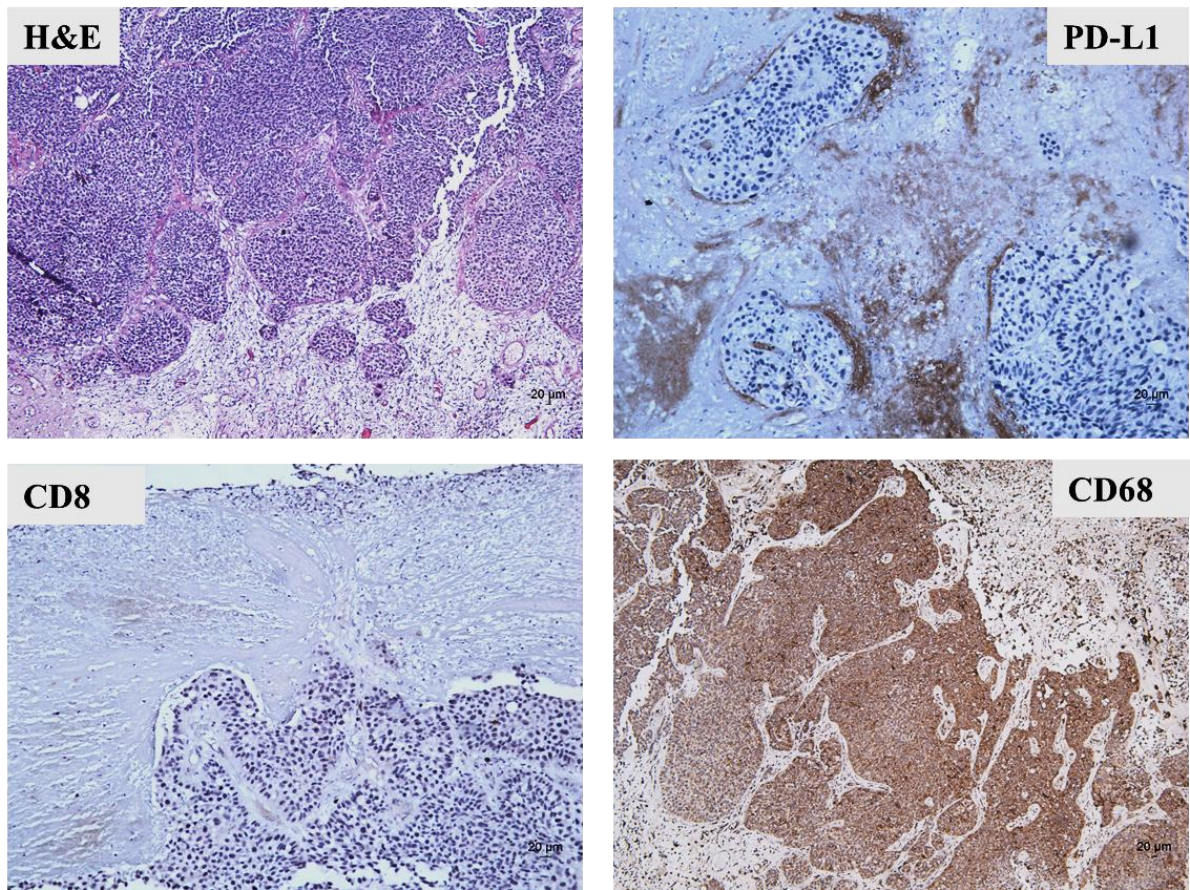
могат също да елиминират туморни клетки и следователно понякога се свързват с по-добра прогноза на заболяването.



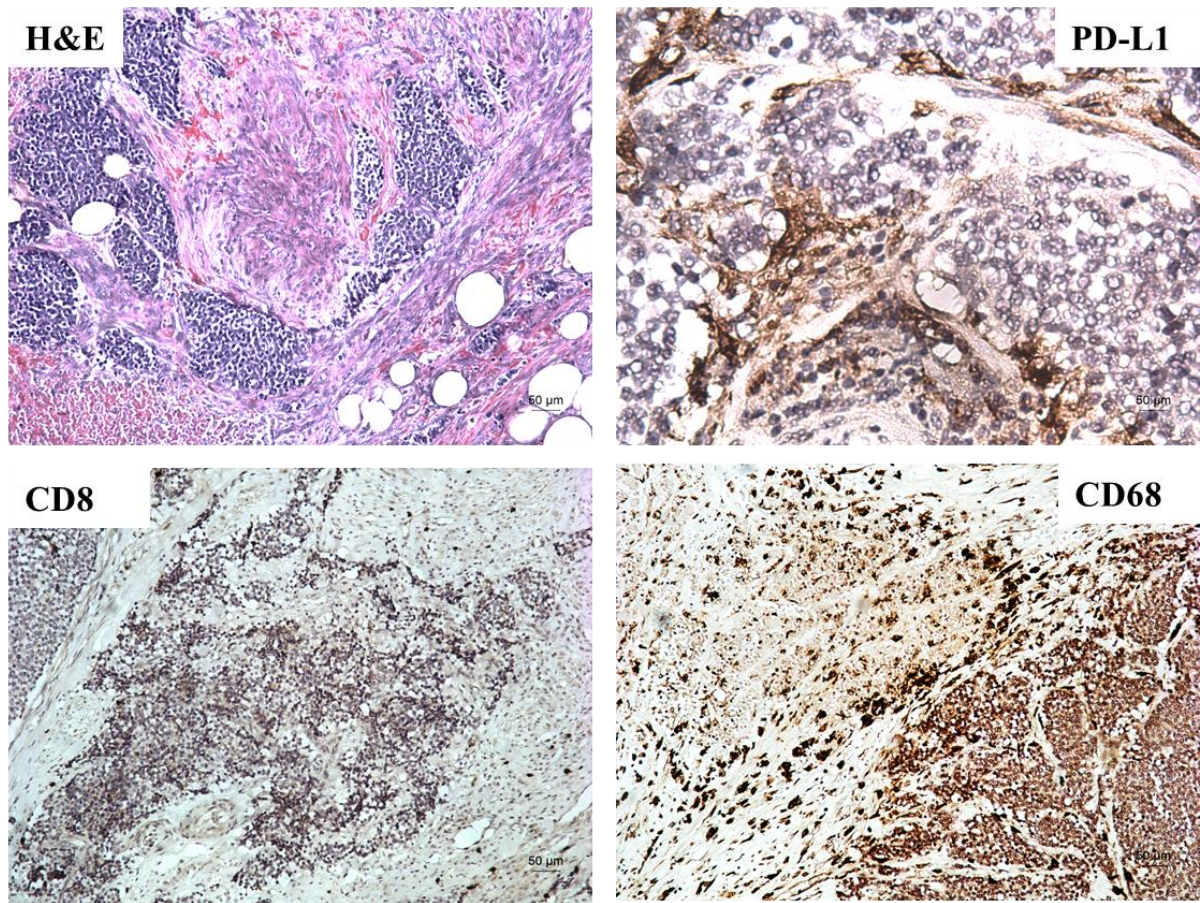
Фигура 31. Саркоматоиден карцином на пикочния мехур. Оцветяване с Н&Е, ИХХ реакция с моноклонално антитяло CD8, CD68 и PD-L1, DAB хромоген, увеличение 200х.



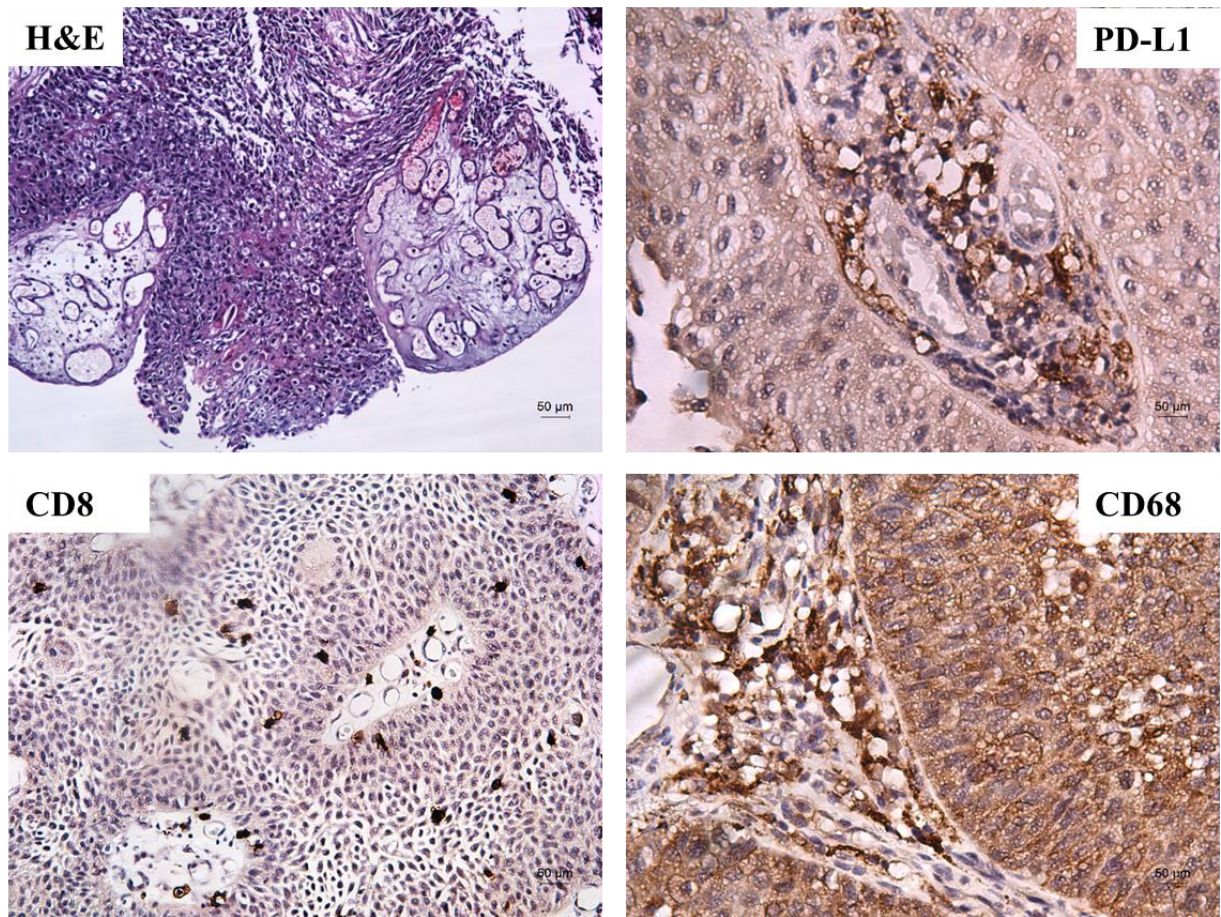
Фигура 32. Туморен рецидив от уротелен карцином pT2aNxMxV0L1R0, G2. Оцветяване с H&E, ИХХ реакция с моноклонално антитяло CD8, CD68 и PD-L1, DAB хромоген, увеличение 200х.



Фигура 33. Умерено диференциран уротелен карцином, инфилтриращ дълбока muscularis propria, T2b. Оцветяване с H&E, ИХХ реакция с моноклонално антитяло CD8, CD68 и PD-L1, DAB хромоген, увеличение 200х.



Фигура 34. Ниско диференциран уротелен карцином с екстравезикална инфилтрация рТ3bNхMхV1L1R0. Оцветяване с Н&Е, ИХХ реакция с моноклонално антитяло CD8, CD68 и PD-L1, DAB хромоген, увеличение 200х.



Фигура 35. Умерено диференциран уротелен карцином, инфилтриращ повърхностна muscularis propria pT2a – многократен рецидив. Оцветяване с H&E, ИХХ реакция с моноклонално антитяло CD8, CD68 и PD-L1, DAB хромоген, увеличение 200х.

Високите нива на CD68+ TAMs са свързани с рецидиви при мускуло-неинвазивни карциноми на пикочния мехур [Ayari C., 2009]. Тумори, определени като T3–T4 проявяват по-висока инфилтрация със CD68+ TAMs от T2, което показва корелацията между нивата на TAMs и туморната инвазия. Проучване на Jie Wu (2022) показва, че инфилтрацията на CD68+ TAMs в областта на стромата е значително свързана с по-лоша преживяемост при пациенти с мукуло-инвазивен карцином на пикочния мехур.

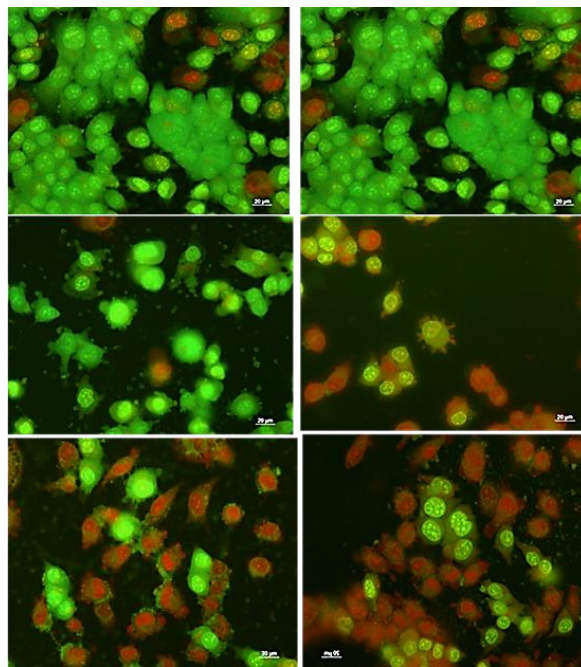
IV.1.9. Сравнително изследване на морфологични промени при апоптоза чрез двойно флуорохромиране с акридиноранж-пропидиев йодид, рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин и имунохистохимично изследване на експресията на PD-L1

При сравнително изследване чрез двойно флуорохромиране с акридиноранж-пропидиев йодид, рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин и имунохистохимично изследване на експресията на PD-L1 на индуцирана с цитостатик (cisplatin) апоптотична клетъчна смърт при туморни клетъчни линии от колоректален карцином при човек (HT29), цервикален аденокарцином при човек (HeLa) и трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с Rous sarcoma virus (RST) бяха наблюдавани типичните за апоптотична клетъчна смърт цитоморфологични промени. Морфологичните изменения на апоптотичната клетъчна смърт, които засягат както ядрото, така и цитоплазмата, са забележимо сходни при различните клетъчни типове и видове. Обикновено са необходими няколко часа от началото на клетъчната смърт до окончателното клетъчно фрагментиране. Морфологичните белези на апоптозата в ядрото са кондензация на хроматин и ядрена фрагментация, които са придружени от закръгляване на клетката, намаляване на клетъчния обем (пикноза) и ретракция на псевдоподите. Кондензацията на хроматин започва от периферията на ядрената мембрана, образувайки полумесец или пръстеновидна структура. Хроматинът допълнително кондензира, докато се разпадне вътре в клетка с неповътната мембрана, характеристика, описана като кариорексис [Manjō G, 2005]. Плазмената мембрана е неповътната през целия процес. В по-късния етап на апоптозата някои от морфологичните характеристики включват образуване на мехурчета в мембраната, ултраструктурна модификация на цитоплазмените органели и загуба на целостта на мембраната. Обикновено фагоцитните клетки поглъщат апоптотични клетки, преди да се появят апоптотични тела. Това е причината апоптозата да бъде открита много късно в историята на клетъчната биология през 1972 г. и апоптотичните тела се наблюдават *in vitro* при специални условия. Ако остатъците от апоптотичните клетки не са фагоцитирани, както в случая при среда за култивирана клетъчна култура, те ще претърпят разграждане, което наподобява некроза и състоянието се нарича вторична некроза.

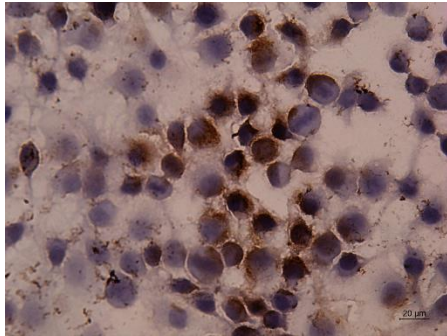
При индуцирана с цитостатик (cisplatin) апоптотична клетъчна смърт при туморни клетъчни линии от колоректален карцином при човек (HT29), цервикален аденокарцином при човек (HeLa) и трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с Rous sarcoma virus (RST) типичните за апоптотичаната клетъчна смърт цитоморфологични промени се визуализират както при флуоресцентна микроскопия с двойно флуорохромиране с

акридиноранж-пропидиев йодид, така и при рутинно цитологично оцветяване с хематоксилин&еозин. Не беше открита обаче експресия на лиганда на рецептора на програмираната клетъчна смърт PD-L1. (Фигура 40-Б).

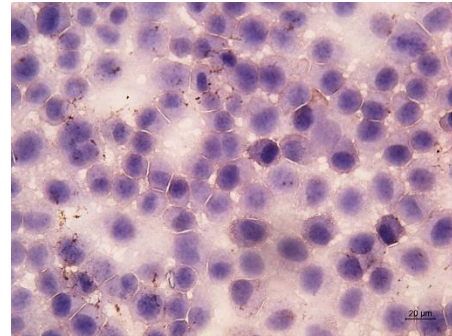
В литературни източници също се съобщава, че преобладаващата част от *in vitro* култивираните туморни линии от човешки и миши произход са PD-L1-отрицателни на клетъчната повърхност, докато експресията на PD-L1 много интензивна в проби, които са прясно изолирани от тумори на пациенти [Saito Y., 2022]. Това несъответствие се обяснява с констатацията, че е необходимо наличието IFN- γ за да се предизвика и стимулира експресията на PD-L1 върху клетъчната повърхност както при нормалните тъкани, така и в различни туморни линии.



Фигура 36-А. Апоптотични промени при туморни клетки, третирани с цисплатина. Двойно флуорохромиране с акридиноранж/пропидиев йодид.

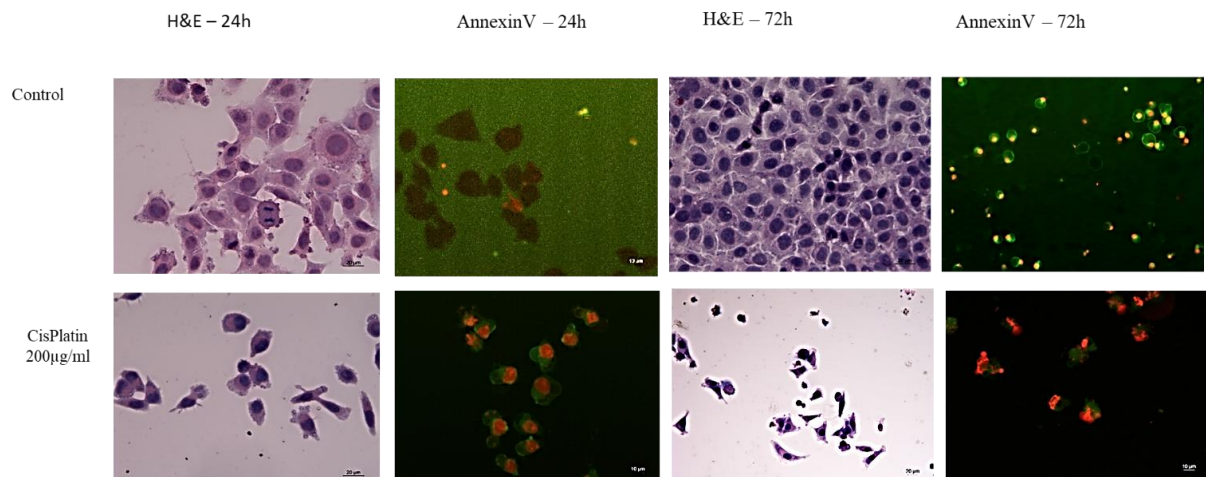


Апоптотични промени след третиране с цисплатина – положителна реакция с AnnexinV, DAB хромоген.



Апоптотични промени след третиране с цисплатина – негативна реакция с PD-L1, DAB хромоген.

Фигура 36-Б. Апоптотични промени при туморни клетки, третирани с цисплатина-имунохистохимична реакция с моноклонални антитела.



Фигура 36-В. Апоптотични промени при клетки от линия HeLa, третирани с цитотатици. Оцветяване с H&E и флуоресцентно имуноцитохимично оцветяване с AnnexinV.

IV.1.10. Изолиране на ДНК от FFPE туморни тъкани

Формалин-фиксираният и пропит с парафин тъканен материал представлява предизвикателство не само за самия метод за екстракция на ДНК, но и за определянето на качеството и количеството на ДНК. Като цяло добивът на ДНК от FFPE проби варира значително в зависимост от вида на тъканта, както и от условията на фиксиране и вграждане. Освен това, поради компрометирания статус на ДНК, определянето на добива може да варира между различните методи за количествено определяне. Докато измерванията, базирани на UV-Vis показват високи абсорбции при A260, особено за ДНК от проби със силна фрагментация, флуорометричните методики, използващи багрила, специфични за dsDNA (напр. Qubit), могат да покажат значително по-ниска концентрация на ДНК.

Таблица 3. Концентрация, чистота и количество на изолираната ДНК от парафинови срези от уротелни карциноми на пикочния мехур.

Проба ID	Концентрация ДНК (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230	Обем/ μ l
1UC	111.2	1.7	2.0	50
2UC	89.5	1.8	2.0	50
3UC	124.7	1.8	2.2	50
4UC	158.2	1.7	2.1	50
5UC	98.3	1.7	2.1	50
6UC	100.5	1.8	2.0	50
7UC	107,5	1.7	2.2	50
8UC	132.6	1.7	2.0	50
9UC	142.0	1.8	2.0	50
10UC	95.2	1.8	2.2	50
11UC	107.2	1.7	2.1	50
12UC	200.0	1.7	2.1	50
13UC	156.0	1.8	2.0	50
14UC	99.8	1.7	2.2	50
15UC	105.4	1.7	2.0	50
16UC	256.0	1.8	2.0	50
17UC	198.2	1.8	2.2	50
18UC	162.1	1.7	2.1	50
19UC	142.1	1.7	2.1	50
20UC	132.5	1.8	2.0	50
21UC	265.2	1.7	2.2	50
22UC	231.0	1.7	2.0	50
23UC	99.0	1.8	2.0	50
24UC	102.0	1.8	2.2	50
25UC	136.5	1.7	2.1	50
26UC	123.6	1.7	2.1	50
27UC	165.1	1.8	2.0	50
28UC	178.2	1.7	2.2	50
29UC	200.0	1.8	2.0	50
30UC	152.3	1.7	2.2	50

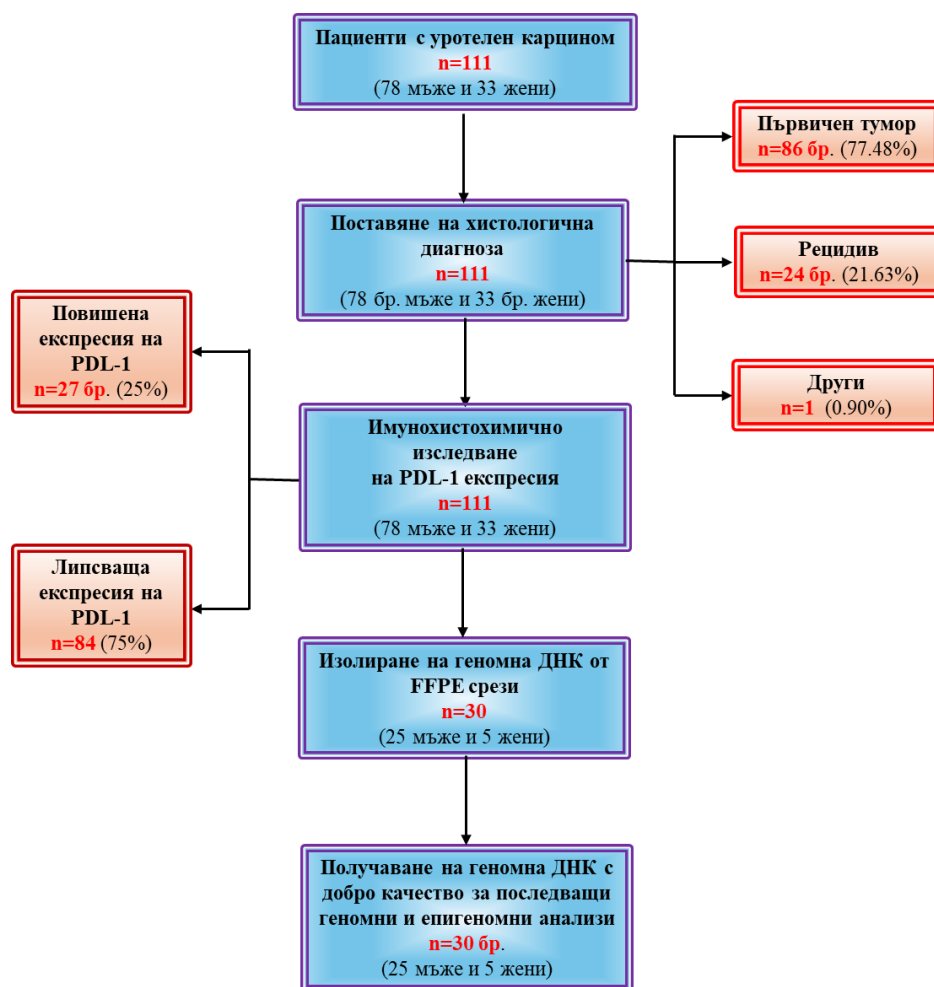
Изолираните ДНКи от събраните проби на пациенти с уротелен карцином на пикочния мехур бяха подготвени за провеждане на цялостно екзомно (WES) и/или геномно (WGS) секвениране при бъдещи проучвания в тази област. Изключително информативно би било извършването на анализ на целия транскриптом от предварително изолирана обща мРНК на пациенти с диагностициран карцином. Друг вид анализ, който би могъл да се извърши на база на събраните образци, е изследване на метилирането на ДНК в целия геном посредством метилационен микрочип, обхващащ повече от стотици хиляди CpGs острови в генома, след задължителна бисулфитна обработка на геномната ДНК. Успешното изпълнение на всички гореизброени анализи ще разшири познанията ни в областта на генетиката и епигенетиката на уротелния карцином при българската

популация, ще подобри разбирането за риска от развитие на канцерогенеза и за това как най-добре да се прилага генетичната оценка на риска в общата популация. Ранното откриване на неинвазивните карциномите още преди началото на субепителна инфилтрация е основа за подобряване качеството на живот и преживяемостта при пациентите.

V. ОБОБЩЕНИЕ

Карциномът на пикочния мехур е един от често срещаните злокачествени тумори, засягащ най-често възрастта след шестдесет години (със зачестяване на случаите около 50 годишна възраст), преимуществено - мъжкия пол. Много често след отстраняване на първичния тумор (6-12 месеца) се развива туморен рецидив, който е мултифокален, с пониска диференциация и инфилтриращ в по-голяма дълбочина мускулните слоеве. Последващите операции водят до силно влошаване на качеството на живот на пациентите. Това налага търсенето на по-успешни терапевтични подходи, включително имунотерапия и съответни клинично-патологични методи за оценка на тяхната ефективност. Тук влиза в съображение експресията на трансмембрания протеин на програмираната клетъчна смърт PD-1, неговият лиганд PD-L1 и ролята им в избягването на антитуморния имуен отговор.

Пациентите с метастатичен уротелен карцином на пикочния мехур обикновено имат лоша прогноза; периперативната химиотерапия на базата на цисплатин може да допринесе за отговор от 50% и да удължи преживяемостта. Въпреки това, извършеният от Tsao и колектив мета-анализ, повдига сериозно съмнение относно прогностичната стойност на експресията на PD-L1 в прогнозата и отговора за адювантна химиотерапия в ранен стадий на недребноклетъчен рак на белия дроб (NSCLC). Те посочват, че статусът на PD-L1 не показва нито прогностична, нито предиктивна стойност на ползите от адювантна химиотерапия при пациенти с частична пневмонектомия [*Galsky, 2020*]. Следователно остава спорно дали PD-L1 може да служи като ценен биомаркер при пациенти с уротелен карцином с адювантна химиотерапия.



Фигура 37. Обобщени резултати

Терапията с блокиране на имунната контролна точка стимулира противотуморния имуен отговор с помощта на PD-1/PD-L1 антитела и причинява драматични ефекти при някои видове рак, като злокачествен меланом и недребноклетъчен рак на белия дроб (NSCLC). Антителата теоретично предотвратяват имунния толеранс чрез блокиране на свързването на PD-1 в CD8+ Т клетките и PD-L1 в туморните клетки. Поради това се предполага, че експресията на PD-L1 в туморните клетки предсказва терапевтичния ефект от лечението с PD-1/PD-L1 антитяло. Съгласно тази концепция, хистологичната оценка на PD-L1+ туморни клетки, извършена имунохистохимично се определя като първа придружаваща диагностика за прилагане на инхибитори на имунните контролни точки [Plimack E.]. Тъй като терапевтичният механизъм на PD-1/PD-L1 антителатата е да инхибират инактивирането на Т-лимфоцитите, преди да се оцени експресията на PD-L1 в туморните клетки трябва да се оцени Т-клетъчната инфилтрация в туморните тъкани. Не е изяснена ефикасността на терапевтичните антителата както при случаите с висока експресия на PD-L1 без Т-лимфоцитна инфилтрация и при случаи с ниска експресия на PD-

L1 при интензивна T-клетъчна инфилтрация. Първоначално е прието разбирането, че терапевтичният механизъм на инхибиторите на имунни контролни точки не зависи от първичната локализация на тумора и хистологичния тип и приложението им бързо се разширява при тумори с различна хистогенеза с определяне експресията на PD-L1 като първи придружаващ диагностичен метод. Въпреки това, граничната стойност на тази експресия е много различна например при плоскоклетъчен карцином на главата и шията или карцином на хранопровода и е много по-ниска от тази за недребноклетъчен карцином на белия дроб (NSCLC). Освен това няма значими доказателства относно граничната стойност на първия придружаващ диагностичен маркер при уротелен карцином, бъбречноклетъчен карцином (RCC) и карцином на стомаха. [Powles T, 2020; Shitara K, 2020].

Като предиктивен маркер за отговор на терапия с инхибитори на контролните имунни точки експресията на PD-L1 сама по себе си е противоречива. Петте одобрени за лечение при карцином на пикочния мехур инхибитори на имунни контролни точки изискват четири различни диагностични платформи за измерване на експресията на PD-L1 чрез имунохистохимично изследване. Анализът с платформата SP142 измерва имунните клетки с висока граница на експресия от $\geq 5\%$ във фаза II проучване, изследващо атезолизумаб при пациенти след лечение с платина. Алтернативно, анти-PD-L1 антитяло чрез ИНС оцветяване с гранична стойност от $\geq 1\%$ в туморни клетки за включване в терапията, а като биомаркер за отговор се отчита както в туморните, така и имунните клетки. Трябва да се отбележи, че клиничните изпитвания на пембролизумаб при карцином на пикочния мехур използват различни методи за интерпретация на експресията на PD-L1. Проучването с durvalumab измерва експресията на PD-L1 с помощта на ИНС, с анализ VENTANA SP263 (Roche, Tuscon, AZ), отчитащ както туморни, така и имунни клетки. Ролята на PD-L1 е несигурна поради вариациите в използваните анализи и критериите за положителен изразяване с различна чувствителност. Експресията на PD-L1 е хетерогенна в тумора и показва различия между първичния тумор и метастазите. Необходимо е да се включат и други потенциални кандидат-биомаркери – например измерване на мутационния товар на тумора и определяне на геномни подтипове. Мутационният товар е важен биомаркер за оценка на отговора на имунотерапията при пациенти с напреднал КПМ [Samstein R., 2019; Bellmunt, J., 2020]. Rosenberg et al. (2024) измерват мутационния товар при пациенти, включени в проучването за прилагане на атезолизумаб след терапия с платина и установяват, че мутационният товар е значително повишен при пациентите с положителен терапевтичен отговор. Инхибиторът пембролизумаб е одобрен като терапевтична опция при солидни тумори с TMB ≥ 10 мутации/Мб без задоволителни алтернативи за лечение [FDA, 2020]. При пациентите, чиито

тумори са имали мутационен товар $\geq 16/\text{MB}$ е установена значително по-дълга преживяемост в сравнение с тези, чиито тумори са имали мутационни товари $< 16/\text{MB}$. Туморният мутационен товар не корелира с експресията на PD-L1, но комбинираното им съвместно отчитане може да бъде по-ефикасно при прогнозиране на отговора към инхибиторри на контролните имунни точки [Galsky M., 2020]. Това подчертана необходимостта от по-задълбочен анализ на индивидуалната геномна информация, персонализираните маркери при насочване на анти-PD/PD-L1 терапия самостоятелно или с други показатели са от решаващо значение за постигане на клинични резултати от такива терапии и трябва да се постигне яснота по отношение на тези ключови въпроси. Подобно на върха на айсберга, PD-1/PD-L1 блокадната антитуморна имунотерапия отваря нова ера в лечението на малигнените неоплазми, но с необходимото допълнително проучване на безопасността и ефективността ѝ. Тъй като PD-1/PD-L1 антителата са скъпоструваща терапия и са ефективни само при част от пациентите, от медицинска и икономическа гледна точка е важно да се прилага сигурен и точен придружаващ диагностичен критерий, който може цялостно да отчете имунологичните взаимодействия между тумора и организма на пациента, включително инфилтриращите тумора имунни клетки. Това затвърждава значението на задълбочената патоморфологична оценка на туморите като основа на на успешна персонализираната лечебна стратегия.

VI. ИЗВОДИ

1. Обобщените клиничко-морфологични резултати при изследваните уротелни карциноми на пикочния мехур показват преобладаване на пациенти от мъжки пол (70,23%), средна възраст 67 години (7-ма декада), възрастовият интервал е 53 – 85 години
2. Сред изследваните туморни проби преобладават умерено диференцираните уротелни карциноми с дълбока инвазия на субепителната съединително-тъканна пластина и собствената мускулна пластина *Lamina muscularis propria* – pT1, G2.
60% от уротелните карциноми на пикочния мехур са диагностицирани в Стадий I.
3. Имунохистохимично се установи експресия на PD-L1 в не повече от 25 % от туморите.
4. Високи нива на експресия на PD-L1 се отчитат предимно при нискодиференцираните уротелни карциноми, при метастатични лимфни възли и най-отчетливо при остеолитични костни метастази.
5. При индуцирана с цитостатик (cisplatin) апоптотична клетъчна смърт при туморни клетъчни линии от колоректален карцином при човек (HT29), цервикален аденокарцином при човек (HeLa) и трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с Rous sarcoma virus (RST) не се открива експресия на лиганда на рецептора на програмираната клетъчна смърт PD-L1.
6. Определянето на статуса на PD-L1 е от съществено значение преди да се пристъпи към имунотерапия с инхибитори на имунните контролни точки, но идентифицирането на пациентите, които биха имали полза от нея може да стане само при вземане под внимание и на други хистологични характеристики – наличие на тумор-инфилтриращи лимфоцити (TILs), CD8+ Т-лимфоцити, тумор-асоциирани макрофаги (TAMs) и др., както и формиране на метастатични огнища.
7. За прецизно определяне на индивидуалната полза за всеки конкретен пациент от въвеждащите се нови имунотерапевтични и таргетни лечебни стратегии е необходимо прилагане на молекулярно-биологични и генетични диагностични методи, надграждащи утвърдените морфологични и имунохистохимични биомаркери.

VII. ПРИНОСИ

С оригинален характер:

1. Създадена е колекция от туморни тъкани от 110 уротелни карцинома на пикочния мехур с различна степен на диференциация и дълбочина на инфилтративен растеж в мускулните слоеве, метастатични лимфни възли и костни метастази.
2. Получени са статистически данни за разпределението по възраст, пол, степен на диференциация (G), степен на туморна инвазия (T) и стадий на заболяването на първичните и рецидивиралите карциноми на пикочния мехур, диагностицирани в Отделението по клинична патология за периода 2016-2020 година

С потвърдителен характер:

1. Потвърден е огнищният характер на експресията на PD-L1 в туморната компонента и инфилтриращите имунни клетки.
2. Потвърдена е висока експресия на PD-L1 при ниско диференцирани уротелни карциноми.
3. Потвърдена е висока експресия на PD-L1 при метастатични лимфни възли и далечни (костни и мекотъканни) метастази.

С приложен характер:

От стратифицираните според степента на диференциация, стадий и дълбочина на инфилтрацията туморни тъкани от уротелни карциноми на пикочния мехур са екстрахирани ДНК, които са готови за провеждане на цялостно екзомно и геномно секвениране на ДНК при бъдещи проучвания в тази област.

VIII. СПИСЪК С НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Росен Спасов**, Здравка Петрова, Радостина Александрова PD-L1 като предиктивен и прогностичен маркер. Сборник с резюмета и публикации от 14-та Работна среща „Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти“, 2-4 декември 2019 г., София, България
2. Daniela C. Culita, Lora Dyakova, Gabriela Marinescu, Tanya Zhivkova, Milena Georgieva, Bela Vasileva, **Rossen Spasov**, George Miloshev, Reni Kalfin, Melita Vidakovic, Ovidiu Oprea, Radostina Alexandrova. SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CYTOTOXICITY EVALUATION OF Ni(II), Cu(II) AND Zn(II) COMPLEXES WITH DEOXYCHOLATE LIGAND, FARMACIA, 2021, Vol. 69, 3 <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.3.7>

Q2 - 20 точки

3. Zhivkova, T., Marinescu, G., Dyakova, L., Culita, D-C., **Spasov, R.**, Mitrenga, P., Patron, L., Alexandrova, R. Zn(II)/Au(I) and Zn(II)/Ag(I) complexes with Salen Schiff base express promising cytotoxic activity in human cancer cells. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 12, 1, 2019, ISSN:0974-2441 (print); 2455-3891 (online), DOI:10.22159/ajpcr2019.v12i1.28403, 458-464. SJR (Scopus):0.167

Q4-12 точки

IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

R. Spasov, Z. Petrova. SIGNIFICANCE OF PD-L1 EXPRESSION IN DETERMINING UROTHELIAL CARCINOMA THERAPY.

VIII National Conference with International Participation “Morphological Days”, Sofia, 2022, Abstract book p.109.

Р. Спасов, З. Петрова. ЕКСПРЕСИЯ НА PD-L1 ПРИ КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР. XIII Национален конгрес по патология, Бургас, 10-12 септември 2021 г. Сборник с резюмета, стр.73.

Росен Спасов, Здравка Петрова, Радостина Александрова. PD-L1 като предиктивен и прогностичен маркер. Сборник с резюмета и публикации от 14-та Работна среща „Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти“, 2-4 декември 2019 г., София, България