

**МАРКЕРИ ЗА НЕОПЛАСТИЧНА ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ЧЕРВОТО**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на научно-образователна степен „Доктор” на
д-р Любен Митков Милачков

Научна специалност - Гастроентерология

Научен ръководител
проф. д-р Росен Кирилов Николов, дмн

София, 2016

Дисертационният труд е написан на 118 печатни страници, онагледени с 44таблици, 1 фигура и 13снимки. Библиографията съдържа 127 заглавия, от които 1 на кирилица и 126 на латиница.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 3 публикации и 6 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра по вътрешни болести- Медицински университет- София на 01.03.2016г. и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

1. Проф. д-р Росен Кирилов Николов, дмн- научен ръководител, вътрешен член, Катедра по вътрешни болести, МФ, МУ, София
2. Доц. д-р. Ваня Александрова Герова- вътрешен член, Клиничен център по гастроентерология, МФ, МУ- София
3. Проф. д-р Захарий Александров Кръстев, дмн- външен член за МУ, София
4. Проф. д-р Симеон Георгиев Стойнов, дмн- външен член за МУ- София
5. Проф. д-р Димитър Василев Таков, дмн- външен член за МУ- София

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по вътрешни болести.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 26.09.2016г. от 13:00 часа вАулата на УМБАЛ ”Св. Иван Рилски” ЕАД-гр. София, бул. Акад. Иван Гешов 15.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	4 стр.
Въведение.....	6 стр.
Цел и задачи.....	8стр.
Материал и методи.....	10 стр.
Резултати	16 стр.
Част 1. Колоректален карцином.....	16 стр.
Част 2. Дебелочревни полипи.....	29 стр.
Част 3. Хронични възпалителни чревни заболявания.....	57 стр.
Обсъждане.....	69стр.
Изводи.....	77 стр.
Приноси.....	79 стр.
Публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд.....	80 стр.

I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

ФАП- фамилна аденоматозна полипоза

КРК- колоректален карцином

НСПВС- нестероидни противовъзпалителни средства

На латиница:

CD- Crohn's disease

CEA- carcinoembryonic antigen

CECs- colonic epithelial cells

COX-2- cyclooxygenase-2

CRC- colorectal cancer

CRP- c-reactive protein

HGB- hemoglobin

IBD- inflammatory bowel disease

IC- inflammation cell

IGF-1R- insulin like growth factor-1-receptor

iNOS- inducible nitric oxide synthase

NF- κ B- nuclear factor- κ B

NO- nitric oxide

M2-PK- piruvate kinase

UC- ulcerative colitis

II. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години се търсят активно да се изследват маркери които да подсказат трансформацията на дадено преканцерозно състояние в карцином. В клиничната практика от години насам са въведени, оценявани и утвърдени маркери които се изследват в кръвта и фекалите които приемаме по- скоро като маркери за проследяване на дадено установено вече туморно заболяване на червото и чрез тях оценяваме ефекта от проведеното до момента лечение отколкото като диагностична стойност. Такива са туморни маркери- карциноембрионалния антиген (СЕА) и пируват киназа (M2-РК).

До момента слабо са проучени по света и у нас маркери които се експресират в самата тъкан на основното заболяване и са израз на малигнена трансформация на група клетки. Съществуват няколко студии по света за маркерите индуцираният нитритен оксид, инсулин разстежен факторен рецептор-1 и циклооксигеназа 2, но данни все още са недостатъчни. Тези наричани от много автори онкогени сигнални молекули освен че биват експресирани в различна степен в преканцерозни заболявания на дебелото черво (полипи с различна степен на епителна дисплазия, възпалителни чревни заболявания –ВЧЗ) както и в карциноми на дебелото черво вземат активно участие в патогенезата на болестта и в процеса на малигнизация.

В България слабо са проучени споменатите по-горе имунохистохимични маркери вероятно поради трудностите в техническото им разработване в биопсичния материал както и високата им финансовата стойност.

През последните години се наблюдава значително увеличение на заболяемостта от дебелочревен рак сред населението предимно в развитите страни. Понастоящем се приема, че в по-голяма част от случаите колоректалният карцином (КРК) се развива на базата на предшестващи дебелочревни полипи както и на базата на възпалителни чревни заболявания - болестта на Крон и улцерозния колит.

Ранното разкриване на маркери за чревна неопластична трансформация е важно за ранната диагноза, лечение и удължаване на преживяемостта.

Въпреки множеството изследвания, все още остават нерешени редица клинично значими въпроси, както при българските пациенти, така и в останалия свят.

Липсват предсказващи маркери за неопластична трансформация при преканцерозни състояния на дебелото черво в Българската популация.

IV. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цели

Целите на настоящата работа включват:

- 1) Да се оцени едновременната тъканна експресия на сигналните онкогенни сигнализиращи маркери при различни увреждания на дебелочревната лигавица- възпаление, пролиферация, дисплазия и неоплазия.

За изпълнение на горепосочените цели си поставихме следните задачи:

2. Задачи:

Задача 1: да се оцени имунохистохимичната експресия на IGF-IR, COX-2 и iNOS при колоректалния карцином, при различни дебелочревни полипи-аденоми с различна степен на епителна дисплазия и при възпалителните чревни заболявания- болестта на Крон (БК) и улцерозния колит (УК).

Задача 2: да се определи връзката между степента на имунохистохимичната експресия на IGF-IR, COX-2, iNOS и хистологичното естество/стадий на дебелочревните полипи.

Задача 3: да се определи връзката между степента на имунохистохимичната експресия на IGF-IR, COX-2, iNOS и хистологичната възпалителната активност както и клиничния стадий на заболяването при болестта на Крон и улцерозния колит.

Задача 4: да се дефинира ролята на IGF-IR, COX-2 и iNOS в канцерогенезата на КРК чрез оценка експресията им в преканцерозни дебелочревни полипи и колоректални карциноми и се сравни експресията с тази при здрави пациенти.

Задача 5: да се определи връзката между експресията на изследваните онкогенни маркери и избрани патологични и клинични характеристики на полипите.

V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изследвани лица

В това ретроспективно проучването участваха общо 97 пациента чийто дебелочревни биопсии бяха изети в клиниката по Гастроентерология на Университетската Болница ‘‘Св. Иван Рилски’’ София през 2012-2014 година.

Проучването бе съставено от 48 (49%) мъжеи49 (51%) жени като средната възраст бе 56 ± 17 (18-84) години. 52 (54%)от анализираниите пациенти са на възраст <60 години, останалите 45 (46%) са на възраст ≥ 60 г. Тези 97 пациента бяха разделени според болестта им както следва: 28 (29%) пациента с колоректален карцином, 10 (10%) пациента с полипи на дебелото черво с хистологична характеристика на тежкостепенна епителна дисплазия, 10 (10%) пациента с полипи на дебелото черво с хистологична характеристика на нискостепенна епителна дисплазия, 10 (10%) пациента с хиперпластичен полип на дебелото черво и един пациент със сератен полип.Бяха включени още 18 (19%) пациента с възпалителни чревни заболявания на дебелото черво (ВЧЗ)- 9 (9%) с болест на Крон (БК) като 5 от тях бяха с висока клинична, ендоскопска и хистологична активност на болестта и 4в клинична, ендоскопска и хистологична ремисия. От улцерозните колити (УК), 5 пациента бяха с висока клинична и ендоскопска активност докато 4 в клинична, ендоскопска и хистологична ремисия на

заболяването. Здравите контролни пациенти- общо 20 (21%) бяха без ендоскопски и хистологични изменения в дебелото черво.

I група- пациенти с дебелочревни полипи с различа степен на епителна дисплазия: 10 пациента с полипи на дебелото черво с хистологична характеристика на тежкостепенна дисплазия, 10 пациента с полипи на дебелото черво с хистологична характеристика на нискостепенна епителна дисплазия, 10 пациента с хиперпластичен полип на дебелото черво и един пациент със сератен полип.

II група- пациенти с възпалителни чревни заболявания- болест на Крон и улцерозен колит: 18 пациента. 9 (50%) от тях с болест на Крон и 9 (50%) с хроничен улцерозен колит. Средната възраст на групата е 35,5 години (18-74).

III група- пациенти с колоректален карцином- 28 пациента

IV група- контролни здрави лица- 20 пациента

2. Използвани методи

Архивен материал от парафинови блокчета от ендоскопските биопсии от дебелото черво на пациенти от по-горните групи бе анализирано с методите на имунохистохимията чрез стандартен авидин- биотин имунопероксидазен

метод (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) бе използван за оценка на IGF-1R, COX-2 и iNOS експресията.

2.1 Имунохистохимичен анализ

2.1.1 Оцветяване за iNOS, COX-2, IGF-1R

Таблица 1: имунохистохимичен метод

Протеин	Блокче- срез	Антигенно възстановяване	Първично анти тяло
COX-2	Парафин	2x15мин на 98qC в 1mM EDTA; pH8.0	Миши моноклоналнов 1:50 BDТрансдукция;
iNOS	Парафин	2x15мин на 98qC в 1mM EDTA; pH8.0	Миши моноклоналнов 1:50 BDТрансдукция;
IGF-1R	Парафин	2x15мин на 98qC в 1mM EDTA; pH8.0	Миши моноклоналнов 1:50 BDТрансдукция;

Във всички случая, материалите бяха изети съответно от основната туморна маса, от основната полипна маса както и в областите с активност (ако е налице такава) при материалите с възпалителните чревни заболявания (БК и УК).

Биопсичните материали бяха фиксирани в неутрален, буфериран формалин и обработени за стандартно хистологично изследване. 4µм секции от формалин-фиксираните, включени в парафин материали бяха подложени на

антигенно възстановяване в автоматизирана система PT-Link (DAKO) в цитратен буфер (10 ммол/л, рН 9) за IGF-1R, COX-2 и iNOS. В следващите стъпки бе използван протокол за мануална работа, предложен от производителя при максимална адхерентност и модификации. Ендогенната пероксидазна активност се блокира чрез инкубиране на секциите в 3% разтвор на водороден пероксид в метанол в продължение на 5 минути. След това стъклата се промиват 3 пъти във фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS) и се инкубират в нормален серум в продължение на 5 минути, за да се намали неспецифичното свързване на антитяло. След промиване с PBS, слайдовете се инкубират в продължение на 30 минути при стайна температура с антитяло (Anti-IGF-1R, anti COX-2, anti-iNOS, β subunit, C-terminal clone CT-3), всички произведени от Santa Cruz Biotechnology при предварително разреждане на лиофилизатите до работни концентрации, съгласно инструкциите на производителя. Комплексът антиген-антитяло се визуализира чрез DAB хромоген (3,3'-diaminobenzidine, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) за IGF-1R, COX-2 и iNOS. След изплакване с дестилирана вода, срезове бяха контраоцветени с хематоксилин и след обезводняване с алкохол серия от увеличаване на концентрацията на секции се монтираха в подходяща включваща среда.

2.1.2 Точкуване

Светлинен микроскоп бе използван за преценка на имунохистохимичните реакции при анализиранияте случаи. Имунохистохимичната оценка бе направена от сертифициран и опитен патолог.

Експресията на IGF-IR, COX-2 и iNOS беше анализирана в 10 различни зрителни полета, в които се определя средният процент на имунохистохимично положителни ракови клетки *при колоректалния карциноми* диспластични *при дебелочревните полипи* (положителна, когато е > 16% от карциномни клетки бяха IGF-IR и COX-2-положителни; отрицателна, когато не е имало реакция или ≤10% от клетките са позитивни).

Оценката на iNOS бе категоризирана в три степени на експресия: ниска степен (0-20% положителни клетки), средна степен (21-70% положителни клетки) и висока степен (>70% от клетките положителни).

По същата скала бяха оценени и *здравите контроли*.

При ВЧЗ, хистологичната активност на болестта беше оценена на базата на наличието или липсата на неутрофили (както в криптите така и в ламина проприя); липсата или не на базалните плазмени клетки и липсата или не на плазмените клетки и еозинофили в ламина проприя.

Подобно, експресията на IGF-IR и COX-2 бе анализирана в 10 различни зрителни полета, в които се определя средният процент на имунохистохимично положителни възпалени клетки (положителна реакция когато > 16% от възпалените клетки са IGF-IR и COX-2-положителни, отрицателна реакция когато няма експресия или та бива ≤10% от положителни клетки).

Оценката на iNOS бе категоризирана също в три степени на експресия: ниска степен (0-20% положителни клетки), средна степен (21-70% положителни клетки) и висока степен (>70% от клетките положителни).

2.1.3 Статистическа обработка

Описателни статистически методи бяха използвани като Pearson, Kendall и Spearman корелационни анализис цел да се направи оценка на връзката между експресията на онкогенни сигнални маркери (IGF-IR, COX-2 и iNOS) и степента на епителна дисплазия при полипи на дебелото черво, степента на клиничната и хистологичната активност на болестта на Крон и улцерозния колит както и спрямо наличието на туморните клетки при пациенти с КРК. Също анализирахме и оценихме експресията на IGF-IR, COX-2 и iNOS спрямо локализацията на заболяването, тежестта ѝ и лечението на изследваните пациенти в момента на вземането на биопсичния материал.

VI. РЕЗУЛТАТИ

ЧАСТ 1. Колоректален карцином (КРК)

1. Аналитична статистика

Пациентите със карцином на дебелото черво бяха описани според локализацията на болестта в (таблица 1):

Таблица 1а: характеристика на пациентите с колоректален карцином

<i>Пациенти с колоректрален карцином (КРК)</i>	<i>n=28</i>
<i>Характеристики</i>	<i>Стойности</i>
Средна възраст	64,3 ± 9,9 (50-84) Med = 63,5
Локализация на тумора:	
- сигма	n=11(39%)
- колон асценденс	n=6 (21%)
- цекум	n=4 (14%)
- ректум	n=3 (11%)
- колон десценденс	n=3 (11%)
- колон трансверзум	n=1 (4%)
Пол:	
- мъже	n= 11 (39%)
- жени	n= 17 (61%)

Таблица 1b: характеристика на пациентите с колоректален карцином

<p>Тютюнопушене</p> <p>Общ брой пациенти</p> <p>- мъже</p> <p>- жени</p>	<p>n=11 (39%)</p> <p>n=6</p> <p>n=5</p>
<p>Фамилна обремененост за карцином на дебелото черво¹</p> <p>Общ брой пациенти</p> <p>- мъже</p> <p>- жени</p>	<p>n=4 (14%)</p> <p>n=2</p> <p>n=2</p>
<p>Фамилна обремененост за друг карцином</p> <p>Общ брой пациенти</p> <p>- мъже</p> <p>- жени</p>	<p>n=7 (25%)</p> <p>n=2</p> <p>n=5</p>
<p>Ректорагия</p> <p>Общ брой пациенти</p> <p>- мъже</p> <p>- жени</p>	<p>n=12 (43%)</p> <p>n=2</p> <p>n=10</p>
<p>Хистологичен вид на КРК</p> <p>- аденокарцином</p> <p>- муцинозен аденокарцином</p>	<p>n=27 (96%)</p> <p>n=1 (4%)</p>

Таблица 1с: характеристика на пациентите с колоректален карцином

Наличието на метастази с колоректален произход в:	
- черен дроб	n=8
- бял дроб	n=1
- няма	n=20

¹ Роднини от първа линия с КРК.

От групата на пациенти с наличие на *колоректален карцином*, средната възраст сред групата беше $64 \pm 9,9$ (50-84), като най-честата локализация на процеса на туморния процес беше в сигмата (39%). В преобладаващата част от случаите, пациентите с КРК бяха непущачи (61%) и само 4 от общо 28 пациента бяха с роднина от първа линия с наличие на КРК. Всички туморни лезии бяха хистологично верифицирани. 27 от изследваните биопсии бяха с хистологична характеристика на аденокарциноми (96%) и един муцинозен аденокарцином (4%). При 8 от анализиранияте пациенти се установиха метастази в черния дроб свързани с основното заболяване, 1 от пациентите с КРК имаше вторични лезии в белите дробове докато при останалата част от пациентите основното заболяване беше локално ограничено, без наличието на метастази.

Таблица 2: клиничко-лабораторна характеристика на изследваните пациенти с КРК

	Брой пациенти	x	Sx	Med	Min	Max
Хемоглобин*	28	123,5	19,9	124	82	163
Желязо*	18	9,2	7,9	6	3	36
ЖСК*	17	66,3	14,8	64	40	98
СЕА*	23	53,0	182,1	3	1	881
СА 19-9*	20	34,1	61,3	6	2	229

*средни стойности, стандартно отклонение, медиана, минимум и максимум на хемоглобин (g/L), желязо ($\mu\text{mol/l}$), ЖСК ($\mu\text{mol/l}$), СЕА ($\mu\text{g/l}$), СА 19-9 (U/ml)

Общо пациентите с КРК бяха 28. При 25 (89%) пациента се отчете положителна реакция към IGF-IR и при 3 (11%) негативна такава. От групата на изследваните мъже, IGF-IR имунореактивно-позитивни бяха 8 мъже срещу 3 имунореактивно-негативни. В групата на жените, всички бяха с IGF-IR-позитивна експресия.

Сред анализиранията група от **IGF-IR имунореактивно-позитивни мъже** средната възраст на последните е $62,9 \pm 12,3$ (50-83) (таблица 3).

Таблица 3: характеристика на IGF-IR имунореактивно-позитивни мъже с КРК

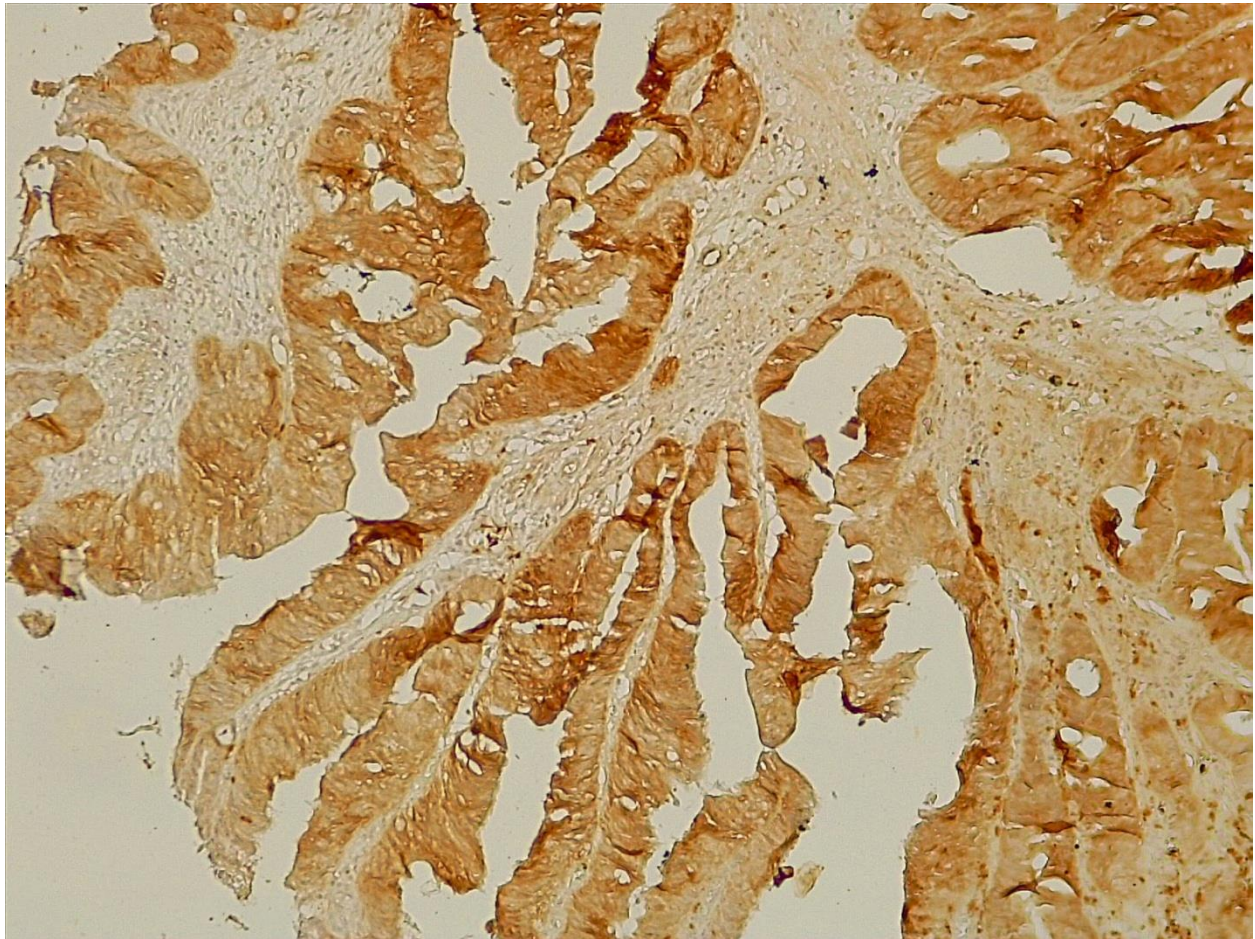
IGF-IR имунореактивно-позитивни мъже (експресия на IGF-IR > 16%)	n=8
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$62,9 \pm 12,3$ (50-83)
-метастази	n=3
-ректорагия	n= 1
-нарушен ритъм на дефекация	n= 4
-стеноза на лумена	n= 3
-контактно кървене	n= 3
-спонтанно кървене	n= 2
-пушачи	n= 3

Сред анализираната група от **IGF-IR имунореактивно-позитивни жени** средната възраст на последните е $64,3 \pm 8,6$ (54-84) (**таблица 4**).

Таблица 4: характеристика на IGF-IR имунореактивно-позитивни жени с KRK

IGF-IR имунореактивно-позитивни жени (експресия на IGF-IR > 16%)	n= 17
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$64,3 \pm 8,6$ (54-84)
-метастази	n= 3
-ректорагия	n= 10
-нарушен ритъм на дефекация	n= 9
-стеноза на лумена	n= 10
-контактно кървене	n= 8
- спонтанно кървене	n= 6
- пушачи	n= 5

Снимка 1: силно- положителна експресия на *IGF-1R* в туморните клетки при пациент с КРК



При сравнение на двете групи пациенти *IGF-1R* имунореактивно-позитивни мъже и жени с наличие на КРК, ректорагията като клиничен симптом е по-честа при жени (n=10) в сравнение с мъжете (n=1). От ендоскопската находка, при жените туморния процес се извява по-често като стенозиращ процес (n=10) в сравнение с мъжете (n=3) (таблица 3 и 4).

Сред анализираната група от **IGF-IR имунореактивно-негативни мъже** средната възраст на последните е $59,7 \pm 7,4$ (54-68) (таблица 5).

Таблица 5: характеристика на IGF-IR имунореактивно-негативни мъжес KKK

IGF-IR имунореактивно-негативни мъже (експресия на IGF-IR $\leq 10\%$)	n= 3
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$59,7 \pm 7,4$ (54-68)
-метастази	n=2
-ректорагия	n=1
-нарушен ритъм на дефекация	n=2
-стеноза на лумена	n=3
-контактно кървене	n= 0
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 3

Не се наблюдаваха **IGF-IR имунореактивно-негативни жени** сред анализиранията група пациенти с КРК.

Сред анализиранията група от **COX-2 имунореактивно-позитивни пациенти с КРК** средната възраст на последните беше $64,0 \pm 9,9$ (50-84) (таблица 6).

Таблица 6: характеристика на COX-2 имунореактивно-позитивни пациенти с КРК

COX-2 имунореактивно-позитивни (експресия на IGF-IR > 16%)	n= 23 (82%)
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$64,0 \pm 9,9$ (50-84)
-метастази	n=9
-ректорагия	n=11
-нарушен ритъм на дефекация	n=12
-стеноза на лумена	n=13
-контактно кървене	n= 7
-спонтанно кървене	n= 7
-пушачи	n= 8

Сред анализираната група от **СОХ-2 имунореактивно-негативни пациенти с КРК** средната възраст на последните е $65,4 \pm 10,9$ (54-77) **таблица 7.**

Таблица 7: характеристика на СОХ-2 имунореактивно-негативни пациенти с КРК

СОХ-2 имунореактивно-негативни с КРК(експресия на СОХ-2 $\leq 10\%$)	n=5 (18%)
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$65,4 \pm 10,9$ (54-77)
-метастази	n=1
-ректорагия	n=1
-нарушен ритъм на дефекация	n=3
-стеноза на лумена	n=3
-контактно кървене	n= 1
-спонтанно кървене	n= 1
-пушачи	n= 3

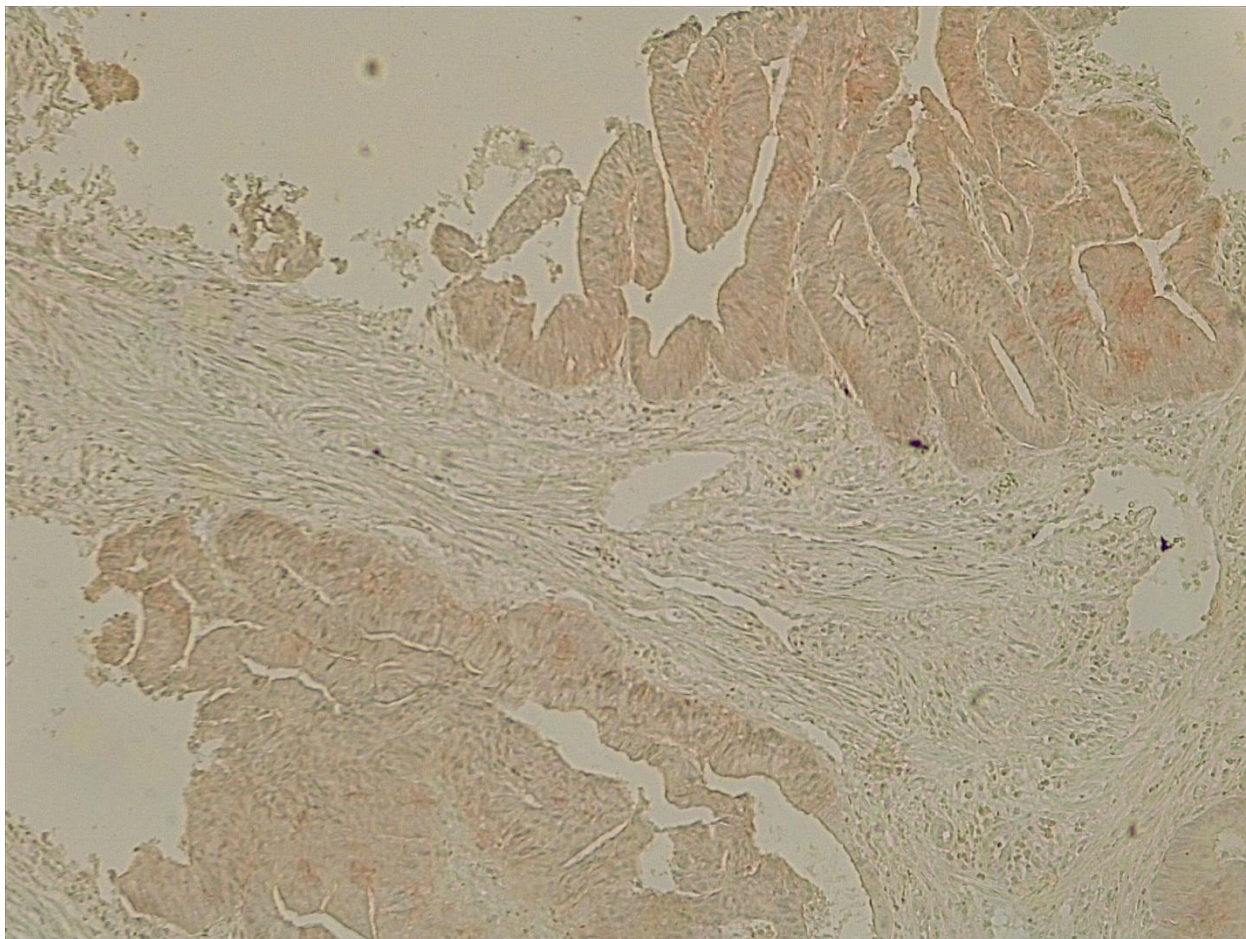
При сравнение на двете групи пациенти с КРК, *СОХ-2* **имунореактивно-позитивни** и *СОХ-2* **имунореактивно-негативни**, се отчита клинично по-често наличие на ректوراгия (n=11 срещу 1) и нарушен ритъм на дефекация (n=12 срещу 3) при *СОХ-2* положителните пациенти спрямо отрицателните такива. Подобно на това, белодробните и чернодробните метастази (n=9) както и стенозираща лумена туморна форма (n=13) са по-чести при *СОХ-2* положителните пациенти с КРК (**таблица 6 и 7**).

Сред анализираниите пациенти **с висока** експресия на *iNOS* средната възраст на последните е $64,8 \pm 9,7$ (50-83) (**таблица 8**).

Таблица 8: характеристика на пациенти с КРК с висока експресия на *iNOS*

INOS експресия >70%	n=20 (71%)
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$64,8 \pm 9,7$ (50-83)
-метастази	n=5
-ректорагия	n=9
-нарушен ритъм на дефекация	n=12
-стеноза на лумена	n= 13
-контактно кървене	n= 6
-спонтанно кървене	n= 6
-пушачи	n= 8

Снимка 2: положителна експресия на *iNOS* в туморните клетки при пациент с КРК



Сред анализираниите пациенти със **средна** експресия на *iNOS* средната възраст на последните е $62,9 \pm 10,9$ (54-84)(таблица 9).

Таблица 9: характеристика на пациенти с КРК със средна експресия на iNOS

INOS експресия 21-70%	n=8 (29%)
Характеристики	Стойности
Средна възраст	62,9 ± 10,9 (54-84)
-метастази	n=3
-ректорагия	n=3
-нарушен ритъм на дефекация	n=3
-стеноза на лумена	n=3
-контактно кървене	n= 3
-спонтанно кървене	n= 2
-пушачи	n= 3

От анализираната група пациенти с КРК, нито един от тях бе с ниска експресия на iNOS < 21%.

Сред пациентите с висока и средна степен на експресия на iNOS се отчитат следните неща:

- ректорагията е по-честа при КРК с висока iNOS експресия (n=9 срещу 3);
- 60% от КРК с висока iNOS реакция имат нарушение в ритъма на дефекация срещу 37% КРК с средна такава експресия;
- два пъти повече пациенти с КРК и висока експресия на iNOS имат дебелочревна стеноза вследствие на туморния процес в сравнение на тези с средна iNOS експресия.

ЧАСТ 2. Полипи на дебелото черво

1. Аналитична статистика

Таблица 10а: характеристика на пациентите с полипи в дебелото черво

Пациенти с колоректални полипи	n=31
Средна възраст	63,3 ± 11,8 (36-80)
Характеристики	Стойности
Хистологична характеристика на полипа	
- хиперпластичен	n=10 (32%)
- аденом с нискостепенна дисплазия	n=10 (32%)
- аденом с високостепенна дисплазия	n= 10 (32%)
- сератен полип	n=1 (4%)

Таблица 10b: характеристика на пациентите с полипи в дебелото черво

Локализация на полипа:	
- сигма	n= 7 (23%)
- колон асценденс	n=4 (12%)
- цекум	n= 3 (10%)
- ректум	n= 12 (39%)
- колон десценденс	n= 1 (4%)
- колон трансверзум	n= 4 (12%)
Пол:	
- мъже	n= 16 (52%)
- жени	n= 15 (48%)
Тютюнопушене Общ брой пациенти	n=12 (39%)
- мъже	n=9
- жени	n=3
Фамилна обремененост за карцином на дебелото черво¹ Общ брой пациенти	n=7 (23%)
- мъже	n= 5
- жени	n= 2
Ректорагия Общ брой пациенти	n=5 (16%)
- мъже	n= 3
- жени	n= 2

¹ Роднини от първа линия с КРК.

От групата на пациенти с наличие на полип в дебелото черво, средната възраст сред групата е 63 години (36-80) като най-честата локализация на полип е ректума (39%) и сигмата (23%). В преобладаващата част от случаите, пациентите с дебелочревни полипи са пушачи (n=9) и 7 от общо 31 пациента са с роднина от първа линия с наличие на КРК. Ректорагия се установява само при пет пациента сред групата на полипите като трима от тях са с адноматозни полипи с нискостепенна епителна дисплазия.

Графика 1: разпределение на пациентите според заболяването

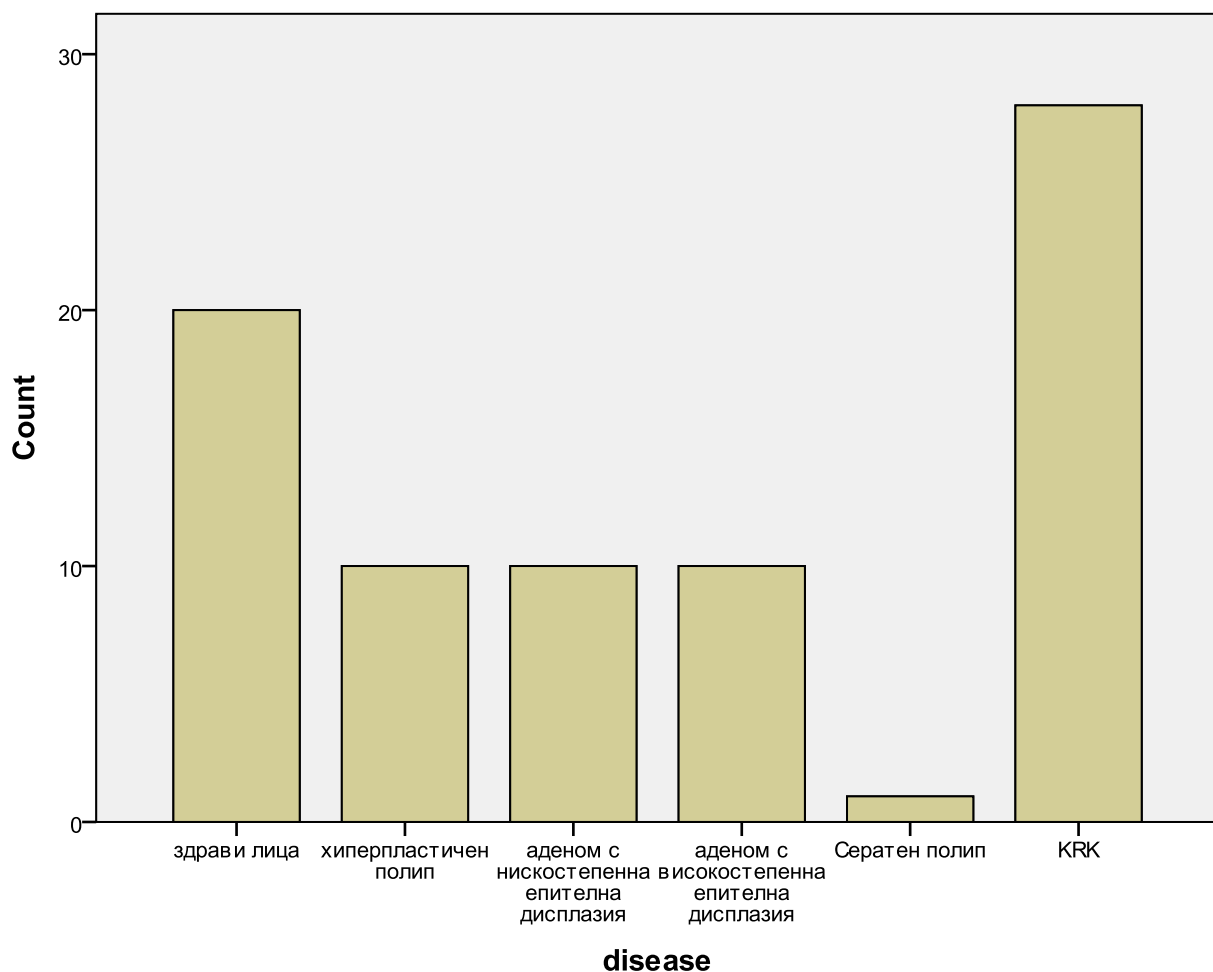


Таблица11: клиничко-лабораторна характеристика на изследваните пациенти с полипи на дебелото черво

	Брой пациенти	x	Sx	Med	Min	Max
Хемоглобин*	31	135,9	14,5	134,0	103	166
Желязо*	23	8,7	6,7	12,0	3	20
ЖСК*	23	50,6	31,5	65,0	36	86

*средни стойности, стандартно отклонение, медиана, минимум и максимум на хемоглобин (g/L), желязо ($\mu\text{mol/l}$) и ЖСК ($\mu\text{mol/l}$)

Общо пациентите с полипи на дебелото черво бяха 31 от които 13 (42%) пациента с положителна реакция към IGF-IR и 18 (58%) с негативна такава. Сред IGF-IR имунореактивно-позитивни пациенти с полипи на дебелото черво, 9 пациента бяха мъже срещу 4 жени.

Сред анализираната група от ***IGF-IR имунореактивно-позитивни пациенти с полипи на дебелото черво*** средната възраст на последните е $65,5 \pm 12$ (44-80) (таблица 12).

Таблица 12: характеристика на IGF-IR имунореактивно-позитивни пациенти с полипи на дебелото черво

IGF-IR имунореактивно-позитивни (експресия на IGF-IR > 16%)	n= 13
<i>Характеристики</i>	<i>Стойности</i>
Средна възраст	65,5 ± 12 (44-80)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 2
-нарушен ритъм на дефекация	n= 4
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 3
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 7

Таблица 13: характеристика на полипите сред IGF-IR имунореактивно-позитивни пациенти

Характеристики	Стойности
Вид на полипа	Брой пациенти
- аденом с нискостепенна епителна дисплазия	n= 6
- аденом с високостепенна епителна дисплазия	n= 7
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма	n= 4
- колон асценденс	n= 4
- цекум	n= 2
- ректум	n= 2
- колон десценденс	n= 0
- колон трансверзум	n= 1

Снимка 3: положителна дифузна експресия на IGF-1R в аденом с високостепенна епителна дисплазия



При пациентите с дебелочревни полипи и положително експресиращи IGF-IR, най-честата локализация на полипа в дебелото черво бе сигмата (n=4) и колон асценденс (n=4). По-равно бяха разпределени същите пациенти според хистологичното естество на полипа (**таблица 13**).

Сред анализиранията група от **IGF-IR имунореактивно-негативни пациенти с полипи на дебелото черво** средната възраст на последните е $61,8 \pm 11,9$ (36-79) (**таблица 14**).

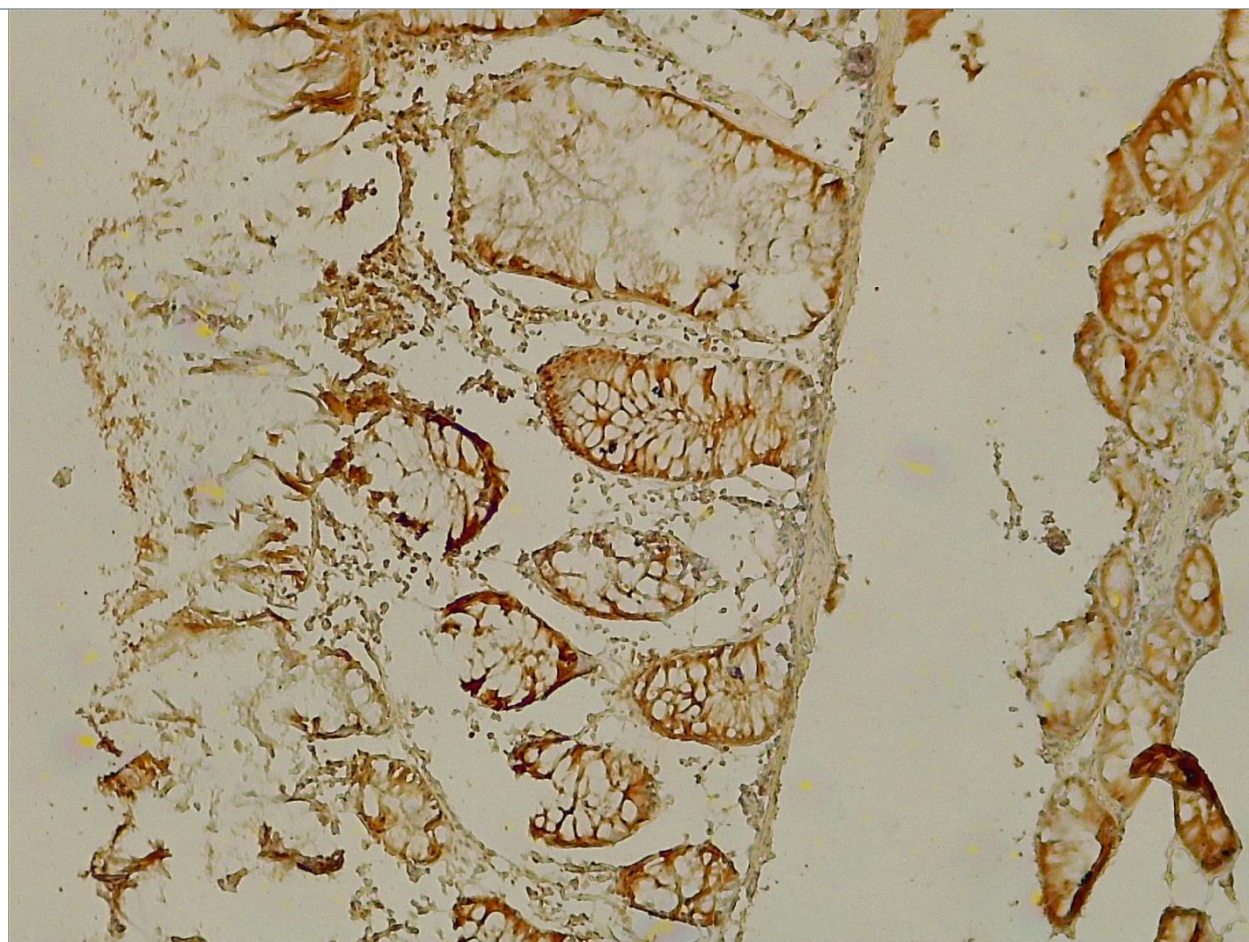
Таблица 14: характеристика на IGF-IR имунореактивно-негативни пациенти с дебелочревни полипи

IGF-IR имунореактивно-негативни (експресия на IGF-IR $\leq 10\%$)	n= 18
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$61,8 \pm 11,9$ (36-79)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 3
-нарушен ритъм на дефекация	n= 11
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 0
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 5

Таблица 15: характеристика на полипите сред IGF-IR имунореактивно-негативни пациенти

Характеристики	Стойности
Вид на полипа	Брой пациенти
- аденом с нискостепенна епителна дисплазия	n=4
- аденом с високостепенна епителна дисплазия	n= 3
- хиперпластични полипи	n= 10
- сератен полип	n= 1
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма	n= 8
- колон асценденс	n= 0
- цекум	n= 1
- ректум	n= 5
- колон десценденс	n= 1
- колон трансверзум	n= 3

Снимка 4: COX-2 експресия <10% при пациент с хиперпластичен дебелочревен полип



При преобладаващата част от пациентите с дебелочревни полипи и IGF-IR отрицателна имунохистохимична реакция полипа беше локализиран в сигмата (44%) последвана от ректума (28%) таблица 15.IGF-IR отрицателна реакция се отчете основно при хиперпластичните полипи (56%) (**таблица 15**).

Пациентите с дебелочревни аденоматозни полипи бяха анализирани и за COX-2 експресия.

Сред анализираната група от **COX-2 имунореактивно-позитивни пациенти с дебелочревни полипи** средната възраст на последните бе $60,4 \pm 14,2$ (36-80) (**таблица 16**).

Таблица 16: характеристика на COX-2 имунореактивно-позитивни пациенти с полипи на дебелото черво

COX-2 имунореактивно-негативни с КРК (експресия на COX-2 > 16%)	n= 14 (45%)
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$60,4 \pm 14,2$ (36-80)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 1
-нарушен ритъм на дефекация	n= 6
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 2
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 10

Таблица 17: характеристика на полипите сред COX-2 имунореактивно- позитивни пациенти

Характеристики	Стойности
Вид на полипа - аденом с нискостепенна епителна дисплазия - аденом с високостепенна епителна дисплазия - хиперпластични полипи - сератен полип	Брой пациенти n=6 n= 6 n= 1 n= 1
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма - колон асценденс - цекум - ректум - колон десценденс - колон трансверзум	n= 3 n= 4 n= 1 n= 3 n= 0 n= 3

86% от пациентите положителни за СОХ-2 бяха с аденом с нискостепенна и високостепенна епителна дисплазия, **таблица 17 и снимка 5.**

Снимка 5: СОХ-2 експресия >16% при дебелочревен аденом с високостепенна епителна дисплазия



Сред анализиранията група от **COX-2 имунореактивно-негативни пациенти с дебелочревни полипи** средната възраст на последните бе $65,8 \pm 9,3$ (42-79) (таблица 6).

Таблица 18: характеристика на COX-2 имунореактивно-негативни пациенти с полипи на дебелото черво

COX-2 имунореактивно-негативни с КРК (експресия на COX-2 \leq 10%)	n= 17 (55%)
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$65,8 \pm 9,3$ (42-79)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 4
-нарушен ритъм на дефекация	n= 7
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 1
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 2

Таблица 19: характеристика на полипите сред COX-2 имунореактивно-негативни пациенти

Характеристики	Стойности
Вид на полипа	Брой пациенти
- хиперпластични полипи	n=9
- полип с нискостепенна епителна дисплазия	n= 4
- полип с високостепенна епителна дисплазия	n=4
- сератен полип	n= 0
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма	n= 9
- ректум	n= 4
- цекум	n= 2
- колон десценденс	n= 1
- колон трансверзум	n= 1
- колон асценденс	n= 0

Около половината от хиперпластичните полипи (53%) бяха негативни за COX-2. Сред негативните COX-2 пациентити, най-честата локализация на полипа беше в сигмата (n=9) (**таблица 19**).

Пациентите с дебелочревни полипи бяха анализирани и за iNOS експресия.

Сред анализираните пациенти **свисока** експресия на *iNOS* средната възраст на последните е $69,3 \pm 9,7$ (56-80) (**таблица 20**).

Таблица 20: характеристика на пациенти сдебелочревни полипи с висока експресия на iNOS

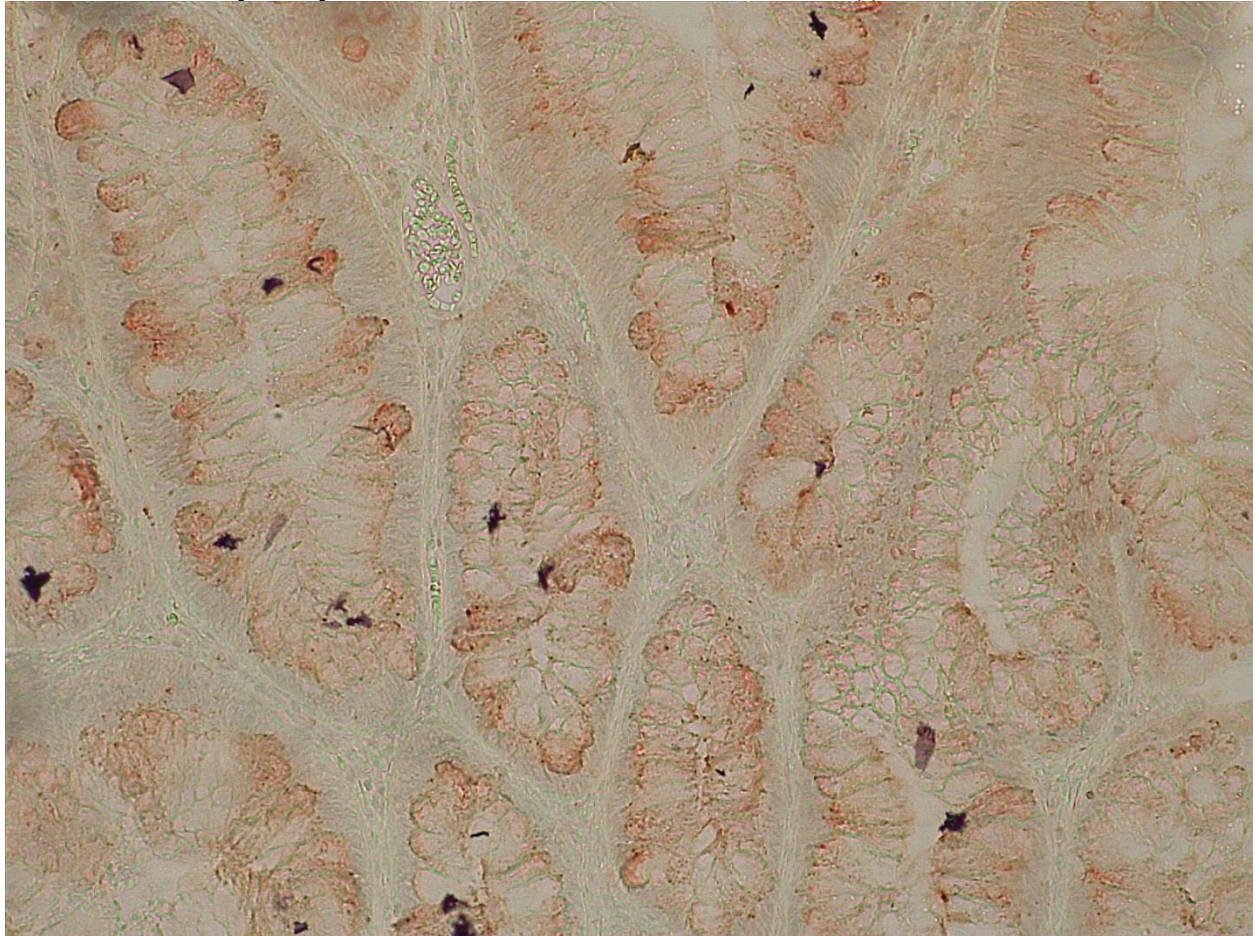
INOS експресия >70%	n= 6 (19%)
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$69,3 \pm 9,7$ (56-80)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 0
-нарушен ритъм на дефекация	n= 2
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 2
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 3

Таблица 21: характеристика на полипите сред пациентите с дебелочревни полипи и висока експресия на iNOS

Характеристики	Стойности
Вид на полипа <ul style="list-style-type: none"> - аденом с високостепенна епителна дисплазия - аденом с нискостепенна епителна дисплазия - хиперпластични полипи - сератен полип 	Брой пациенти <ul style="list-style-type: none"> n=5 n= 1 n= 0 n= 0
Локализация на полипа	Брой пациенти
<ul style="list-style-type: none"> - сигма - цекум - ректум - колон десценденс - колон трансверзум - колон асценденс 	<ul style="list-style-type: none"> n= 1 n= 0 n= 2 n= 0 n= 1 n= 2

Сред полипите с висока iNOS експресия, 83% бяха аденоми с високостепенна епителна дисплазия **таблица 21 и снимка 6.**

Снимка 6: положителна огнищна експресия на iNOS при дебелочревен аденом с хистологична характеристика на високостепенна епителна дисплазия



Сред анализираниите пациенти със **средна** експресия на *iNOS* средната възраст на последните е $56,5 \pm 13$ (36-78) (**таблица 22**).

Таблица 22: характеристика на пациенти с дебелочревни полипи и средна експресия на iNOS

INOS експресия 21-70%	n= 13 (42%)
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$56,5 \pm 13$ (36-78)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 3
-нарушен ритъм на дефекация	n= 5
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 1
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 6

Таблица 23: характеристика на полипите сред пациентите с средна експресия на iNOS

Характеристики	Стойности
Вид на полипа - полип с високостепенна епителна дисплазия - полип с нискостепенна епителна дисплазия - хиперпластични полипи - сератен полип	Брой пациенти n=5 n= 7 n= 1 n= 0
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма - цекум - ректум - колон десценденс - колон трансверзум - колон асценденс	n= 6 n= 2 n= 1 n= 1 n= 1 n= 2

Сред анализираниите пациенти със **ниска** експресия на *iNOS* средната възраст на последните бе $67,7 \pm 7,7$ (52-79) (таблица 24).

Таблица 24: характеристика на пациенти с дебелочревни полипи и ниска експресия на *iNOS*

INOS експресия 0-20%	n= 12 (39%)
Характеристики	Стойности
Средна възраст	$67,7 \pm 7,7$ (52-79)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 2
-нарушен ритъм на дефекация	n= 8
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 0
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 3

Таблица 25: характеристика на полипите сред пациентите с ниска експресия на iNOS

Характеристики	Стойности
Вид на полипа	Брой пациенти
- полип с високостепенна епителна дисплазия	n=0
- полип с нискостепенна епителна дисплазия	n= 2
- хиперпластични полипи	n=9
- сератен полип	n=1
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма	n= 5
- цекум	n= 1
- ректум	n= 4
- колон десценденс	n= 0
- колон трансверзум	n= 2
- колон асценденс	n= 0

Сред пациентите с нискостепенна имунохистохимична реакция за iNOS, 9 от тях бяха с хиперпластичен полип като преобладаващата локализация на полипа в тази група бе в дисталната част на дебелото черво (ректум и сигма = 75%) (таблица 25).

2. Корелационни анализи на IGF-1R, iNOS, COX-2 при КРК и дебелочревни полипи

Установи се слаба към много слаба корелация между степента на експресия на *COX-2*, *IGF-1R*, *iNOS* и наличието на *метастази* при пациенти с КРК, но тя бе статистически значима само при *COX-2* експресията (таблица 26).

Таблица 26: корелация между COX-2, IGF-1R, iNOS степента експресия и наличието на метастази при КРК

COX-2	метастази
Pearson	R=0,267 p=0,018
Kendall's	R=0,280 p=0,013
Spearman's	R=0,281 p=0,012
IGF-1R	метастази
Pearson	R=0,258 p=0,185
Kendall's	R=0,268 p=0,157
Spearman's	R=0,272 p=0,161
iNOS	метастази
Pearson	R=0,093 p=0,639
Kendall's	R=0,104 p=0,583
Spearman's	R=0,106 p=0,593

Отчете се слаба връзка между степента на тъканната имунохистохимична експресия на *COX-2*, *IGF-1R*, *iNOS* и наличието на *стенози* в дебелото черво вследствие на туморния процес ($R=0,361$, $p=0.001$ по Spearman) (таблица 27).

Таблица 27: корелация между степента на *COX-2*, *IGF-1R*, *iNOS* експресия и наличието на дебелочревни стенози при КРК

COX-2	стеноза
Pearson	$R=0,361$ $p=0,001$
Kendall's	$R=0,361$ $p=0,001$
Spearman's	$R=0,361$ $p=0,001$
IGF-1R	стеноза
Pearson	$R=0,300$ $p=0,121$
Kendall's	$R=0,300$ $p=0,119$
Spearman's	$R=0,300$ $p=0,121$
iNOS	стеноза
Pearson	$R=0,251$ $p=0,198$
Kendall's	$R=0,251$ $p=0,192$
Spearman's	$R=0,251$ $p=0,198$

Установихме още положителна слаба статистическо значима връзка между степента на *IGF-1R* тъканната експресия при дебелочревни полипи и КРК и *възрастта* на изследваните пациенти ($R= 0,388$, $p=0,000$) (таблица 28).

Таблица 28: корелация между степента на *IGF-1R* експресия и възрастта на пациентите с дебелочревни полипи и КРК

IGF-1R	възраст
Pearson	$R=0,267$ $p=0,000$
Kendall's	$R=0,280$ $p=0,001$
Spearman's	$R=0,365$ $p=0,001$

Слаба бе връзката между *локализацията* на заболяването и степента на експресия на *iNOS* ($R=0,272$, $p=0,016$) (таблица 29).

Таблица 29: корелация между iNOS експресията и локализацията на заболяването при дебелочревни полипи и КРК

iNOS	Локализация на процеса
Pearson	$R=0,247$ $p=0,028$
Kendall's	$R=0,239$ $p=0,014$
Spearman's	$R= 0,272$ $p=0,016$

Различна по степен бе връзката между *характера на заболяването* и степента на експресия на *онкогенните сигнализиращи маркери*.

Отчете се силна и статистически значима корелация между степента на експресия на *IGF-1R* и болестта ($R= 0,743$, $p=0,000$) (таблица 30).

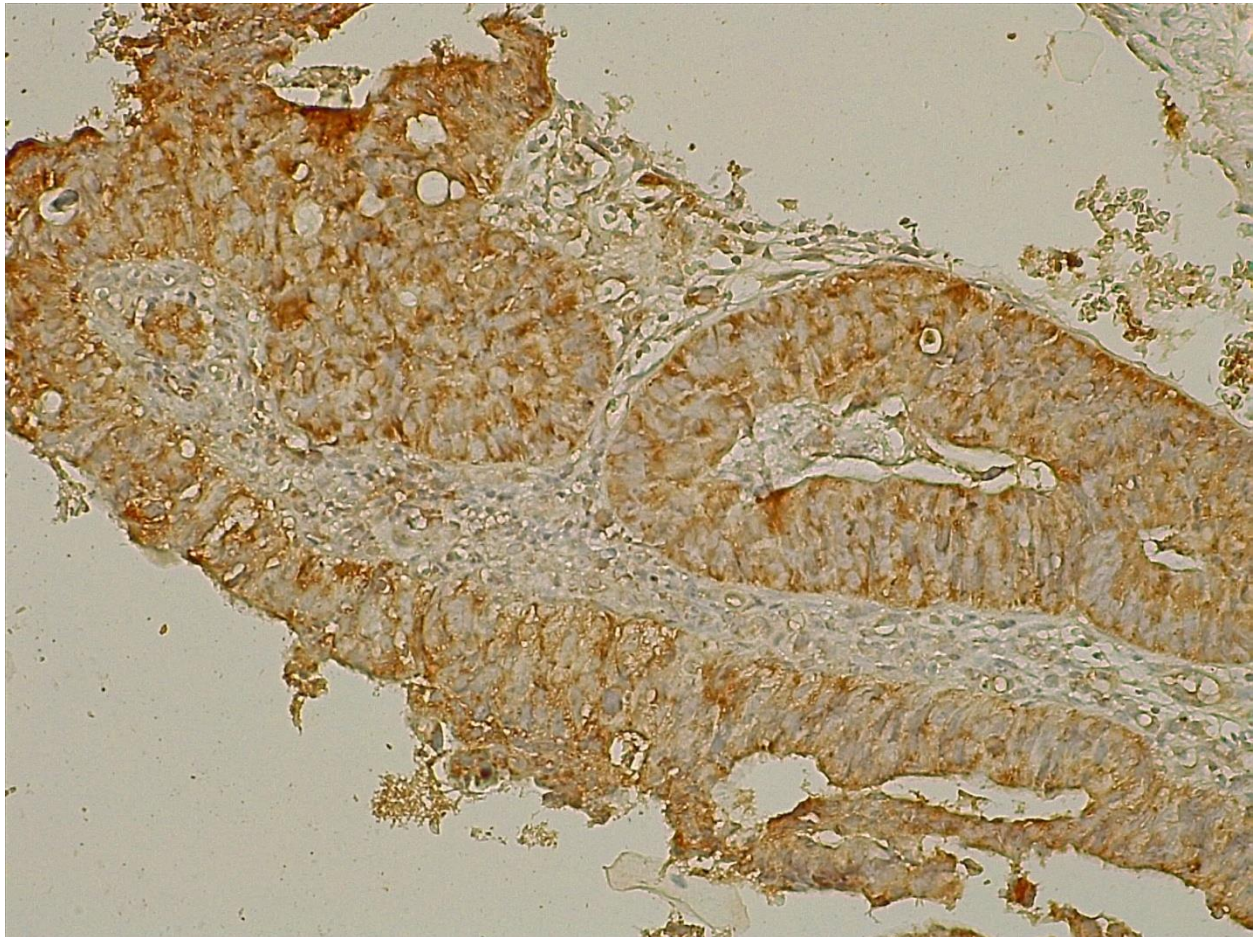
При пациентите с хиперпластични полипи експресията е по-ниска спрямо тази при пациентите с КРК.

Таблица 30: корелация между степента на IGF-1R експресия и характера на заболяването

IGF-1R	заболяване
Pearson	$R=0,743$ $p=0,000$
Kendall's	$R=0,674$ $p=0,000$
Spearman's	$R= 0,746$ $p=0,000$

От друга страна, *COX-2* експресията също беше по- силна при пациенти с КРК спрямо тези с наличие на хиперпластични полипи, но тази връзка е по- скоро средно изразена ($R=0,696$, $p=0,000$).

Снимка 7: положителна огнищна експресия на COX-2 в туморните клетки при пациент с КРК



Връзката между iNOS тъканната експресията и характера на заболяването бе най-слаба по степен ($R=0,578$, $p=0,000$)(таблица 31).

Таблица 31: корелация между iNOS експресията и характера на заболяването

iNOS	заболяване
Pearson	$R=0,541$ $p=0,000$
Kendall's	$R=0,460$ $p=0,000$
Spearman's	$R=0,578$ $p=0,000$

От проведените статистически анализи, не се установи статистическа значима разлика в средните стойности на **хемоглобина** сравнявайки здравите пациенти и тези с КРК ($p=0,058$, Mann-Whitney).

Ректорагията се явява с различна честота сравнявайки групата на здравите лица и пациентите с КРК. Отчита се по-честа изява на ректорагия при пациенти с КРК спрямо здравите лица ($p=0,042$). По-високи са средните стойности на ректорагията при пациентите с КРК спрямо тези с аденом с високостепенна епителна дисплазия ($p=0,014$).

Значителна статистическа разлика имаше в средните стойности на **ендоскопското контактно кървене** на лигавицата между здравите лица и пациентите с КРК ($p=0,002$). Подобна разлика се отчете и между пациенти с КРК и такива с аденом с високостепенна епителна дисплазия, но тяне беше статистически значима ($p=0,276$).

Разлика имаше в **ендоскопското спонтанно кървене** на дебелочревната лигавица между групата на здравите лица и пациентите с КРК ($p=0,010$). Такава разлика се видя също между пациентите с аденом с високостепенна епителна дисплазия и тези с КРК, но тя беше незначима ($p=0,060$).

Дялът на **фамилна обремененост** за тумор на дебелото черво сред пациентите с КРК не бе статистически значимо по-изразена спрямо групата на здравите лица ($p=0,354$).

Отчетоха се значително по-ниски експресии на **iNOS, COX-2 и IGF-1R** при здравата група хора в сравнение с пациентите с КРК и това бе статистическо

значимо при изследване с непараметричен анализ на нечифтни данни ($p=0,000$, с теста на Mann-Whitney). Пациентите с наличие на КРК имаха по-висока експресия на посочените онкогенни маркери спрямо здравата група.

Не се установиха разлики в средната аритметична експресията на **iNOS**, **COX-2** и **IGF-1R** между здравите хора и пациентите с наличие на хиперпластични полипи ($p=0,000$).

Отчете се статистическа значима разлика в средните стойности на експресия на **трите онкогенни маркера** между пациенти с хиперпластични дебелочревни полипи и пациентите с КРК ($p=0,000$ Mann-Whitney).

Обратно на това, не се установиха значими разлики в средните стойности на експресия на **iNOS** ($p=0,030$), **COX-2** ($p=1,000$) и **IGF-1R** ($p=0,648$) между пациенти с дебелочревни аденоми с нискостепенна епителна дисплазия и аденоми с високостепенна епителна дисплазия.

Статистически значима разлика имаше в средните стойности в тъканната експресия на **iNOS** ($p=0,000$), **COX-2** ($p=0,022$) и **IGF-1R** ($p=0,001$) между хиперпластични полипи и аденоми с висока епителна дисплазия.

Сигнификантна статистическа разлика се отчете и между средни стойности на експресия на сигналините молекули между здравите лица и пациентите с аденом с нискостепенна епителна дисплазия ($p=0,000$).

ЧАСТ 3. Възпалителни чревни заболявания: болест на Крон и улцерозен колит

3.1 Клинични и хистологични характеристиките на изследваните пациенти с ВЧЗ

От изследваните пациентите с болест на Крон и улцерозен колит, 11 (61%) бяха мъже и 7 (39%) бяха жени.

Пациентите с ВЧЗ бяха разделени в 3 групи в зависимост от тежестта на заболяването което беше оценено чрез калкулиране на общ Мауо скор и CDAI скор (таблица 32 и 33).

Тоталния Мауо скор включваше следните параметри: честота и брой течнокашави дефекации за денонощие, ректално кървене, ендоскопски скор (оценка) и обща клинична оценка на лекаря.

CDAI скор включваше: брой течни и кашави изхождания за денонощие през последните 7 дни, общо клинично стояние за последните 7 дни, наличие на усложнения (фистули, артралгии, увеити, абсцеси, наличие на абдоминална маса, прием на анти-диарийни средства, стойности на хематокрита и процентно отклонение от стандартното тегло.

Таблица 32: разпределение на пациентите с болест на Крон според CDAI скор

CDAI	< 150	>150 - < 220	>220
N= брой пациенти	4	1	4

Таблица33: разпределение на пациентите с улцерозен колит според Мауо сора

Мауо скор	1	2	3
N=брой пациенти	4	2	3

Клиничната активност на заболяването беше изчислена с помощта на Мауо за пациенти с улцерозен колит и CDAI за пациентите с болест на Крон.

За клинична ремисия приехме CDAI скор < 150 точкии Мауо клиничен скор ≤ 2 .

От всички включени и анализирани пациенти с ВЧЗ, нито един не беше обременен фамилно за колоректален карцином.В момента на провежданото изследване, 14 пациенти бяха на лечение със Сулфасалазин, 7 пациенти на лечение с Азатиоприн и 4 пациента на биологично лечение с Адалимумаб.

(таблица34).

Таблица34: провежданата терапия на анализираниите пациенти с болест на Крон и улцерозен колит

N= Брой пациент	Сулфасалази н	Азатиоприн	Адалимумаб	Сулфасалазин + Азатиоприн	Сулфасалазин + Адалимумаб	Азатиоприн + Адалимумаб
БК	3	1	1	2	1	1
УК	5	0	1	3	0	0
Общо	8	1	2	5	1	1

Таблица 35: клиничко-лабораторна характеристика на изследваните пациенти с ВЧЗ

	Хемоглобин*	ЦРП*	Тромбоцити*	Калпротектин*	Брой пациенти с ректорагия
БК в ремисия (n= 4)	127,7± 11,3 Med = 137	0,4± 0,2 Med = 0,4	297,5± 69,7 Med = 284	108,7± 64,8 Med = 92,5	1
УК в ремисия (n= 5)	139,7± 28,2 Med = 146	3,7± 2,8 Med = 3,9	256,0± 55,8 Med = 247	61,2± 13,1 Med = 60	0
БК- активна форма (n= 5)	135,4± 11,1 Med = 137	30,2± 25,7 Med = 12,8	416,6± 77,6 Med = 436	650,0± 100 Med = 600	1
УК активна форма (n= 5)	127,0± 11,9 Med = 122	15,5± 14,8 Med = 12	307,8± 61,8 Med = 316	660,0± 194,9 Med = 800	2

*средни стойности, медиана и средно отклонение на хемоглобин (g/L), ЦРП (mg/l) и фекален калпротектин (mg/kg)

Таблица 36: засягане на болестта при БК и УК

N= Брой пациент и	Тънко черво	Дебело черво	Тънко и дебело черво	ректум	Ректум и сигма	Цялото дебело черво	Общ брой пациенти
БК	2	2	5				9
УК				1	6	2	9
Общо							18

От пациентите с БК, 2 имаха изолирано засягане на тънкото черво (ентерит), 2 с изолирано дебелочревно засягане (колит) и 5 с комбинирано засегнати тънките и дебелите черва. Нито един от тях нямаше засягане на горно-интестиналния тракт.

От пациентите с УК, 7 пациенти бяха с левостраннен колит (засягане съответно на ректум и сигма) и 2 с панколит.

5 (55%) от пациентите с УКимаха хистологична активност на изследвания биопсичен материал срещу 4 (45%) без хистологична активност. Сред пациентите с БК, 5 (55%) имаха хистологична активност на болестта докато 4 (45%) нямаха такава (**таблица37**).

Таблица37: хистологична активност на болестта при пациенти с ВЧЗ

N= пациенти	без хистологична активност	с хистологична активност
БК	4	5
УК	4	5

3.2 Резултати от имунохистохимичния анализ

Експресията на iNOS, IGF-1R и COX-2 беше отрицателна при всички изследвани контролни лица.

Снимка 8: нормална дебелочревна лигавица, отрицателна за COX-2

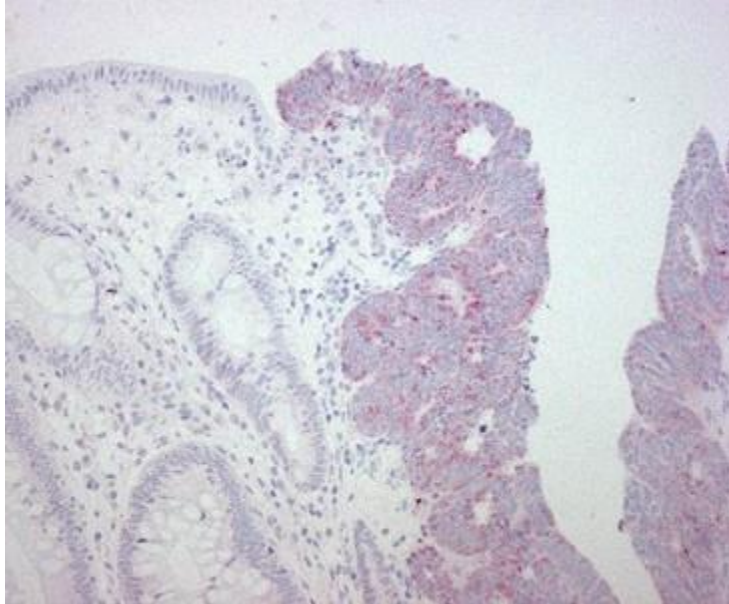


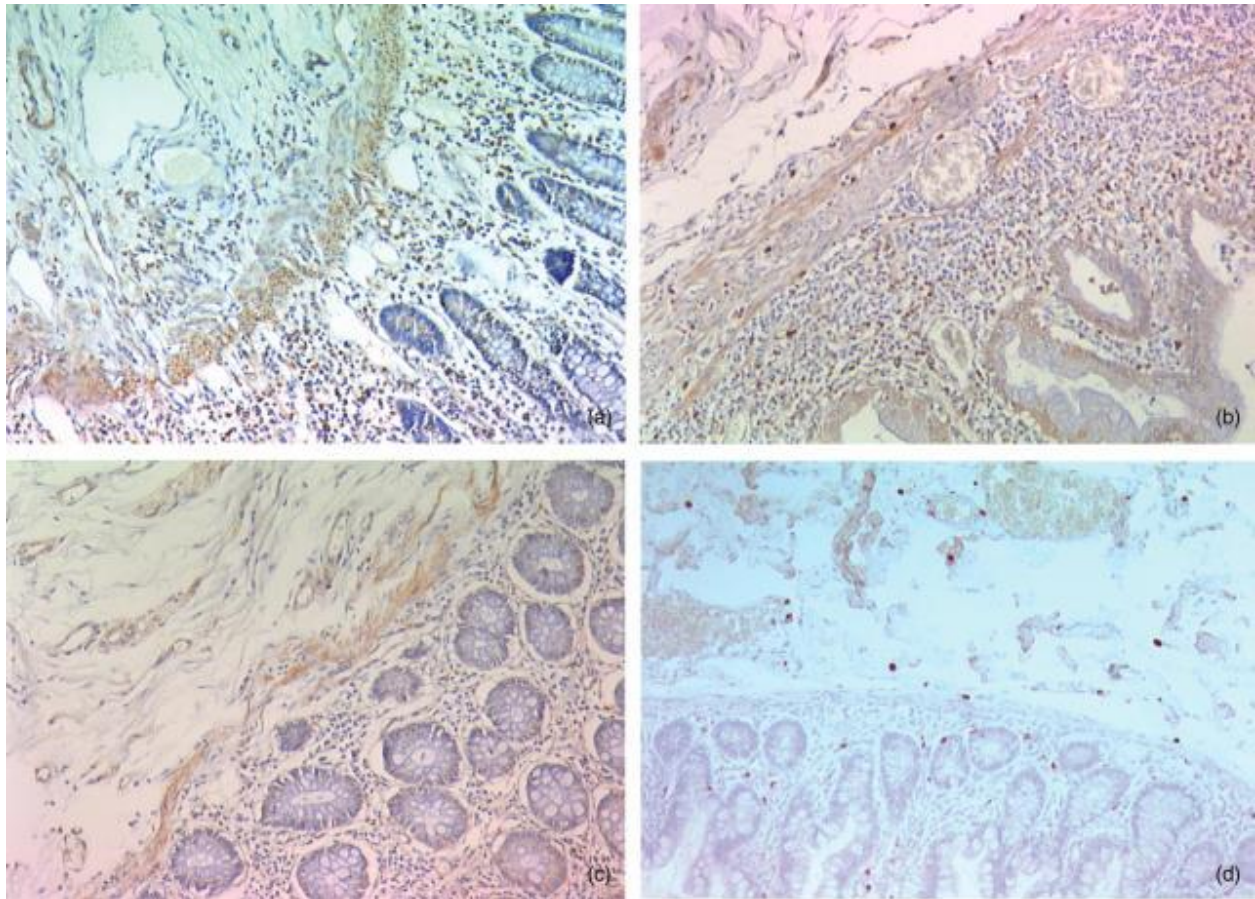
Таблица 38: позитивна тъканна експресия на IGF-1R, COX-2 и iNOS при пациенти с ВЧЗ

Тъканна експресия	IGF-1R	COX-2	iNOS		
			ниска*	средна*	висока*
БК(n=9)	4	3	3	3	3
УК(n=9)	6	5	2	1	6
Общо (n=18)	10	8	5	4	9

*изследваните лица бяха разделени на три групи според степента на тъканна експресия на iNOS в биопсичния материал: ниска степен (0-20%), средна степен (21-70%) и висока степен (>70%) на положителни възпалителни клетки.

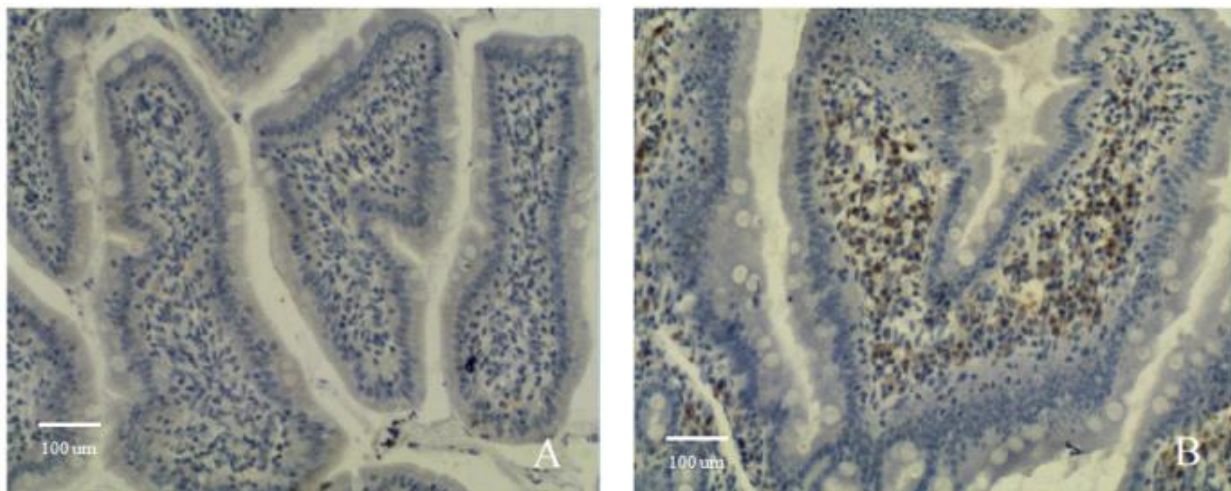
Оцветяването и експресията на IGF-1R във възпалителните мукозни клетки бе оценено като високо.

Снимка 9: IGF-1R експресия според лигавичното възпаление при ВЧЗ



(a) увеличен брой на IGF-1R положителни възпалителни клетки (в кафяво) в мукозата и субмукозата, в засегната област при болестта на Крон. (b) увеличен брой на IGF-1R положителни възпалителни клетки в лигавицата в засегнат участък при улцерозен колит. (c) липса на IGF-1R експресия при здрава контрола. (d) положителни възпалителни клетки (в червено), в процес на апоптоза в незасегната област при болест на Крон.

Снимка10: Експресия на циклооксигеназа- 2 в интестинална тъкан изследвана чрез имунохистохимия при ВЧЗ



От всички изследвани пациенти с ВЧЗ, 8 пациенти са били IGF-1R отрицателни, 10 пациенти са били COX-2 отрицателни и 5 пациенти са били с iNOSекспресия от 0-20%.

3.3 Корелации

Таблица 39: корелация между онкогенетичните сигнални маркери и възрастта на пациентите

възраст	COX-2	iNOS
Pearson	R=-0,566; p=0,014	
Kendall's	R=-0,475; p=0,021	R=-0,439; p=0,025
Spearman's	R=-0,561; p=0,015	R=-0,490; p=0,039

Отрицателно висока корелация беше наблюдавана между експресията на COX-2 и възрастта на пациентите в групата на ВЧЗ (R= - 0.566) както и средна по тежест отрицателна корелация между iNOS експресията и възрастта в същата група пациенти (R= - 0,490) (**таблица39**).

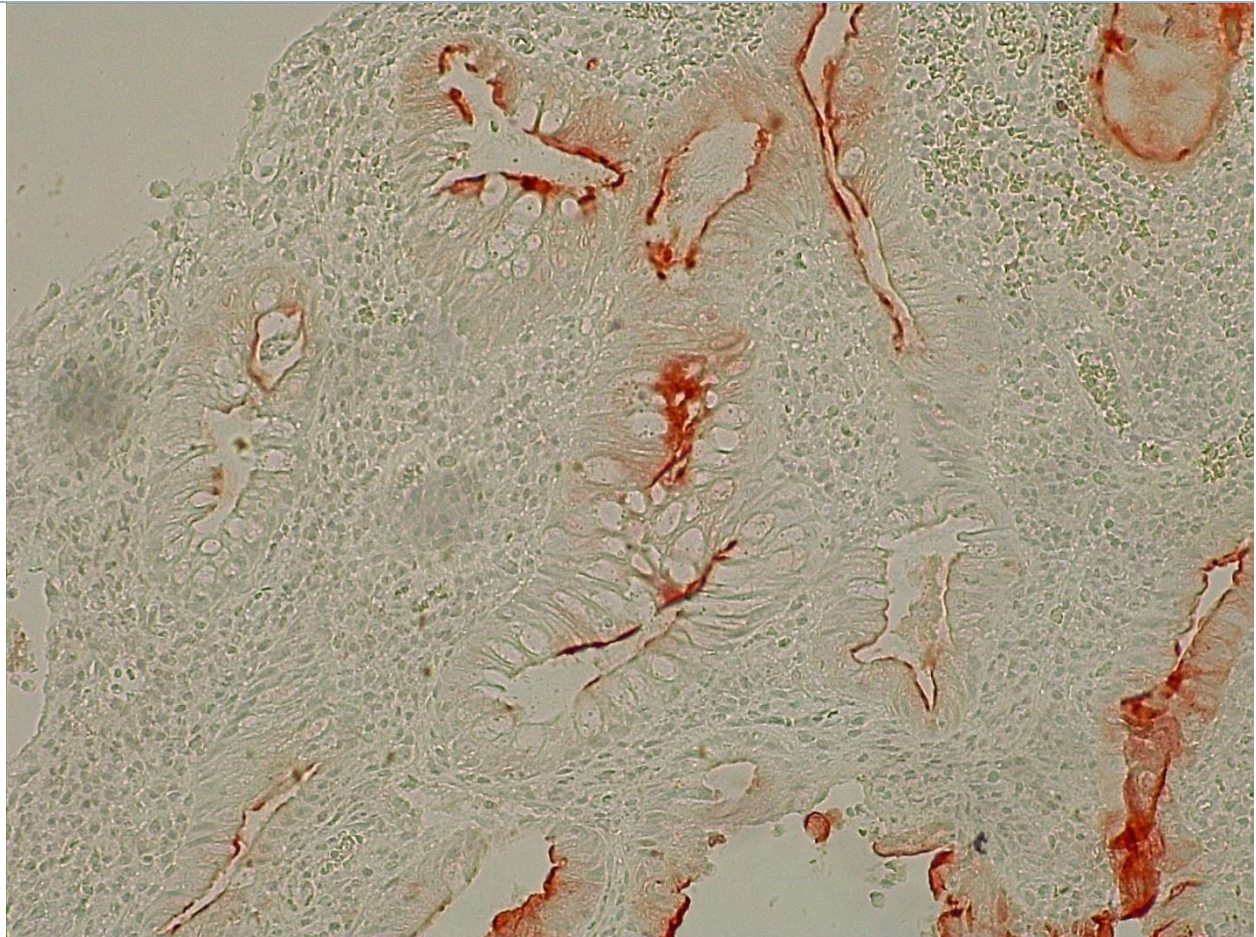
Отчете се статистически значима корелация между COX-2 експресията в групата на ВЧЗ и хистологичната активност на болестта (R=0,553, p=0,017) (**таблица40**). Пациентите с хистологична активност на тяхната болест имаха повишена експресия на COX-2 (46% от тях позитивни) в биопсичните материали.

Таблица40: Хистологична активност на заболяването и COX-2 тъканна експресия

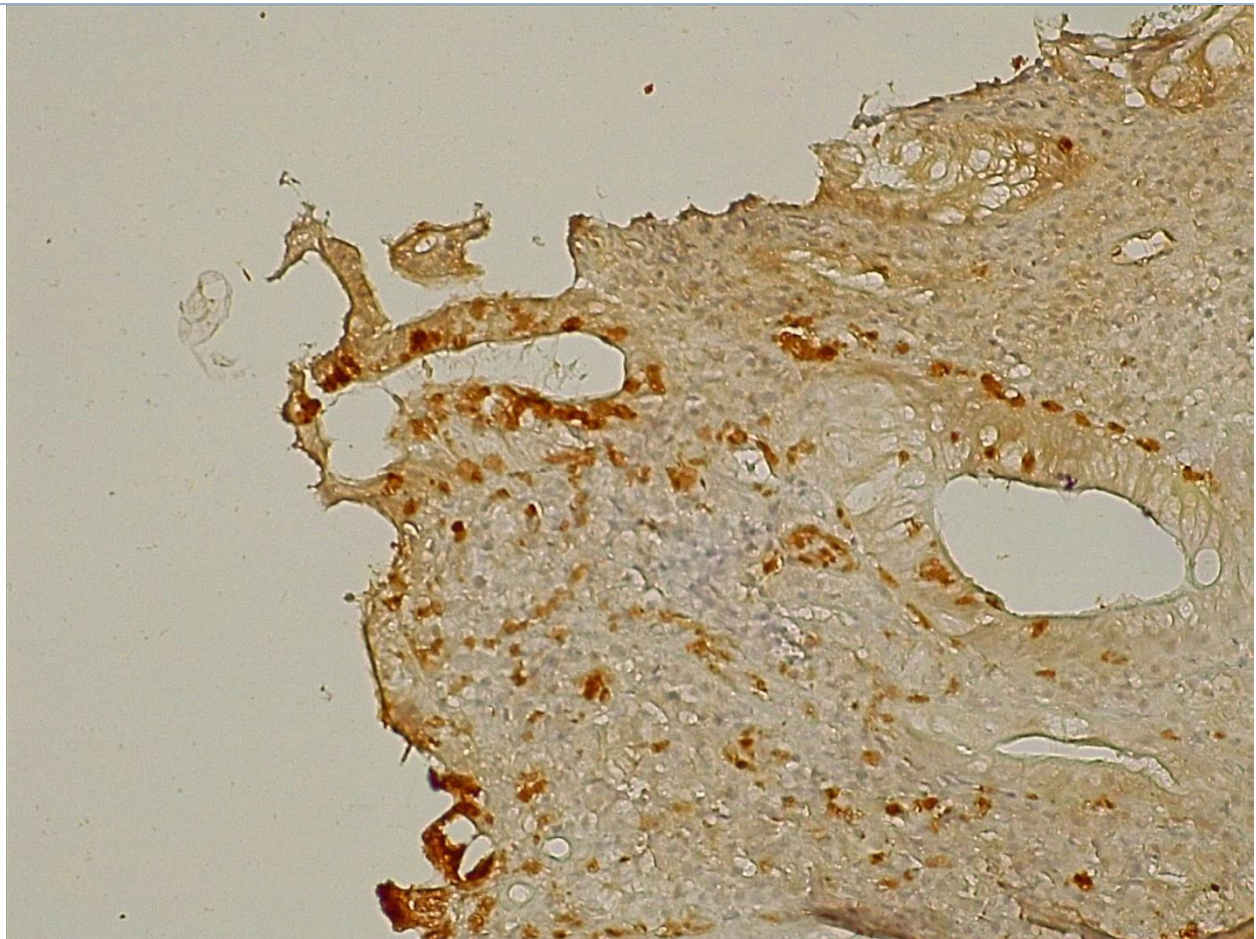
Хистологична активност на ВЧЗ	COX-2
Pearson	R=0,553 p=0,017
Kendall's	R=0,553 p=0,023
Spearman's	R=0,553 p=0,017

Установихме корелация между IGF-1R, iNOS експресията при ВЧЗ и хистологичната активност на болестта ($R=0,665$, $p=0,013$)

Снимка 11: висока фокална iNOS експресия в диспластичен участък при хистологично активен улцерозен колит



Снимка 12: положителна огнищна експресия на IGF-1R при хистологично активен улцерозен колит



Сигнификантно- висока корелация беше установена между COX-2 тъканната експресия и фекалния калпротектин ($R=0,788$ $p=0,000$) както и между COX-2 и с- реактивния протеин (ЦРП) ($R=0,583$ $p=0,011$) сред анализираните пациенти с болест на Крон и улцерозен колит (**таблица41**).

Таблица41: Връзка между COX-2 експресия, фекален калпротектин и ЦРП

COX-2	калпротектин	ЦРП
Pearson	$R=0,788$ $p=0,000$	$R=0,557$ $p=0,016$
Kendall's	$R=0,636$ $p=0,002$	$R=0,495$ $p=0,016$
Spearman's	$R=0,738$ $p=0,000$	$R=0,583$ $p=0,011$

Тъканната експресия на индуцируемия азотен оксид синтаза бе по висока при повишени стойности на фекалния калпротектин сред пациентите с ВЧЗ и тази връзка беше статистически значима използвайки теста на Pearson ($R=0,573$ $p=0,013$) (таблица 42).

Таблица 42: корелация между експресията на iNOS и фекален калпротектин сред ВЧЗ

iNOS	Калпротектин
Pearson	$R=0,573$ $p=0,013$
Kendall's	$R=0,429$ $p=0,033$
Spearman's	$R=0,502$ $p=0,034$

Обратно, не установихме връзка между тъканната експресия на COX-2, IGF-1R, iNOS и терапията на пациентите с ВЧЗ. Допълнително беше открита връзка между самите онкогени сигнални молекули в различна степен (таблица 43).

Таблица 43: корелация между IGF-1R, COX-2 и iNOS

IGF-1R	COX-2	iNOS
Pearson	$R=0,575$ $p=0,013$	$R=0,757$ $p=0,000$
Kendall's	$R=0,575$ $p=0,018$	$R=0,712$ $p=0,000$
Spearman's	$R=0,575$ $p=0,013$	$R=0,750$ $p=0,000$

Значима връзка беше разкрита между експресията на IGF-1R и iNOS ($R=0,757$) както и такава между IGF-1R и COX-2 ($0,575$). Получените резултати бяха статистически значими съответно $p=0,000$ и $p=0,013$.

Онкогените маркери показаха по-висока експресия при по-тежка болест на Крон и по-тежък улцерозен колит (таблица 44).

Таблица 44: Корелация между COX-2, IGF-1R, iNOS тежестта на заболяването

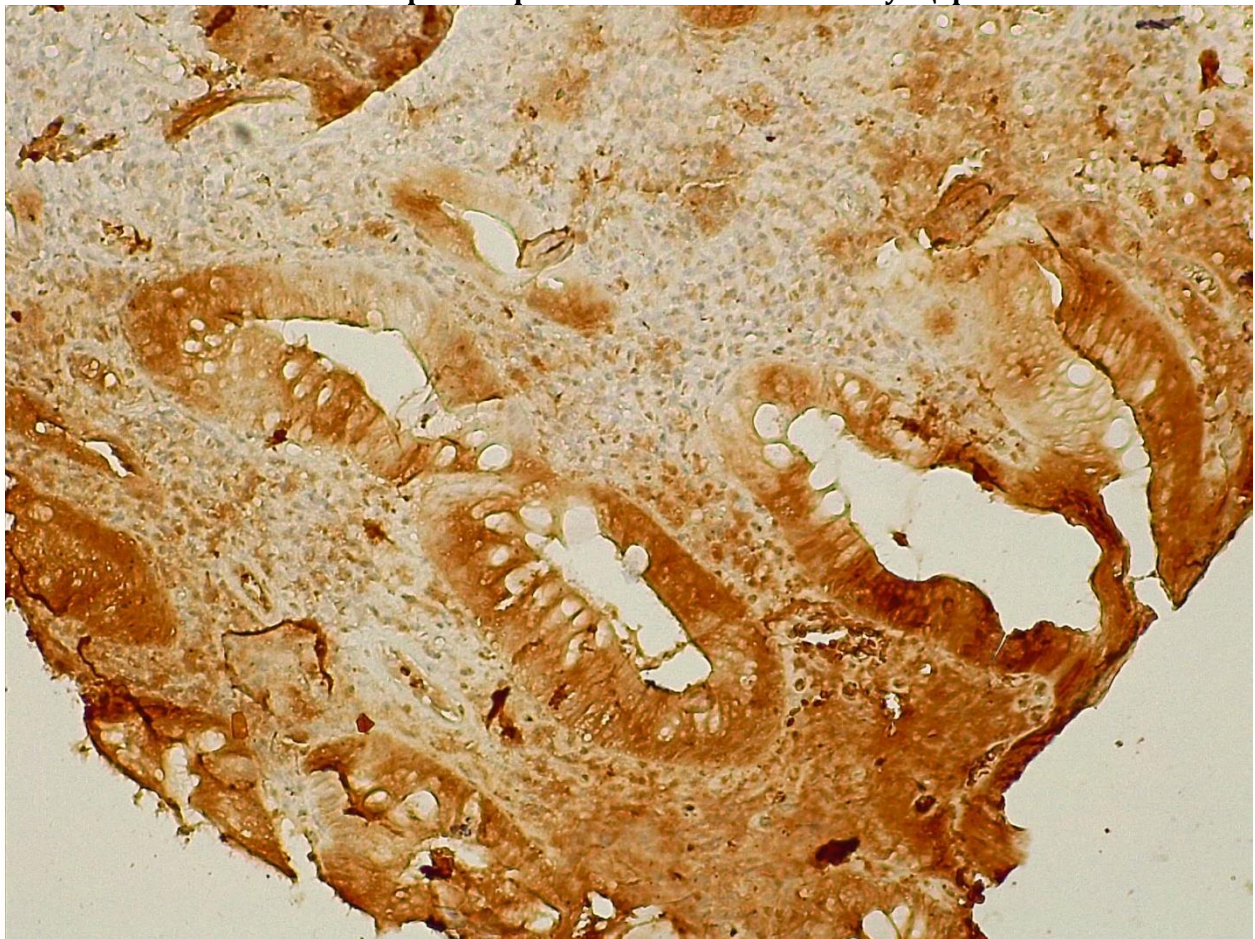
COX-2	Тежест на болестта	iNOS	Тежест на болестта	IGF-1R	Тежест на болестта
Pearson	$R=0,791$ $p=0,000$	Pearson	$R=0,659$ $p=0,003$	Pearson	$R=0,559$ $p=0,016$
Kendall's	$R=0,756$ $p=0,001$	Kendall's	$R=0,614$ $p=0,005$	Kendall's	$R=0,534$ $p=0,021$
Spearman's	$R=0,794$ $p=0,000$	Spearman's	$R=0,645$ $p=0,004$	Spearman's	$R=0,561$ $p=0,016$

Сред iNOS позитивните пациенти, тежестта на заболяването бе по-висока спрямо iNOS негативните пациенти вземайки в предвид тоталния Mayo and CDAI сора ($R=0,659$ $p=0,003$).

COX-2 беше значително високо експресиран при тежка болест на Крон и улцерозен колит на базата на изчисления с теста на Spearman ($R=0,794$, $p=0,001$).

Обратно на това сред анализираниите пациенти с активно ВЧЗ се отчете и ниска COX-2 експресия <10%, **снимка 13**.

Снимка 13: ниска COX-2 експресия при хистологично активен улцерозен колит



VII. ОБСЪЖДАНЕ

Тази студия показва за първи път едновременната оценка на експресията на онкогенни сигнализиращи маркери в дебелочревна тъкан при пациенти с колоректален карцином, пациенти с полипи на дебелото черво с различна степен на епителна дисплазия и при пациенти с възпалителни чревни заболявания (болест на Крон и улцерозен колит).

КРК и полипи на дебелото черво

На базата на получените резултати, IGF-IR позитивна експресия (IGF-IR \geq 16%) бе установена в 89% от случаите с КРК. Weber *и други* описват позитивна имунохистохимична реакция за IGF-IR в 91% от изследваните колоректалните клетки. Накат *и други* също наблюдават позитивна имунохистохимична реакция в 96% от изследваните тумори. Авторите установяват засилена IGF-IR експресия в корелация с хистопатологичната степен на диференциация и анатомопатологичното разпространение на КРК. Според тези изследователи, по-висока експресия на IGF-IR може да подпомогне образуването на метастази. Нашите данни не показаха връзка между IGF-1R експресията и наличието на метастази при КРК, независимо дали са чернодробни, белодробни или други такива. Вероятно това се дължи на факта че сред пациентите с КРК, дялът с наличие на метастази бе много малък (общо 8 пациента).

Слаба връзка бе установена между експресията на COX-2 в туморните клетки и наличието на метастази от КРК (R=0,281, p=0,012).

От друга страна, нито Adenis нито Zenilman, които са изследвали експресията на IGF-IR и РНК при пациенти с колоректален карцином, са установили повишена експресия на IGF-IR в колоректални ракови клетки. Noshu *и*

други намират повишена експресия на IGF-1R в 37.8% от изследваните КРК. Констатациите, отчетени от Pollak *и други* обясняват несъответствията между настоящите резултати и по-голямата част от данните от литературата. Тези автори са показали, че по-ниска **IGF-1R** експресия може да се наблюдава при висока степен колоректални карциноми, включително карцином на простатата.

IGF-1R експресията бе до голяма степен еднакво отрицателна при хиперпластични дебелочревни полипи и при здравите контроли ($R=0,743$, $p=0,000$). Shan HB и Zhang R показаха че няма значими разлики експресията на IGF-1R в възпалителни дебелочревни полипи спрямо нормалната мукоза на дебелото черво чрез Mann-Whitney U test ($p=0.251$). Въпреки това, тубуларните и вилозните аденоми експресираха значително по-високи нива на **IGF-1R** ($p=0.000$). От нашите имунохистохимични изследвания се отчете статистически значима разлика в средните стойности на тъканната експресия на **iNOS** ($p= 0,000$), **COX-2** ($p= 0,022$) и **IGF-1R** ($p= 0,001$) между хиперпластични полипи и аденоми с висока епителна дисплазия. Тези резултати донякаде следват логиката на нещата като се има предвид ниския малигнен риск при хиперпластичните полипи и високия такъв при аденомите с високостепенна епителна дисплазия.

Сигнификантна статистическа разлика се отчете и между средни стойности на експресия на сигналините молекули между здравите лица и пациентите с аденом с нискостепенна епителна дисплазия ($p= 0,000$).

Нашите данни показаха слаба връзка между експресията на iNOS и **локализацията** на полипите в дебелото черво ($R=0,272$, $p=0,016$).

Не бяха установени значителни асоциации между IGF-1R, COX-2, iNOS и **възрастта** както и **пола** на изследваните пациенти ($R=0,388$, $p=0,000$).

Подобно на това, Wasilewicz MP. u Kolodziej B. не доказаха разлики между експресията на COX-2 и възрастта и пола.

Доказахме средно до силна значима асоциация на IGF-1R ($R=0,743$, $p=0,000$), COX-2 ($R=0,696$, $p=0,000$), iNOS ($R=0,578$, $p=0,000$) с хистологично естество на заболяването.

Отчетохме значително по-ниска експресия на iNOS, COX-2 и IGF-1R при здравата група хора в сравнение с пациентите с КРК и това бе статистически значимо ($p=0,000$). Zafirellis K. u Zachaki A. установяват висока имунореактивност на iNOS в цитоплазмата на епителните туморни клетки при 45,5% от анализирани пациенти. Същите не откриват статистически значима връзка между iNOS експресията и различни клинично-патологични фактори като възраст, пол и туморна локализация.

Не се установиха значими разлики в средните стойности на експресия на **iNOS** ($p= 0,030$), **COX-2** ($p= 1,000$) и **IGF-1R** ($p= 0,648$) между пациенти с дебелочревни аденоми с нискостепенна епителна дисплазия и аденоми с високостепенна епителна дисплазия. Разлики не се установиха вероятно поради сравнително малкия брой пациенти с аденоми включени в студията.

Не се установиха разлики в средната аритметична експресията на **iNOS**, **COX-2** и **IGF-1R** между здравите хора и пациентите с наличие на хиперпластични полипи ($p=0,000$). Значителни бяха и разликите в средните стойности на експресия на **трите онкогенни маркера** между пациенти с хиперпластични дебелочревни полипи и пациентите с КРК ($p= 0,000$).

Това се обяснява до голяма степен с ниския потенциал на хиперпластични полипи да малигнизират в посока на КРК и поради тази причина ендоскопския и хистологичния контрол не е толкова чест.

Оценката на експресията на COX-2 при аденоматозни полипи и КРК ще се окаже много важна. Проспективни кохортни проучвания с дългосрочен прием на Аспирин и други нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС) са показали намаляване на честотата на колоректални аденоматозни полипи, КРК и смъртността от КРК от 40% на 50%. Клинични проучвания са показали че приема на Сулиндак- често приемано и изписвано НСПВС на пациенти с ФАП е свързано със значимо намаляване на броя и размера на аденоматозните дебелочревни полипи.

Оценката на броя на клетки с положителна имунохистохимична реакция за IGF-1R може да има сериозен принос терапията на КРК както и блокиране на канцерогенезата при преканцерозите. Както е показано в някои публикации, блокирането на IGF-1R може да стимулира апоптоза на ракови клетки. Противораковата терапия на основата на действието върху една от осите GH-IGF-IGFR води до високи очаквания, особено при колоректален карцином. Редица изследвания са показали, че IGF-1R е най-перспективния таргет в противораковата терапия.

ВЧЗ

iNOS, IGF-1R и COX-2 експресията присъства в ендотелни клетки и в имунни клетки на ламина проприя в възпалената чревна лигавица при пациенти с ВЧЗ.

В това проучване демонстрирахме наличието на висока експресия на COX-2, iNOS и IGF-1R в активна форма на улцерозен колит и болест на Крон.

Тъканна експресия на iNOS, IGF-1R и COX-2 липсваше в следните случая:

-
- в интестинална тъкан без морфологични и възпалителни изменения
-

- в чревен епител при пациенти с ВЧЗ в клинична ремисия
 - при ВЧЗ без хистологична активност на биопичните материали.
-

Не се установи COX-2 експресия в невъзпалени дебелочревни клетки, докато при болестта на Крон и улцерозния колит, COX-2 експресията беше значителна в апикалните епителни клетки и моноклеарните клетки в ламина проприя.

При пациентите с улцерозен колит, дебелочревните епителни клетки също експресираха индуцируем нитритен оксид синтаза.

Подобни резултати бяха описани от Irwin I. Singer, Douglas W. Kawa през 1998 анализиращи COX-2 експресията в епителни клетки на колона при ВЧЗ.

Свръхпроизводството на NO чрез iNOS възходяща регулация от чревния епител е пряко свързано с ВЧЗ. Това може да обясни до някаква степен и нашите резултати - повишената iNOS експресия при активно ВЧЗ. Въпреки това, механизмът чрез който NO се превръща от крайно необходим хомеостатичен регулатор във вреден деструктор остава неизвестен.

Експресията на iNOS би могла да предостави предимство за оцеляване на клетките чрез различни механизми:

1) Повишената продукция на NO инхибира каспазната активност и следователно апоптозата, като по този начин промотира и удължава абнормния клетъчен живот и канцерогенезата. Високи стойности на iNOS са били доказани при карцином на стомаха и неоплазия на колона.

2) Активацията на NF- κ B позволява пролиферация на клетки iNOS експресията се свързва с нарушена чернодробна регенерация след частична хепатектомия.

3) Производството на NO от iNOS инхибира ДНК репарационни ензими като повишената експресия на iNOS следователно може да доведе до появата на потенциални туморогенни клетки, съдържащи ДНК мутации. Това наскоро беше изтълкувано в патогенезата на холангиокарцинома.

Висока експресия на IGF-1R беше също намерена при УК и БК. Обратно, в здравите контроли, без чревно възпаление, не се установи експресия на IGF-1R в нито един от слоевете на стената на червата.

F. El Yafi, R. Winkler показали че увеличението на абсолютния брой на IGF-1R положителни възпалителни клетки в ламина проприя и субмукозата на пациенти с болест на Крон корелирало във висока степен с наличния възпалителен инфилтрат.

Въпреки това, те демонстрираха също така относително увеличаване на дела на възпалителните клетки положителни за IGF-1R при БК.

Един от механизмите, чрез които IGF-1R експресията може да допринесе за увеличаване на имунния възпалителен инфилтрат е чрез индуциране на резистентността към апоптоза. Докладвано е, че IGF-1-медирана активация на PI3-киназа / Akt допринася за нормалното оцеляване Т-клетките и че експресията на IGF-1R е повишена в активирани Т-клетки, което ги предпазва от Fas- индуцирана апоптоза.

Демонстрирана бе връзка между тежестта на заболяването и iNOS, IGF-1R и COX-2. Пациенти с усложнена и тежка болест на Крон и улцерозен колит имат по-висока iNOS, IGF-1R и COX-2 експресия в биопсични проби в сравнение с по-леките форми на БК и УК.

Нашите резултати показаха, че iNOS, COX-2 и фекалния калпротектин бяха значително увеличени по време на активно чревно възпаление при ВЧЗ.

Reinders Claudia A., D. Jonkers и други показали в едно проучване че пациенти с ВЧЗ имат значително по- високи стойности на NO и калпротектин в сравнение със здрави доброволци($p < 0.001$). В допълнение, съдържанието на нитрати е леко повишено при пациенти с ВЧЗ.

Една слаба корелация била създадена между ректалните нива на NO, активността на заболяването и броя на течни- кашави изпражнения при пациенти с ВЧЗ (Spearman's rho 0.37 и 0.51, съответно; $p < 0.05$).

ИЗВОДИ

Въз основа на резултатите, са формулирани следните изводи:

- 1) Експресията на iNOS, COX-2 и IGF-1R при **КРК** беше значително по-висока спрямо здравата група лица. Експресията на IGF-1R беше най-висока при КРК в сравнение с другите имунохистохимични маркери като iNOS бе най-ниска. Не се установи връзка между стадия на КРК и експресията на онкогенните маркери. Не се установи връзка между степента на експресия на маркерите и локализацията на тумора в дебелото черво.
- 2) Експресията на iNOS, COX-2 и IGF-1R беше значително по-висока при **дебелочревните аденоми** с ниска и висока степен на епителна дисплазия в сравнение с експресията при **хиперпластични полипи** и здрави лица. Нямаше значима разлика в степента на експресия на iNOS, COX-2 и IGF-1R между аденом с нискостепенна епителна дисплазия и такъв с високостепенна епителна дисплазия. Не се установи връзка между степента експресията на маркерите и локализацията на полипа в дебелото черво.
- 3) Експресията на iNOS, COX-2 и IGF-1R беше по-висока при пациенти с **болест на Крон** и **улцерозен колит** спрямо здрави лица. Значително по-висока беше експресията на посочените маркери при хистологично и клинично активно ВЧЗ в сравнение с ВЧЗ в стадий на ремисия. Пациентите с наличие на усложнения вследствие на ВЧЗ (стеноза, фистула) имаха по-висока експресия на по-горните маркери спрямо ВЧЗ без усложнения.

4) IGF-IR, COX-2 и iNOS играят важна роля като сигнални молекули в морфологичното изменение на лигавицата при възпалителни и преканцерозни заболявания с подтискане на апоптозата, инициране и подпомагане прогресията на **неопластична трансформация** на клетките в туморни такива.

ПРИНОСИ:

- Изследвахме онкогенните сигнализиращи маркери (IGF-1R, COX-2 и iNOS) в генетично еднородна популация- българската
- Едновременно са изследвани и трите маркера заедно сред български пациенти
- Маркерите биват изследвани сред различни заболявания, но участващи по оста преканцероза-дисплазия-рак
- Резултати показват, че IGF-1R, COX-2 и iNOS може да се разглеждат като имунохистохимични биомаркери за оценка етапа и риска за канцерогенезата по оста лигавица-възпаление/полип-рак

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Милачков Л. Експресия на IGF- 1R в дебелочревни полипи с различна степен на дисплазия и ролята му в патогенезата на колоректалния карцином. Българска хепатогастроентерология. 2013, кн.2, стр. 45-48.

2. Milatchkov L., Dikov T., Kioseva D., Ivanova R., Nikolov R. Oncogenic signaling markers expression (COX-2, INOS and IGF-1R) in Bulgarian IBD patients: a pilot study. Journal of current research in science. April 2016. ISSN 2322-5009

3. Milatchkov L., Panova D., Spassova Z., Nikolov R. Adalimumab efficacy in Bulgarian patients with Crohn's disease in a single study center. Medinform. 2014,1,19-27

4. Милачков Л., Дереджян С., Спасова З., Николов Р. Ограничение на биологичната терапия при Болест на Крон. Орална презентация на ИМАВ (International Medical Association Bulgaria), 09-12 Май 2013, Варна, България

5. Milatchkov L., Panova D., Deredjan S., Nikolov R., Spassova Z., Mateva L., Krastev Z. Clinico- epidemiological characteristic of Bulgarian patients with Inflammatory Bowel Disease. Oral presentation, 27 september 2014. Bucharest, Romania.

6. Milatchkov L., Velikova T., Panova D., Ivanova-Todorova E., Kyurkchiev D., Nikolov R., Spassova Z. Long term efficacy of Adalimumab therapy in Crohn's disease and Potential of one-step card tests for faecal calprotectin and faecal lactoferrin in evaluation of IBD patients. Two posters 30-31 May 2014 FALK, Paris, France.

7. Milatchkov L., Panova D., Deredjan S., Spassova S., Krastev Z. Clinico- epidemiological characteristic of Bulgarian patients with inflammatory bowel disease. IMAV oral presentation (International Medical Association Bulgaria), 14-17 May 2015, Varna, Bulgaria

8. Milatchkov L., Panova D., Deredjan S., Nikolov R., Spassova Z., Mateva L., Krastev Z. Clinico-epidemiological characteristic of Bulgarian patients with Inflammatory Bowel Disease. Gastro-update-europe.eu. Poster, June 2015, Budapest, Hungary.

9. Милачков Л., Панова Д., Кьосева Д., Дереджан С., Иванова Р., Николов Р., Спасова З., Матева Л. Ефект от лечението с Адалimumаб при улцерозен панколит /клиничен случай/. Презентация на Национален конгрес по гастроентерология, юни 2015, Бургас, България.

Благодаря Ви!

На семейството ми

На проф. З. Кръстев, на д-р Т. Диков и целия екип от клиниката по гастроентерология, УМБАЛ "Св. Иван Рилски"