

УНИВЕРСИТЕТСКА СПЕЦИАЛИЗИРАНА БОЛНИЦА
ЗА АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ ПО ОНКОЛОГИЯ

ПРОФ. ИВАН ЧЕРНОЗЕМСКИ

КЛИНИКА МЕДИЦИНСКА ОНКОЛОГИЯ

Д-р Ихсан Исмаил Хасан

**Тумор-асоциирани макрофаги при карцином на маточната шийка:
клинико-патологични корелации**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА
СТЕПЕН „ДОКТОР“

Професионално направление: 7.1. Медицина

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: ОНКОЛОГИЯ

Научни ръководители:

Доц. д-р Ася Консулова, д.м.

Доц. д-р Велизар Шиваров, д.м.

2026

София

Дисертационният труд е представен в обем 130 страници и съдържа 8 таблици и 36 фигури. Литературната справка включва 210 заглавия. Дисертационният труд е обсъден и одобрен за публична официална защита на Разширен научен колегиум на УСБАЛО Проф. Иван Черноземски с Протокол №31 / 30.04.2026 и съгласно Заповед 3-1691 #1/ 14.05.2026 на Изпълнителния директор на УСБАЛО Проф. Иван Черноземски, София докторантът д-р Ихсан Исмаил Хасан е отчислен с право на защита. Със Заповед 3-1691 #2/ 14.05.2026 на Изпълнителния директор на УСБАЛО Проф. Иван Черноземски, София е избрано научно жури в състав:

Външни членове:

1. Доц. д-р Иван Недков Иванов, д.м., МУ – Плевен, Факултет по Медицина, Катедра Патологоанатомия, УМБАЛ *Георги Странски*
2. Доц. д-р Ангел Данчев Йорданов, д.м. – МУ – Плевен, Факултет по Медицина, Факултет *Здравни грижи*, Катедра *Акушерски грижи*
3. Доц. д-р Стоян Георгиев Костов, д.м., Научно-изследователски център, МУ – Плевен, Клиника по Гинекология, МБАЛ Света Анна, Варна

Резервен външен член: доц. д-р Весела Иванова Тодорова, д.м., Катедра Обща и клинична патология, МУ София

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Иглика Спасова Михайлова, д.м., УСБАЛО Проф. Иван Черноземски ЕАД, София
2. Проф. д-р Здравка Гърдева Валерианова, д.м.н., УСБАЛО Проф. Иван Черноземски ЕАД, София

Резервен вътрешен член: доц. д-р Лидия Иванова Чавдарова, д.м., УСБАЛО Проф. Иван Черноземски ЕАД, София

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 30.07.2026 г. (четвъртък) от 12.00 часа в Аула на УСБАЛО Проф. Иван Черноземски ЕАД, София

Материалите по защитата са на разположение в Научния отдел на УСБАЛО Проф. Иван Черноземски ЕАД, София и на интернет страницата на институцията

СЪДЪРЖАНИЕ

I.УВОД	4
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III.КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ	8
1.Материална база за реализиране на дисертационния труд	8
2.Пациентска популация	8
3.Рутинни клинични изследвания и биологични маркери.....	8
4.Медицинска история на пациентите.....	10
5.Информация за онкологичната болест	10
6.Специфични методи на изследване	10
7.Клинична и патологична стратификация на пациентската популация (подгрупи).....	11
8.Статистически дизайн и анализ	16
IV.РЕЗУЛТАТИ	18
1. Клинични и патологични корелации на експресията на CD47 от туморните клетки ..20	
2. Клинични и патологични корелации на експресията на CD68 в интратуморни имунни клетки (TAM)	26
3. Клинични и патологични корелации на експресията на CD68 в перитуморни (стромални) имунни клетки (TAM)	33
V.ДИСКУСИЯ	43
VI.ИЗВОДИ	46
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	46
1. Приноси с научно-теоретичен характер	46
2. Приноси с научно-практичен характер	46
VIII. ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	47
1. Публикации в пълен текст	47
2. Научни съобщения	47

I. УВОД

Карциномът на маточната шийка (КМШ) е сериозен медицински проблем със значително влияние върху здравето на жените в България и по света. Според *Globocan* през 2020 има 5,7% увелечение на заболяемостта спрямо 2018 година в световен мащаб. С течение на времето сме свидетели на значителен напредък в профилактиката, диагностиката и лечението на тази форма на онкологична нозология, но предвид нейната висока смъртност и възможността за ранна прогресия и рецидиви, необходимостта от иновативни прогностични индикатори е налице. Изучаването на тъканната експресия на CD47 и CD68 като потенциални прогностични биомаркери представлява значителен интерес в този контекст.

CD47 е гликопротеин, с важна роля в регулацията на имунитета и туморния растеж, докато CD68 е маркер за макрофагите, които играят ключова роля в имунната реакция. Разбирането на взаимодействието между тези молекули и техните нива на експресия в тъканите на пациентите с КМШ може да предостави ценна информация за участието на имунната система в развитието на болестта.

Настоящата дисертация има за цел да проучи ролята на CD47 и CD68 в контекста на КМШ и да допринесе за по-доброто разбиране на молекулярните механизми зад развитието на тази патология. Чрез детайлен анализ на тъканни проби и корелации с клинични данни, се надяваме да идентифицираме потенциални предиктори за прогноза (прогностични биомаркери), които да променят практиката на лечение и да подобрят крайните онкологични резултати за пациентите.

КМШ е четвъртата най-често срещана онкологична болест при жените след карциномите на гърда, дебело черво и бял дроб. През 2018 приблизително 570 000 жени са били диагностицирани с КМШ по света и около 311 000 жени са починали от болестта, като някои от тези случаи биха могли да бъдат предотвратени ако бяха ефективно ползвани програми за ваксиниране срещу hrHPV и програми за вторичен скрининг.

Повечето от публикуваните проучвания, отчитащи наличието на TAM (CD68) върху ТМС, съобщават за връзката им с прогресията на тумора и по-лош изход от болестта (186, 187). Същото изглежда се случва и при КМШ (188). Много публикации изследват и предполагат решаваща роля на TAM (CD68) в прогресирането на много видове онкологични болести. Наскоро едно проучване се фокусира върху ролята на макрофага при гинекологични малигнени туморни заболявания, но данните за пациенти с КМШ са минимални (189).

Докато инфилтрацията на макрофагите е свързана с напреднал стадий на КМШ и по-лош изход от болестта, се наблюдават и противоположни заключения (190). Като цяло, в сравнение с нормалните тъкани, плътността на макрофагите е повишена както при

прекурсорните лезии, така и при вече диагностициран КМШ. Съобщава се за по-висока плътност на ТАМ при инвазивна болест, което е в съгласие с проучванията, свързващи броя/плътността на ТАМ с лоша прогноза (191), както и при КМШ, така и при други видове солидни малигнени тумори като карцином на гърда, стомах, или тумори на глава и шия.

Въпреки това проучванията съобщават за изключения, при които броят на макрофагите не корелира нито със стадий на тумора, нито с преживяемост (190). Докато изучават клиничното и функционалното значение на ТАМs, *Ding et al.* наблюдава обогатяване на макрофаги в ракови гнезда в сравнение с по-слабо развити лезии и нормална тъкан, но не открива значима корелация със стадий по FIGO (192).

Установено е, че М2 ТАМs са повишени в неопластична тъкан (193) и се съобщава за тясна връзка между тежестта на лезията и повишената плътност в М2 макрофагите (194). Освен това, CD163+ макрофагите демонстрират по-силна корелация с напредналия стадий на FIGO и лимфните метастази, отколкото CD68+ клетките (195). Друга работа идентифицира връзката между М2 ТАМs и моделите на инвазия при ПКК на маточна шийка, забелязвайки значително увеличение на съдържанието на М2 макрофаги в масиви от туморни тъкани с модели на дифузна инфилтрация (193). Освен това *Petrillo et al.* са показали, че диференциацията на макрофагите в М2 може да доведе до резистентност към терапии с платина, което е в съответствие със заключението на проучвания за различни видове солидни туморни болести, които показват доказателства за намален ефект от химиотерапия и лъчелечение (188, 196). *Dijkgraaf et al.* потвърдиха своите резултати, като показаха, че химиотерапевтичните агенти индуцират пролиферацията на макрофаги тип М2, което може да доведе до индиректна резистентност към противотуморно лечение (197).

Независимо от вида на изследването, ясно е, че увеличаването на ТАМs е индикатор за по-лоша прогноза (198) и че инфилтрацията на ТАМ корелира с прогресията на болестта при пациенти с КМШ (199). Взети като цяло, тези открития предполагат, че ТАМ благоприятстват разпространението на онкологичните болести и лимфната инвазия във взаимодействие с туморните клетки (81). Въпреки това, някои проучвания имат ограничението да не дискриминират фенотипове на макрофагите (200, 201). В допълнение, М2 ТАМs може също да причиняват по-лоша прогноза (202), разкривайки капацитет за стимулиране на тумори, демонстриран в няколко работи (188, 194, 203). Намаленото съотношение М1/М2, както се съобщава от *Petrillo et al.*, може да обясни, поне до известна степен, тежестта (188) и е благоприятно за прогресията на тумора (204).

Доколкото ни е известно, няма проучване относно ефекта на фенотипа М1 при пациенти с КМШ. Въпреки това, този фенотип се свързва с по-високо очакване за преживяемост при пациенти с недребно клетъчен белодробен карцином (205),

подчертавайки контрастиращите роли на макрофагите и необходимостта от разграничаване на техните фенотипове поради техните различни ефекти. Намаленото съотношение M1/M2 е от голямо значение за изхода от болестта и последиците (188) за резултата от баланса на M1 и M2 поради антагонистичните активности на тези фенотипове (188, 194).

Вариациите, наблюдавани между резултатите, изразени в литературата, особено във връзката между стадите на болестта, повишените TAM и прогнозата, могат да отразяват разлики, свързани с размера на пробата, използваните антитела, степента на тумора или стадия; въпреки че същата методология е приложена за оценка на плътността на TAM в тумори.

За CD47 при пациенти с КМШ има само едно проучване в световен мащаб и то е на екипа на *Йорданов, Шиваров и съвт.* Първоначалните резултатите показват значителна разлика в експресията на CD47 при pT1B спрямо pT2 пациенти. Няма значителна разлика между pT2A и pT2B. Експресията на CD47 не зависи от нодалния статус и е по-висока за pT1b независимо от нодалния статус. Най-подходящият метод за определяне на този израз е използването на H-скор (62).

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Ролята на тумор-асоциираните макрофаги в туморната микросреда в процеса на карциногенезата на карцином на маточна шийка е неизвестна. Въз основа на сегашното състояние на проблема, изложен в литературния обзор и наличието на все още неразрешени научно-клинични аспекти, ние формулираме следната работна хипотеза: съществуват корелации между нивата на туморна експресия CD47 и CD68, хистологичен подвид, стадий на болестта, лимфни метастази при пациенти с КМШ, преживяемост без прогресия, общата преживяемост при КМШ.

Базирайки се на изследователската хипотеза формулираме следните изследователски цели:

1. да се проучат тъканни параметри, свързани с пътищата на туморна миграция и фагоцитоза по оста CD47-SIRPα, CD68 като предиктивни биомаркери при пациенти с карцином на маточна шийка;
2. да се проучат възможностите за клинична употреба на нивата на експресия на CD47 и CD68 в туморни проби и тяхната корелация при пациенти с карцином на маточна шийка

За постигане на поставените цели се формулират следните изследователски задачи:

1. Да се анализират нивата на експресия на CD47 и CD68 в туморни проби от карцином на маточна шийка
2. Да се изследват корелациите между експресия поотделно и съвместно на CD47 и CD68 и някои клинично-патологични характеристики:
 - 2.1. Първичен тумор (T)
 - 2.2. Лимфни възли(N)
 - 2.3. Стадий на болестта при диагноза
 - 2.4. Хистологични варианти(адено/ПКК)

III. КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ

1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

1. Ретроспективно неинтервенционално клинично изпитване, което включва пациенти с диагноза КМШ, при които е проведена хирургия в университетските болници на Медицински университет – Плевен.
2. Хистологични материали за изпитването са предоставени и от УМБАЛ *Софиямед*, София, както и от УМБАЛ *Св. Анна*, Варна.

2. Пациентска популация

Ретроспективно неинтервенционално клинично изпитване, което включва пациенти с диагноза КМШ, при които е проведена хирургия в университетските болници на Медицински университет - Плевен, България за 7-годишен период от време (1 януари 2015 до 31 декември 2021). Хистологични материали за изпитването са предоставени и от УМБАЛ *Софиямед*, София, както и от УМБАЛ *Св. Анна*, Варна. Всички материали са на пациенти с потвърдена хистология КМШ. При всички пациенти е проведено начално радикално хирургично лечение в обем радикална хистеректомия тип С1 или С2 според класификация на *Querleu-Morrow*, съпроводено с тазова / парааортална лимфна дисекция. Преди включване в научното изследване, всички пациенти са подписали информирано съгласие за участие и отделно информирано съгласие за събиране на биологичен материал (плазма, парафинови срези от туморна тъкан). Използвана е класификацията на FIGO от 2018. Всички пациенти са с болест в стадий от IB до IIB. Има и пациенти със засягане на лимфни възли във FIGO стадий IIIС, тъй като пациентите с FIGO стадий IIIА и FIGO стадий IIIВ не са кандидати за първична операция.

3. Рутинни клинични изследвания и биологични маркери

Крайният резултат е интерпретиран въз основа на три модела за отчитане: Н-резултат, резултат на *Allred* и комбиниран резултат. Трите системи класифицират карциномите в подобни, но не идентични групи.

Н-оценка (H-score)

За оценка на H-score е приложена следната формула:

$CD47 \text{ H-скор} = (\% \text{ от клетките, оцветени със слаб интензитет} \times 1) + (\% \text{ от клетките, оцветени с умерен интензитет} \times 2) + (\% \text{ от клетките, оцветени със силен интензитет} \times 3).$

Получените резултати варират от 0 до 300, където 300 е равно на 100% силно оцветени туморни клетки (3+).

Нивото на експресия е категоризирано според средната стойност на H-score: ниско (с H-score \leq 74) или високо (с H-score $>$ 74). Стойността 74 за H score е избрана, като гранична стойност в контекста на КМШ, тъй като разделя ниските (под 74) от високите (над 74) нива на експресия базирано на ROC анализ

При $<1\%$ положителни клетки с H-score = 0, това се отчита като отрицателен резултат.

Оценка по *Allred*

За оценка на резултата по *Allred* са използвани следните два показателя:

1. Пропорционален резултат (PS): 0 (без оцветяване на клетки); 1 ($<1\%$ клетъчно оцветяване); 2 (1–10% оцветяване на клетки); 3 (11–33% оцветяване на клетки); 4 (34–66% клетъчно оцветяване); 5 (67–100% клетъчно оцветяване).
2. Резултат за интензитет (IS): 0 (без оцветяване); 1 (слабо оцветяване); 2 (умерено оцветяване); 3 (силно оцветяване).

Комбинирана оценка

За комбинирания резултат са отчетени два показателя:

1. Степен на интензивност: липсва (0 точки), слаба (1 точка), умерена (2 точки), силна (3 точки).
2. Процент на положителни туморни клетки: няма положителни клетки (0 точки), 1–5% (1 точка), 6–25% (2 точки), 26–50% (3 точки), 51–75% (4 точки), 76–100% (5 точки).

Крайният резултат е получен на базата на сумиране на точките от двете категории: отрицателен резултат, с пълна/почти пълна липса на експресия (0–2 точки); слаба експресия (3–6 точки); свръхекспресия (7–8 точки).

При микроскопска оценка, CD68+-позитивни макрофаги са преброени в туморите и стромата на пет произволно избрани полета при $\times 40$ увеличение (HPF). Резултатите със среден брой до 25 ИХХ-позитивни клетки в стромална локализация и до 12 или 13 в интратуморална локализация (CD68 подтипове) са отчетени за ниска стойност на съответния клетъчен подтип. При съответно по-висок брой положителни клетки е докладвана тяхната висока интратуморална или стромална концентрация. Тези стойности са изведени на база на протоколи за оценка на конфърмационни матрици.

4. Медицинска история на пациентите

За всеки пациент в изпитването е създадено отделно медицинско досие, включващо следната информация:

Демографски данни

- *Имена:*
- *ID номер / дата на раждане:*
- *Възраст, години*

5. Информация за онкологичната болест

- *Клинична диагноза: локализация на първичния тумор, TNM стадиране, степен на диференциация*
- *Дата на операция:*
- *Обем на хирургия:*
- *Хистологичен подвид:*
- *Дата на започване на първа линия химиотерапия:*
- *T-, N-, M, G параметри на болестта*

6. Специфични методи на изследване

За всеки пациент, участващ в изследването, е изготвено едно хистологично стъкло за имунохистохимично оцветяване с хематоксилин и еозин. Предметни стъкла за (ИХХ на подтиповете имунни клетки са приготвени от съответната фиксирана във формалин, вградена в парафин (FFPE) тъканна проба. Използвана е система за визуализация *EnVision™ FLEX*, High pH, (Link), а DAKO за откриване на антитела. От тъканни проби FFPE се приготвят тъканни срезове с дебелина 2–4 µm и се поставят върху адхезивни слайдове. Всеки от изследваните пациенти е тестван с всяко от двете първични антитела (предварително разредени, готови за употреба) и система за визуализация с помощта на автоматизирана система *AutostainerLink 48*, DAKO. Всички работни процедури (включително депарафинизация и рехидратация на тъканни срезове; топлинно индуцирано извличане на антиген; инкубация с първично антитяло и със системата за откриване; визуализация на комплекса и др.) при провеждане на ИХХ анализ са извършени съгласно протоколите за съответните антитела на фирмата производител. При всеки цикъл на оцветяване са използвани външни контролни тъкани за установяване на функционалността на оцветяващите реагенти, за оценка на качеството на реакцията на оцветяване, за определяне на модела на експресия на използваните антитела и за оптимизиране на работните процедури на ИХХ, преди да се приложат към изследваните случаи.

Точкуването на положителни имунохистохимично оцветени клетки (оцветени в кафеникаво-с мембрана и/или цитоплазмена експресия за Тс; цитоплазмен за ТАМ), се извършва независимо от двата патолози, които не са запознати с клинично-патологичните данни на изследваните случаи. Понастоящем няма приета система за точкуване за CD47. 3 установени метода в имунохистохимията бяха проучени и сравнени: Н резултат, *Allred* резултат и комбинацията от двата.

За всеки пациент е избран един слайд с оцветяване с хематоксилин-еозин. От съответния фиксиран във формалин и вграден в парафин туморен блок, са оцветени по един участък с 3 µm дебелина на CD47 и друг с дебелина от 2 до 4 µm на CD68 (Clone SP279, Rb, разреждане 1:100, Abcam, UK). Използвана е имунохистохимия с визуализация *EnVision TM FLEX*, система с високо рН (DAKO) и техника *AutostainerLink 48 (DAKO)*. Извършено е топлинно медирано извличане на антиген с цитратен буфер, рН 6, преди започване на протокол за ИХХ оцветяване. Като положителна външна контрола е използвана тъкан от аденокарцином на простата, включена във всеки цикъл. Целият срез на тъканта е оценен начално при ниско увеличение, след това при голямо увеличение, като се взеха под внимание два показателя: (I) степен на интензитет — липсващ, слаб, умерен и силен и (II) процент положителни оценени туморни клетки. Отчетено е локализиране на експресията в туморни клетки (цитоплазмени/мембранни/ядрени). При определяне на положителността е включено само оцветяване на мембраната.

Крайният резултат е интерпретиран въз основа на три модела за отчитане: Н-резултат, резултат на *Allred* и комбиниран резултат. Трите системи класифицират карциномите в подобни, но не идентични групи.

7. Клинична и патологична стратификация на пациентската популация (подгрупи)

Следните клинични данни са събирани: демографски данни (имена, възраст при диагностициране, пол и др.), дата на хирургично лечение, вид хирургично лечение, локализация на първичен тумор и TNM класифициране, общо състояние според ECOG.

Следните патологични данни са събирани: характеристика на тумора – хистология, степен на диференциация и патоанатомична TNM класификация, нива на експресия на CD 47, CD 68 класификация.

Исходните клинични и патологични характеристики на пациентите са обобщени в Табл. 1.

Таблица 1. Разпределение в изследваната кохорта български жени с КМШ по основни демографски и клинични характеристики. Използвани означения: *p-стойността е от тест на Shapiro за нормално разпределение; **p-стойността е от χ^2 тест.

Параметър	Стойност	p
Възраст		
Медиана	51	
Обхват	25-82	p=0.174*
Хистологичен подтип (n)		
Сквамозен карцином	151	p<10 ⁻¹⁶ **
Аденосквамозен карцином	14	
Аденокарцином	26	
Т статус (n)		
pT1b	152	p<10 ⁻¹⁶ **
pT2a	19	
pT2b	20	
N статус (n)		
N0	136	p<10 ⁻⁸ **
N1	55	

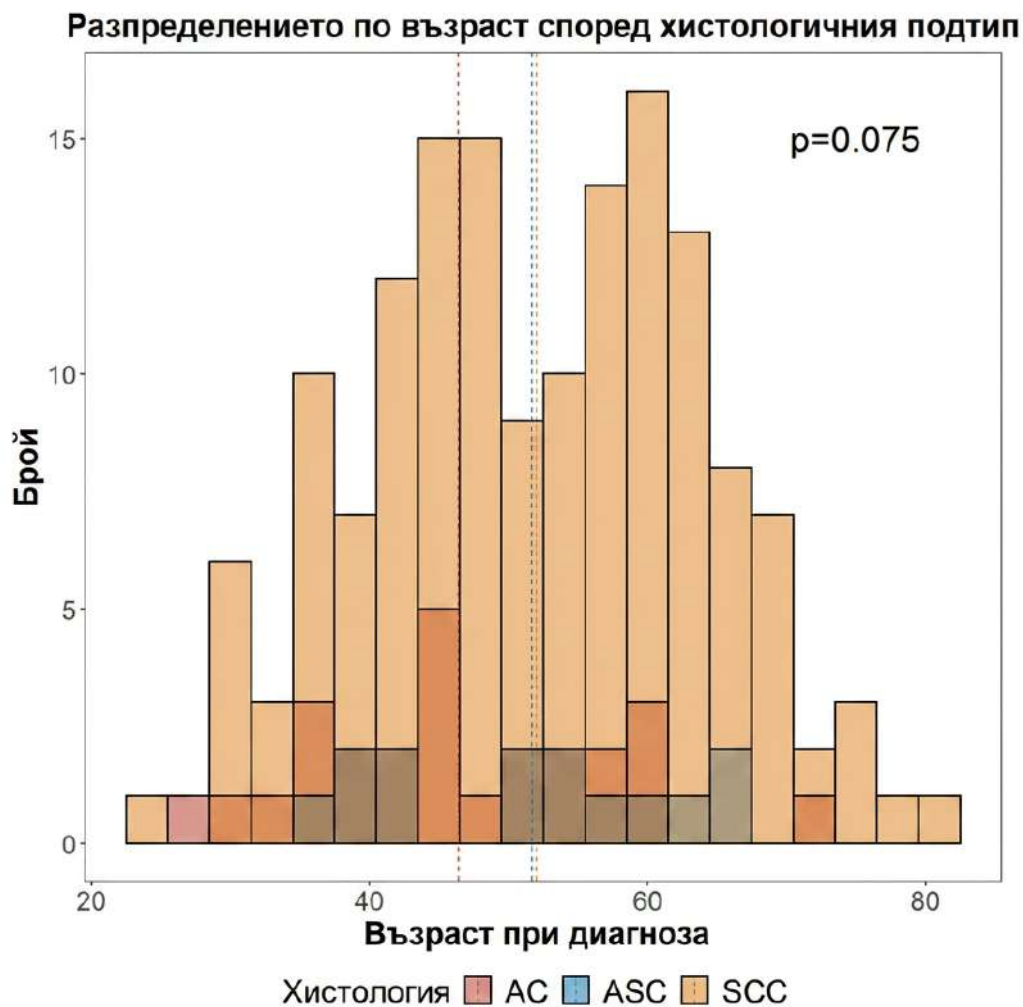
• Клинична стратификация и разпределение по групи

В настоящото проучване са обхванати 191 пациентки на възраст между 25 и 82 години, като 151 от тях са със сквамозен карцином, 14 са с аденосквамозен тип и 26 са с аденокарцином. При всички от тях е извършена радикална хистеректомия като при 4 от пациентките не е извършена лимфна дисекция. Това са пациентки, при които злокачественият процес се установява следоперативно по време на хистологичното изследване на пациентките.

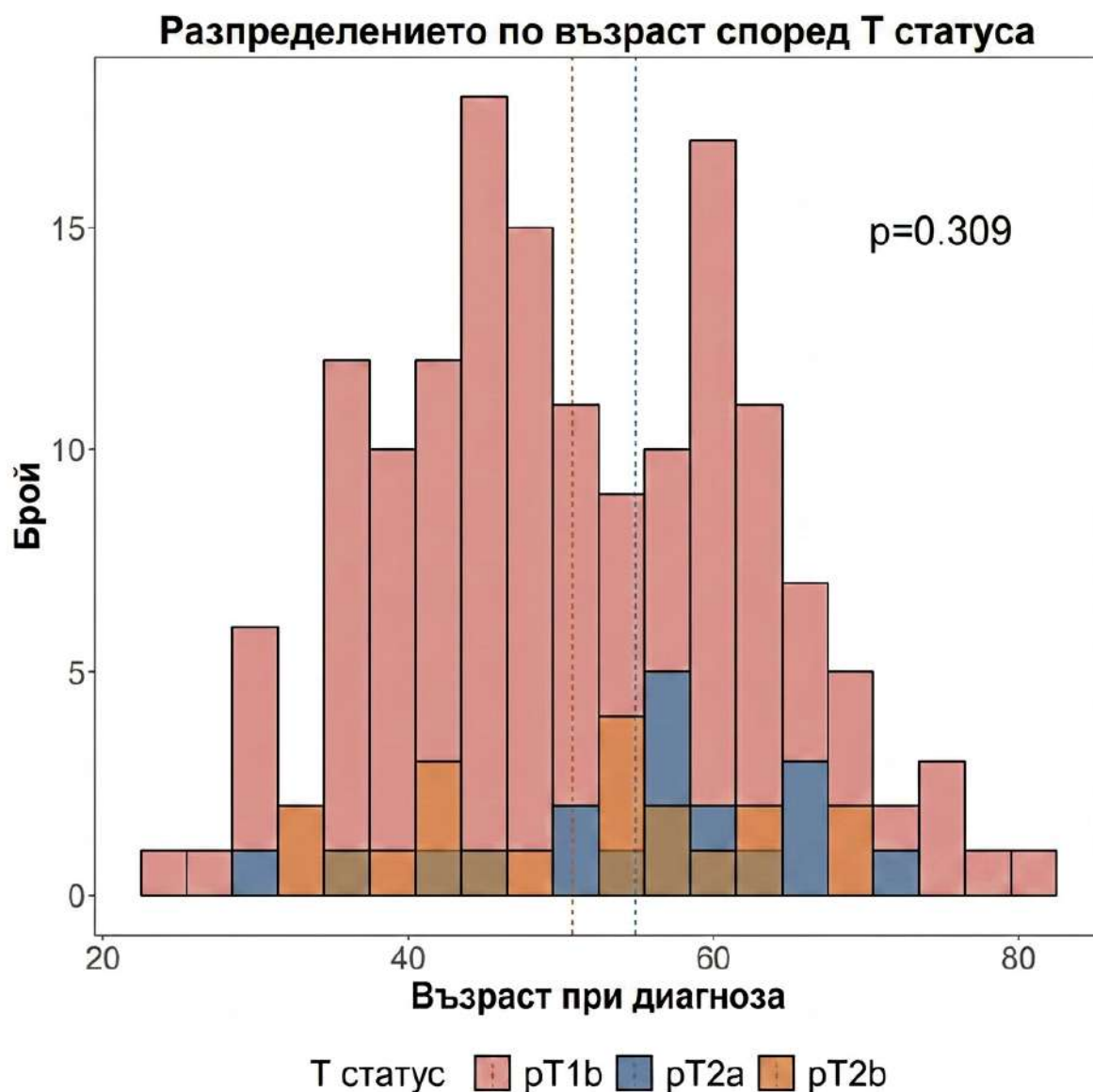
Предварително определените биомаркерни анализи включват изследване на два тъканни биомаркера (нива на експресия на CD 47 и CD 68), изследвани от първичните карциномни лезии.

• **Разпределение по групи**

Фиг. 1 онаглеждава разпределението по възраст спрямо хистологичен подвид на болестта при изследваната популация (N = 191). Преобладаващата възраст на изява и диагноза на КМШ е между 40 и 70 годишна възраст като варира в широки граници 25 – 82 години. Основният хистологичен тип е плоскоклетъчен карцином и той се установява при 79.05% от пациентките (N = 151). Аденокарцином се диагностицира при 13,6% (N = 26) и аденосквамозен съответно при 7,33% (N = 14). Липсва статистическа значимост между вида на диагностициран карцином (ПКК, АК или аденосквамозен карцином) и възраст при диагноза ($p=0.075$).



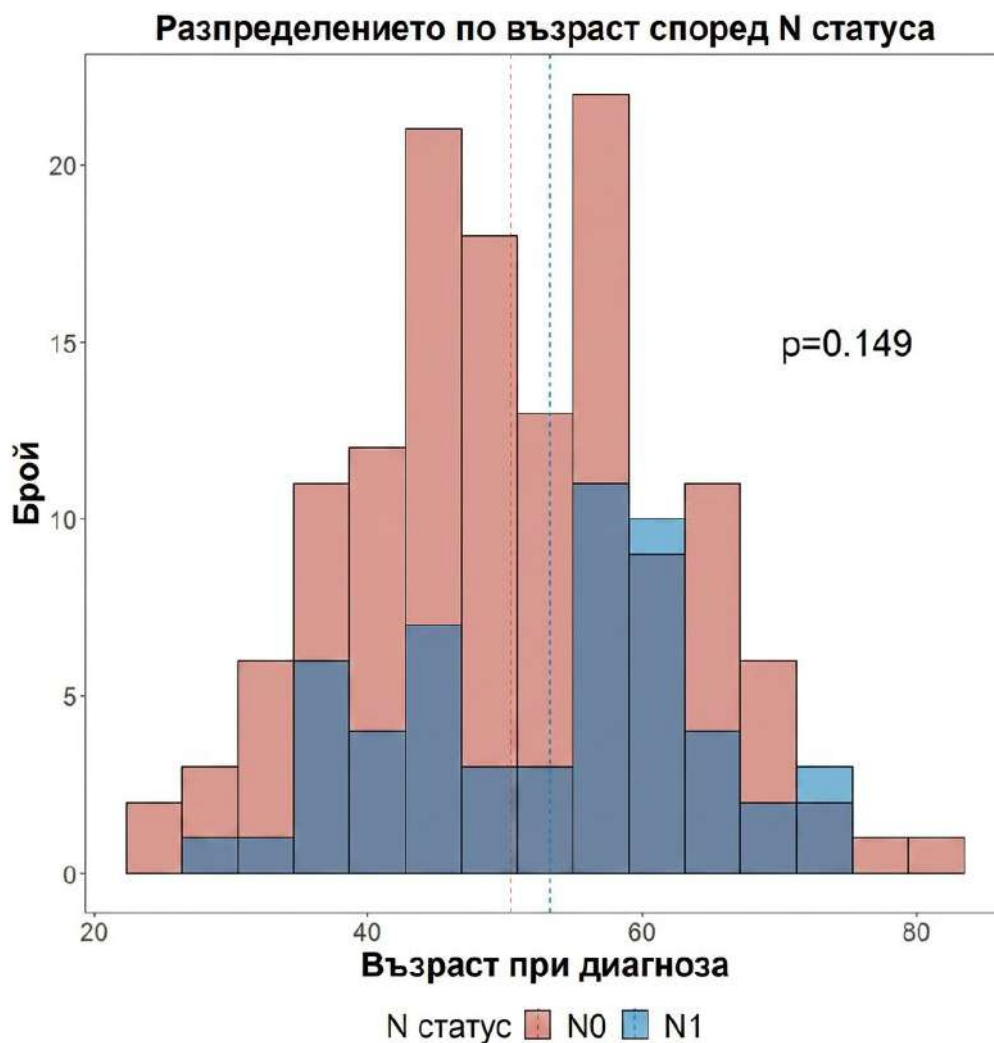
Фигура 1. Разпределение по възраст спрямо хистологичен подтип на тумора. Стойността на p е от двустранен Kruskal-тест за продължителни променливи.



Фигура 2. Разпределение по възраст според размера на първичен тумор. Стойността на p е от двустранен Kruskal-тест за продължителни променливи.

Фиг. 2 онагледява разпределение на стадий на първичния тумор (pT1b, pT2a или pT2b) според възрастта. Предвид факта, че при изследваната група пациентки изборът на начално лечение е хирургия, са анализирани само ранните стадии pT1b, pT2a и pT2b.

Видно от данните основният стадий при диагноза на болестта при изследваните жени е pT1b – 79,58 % (N = 152). Това разпределение касае пациентки, подложени на хирургия, поради което са включени само изброените стадии pT1b -79,58 % (N =152), pT2a – 9,95% (N =19) или pT2b -10,47 % (N =20). Не се установява статистическа значима корелация между възрастта на пациентките при диагноза КМШ и стадий на болестта при диагноза ($p=0.309$).



Фигура 3. Разпределение по възраст според нодалния статус. Стойността на p е от двустранен T -тест за продължителни променливи.

Фиг. 3 представя разпределението на пациентите ($N = 191$) по следоперативен нодален статус (pN) спрямо възраст (граници 25 – 82 години). Не се установява статистически значима корелация между възраст при диагноза и честота на регионално нодално засягане ($p=0.149$). При 71,3 % от пациентките ($N = 136$) не се установява нодално метастатично засягане ($pN0$) и при 28,7 % ($N = 55$) е налично такова, класифициращо стадий $pN1$.

Обобщени данни за всички изследвани асоциации между клинични показатели и инфилтрацията от CD68+ и степента на експресия от CD47 са представени в Таблица 2.

8. Статистически дизайн и анализ

Всички имунохистохимични маркери са кръстосано обобщени спрямо основните клинични и патологични параметри като възраст (дефинирана като категорична променлива с гранична стойност от 50 години), T стадий, N стадий и хистологичен подтип. Получените таблици за контингентност бяха анализирани с помощта на точния тест на Фишър поради ниския брой на някои клетки в таблиците за контингентност. p -стойности под 0,05 бяха считани за значими. Мултивариантни линейни регресии за всичките три имунохистохимични фагоцитозни маркера бяха извършени, като всички налични клинични и патологични параметри бяха използвани като ко-променливи. Кривите на преживяемост за подгрупи пациенти, дефинирани чрез имунохистохимични маркери, бяха построени с помощта на метода на *Kaplan-Mayer* и анализирани за статистическа значимост с помощта на *log-rank* тест. Кривите на *Kaplan-Mayer* са нанесени на графика и анализирани с помощта на пакета *survminer* за R 0.4.9. Мултивариантният модел на *Cox* беше настроен за оценка на общата преживяемост, използвайки всички клинични и патологични параметри като ко-променливи. Това беше извършено с помощта на пакета за преживяемост за R. Кумулативните функции на честотата за риск от смърт от неопластично заболяване или друга причина бяха оценени с помощта на метода на Каплан-Майер и нанесени на графика с помощта на пакета *survminer* за R. Многовариантният *Fine-Gray* модел за оценка на ефекта на ковариациите върху риска от смърт от неопластично заболяване беше извършен с помощта на пакета за регресия на риска за R. Резултатите от многовариантните статистически модели са представени с помощта на пакети *forest model* или *forest plot* за R. Всички статистически анализи са извършени с помощта на R v. 4.3.1 за *Windows*.

Статистическият анализ е осъществен чрез програмен пакет SPSS версия 23 и включва следните методи:

- (1) Дескриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност, стандартна грешка на средната, минимални и максимални стойности, медиана.
- (2) Непараметрични методи:
 - Kolmogorov–Smirnov Test: тест за проверка на нулевата хипотеза и определяне на типа на разпределение на стойностите с оглед подбор на параметричен или непараметричен корелационен метод за анализ.
- (3) Параметрични методи:
 - Student t-test: тест за сравняване на средните стойности между две групи от случаи

(4) Статистическо изследване на зависимости чрез корелационен анализ:

- чрез определяне коефициент на Spearman (непараметричен метод) и/или
- чрез коефициент на Pearson (параметричен метод)
- χ^2 -test или Fisher exact test

(5) Kaplan–Meier Test за преживяемост.

(6) Cox регресионен модел за унивариантен анализ с цел подбор на фактор с независимо прогностично значение.

(7) Алтернативен анализ за сравняване на относителни стойности.

(8) Графично изобразяване на статистическите данни.

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0.05$ при доверителен интервал 95%.

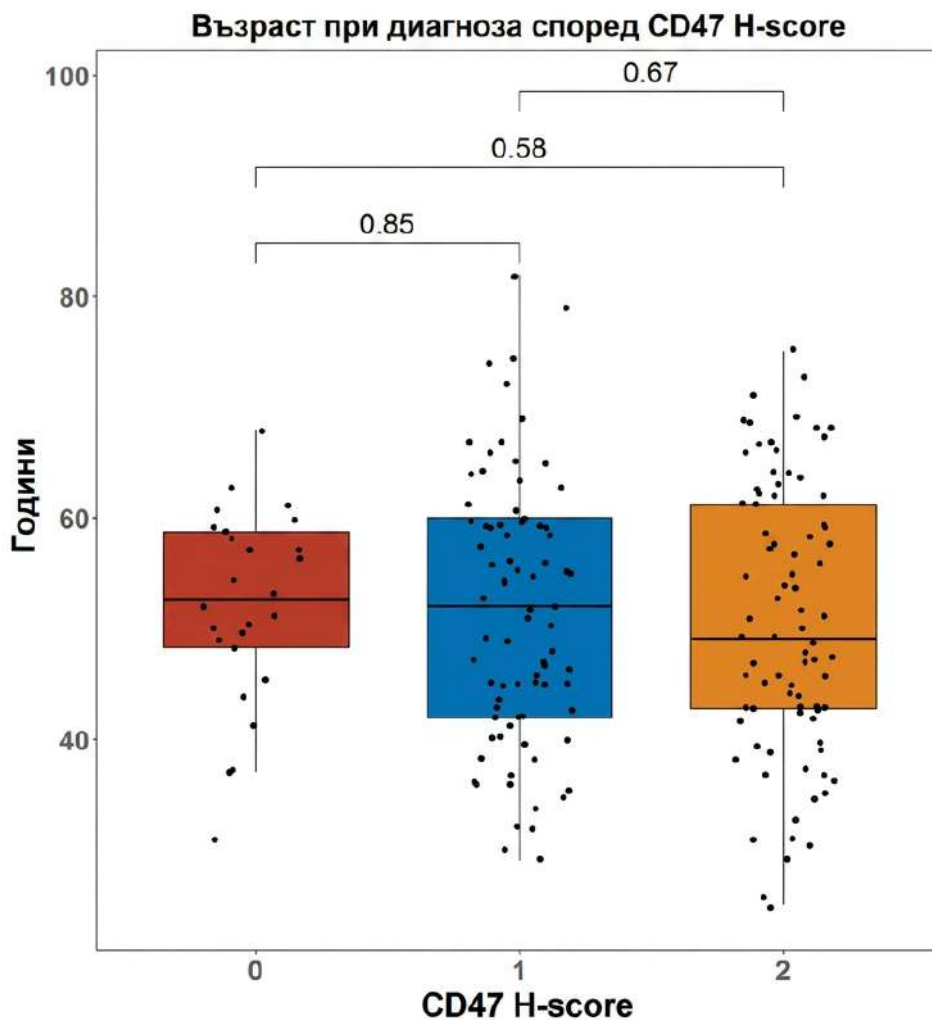
IV. РЕЗУЛТАТИ

Таблица 2. Обобщени данни на всички изследвани асоциации между клинични показатели и инфилтрацията от CD68+ и степента на експресия от CD47. Всички р-стойности са от χ^2 тест. Значимите стойности на $p < 0.05$ са оцветени в уплътнен шрифт

	CD68IT				р-стойност	CD68ST				р-стойност	CD47				р-стойност
	0	1	2			1	2		0		1	2			
T стадий				Общо				Общо					Общо		
T1b	1	114	37	152	0.6806	75	77	152	0.7251	10	65	77	152	1.7x10⁻⁶	
T2a	0	14	5	19		11	8	19		8	8	3	19		
T2b	0	13	7	20		9	11	20		8	8	4	20		
Total	1	141	49	191		95	96	191		26	81	84	191		
N стадий															
N0	0	99	37	136	0.2716	68	68	136	1	14	58	64	136	0.09195	
N1	1	42	12	55		27	28	55		12	23	20	55		
Общо	1	141	49	191		95	96	191		26	81	84	191		
FIGO стадий															
FIGO I	0	87	31	118	0.4435	58	60	118	0.9047	8	49	61	118	0.0012	
FIGO II	0	12	6	18		10	8	18		6	9	3	18		
FIGO III	1	42	12	55		27	28	55		12	23	20	55		
Общо	1	141	49	191		95	96	191		26	81	84	191		
Хистология															
AC	0	26	0	26	3.41x10⁻⁵	17	9	26	0.2297	2	14	10	26	0.514	
ASC	0	14	0	14		7	7	14		1	8	5	14		
SCC	1	101	49	151		71	80	151		23	59	69	151		
Общо	1	141	49	191		95	96	191		26	81	84	191		
Възраст															
< = 50 години	1	71	22	94	0.5631	49	45	94	0.5638	11	39	44	94	0.6619	
>50 години	0	70	27	97		46	51	97		15	42	40	97		
Общо	1	141	49	191		95	96	191		26	81	84	191		
CD68IT															
0	1	0	0	1	NA	1	0	1	0.1851	0	0	1	1	0.005581	
1	0	141	0	141		74	67	141		20	69	52	141		
2	0	0	49	49		20	29	49		6	12	31	49		

	CD68IT					CD68ST					CD47				
Общо	1	141	49	191		95	96	191		26	81	84	191		
CD68ST															
1	1	74	20	95	0.1851	95	0	95	NA	16	44	35	95	0.1246	
2	0	67	29	96		0	96	96		10	37	49	96		
Общо	1	141	49	191		95	96	191		26	81	84	191		
CD47 H score															
0	0	20	6	26	0.00581	16	10	26	0.1246	26	0	0	26	NA	
1	0	69	12	81		44	37	81		0	81	0	81		
2	1	52	31	84		35	49	84		0	0	84	84		
Общо	1	141	49	191		95	96	191		26	81	84	191		

1. Клинични и патологични корелации на експресията на CD47 от туморните клетки

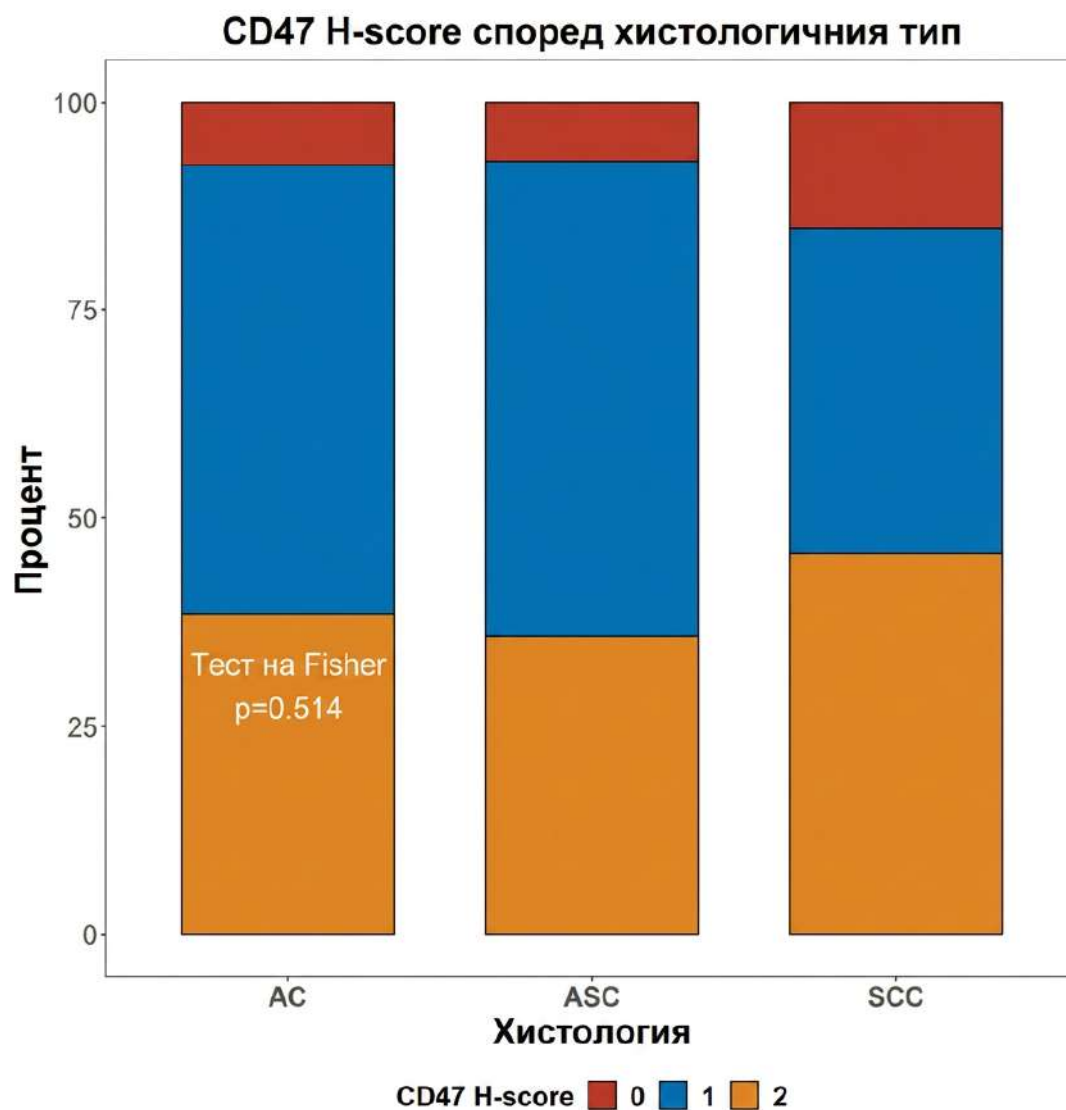


Фигура 4. Разпределение по възраст при диагноза на КМШ на групите пациентки според експресията на CD47 в туморните клетки. Стойностите на p са от двустранни T -тест за продължителни променливи.

Разпределението на пациентите с липсващ (13,6%, $N = 26$), нисък (42,4 %, $N = 81$) и висок H score (44%, $N = 84$) при КМШ), $N = 191$ (100%) е онагледено във Фигура 4. При пациенти под 50 годишна възраст (49,2%, $N = 94$) с нулев score са 5,8% ($N = 11$), с нисък score са 20,4% ($N = 39$) и с висок score са 23% ($N = 44$). При пациенти над 50

годишна възраст 50,8%, (N =97) с нулев score са 7,8% (N =15), с нисък score са 22% (N = 42), а тези с висок score са 20,9% (N =40).

Липсва сигнификантна корелация между степента на изява на CD47 в туморните клетки и възрастта на пациентките при диагноза.

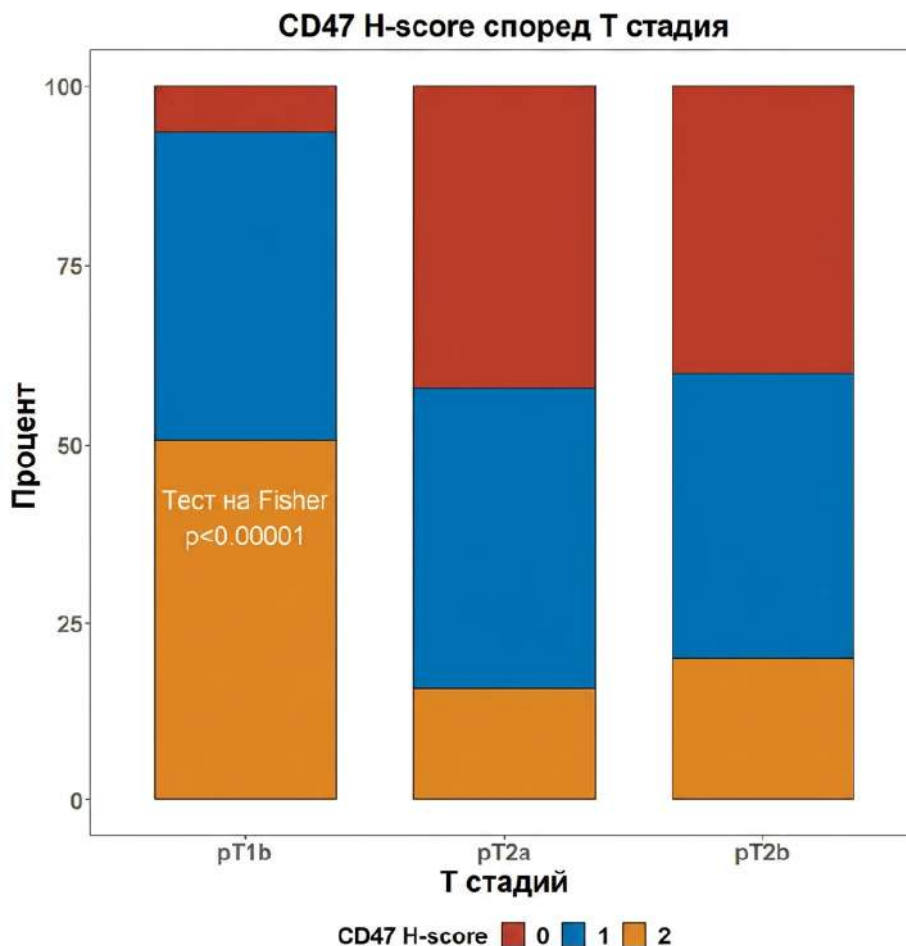


Фигура 5. Разпределение в процентни съотношения по експресия на CD47 в туморните клетки според хистологични подтип на КМШ. На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

Разпределение на нива на експресия на CD47 в туморните клетки спрямо хистологични подтип на КМШ е представен броят случаи AC общо 26, ASC общо 14, SCC общо 151 (общ брой N=191) във всяка подгрупа е онагледено във *Фигура 5*. Стойността на p е от точностен тест на *Fisher*.

При пациентите с AC, CD47 с нулев скор са N= 2 или 1,05% от цялата популация. Със скор 1 са N=14 или 7,35%, а със скор 2 са N=10 или 5,23%. При пациентите с доказан ASC, CD47 с нулев скор са N=1 или 0,52%, със скор 1 са N=8 или 4,18%, а със скор 2 са N=5 или 2,61%. При пациентите с доказан SCC, CD47 с нулев скор са N=23 или 12,04%, със скор 1 са N=59 или 30,89%, а със скор 2 са N=69 или 36,12%.

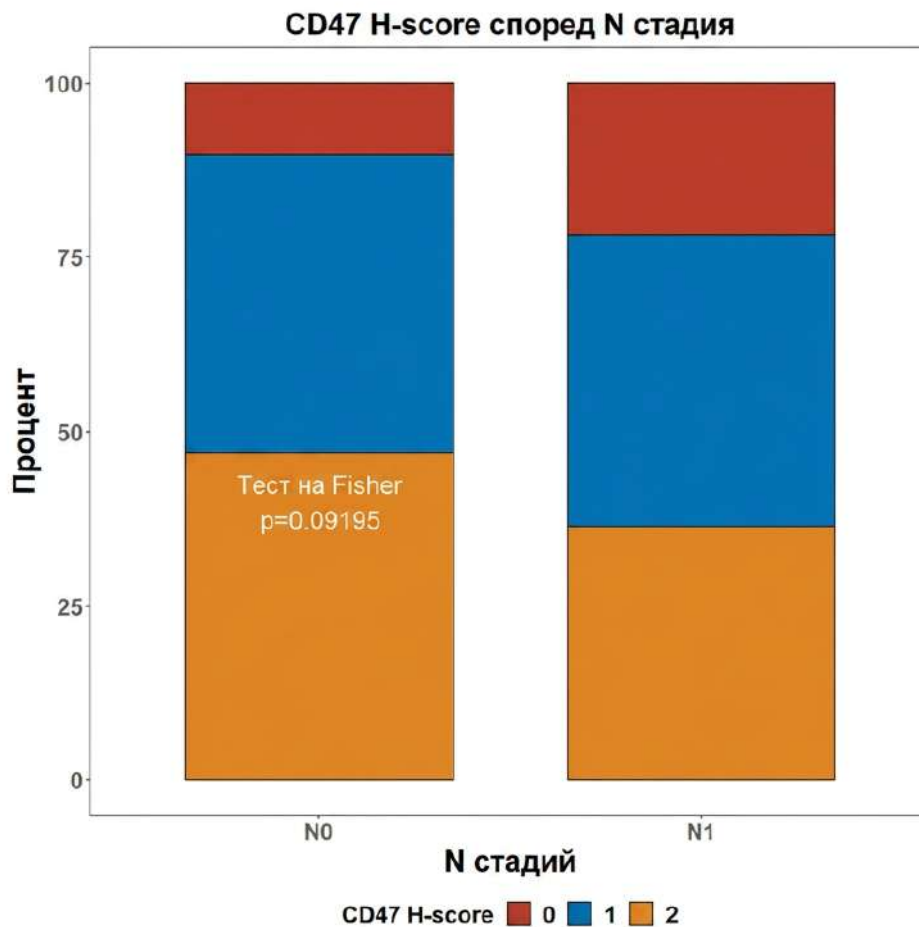
Липсва корелация между хистологичния подвид и нива на имунохистохимична експресия на CD47 ($p=0.514$).



Фигура 6. Разпределението в процентни съотношения на нива на експресия на CD47 в туморните клетки според размера на тумора (T стадий според TNM). На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

Разпределението на различните нива на експресия на CD47 в туморните клетки спрямо pT-стадий на болестта е онагледено във *Фигура 6*. В стадий T1b CD47 score 0 са N=10 (5,23%), score 1 са N=65 (34,03), score 2 са N=77 (40,31%), в стадий T2a score 0 са N=8 (4,18%), score 1 са N=8 (4,18%), score 2 са N=3 (1,57%), в стадий T2b CD47 score 0 са N=8 (4,18%), score 1 са N=8(4,18%), score 2 са N=4 (2,09%). Установява се значима разлика в нивата на експресия на CD47 score 2, които са статистически значимо по-високо експресиран при 77(40,31%) пациентки в стадий pT1b в сравнение с другите посочени стадии, съответно 3(1,57%) при pT2a и 4(2,09%) за pT2b ($p < 0.00001$).

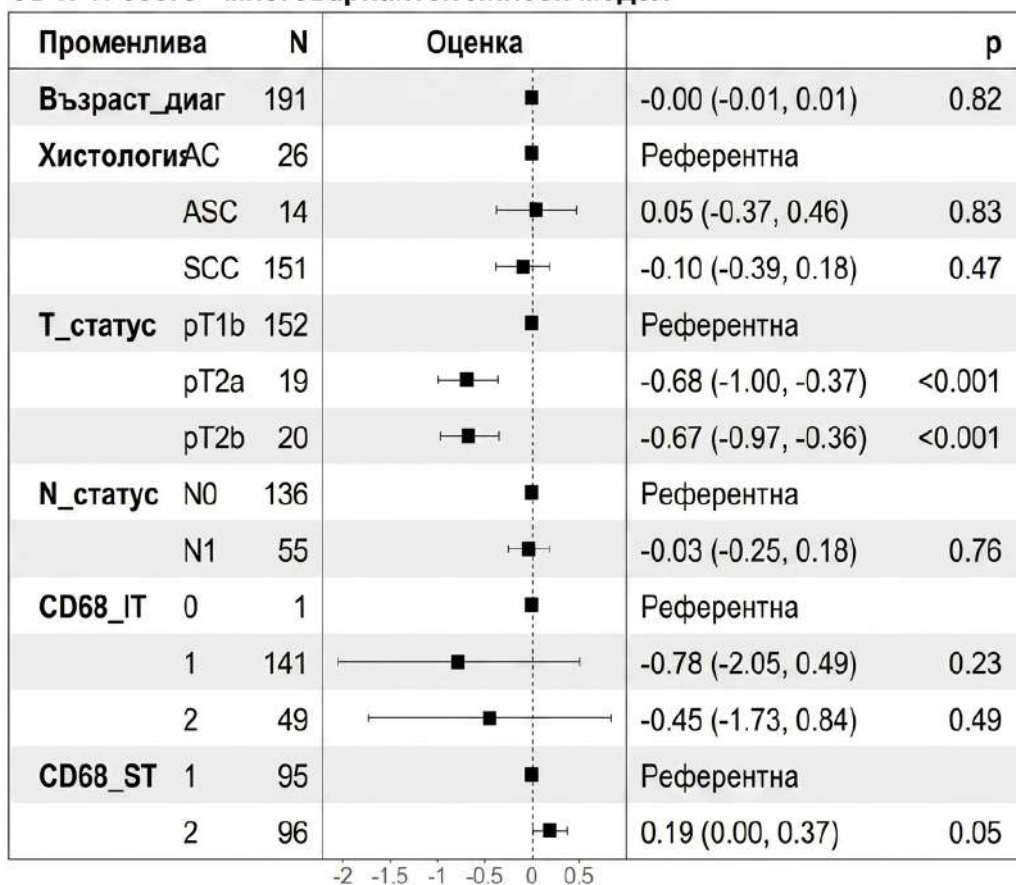
CD47 показва сигнификантно увеличение в стадий pT1b в сравнение с другите посочени стадии pT2a, pT2b.



Фигура 7. Разпределение в процентни съотношения на експресия на CD47 в туморните клетки спрямо засягането на лимфни възли (N стадий според TNM). На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

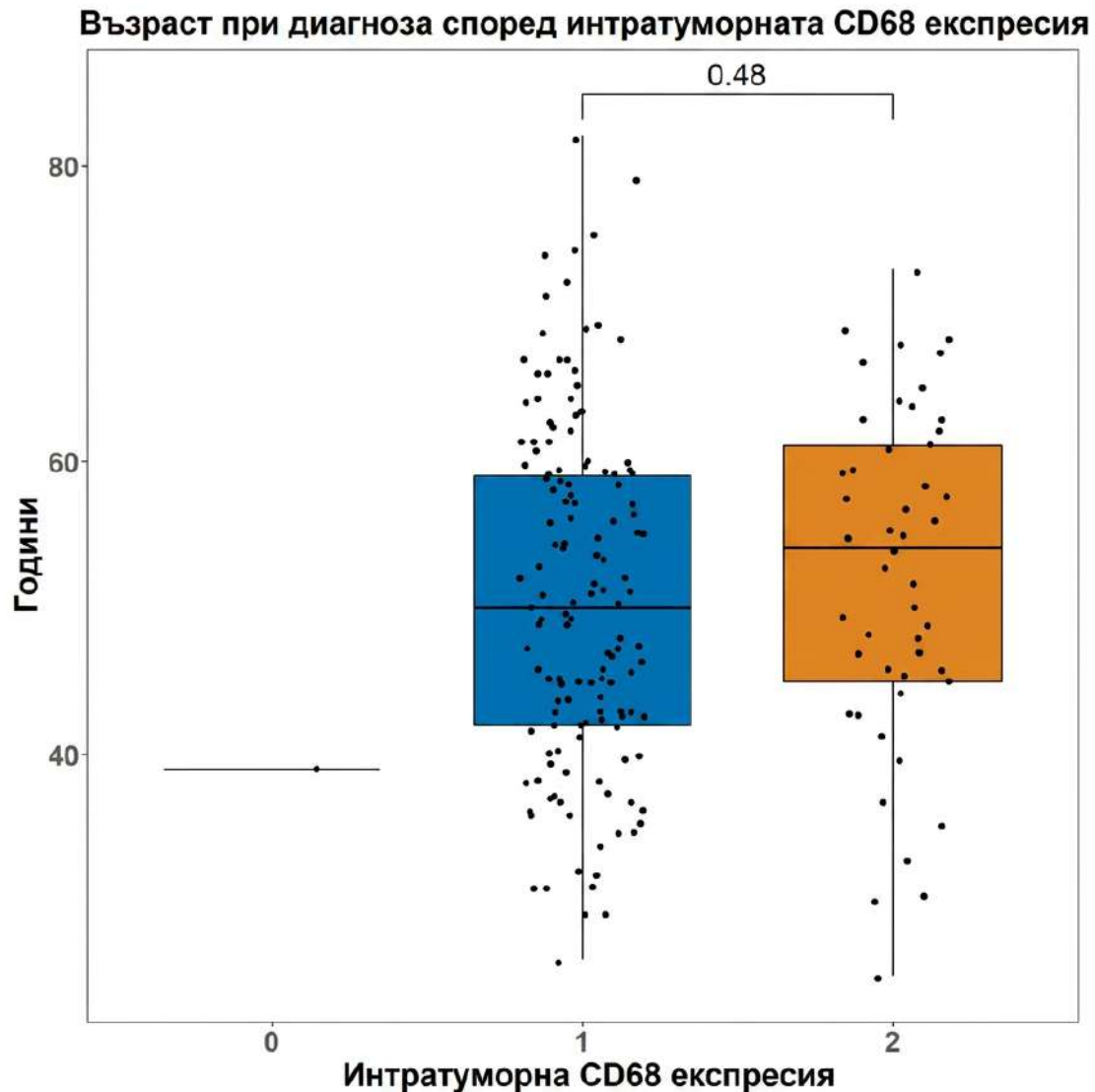
Разпределението на брой тумори с експресия на CD 47 според pN стадий (pN0 при 136(71,2%) пациентки, спрямо pN1 при 55 (28,8%)) е онагледено във *Фигура 7*. Разпределението на CD47 H score спрямо N стадия е следното: При N0 и score 0 N=14 (7,33%), score 1 N=58 (30,36%), score 2 N=64 (33,5%). При N1 и score 0 N=12 (6,28%), score 1 N=23 (12,04%), score 2 N=20 (10,47%) Не се установява значима корелация между нивата на експресия на CD 47 и N стадий (p=0.09195).

CD47 H-score - многовариантен линеен модел



Фигура 8. Forest плот, представящ мултивариационен линеен модел за анализ на зависимостта на експресията на CD47 от клинични и патологични променливи. Стойностите на *p* за всяка променлива са от двустранни *T*-тестове.

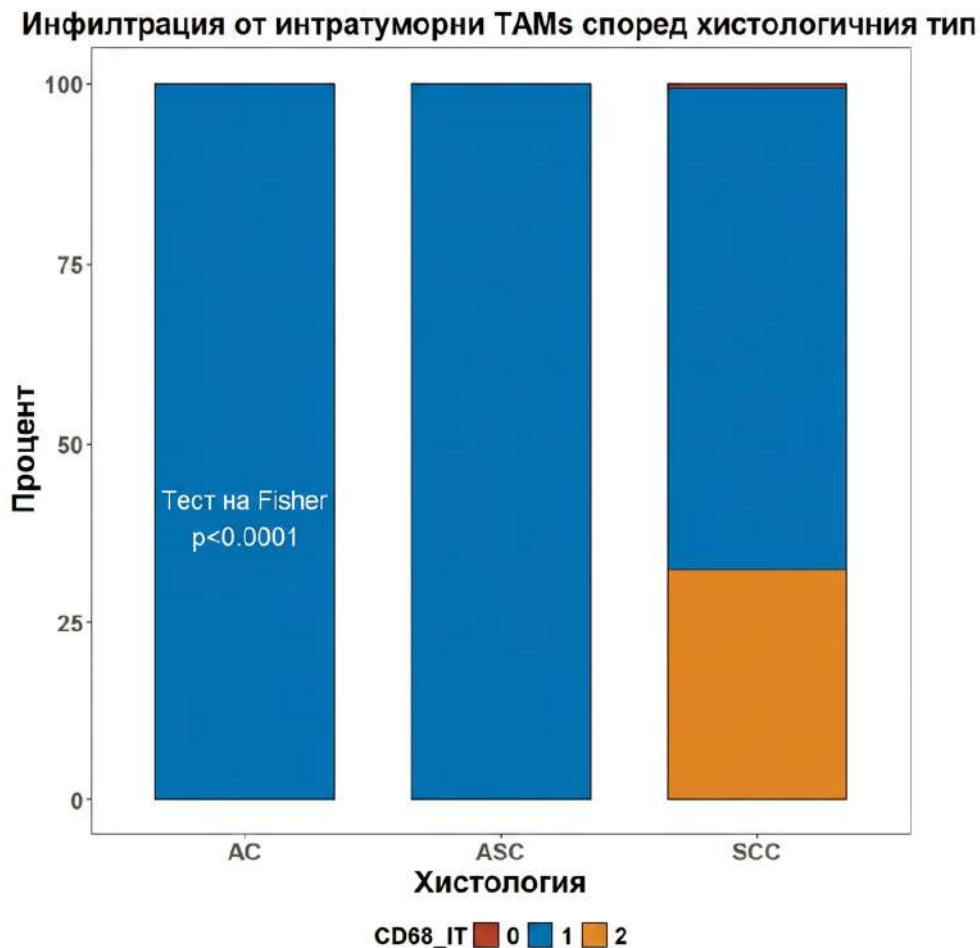
2. Клинични и патологични корелации на експресията на CD68 в интратуморни имунни клетки (TAM)



Фигура 9. Разпределение по възраст на групите пациентки според плътността на инфилтрацията от интратуморни TAM (CD68+ имунни клетки). Стойността на p е от двустранен T -тест за продължителни променливи.

Разпределението на експресията на CD68 в интратуморните клетки е онагледено във Фигура 9. CD68 в интратуморните клетки показва следните характеристики спрямо възрастта на пациентите: във възрастта под 50 години липсваща експресия има при $N=1$ (0,5%), ниска експресия има при $N=71$ (37,1%), висока експресия има при $N=22$ (11,52%). Във възрастта над 50 години липсваща експресия не е отчетена, ниска експресия има при $N=70$ (36,64%), а висока експресия има при $N=27$ (14,13%).

Плътноста на интратуморна инфилтрация с CD68 не се влияе от възрастовите характеристики на пациента.

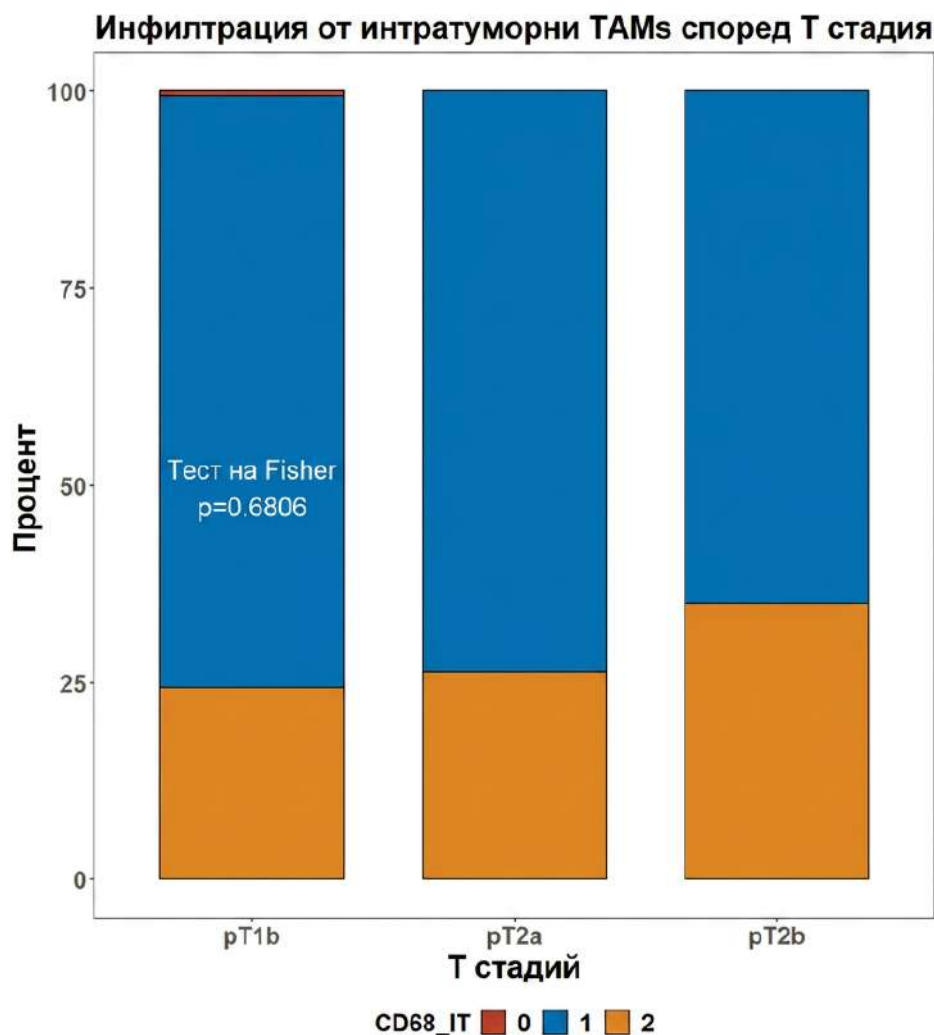


Фигура 10. Разпределение в процентни съотношения по плътността на инфилтрацията от интратуморни TAM (CD68+ имунни клетки) според хистологични подтип на КМШ. На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

На Фиг. 10 е представена графика на инфилтрация на интратуморни TAM спрямо хистологичния тип на тумора. Установява се сигнификантна разлика в нивата на интратуморна инфилтрация със CD68 позитивни клетки, като при $N=49$ или 25,7% са с висока експресия при плоскоклетъчни карциноми, при $N=101$ или 52,9% са с ниска експресия при пациенти със същия хистологичен вид. Съответно $N=26$ или 13,6% са с

ниска експресия при аденокарцином и само N=14 или 7,3% са с ниска експресия при смесен аденосквамозен карцином ($p < 0.0001$).

Установява се сигнификантна значима разлика на интратуморен CD68 при плоскоклетъчните хистологични варианти на КМШ ($P < 0.0001$).

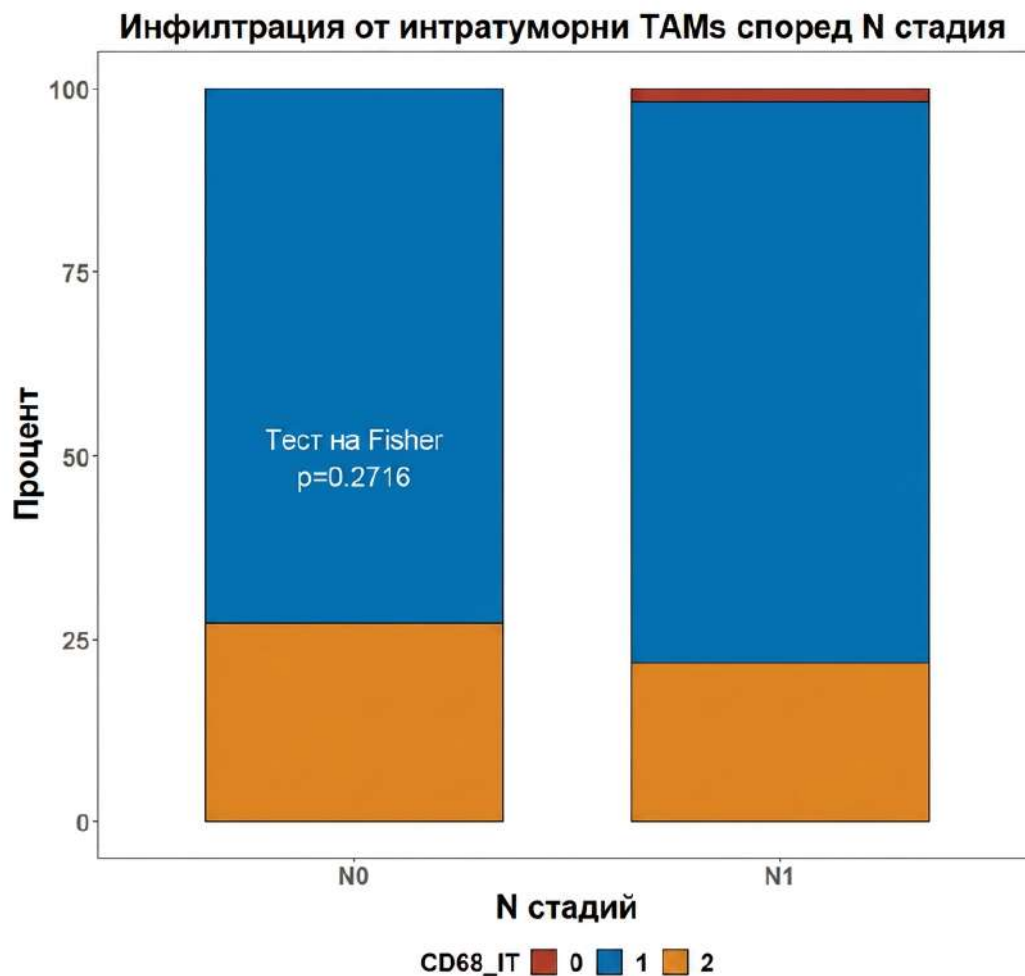


Фигура 11. Разпределение в проценти на плътността на инфилтрацията от интратуморни TAM (CD68+ имунни клетки) според размера на тумора (Т стадий по дефинициите на TNM класификацията). На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

Цифровото изражение на разпределението ниво на експресия на CD68 IT спрямо Т стадия е онагледено във *Фигура 11* и е следното: При T1b стадий с липсваща експресия е N=1(0,5%) пациент, с ниска експресия са N=114(59,7%), с висока експресия са N=37(19,37%). При T2a стадий с липсваща експресия няма отчетени случаи, с ниска

експресия са N=14(7,3%), с висока експресия са N=5(2,6%) пациенти. При T2b стадий цифровото изражение е следното: с липсваща експресия няма отчетени случаи, с умерена експресия са N=13(6,8%) пациенти, с висока експресия са N=7(3,66%).

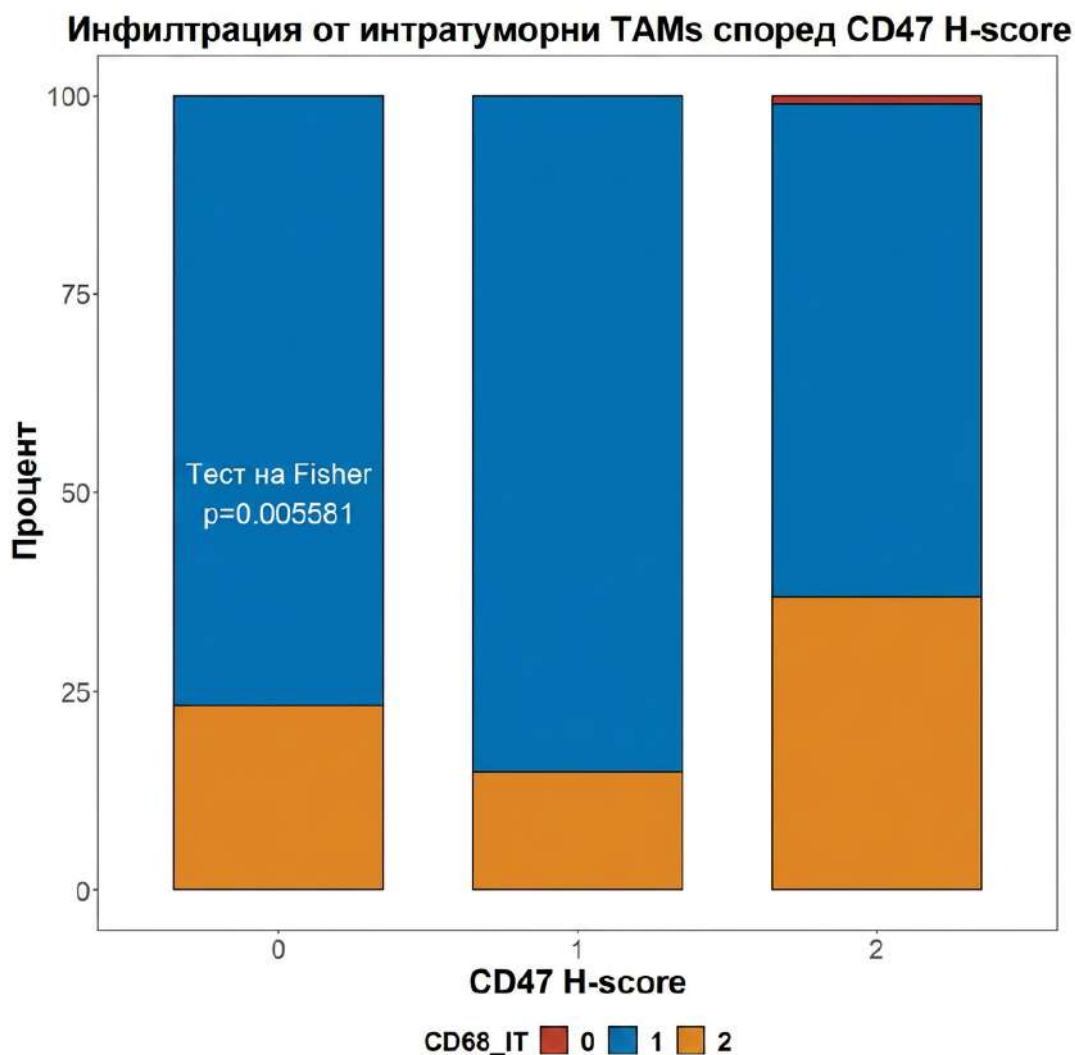
Не се отчита статистически значима разлика в нивото на интратуморен CD68 спрямо размера на тумора при КМШ.



Фигура 12. Разпределение в процентни съотношения по плътността на инфилтрацията от интратуморни TAM (CD68+ имунни клетки) според засягането на лимфни възли (N стадий по дефинициите на TNM класификацията). На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

Разпределението на експресията на CD68 в интратуморните клетки от *Фигура 12* показва следните характеристики спрямо N статуса на пациентите: при N0 статус с липсваща експресия има при N=0 (0%) случаи, ниска експресия има при N=99 (51,83%) пациенти, висока експресия има при N=37(19,37%). При N1 липсваща експресия има при N=1(0,52%) пациент, ниска експресия има при N=42(21,98%), а висока експресия има при N=12(6,28%) пациента.

Не се отчита сигнификантна зависимост на интратуморния CD68 спрямо нодалния статус на пациентите с КМШ.



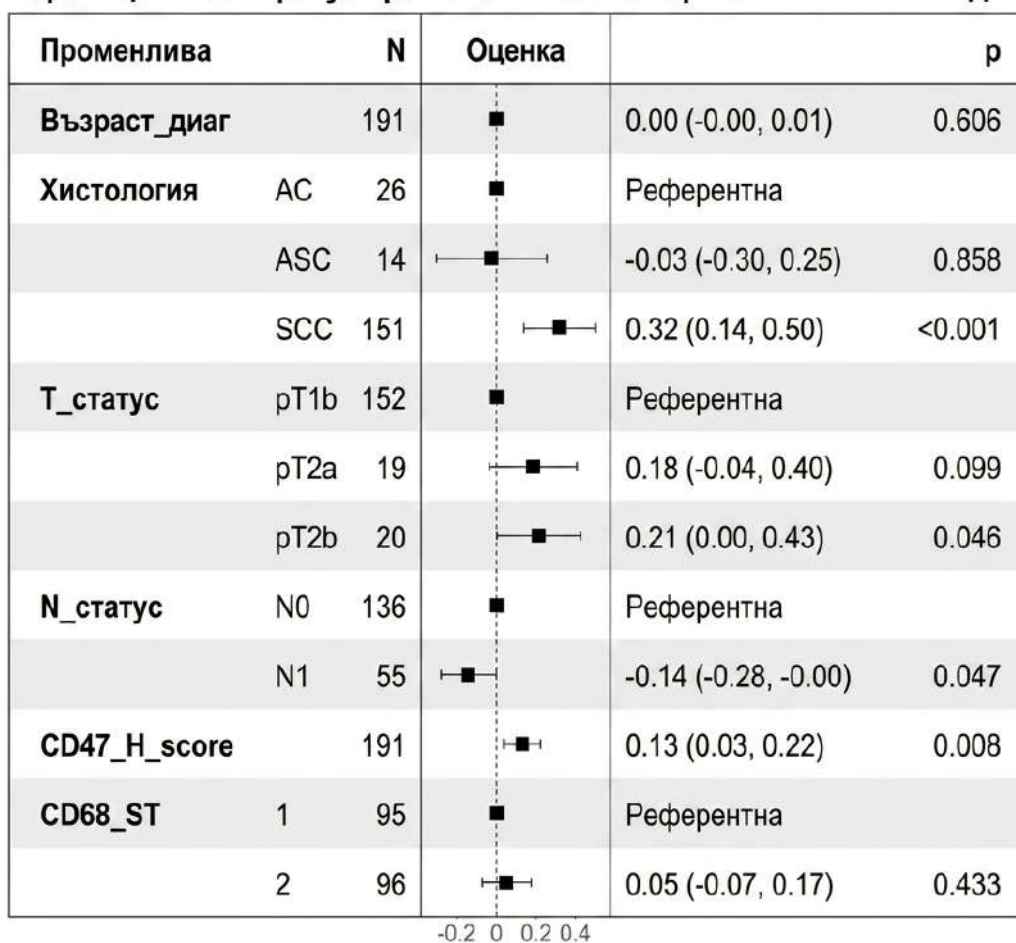
Фигура 13. Разпределението в процентни съотношения по плътността на инфилтрацията от интратуморни TAM (CD68+ имунни клетки) според експресията на CD47 от туморните клетки. На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

Разпределението в абсолютен брой и в проценти по плътността на инфилтрацията от интратуморни TAM (CD68+ имунни клетки) според експресията на CD47 от туморните клетки от *Фигура 13* показва следните характеристики: при пациенти с нулев скор на CD47 няма отчетени такива с липсваща експресия на CD68 IT, има N=20 (10,47%) пациенти с ниска експресия на CD68 IT, тези с висока експресия на CD68 IT са N=6 (3,14%). При пациенти със скор 1 на CD47 не се отчитат случаи с липсваща експресия на CD68 IT, тези с ниска експресия на CD68 IT са N=69 (36,12%) случаи, а тези с висока експресия на CD68 IT са N=12 (6,28%). При пациенти със скор 2 на CD47 има N=1 (0,52%) пациент с липсваща експресия на CD68 IT, с ниска експресия на CD68 IT са N=52 (27,22%), а с висока експресия са N=31 (16,23%).

Отчита се правопрпорционална зависимост в нивата на CD47 и CD68. Пациентите с по-висок CD 47 H-score са склонни да имат по-висока инфилтрация на интратуморни CD 68+ макрофаги.

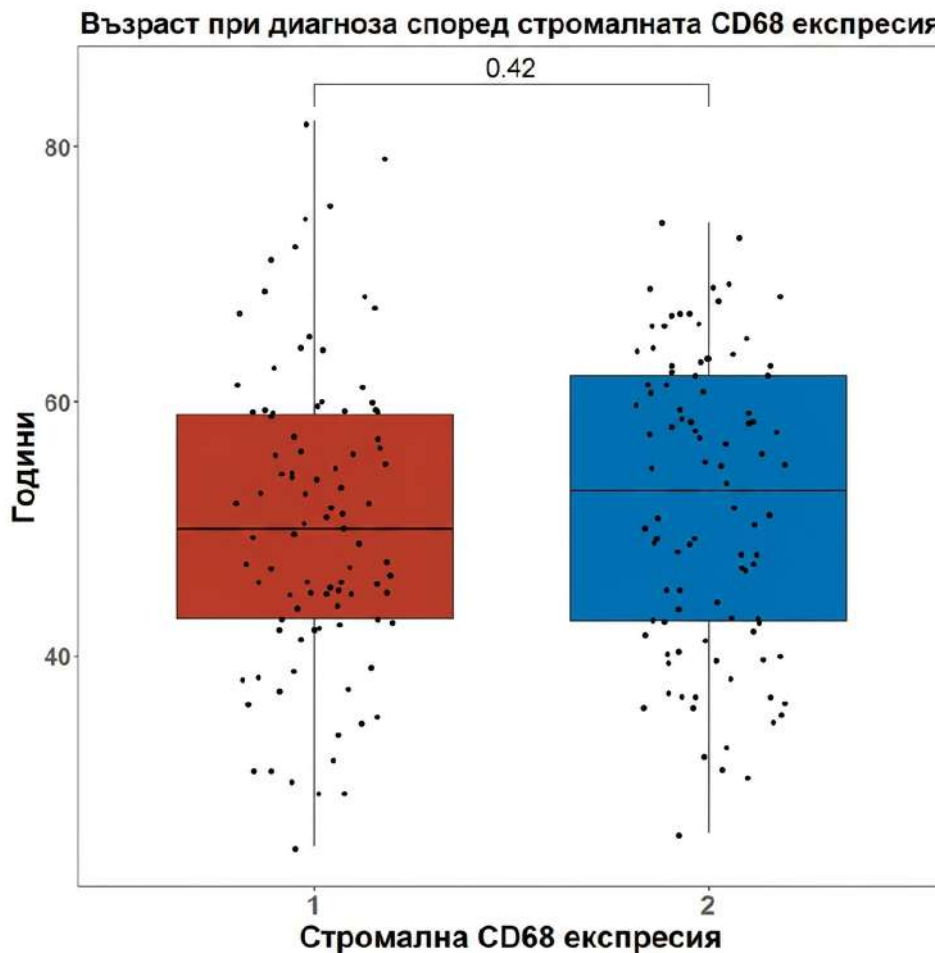
Отчита се сигнификантна правопрпорционална зависимост в нивата на CD47 и интратуморен CD68 ($p=0.005581$).

Корелации на интратуморни TAMs - многовариантен линеен модел



Фигура 14. Forest плот, обобщаващ резултатите от мултивариационен линеен модел за зависимостта на плътността на инфилтрацията от интратуморни TAM (CD68+ имунни клетки) от клинични и патологични променливи. Стойностите на *p* за всяка променлива са от двустранни *T*-тестове.

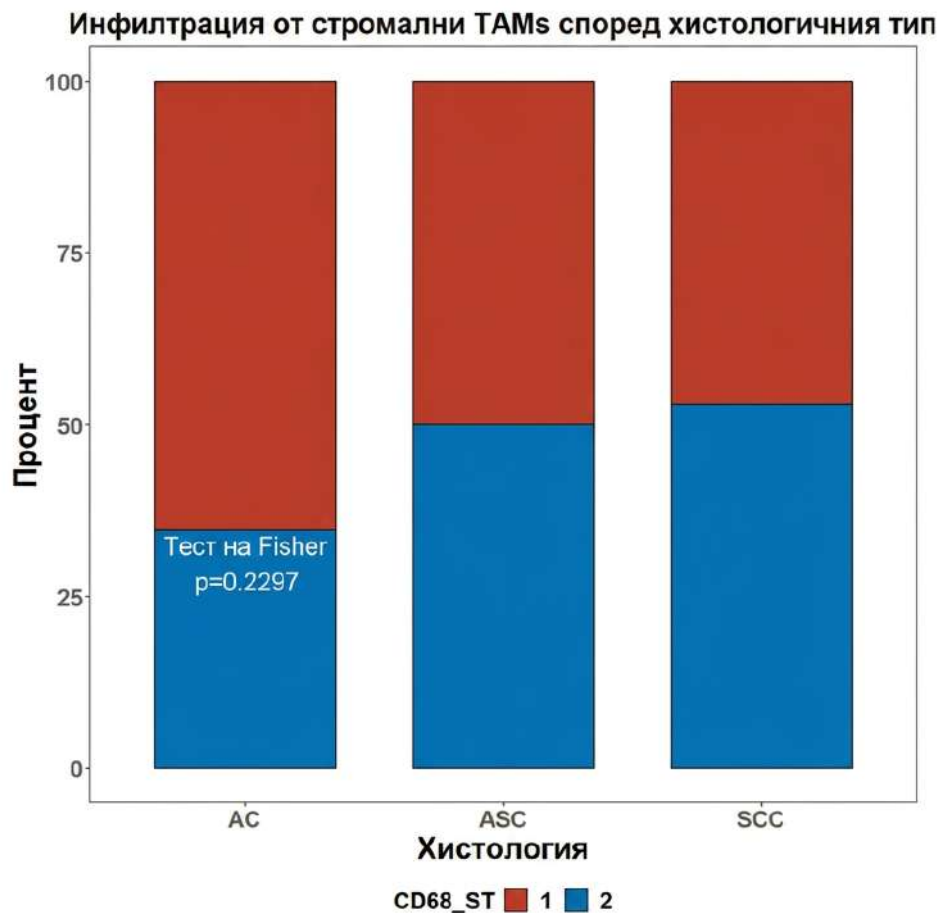
3. Клинични и патологични корелации на експресията на CD68 в перитуморни (стромални) имунни клетки (TAM)



Фигура 15. Сравнение по възраст на групите пациентки според плътността на инфилтрацията от перитуморни (стромални) TAM (CD68+ имунни клетки). Стойността на p е от двустранен T -тест за продължителни променливи.

Сравнение по възраст на групите пациентки според плътността на инфилтрацията от перитуморни (стромални) TAM (CD68+ имунни клетки) от Фигура 15 показва следната зависимост: При пациентки под 50 годишна възраст се отчитат $N=49$ (25,65%) с ниска експресия на CD68 ST и $N=45$ (23,56%) с висока експресия на CD68 ST. При пациентки над 50 годишна възраст се отчита $N=46$ (24,08%) с ниска експресия на CD68 ST и $N=51$ (26,70%) с висока експресия на CD68 ST.

Не се отчита сигнификантна разлика спряко възрастта и инфилтрацията със стромални (TAM).

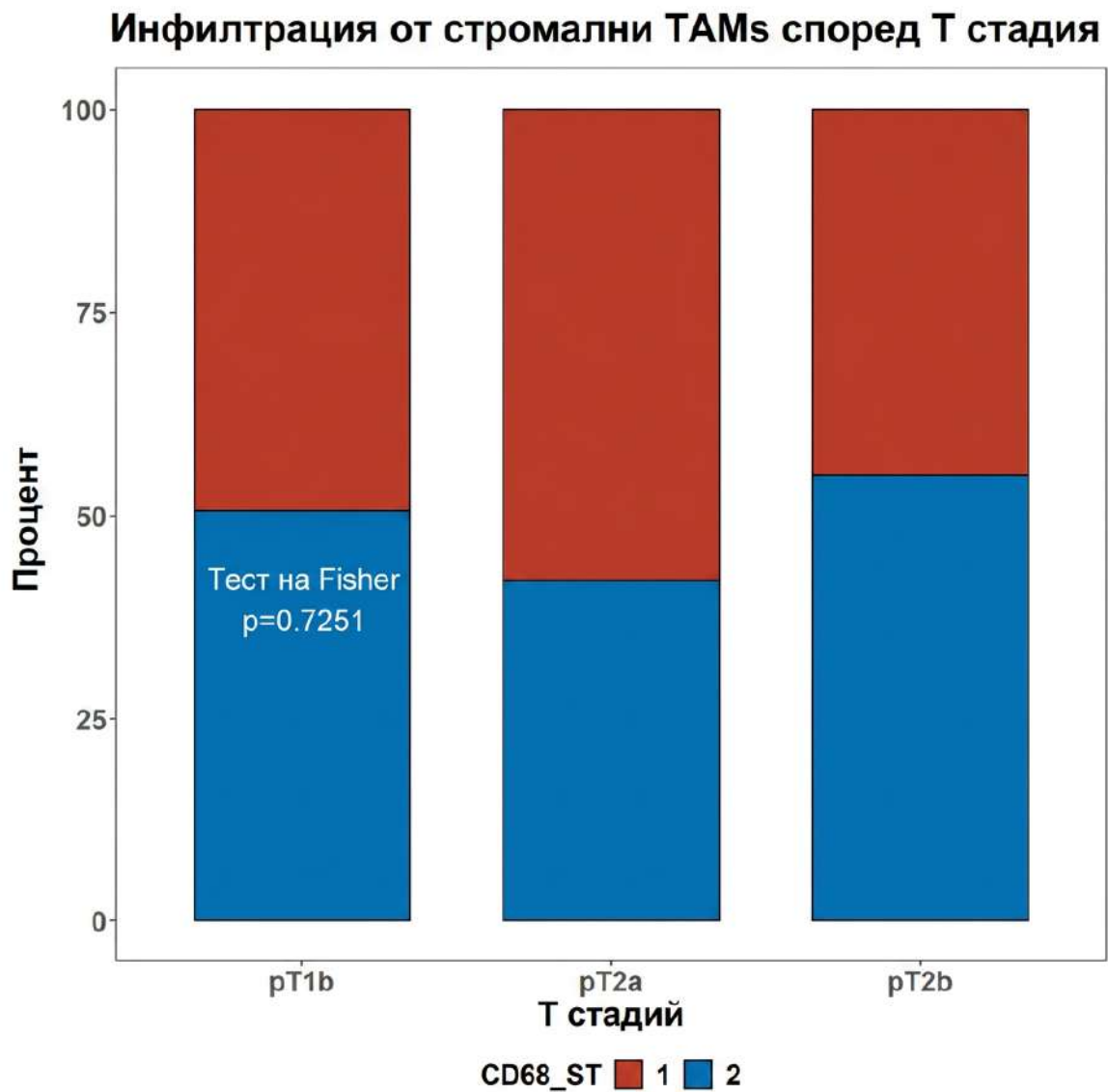


Фигура 16. Разпределение в процентни съотношения на плътността на инфилтрацията от перитуморни (стромални) TAM (CD68+ имунни клетки) според хистологични подтип на КМШ. На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

Инфилтрацията на стромални TAM спрямо хистологичния тип от Фигура 16 показва следното: N=17 (8,9%) пациентки с аденокарцином на маточната шийка са с ниска инфилтрация на CD68_ST, N=9 (4,71%) са с висока. При пациентки с аденосквамозен

карцином N=7 (3,66%) са с ниска инфилтрация и N=7 (3,66%) с висока инфилтрация на CD68_ST. При плоскоклетъчните хистологични типове N=71 (37,17%) пациентки са с ниска инфилтрация на CD68_ST и N=80 (41,88%) са с висока.

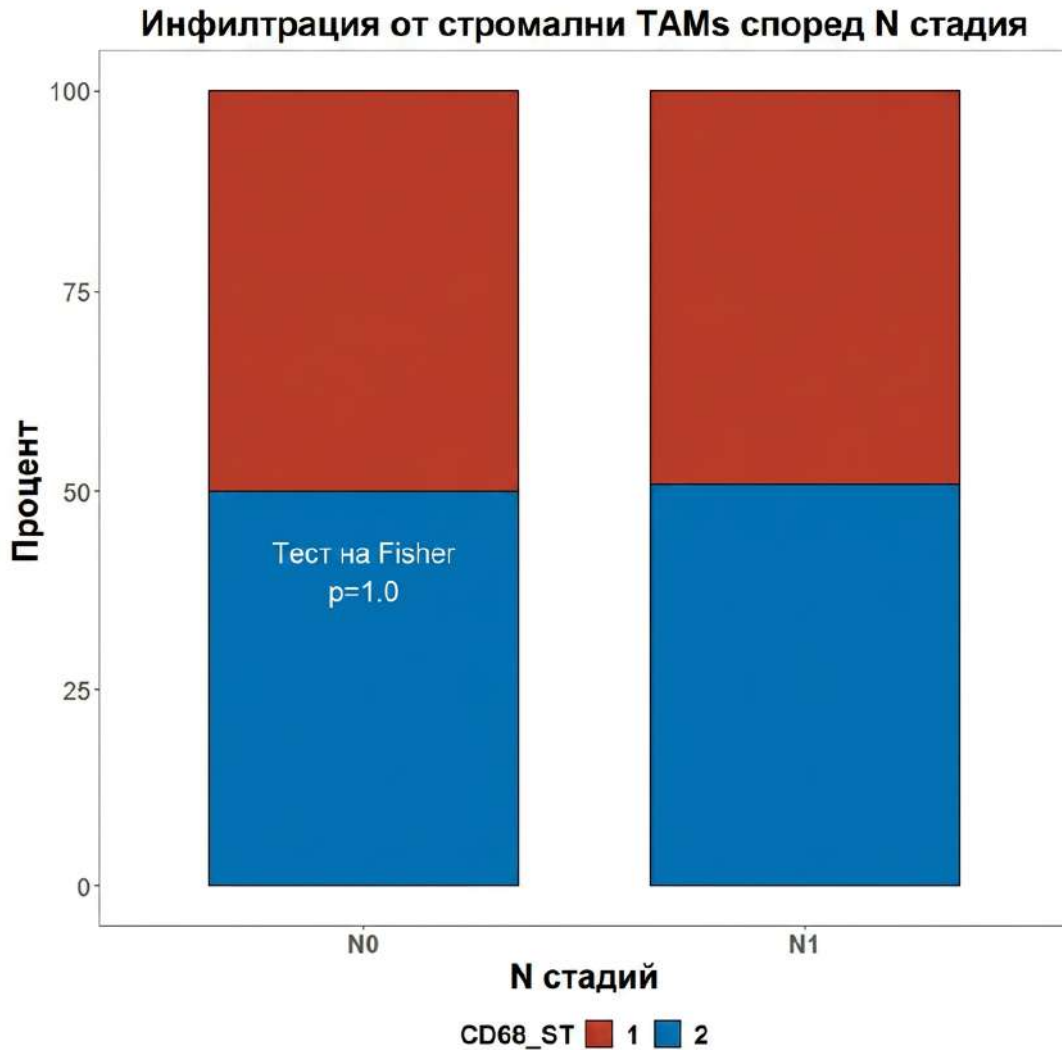
Няма статистически значима разлика в нивата на стромален CD68 при различните хистологични типове.



Фигура 17. Разпределение в проценти на плътност на инфилтрацията от перитуморни (стромални) TAM (CD68+ имунни клетки) според размер на тумора (T стадий по дефинициите на TNM класификацията). На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

Инфилтрацията на стромални TAM спрямо T стадий във *Фигура 17* показва следното: N=75(39,26%) пациентки с T1b са с ниска инфилтрация на CD68_ST, N=77(40,31%) са с висока. При пациентки в стадий T2a N=11(5,75%) са с ниска инфилтрация и N=8(4,18%) с висока инфилтрация на CD68_ST. В стадий T2b N=9(4,71%) пациентки са с ниска инфилтрация на CD68_ST и N=11(5,75%) са с висока.

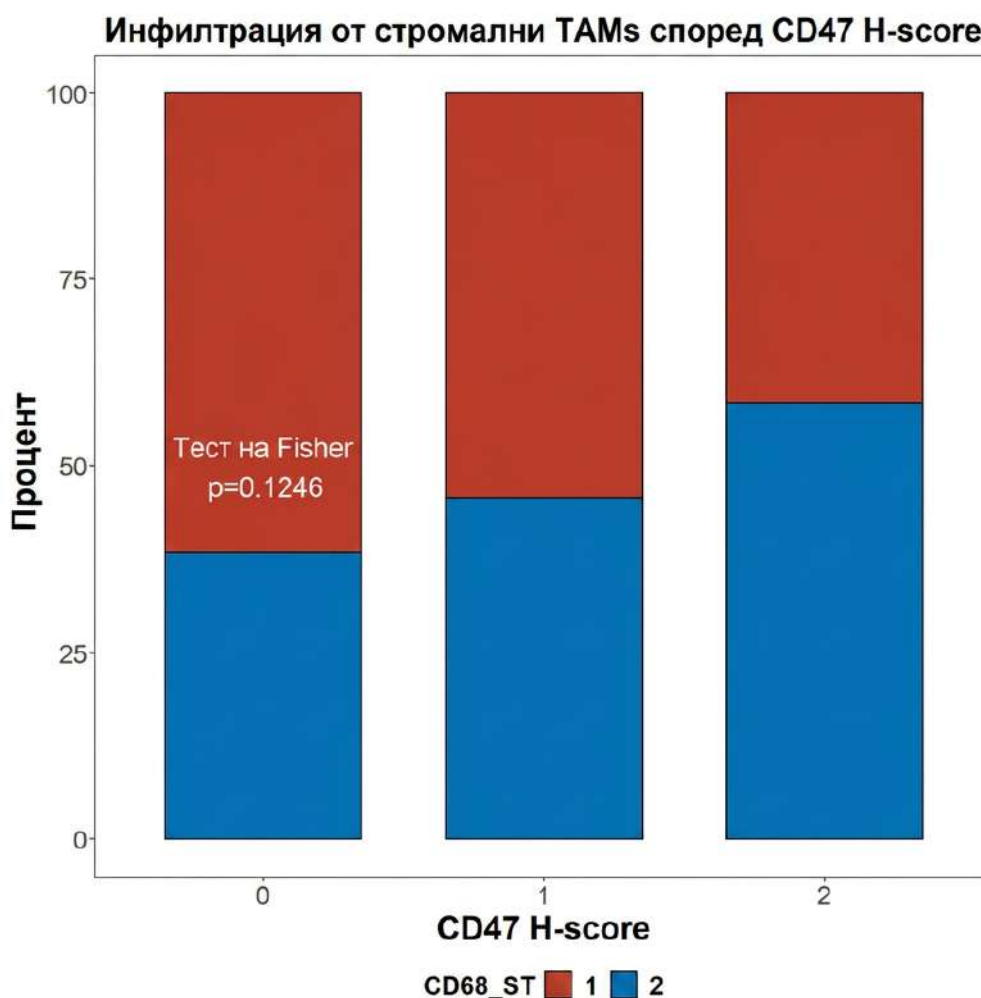
Няма статистически значима разлика и в нивата на стромален CD68 при различните стадии свързани с размера на тумора.



Фигура 18. Разпределението в процентни съотношения по плътността на инфилтрацията от перитуморни (стромални) TAM (CD68+ имунни клетки) според засягането на лимфни възли (N стадий по дефинициите на TNM класификацията). На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

Инфилтрацията на туморите със стромален CD68 спрямо наличието или не на лимфни метастази от *Фигура 18* показва следната характеристика: N=68(35,6%) от пациентите без лимфни метастази са с ниска CD68_ST инфилтрация, N=68(35,6%) от пациентите без лимфни метастази са с висока CD68_ST инфилтрация. Пациентите с лимфни метастази показват следната характеристика: N=27(14,13%) са със слаба CD68_ST инфилтрация, а N=28(14,65%) са с висока CD68_ST инфилтрация.

Няма статистически значима разлика в нивата на стромален CD68 и спрямо липсата или наличието на лимфни метастази.

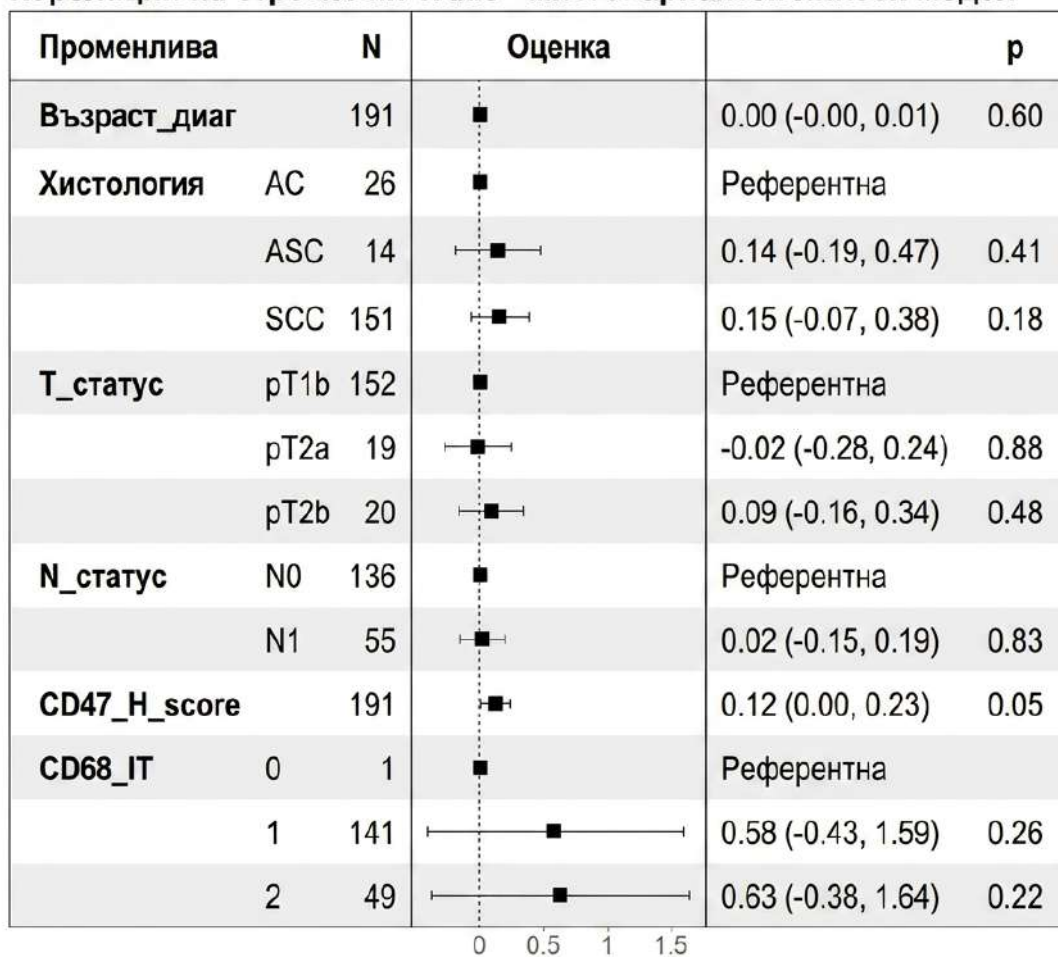


Фигура 19. Разпределение в процентни съотношения по плътността на инфилтрацията от перитуморни (стромални) TAM (CD68+ имунни клетки) според експресията на CD47 от туморните клетки. На ординатата е представен процентът случаи във всяка подгрупа. Стойността на p е от точностен тест на Fisher.

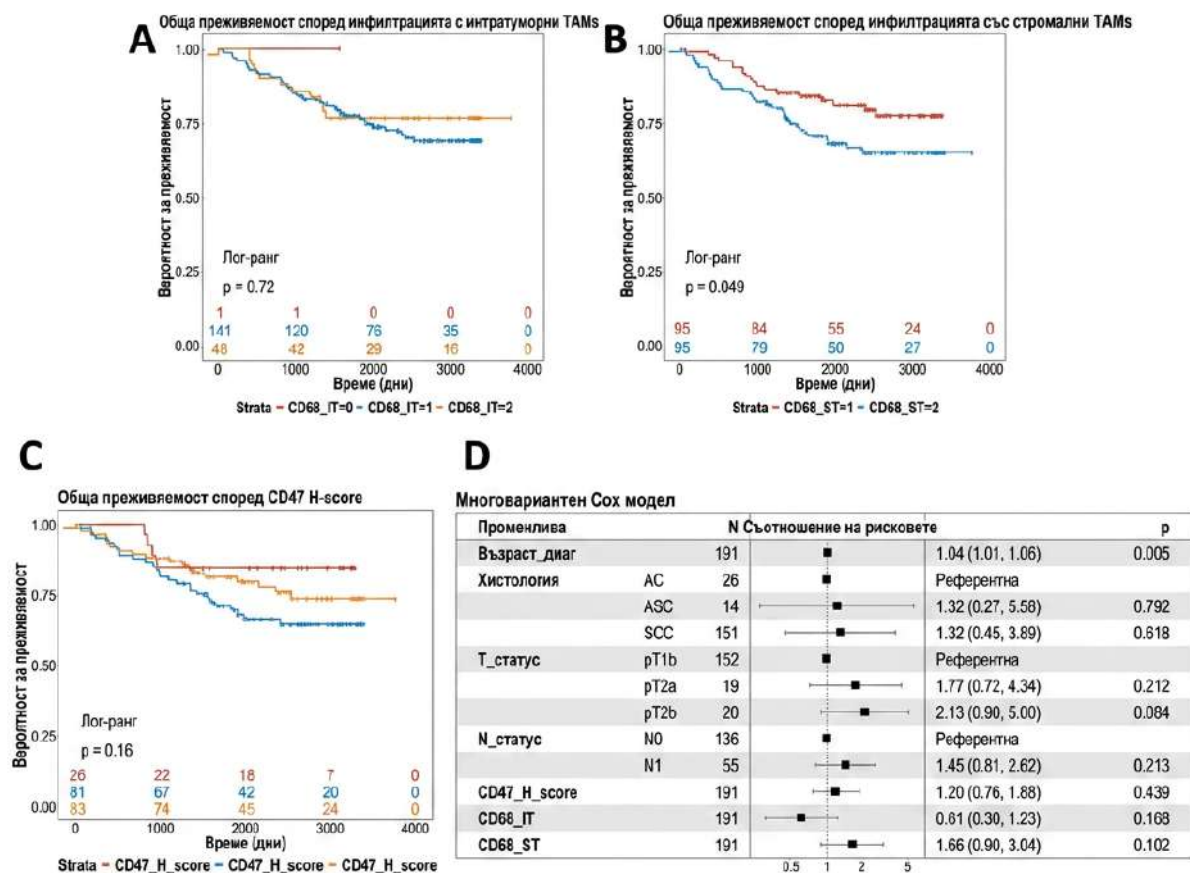
Разпределението в абсолютен брой и в проценти по плътността на инфилтрацията от стромални TAM (CD68+ имунни клетки), *Фигура 19* според експресията на CD47 от туморните клетки показва следните характеристики: при пациенти с нулев скор на CD47 тези с ниска експресия на CD68 ST са N=16 (8,37%), тези с висока експресия на CD68 ST са N=10 (5,23%). При пациенти със скор 1 на CD47 тези с ниска експресия на CD68 ST са N=44 (23,03%) случаи, а тези с висока експресия на CD68 ST са N=37 (19,37%). При пациенти със скор 2 на CD47 с ниска експресия на CD68 ST са N=35 (18,32%), а с висока експресия са N=49 (25,65%).

Не се отчита статистически значима разлика в нивата на стромален CD68 спрямо нивата на CD47.

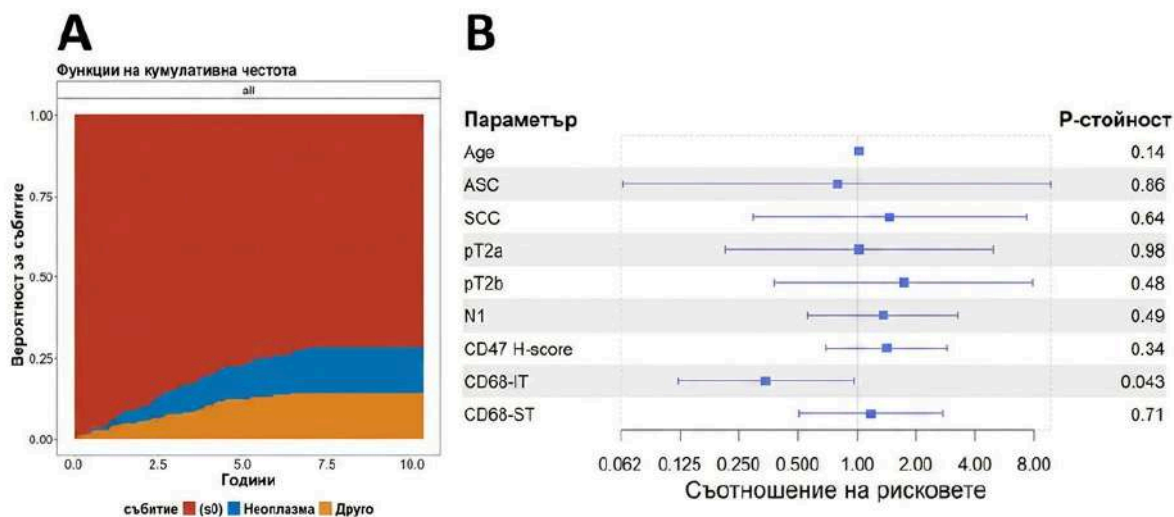
Корелации на стромални TAMs - многовариантен линеен модел



Фигура 20. Forest плот, обобщаващ резултатите от мултивариационен линеен модел за зависимостта на плътността на инфилтрацията от перитуморни (стромални) TAM ($CD68^+$ имунни клетки) от клинични и патологични променливи. Стойностите на p за всяка променлива са от двустранни T -тестове.



Фигура 21. Анализ на прогностичната стойност на фагоцитните маркери по отношение на общата преживяемост. (A) Унивариантна преживяемост с нивото на инфилтрация от интратуморни TAM. p -стойността е от log-rank теста. (B) Унивариантна преживяемост с нивото на инфилтрация от стромални TAM. p -стойността е от log-rank теста. (C) Унивариантна преживяемост с CD47 H-скор. p -стойността е от log-rank теста. (D) Forest plot, обобщаващ резултатите от многовариантен Cox модел за обща преживяемост, използващ клинични ковариати и трите фагоцитни маркера, които са третирани като непрекъснати променливи.



Фигура 22. Регресионен анализ на конкуриращия се риск. (А) Кумулативни функции на честотата за риска от смърт от неопластично заболяване или друга причина за всички пациенти. (В) Модел „Forest“, обобщаващ резултатите от модела Fine-Gray, настроен за оценка на ефекта на всички клинични и патологични променливи върху кумулативната честота на смърт поради неопластично заболяване.

От направените изследвания показани на фигури 21 и 22 се стига до извода, че единствения статистически значим резултат е високата стромална инфилтрация от TAMs (CD68-ST), която се оказва негативен прогностичен фактор. Интратуморните TAMs (CD68-IT) нямат статистически значима разлика в общата преживяемост ($p=0,72$). Графика С сочи, че няма статистически значима разлика в преживяемостта според нивата на CD47 ($p=0,16$). Това потвърждава, че изследваният показател не е независим прогностичен фактор в този анализ.

От графиката на *Fine-Gray* при параметъра CD68-IT се вижда, че стойността на Hazard Ratio е под 1, а p-стойността е 0,043, което е статистически значимо. Това означава, че увеличена CD68-IT е свързана с намален риск от смърт.

V. ДИСКУСИЯ

Туморната микросреда (ТМС) е сложна екосистема, включваща различни клетъчни и извънклетъчна компоненти. Клетъчните компоненти включват: 1. туморни клетки - те влияят върху ТМС и се влияят от нея; 2. имунни клетки - тумор-инфилтриращи (лимфоидни и миелоидни клетки, които могат да стимулират или инхибират антитуморния имуноен отговор) и 3. стромални клетки - свързани с тумора фибробласти и ендотелни клетки, които допринасят за структурната цялост на тумора. (206-210) Извънклетъчните компоненти включват цитокини, хормони, извънклетъчната матрица и растежни фактори, които обграждат туморните клетки като съдова мрежа. ТМС има основна роля в растежа и развитието на тумори, като различните клетки имат строго определена функция. Ендотелните клетки са ключови в развитието на тумора и защитата на туморните клетки от имунната система – туморната ангиогенеза се простира отвъд нормалните кръвоносни съдове и по този начин осигурява хранителна подкрепа за развитието на тумора. Фибробластите насърчават туморната ангиогенеза и далечните метастази на туморните клетки. Имуноните клетки са гранулоцити, лимфоцити и макрофаги, като макрофагите имат основна роля в имуноните процеси в ТМС. Макрофагите са основните клетки на вродената имунона система и изпълняват различни функции, свързани с развитието и прогресията на онкологичните болести; те подпомагат екстравазацията на туморни клетки от кръвоносната система и по този начин осигуряват далечни метастази; и те могат да потиснат антитуморните имунони механизми и отговори. Тези макрофаги се определят като тумор-асоциирани макрофаги (ТАМ) и произлизат от моноцити от периферна кръв от костния мозък и се диференцират в различни макрофаги подмножества в ТМЕ . ТАМs могат да бъдат разделени на два фенотипа: М1 и М2 макрофаги. М1 синтезират провъзпалителни цитокини като фактор на туморна некроза- α (TNF- α), IL-1, IL6, IL-12, IL-23 и реактивни азотни и междинни кислородни съединения и по този начин инхибират развитието на тумор. От друга страна, фенотипът М2 секретира цитокини като IL-4, IL-13, IL-10, витамин D3 и глюкокортикоиди, което води до отслабване на антитуморната активност и засилване на способността за поддържане на ангиогенезата и тъканно ремоделиране, което е от полза за туморния растеж и инвазия. За да могат М1 фенотипните макрофаги да изпълняват основната си дейност, т.е. фагоцитоза, те трябва да разпознаят туморната клетка; обаче, туморните клетки се опитват да избегнат макрофагите. Туморните клетки избягват имунологичното наблюдение по три начина: 1. загуба на антигенност; 2. загуба на имуногенност и 3. модулирането на имуносупресивна микросреда. Загуба на имуногенност може да се наблюдава дори при напълно запазена антигенност и интактен път на обработка и представяне на неоантигена. Типичните механизми за намалена имуногенност са свръхекспресията на негативни корцептори от Т-лимфоцити и техните лиганди на повърхността на туморните клетки. Един такъв механизъм е експресията на CD47.

ТМС не само играе ключова роля по време на иницирането на тумора, прогресията и процесите на метастазирание, но също така има дълбок ефект върху терапевтичната ефикасност. Медираната от ТМС резистентност към химиотерапия е резултат от сложни взаимодействия с туморните клетки. Експресията на CD47 върху незлокачествени клетки изпраща сигнал „не ме яж“ към фагоцитите, като по този начин осигурява имунна толерантност в човешкия организъм. Когато CD47 се експресира върху туморни клетки, това им позволява да избегнат имунната система. Известно е, че CD47 насърчава растежа, инвазията и миграцията на ракови клетки. При карцином на гърда и дребноклетъчен карцином на белия дроб се съобщава, че експресията на CD47 е свързана с напреднал стадий при диагностициране, лимфогенни метастази и рецидив. Високата експресия на CD47 има ограничена корелация с намалена 5-годишна преживяемост без заболяване. Използвайки модели на ксенотрансплантация, беше показано, че анти-CD47 антителата инхибират туморния растеж и метастазите. Заглушаването на CD47 от siRNA инхибира растежа на меланома и на неговите белодробни метастази. Понижаването на CD47 инхибира неговия туморен растеж, клетъчна инвазия и метастази при недробноклетъчен рак на белия дроб. Свърхекспресията на CD47 в клетъчните линии от овариален карцином стимулира растежа и подвижността на раковите клетки. Според някои проучвания, броят на макрофагите се увеличава с прогресията на цервикалните неопластични лезии. Предполага се, че туморните клетки секретират различни видове цитокини в ТМС, за да стимулират миграцията на моноцити към неопластичната тъкан. Освен това високата концентрация на тези клетки корелира с неблагоприятни клинични находки, като метастатични лимфни възли и по-напреднал стадий според FIGO. Възможно обяснение е, че под въздействието на туморни клетки, макрофагите вероятно допринасят за прогресията на карцинома чрез промяна на техния фенотип към такъв с намалена антиген-представяща функция и потискане на Т-клетъчната пролиферация. Други проучвания са установили, че голям брой TAMs показват значителна отрицателна корелация с туморния стадий и не са прогностичен маркер при СС. Количественото определяне на имунните клетки само по себе си не отразява динамиката и функционалността на ТМС. В жизнеспособните тъкани те не са фиксирани и могат да се движат пространствено. Подобно на изследванията при други неоплазми, имунните клетки могат да бъдат разделени на интратуморни (интраепителни) и стромални. Клетките в туморното гнездо или в директен контакт с неопластично променени клетки се определят като интратуморни. Стромалните имунни клетки в компонента на съединителната тъкан преминават между туморната (паренхимна) зона, без да имат пряк контакт с туморните клетки. И двата вида са истински имунни клетки, инфилтриращи тумора, т.е. те са разположени в областта на тумора. Разграничаването им е условно, тъй като отразява статичната им локализация в изследвания хистологичен срез. Според някои резултати стромалният компонент показва по-голям брой макрофаги от интраепителния. Установено е обаче, че увеличеният брой макрофаги в епителната зона е свързан със злокачествена трансформация при КМШ. От всичко, което е

докладвано досега, мнението е, че CD47 има много важна роля в онкогенезата при много злокачествени болести. Към днешна дата не са провеждани молекулярно-биологични изследвания на експресията на CD47 при цервикален карцином.

От нашето проучване можем да направим следните заключения: Резултатите са сходни независимо от това кой имунохистохимичен метод е използван. Най-значимата корелация се наблюдава при използване на H-скор ($p = 0,00018$), в сравнение с резултата на *Allred* ($p = 0,0013$) и комбинирания резултат ($0,0002$). Експресията на CD47 е по-висока за pT1b в сравнение с pT2 и няма статистически значима разлика между pT2A и pT2B. Експресията на CD47 е по-висока в етап FIGO 1 от етап FIGO 2. Експресията на CD47 не зависи от нодалния статус. На пръв поглед тези резултати може да не са логични и да се различават от докладваните досега в литературата за други неоплазми. Въпреки това, нашите резултати могат да отразяват различната роля на механизмите за избягване на тумора на различни етапи от еволюцията на КМШ. Може да се спекулира, че в ранната фаза на развитие на КМШ, популациите от туморни клетки избягват предимно медирано от вродения имунитет наблюдение чрез повишена регулация на CD47. След като тази първа линия на имунно наблюдение бъде избегната, популацията от ракови клетки вече няма да се възползва от повишената регулация на CD47, а по-скоро ще трябва да избегне Т-клетъчно-медирана ерадикация. Следователно по-напредналите тумори дерегулират обратно експресията на HLA клас I молекули и вече няма да регулират нагоре експресията на CD47, както се вижда от описаните резултати.

В нашето проучване е сравнена експресията на стромални и интратуморни CD68+ клетки и е анализирана тяхната роля в прогресията на тумора. Няма сигнификантна значимост спрямо размер, стадий на тумора, лимфен статус и интратуморен и стромален CD68. Високата инфилтрация от стромални макрофаги (CD68-ST) е неблагоприятен прогностичен фактор, докато високата инфилтрация от интратуморни макрофаги (CD68-IT) е свързана с по-добра прогноза. Не се отчита сигнификантна връзка между нивата на CD47 и стромален CD68. Отчита се обаче статистически значима разлика в нивата на интратуморен CD68 и CD47, високата експресия на CD47 се среща по-често при ранни стадии и корелира с по-голяма инфилтрация от CD68-IT

Отчита се сигнификантна връзка между интратуморен CD68 и хистологията на КМШ, като изявата е по-висока при плоскоклетъчни варианти, висока инфилтрация на CD68-IT клетки се открива само при пациенти с ПКК, но не и при аденокарцином и аденосквамозен карцином.

VI. ИЗВОДИ

В резултат на проведените изследвания и анализи могат да бъдат направени следните 6 изводи:

1. експресията на CD47 и инфилтрацията от CD68+ макрофаги са важни характеристики на туморната микросреда при КМШ. Нивата на експресия на CD47 имат значима корелация с ранен стадий на карцином на маточна шийка pT1b спрямо pT2a и pT2b
2. установява се сигнификантна връзка между интратуморен CD68 и хистологията на карцином на маточната шийка с повишена експресия при карцином на маточна шийка с плоскоклетъчна хистология
3. установява се негативното прогностично значение на висока инфилтрация от стромални макрофаги (CD68-ST), както и позитивното прогностично значение на високата инфилтрация от интратуморни макрофаги (CD68- IT)
4. установява се висока експресия на CD47, която се среща по-често при ранни стадии и корелира с по-голяма инфилтрация от CD68-IT
5. установява се научно и клинично значение на коекспресията на стромални макрофаги (CD68-ST) и на интратуморните макрофаги (CD68- IT) с предиктивно значение за стратификация на риска
6. установява се възможност за потенциално таргетиране на оста CD47-SIRP α като нова имунотерапевтична стратегия при КМШ.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Приноси с научно-теоретичен характер

- 1.1 Проучени са клинично-патологичните корелации на CD47 при карцином на маточна шийка
- 1.2 Проучени са клинично-патологичните корелации на CD68 при карцином на маточна шийка
- 1.3 Проучена са и се докладват данни за коекспресивна роля на CD47, CD68 при различните клинично-патологични асоциации при пациенти с карцином на маточна шийка.

2. Приноси с научно-практичен характер

- 2.1 Предлага се стратификацията на риска и персонализиране на лечението при пациенти с ранен карцином на маточна шийка (pT1, pT2a и pT2b)
- 2.2 Предлага се потенциално таргетиране на оста CD47-SIRP α като нова имунотерапевтична стратегия

VIII. ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Публикации в пълен текст

1. Dimitrova P, Vasileva-Slaveva M, Shivarov V, **Hasan I**, Yordanov A. Infiltration by Intratumor and Stromal CD8 and CD68 in Cervical Cancer. *Medicina*. 2023;59(4):728. <https://doi.org/10.3390/medicina59040728>; Web of Science (IF-2.498), Scopus(SJR-0,536);ISSN: 1648-9144
2. Yordanov A, Tsoneva E, Kostov S, Karakadieva K, **Hasan I**. The Role of CD47 in Gynecological Oncology, Surgery, Gastroenterology and Oncology, Vol. 29, No. 2, Jun 2024, Article DOI: 10.21614/sgo-665
3. Yordanov A, Damyanova P, Vasileva-Slaveva M, **Hasan I**, Kostov S, Shivarov V. Integrated Analysis of Phagocytic and Immunomodulatory Markers in Cervical Cancer Reveals Constellations of Potential Prognostic Relevance, *International Journal of Molecular Sciences*, 2024 Aug., 22;25(16):9117. Doi: 10.3390/ijms25169117. PMID: 39201801 Free PMC article
4. **И. Хасан**, В. Шиваров, П. Спасов, Ц. Йорданов, М. Мусин, И. Панджарова, С. Тунчева, Х. Маркова, Т. Караниколова, С. Велчова, А. Консулова, А. Йорданов. Роля на CD47 И CD68 при карцином на маточна шийка. *Онкология* 2025;1:16

2. Научни съобщения

1. Хасан И, Консулова А, Шиваров В. Роля на CD47 и CD68 при карцином на маточната шийка. XV-та юбилейна научна конференция по онкология с международно участие, Банско 20-22 юни 2025г. 2025;1;16