МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛОВДИВ

КАТЕДРА ПО ОБЩА И КЛИНИЧНА ПАТОЛОГИЯ

Д-р ДАНИЕЛ ЙОРДАНОВ МАРКОВ

РОЛЯТА НА ХИПОКСИЯТА И ЕПИТЕЛНО-МЕЗЕНХИМНИЯ ПРЕХОД В КАНЦЕРОГЕНЕЗАТА ПРИ ЕНДОМЕТРИОЗА, ЕНДОМЕТРИАЛНИ И ЯЙЧНИКОВИ КАРЦИНОМИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

Научна област: Медицина
Научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“,
шифър 03.01.03

Научен ръководител:
доц. д-р Илия Петров Биволарски, д.м.

Пловдив, 2025 г.

Дисертационният труд е написан на 180 страници и е онагледен с 42 фигури, 12 таблици и 40 микроскопски снимки. При изложението на обзора и при обсъждането на резултатите е коментирана информация от общо 289 литературни източника. Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд. Дисертационният труд е финансиран по Докторантски проект към МУ – Пловдив.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 19.01.2026 г. от 14 часа, във Втора аудитория на МУ – Пловдив, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научна степен „доктор“ на МУ – Пловдив. Дисертационният труд е обсъден на Разширен катедрен съвет в Катедра „Обща и клинична патология“ на МУ – Пловдив, и е насочен за защита пред Научно жури, одобрено на Факултетен съвет.

➢ **Външни членове:**

1. Проф. д-р Мая Владова Гълъбова, дмн – Бургаски държавен университет „Проф. д-р Асен Златаров“
2. Проф. д-р Юлиан Руменов Ананиев, дм – Тракийски университет – Стара Загора
3. Доц. д-р Кони Иванова-Танева, дм – Тракийски университет – Стара Загора

➢ **Вътрешни членове:**

1. Проф. д-р Веселин Тодоров Беловеждов, дм – Катедра „Обща и клинична патология“
2. Проф. д-р Екатерина Христова Учикова, дм – Катедра по Акушерство и гинекология

➢ **Резервни членове:**

1. Проф. д-р Николай Димитров Хаджиолов, дмн – УМБАЛ „Софиямед“ – София
2. Проф. д-р Пепа Косева Атанасова-Хрисчева, дм – Катедра “Анатомия, хистология и ембриология“

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по обща и клинична патология и на интернет страницата на МУ - Пловдив.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ЕМП – епително-мезенхимен преход
ИХХ – имунохистохимично изследване
МЕП – мезенхимно-епителен преход
HIF1α – хипокси-индуциран фактор 1 алфа
Ki-67 – ядрен протеин, маркер за клетъчна пролиферация
SMA – гладкомускулен актин
Fascin – протеин, участващ в клетъчната миграция и инвазия
VEGF – съдов ендотелен растежен фактор
p53 – онкопротеин, контролиращ клетъчния цикъл и апоптозата
CDH1 – ген, кодиращ Е-кадхерина (молекула за клетъчна адхезия)
CTNNB1 – ген, кодиращ Бета-катенин (участва в клетъчната адхезия и сигнализация)
WNT1 – протоонкоген, лиганд на Wnt сигналния път
ER – естрогенов рецептор
PR – прогестеронов рецептор
TGF-β – трансформиращ растежен фактор бета
ET1 – ендотелин 1
EGFR – рецептор за епидермален растежен фактор
ARID1A – ген, който кодира протеин, участващ в ремоделирането на хроматина, и е свързан с различни видове рак.
PTEN – ген, който кодира протеин, играещ роля на туморен супресор.
PIK3CA – ген, който кодира белтък, участващ в клетъчната сигнализация.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ендометриозата, ендометриалният и яйчниковият карцином представляват три значими медицински проблема със сериозно отражение върху женското здраве в глобален мащаб. Сложността на тези заболявания и честотата, с която те се срещат, предопределят високата им социална значимост, както и необходимостта от задълбочено разбиране на патогенетичните механизми, които стоят в основата им. В съвременната медицина вниманието към връзката между ендометриоза и злокачествените процеси в матката и яйчниците се увеличава, като особен интерес представляват механизмите на хипоксията и епително-мезенхимният преход (ЕМП), заради доказаната им роля в прогресията и агресивността на тези заболявания (Giannella et al., 2021; Guo et al., 2022).

През последните десетилетия се наблюдава съществено нарастване на случаите с ендометриоза, като заболяването засяга между 6% и 10% от жените в репродуктивна възраст по целия свят (Zondervan et al., 2020). Характерната симптоматика на ендометриозата, включваща хронична тазова болка, дисменорея и безплодие, води до сериозни социални и икономически последствия. Заболяването влияе не само на физическото здраве, но и на психо-емоционалното състояние на пациентките, което от своя страна утежнява допълнително качеството им на живот и налага комплексен и по-прецизен подход за диагностика и лечение (Johnson et al., 2021).

От друга страна, ендометриалният карцином се нарежда сред най-честите злокачествени заболявания на женската полова система в световен мащаб, като тенденцията през последните години сочи стабилно повишаване на случаите, особено в развитите страни. Този карцином представлява около 7% от всички новодиагностицирани случаи на рак при жените, като честотата му след менопаузата нараства (Sung et al., 2021). Увеличаването на възрастта на пациентките при първоначално поставяне на диагнозата представлява допълнителна трудност за здравната система. Ендометриалният карцином се характеризира с голямо хистологично и молекулярно разнообразие, което предизвиква необходимостта от прецизиране на диагностичните и прогностичните критерии, както и от персонализиране на терапевтичния подход.

Овариалният карцином е познат като едно от най-смъртоносните гинекологични заболявания, поради честото му откриване в напреднал стадий. Въпреки напредъка в диагностичните методи и терапевтичните стратегии, петгодишната преживяемост остава незадоволителна и не надхвърля 40% в световен мащаб (Ferlay et al., 2020). Повечето случаи се диагностицират в стадий III или IV, което значително ограничава възможностите за успешна терапия и подобряване на прогнозата. Това обуславя необходимостта от проучване на

допълнителни маркери и механизми, свързани с агресивността на заболяването и неговото метастазиране.

В контекста на патогенезата на тези заболявания, хипоксията играе значителна роля чрез активиране на специфични сигнални пътища, ключов от които е HIF (Hypoxia-Inducible Factor). Този фактор е директно свързан с регулацията на генната експресия, ангиогенезата, клетъчната миграция и инвазия - процеси, които определят агресивното поведение и способността за метастазиране на злокачествените тумори (Keith et al., 2019). Епително-мезенхимният преход (ЕМП) представлява процес, при който епителните клетки придобиват мезенхимни свойства, повишавайки своята подвижност и инвазивен потенциал. Комбинацията от хипоксия и ЕМП се разглежда като ключов механизъм, допринасящ за прехода от доброкачествено състояние като ендометриоза към малигнени тумори.

На базата на актуалните познания относно епидемиологичните аспекти, новите класификационни подходи, молекулярните механизми и клиничното значение на хипоксията и епително-мезенхимния преход при тези често срещани гинекологични заболявания са разгледани съвременните подходи за диагностика и терапия, както и перспективите за бъдещи изследвания в областта на персонализираната медицина, базирана на интегрирането на молекулярни и имунохистохимични маркери с цел подобряване на диагностичните алгоритми, терапевтичните стратегии и общата прогноза при тези пациентки.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. ЦЕЛ

Цел на настоящото проучване е да се изследва имунохистохимичната експресия на HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin, β-cathenin, SMA и Fascin в огнища с ендометриоза, при ендометриални и яйчникови карциноми във връзка с хипоксията, канцерогенезата и прогресията и да се потърси корелация с хистологични и клинико-патологични параметри.

2. ЗАДАЧИ

1. Да се проучи разпределението на случаите с ендометриоза, ендометриален и яйчников карциноми в биопсичния масив на Отделението по Клинична патология на УМБАЛ Пълмед-Пловдив за период от пет години 2019-2023г.
2. Да се оцени експресията на HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin и Fascin при пациентки с извънматочна ендометриоза и аденомиоза, като се разпределят по възраст и по локализация.
3. Да се изследва експресията на HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin, β-cathenin, SMA и Fascin в трите групи във връзка с хипоксията и епително-мезенхимния преход и да се направи сравнителен анализ.
4. Да се проучи сравнително експресията на HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin, β-cathenin и Fascin в инвазивния туморен фронт и около некротични огнища при карциноми на яйчниците и на ендометриума и да се сравни с експресията в еутопичен ендометриум и ендометриоза във връзка с канцерогенезата.
5. Да се сравни разпределението на експресията на HIF1alpha, Ki 67 и Fascin в инвазивния фронт и в тумора при пациентки с карцином и ендометриоза.
6. Да се изследва експресията на изследваните антитела във връзка с разпределението на туморите по FIGO стадий и да се изведе прогностичен ИХХ-панел за оценка на риска от прогресия в трите групи.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. МАТЕРИАЛ

Изследването включва ретроспективно проучване на 343 случая с ендометриоза и с тумори на матката и яйчниците от биопсичния масив на Отделението по клинична патология на УМБАЛ „Пълмед“ – гр. Пловдив за период от 5 години (2019 г. - 2023 г.). Всички биопсични диагнози са поставени на оперативен материал от Клиниката по Хирургия и АГ клиниката на УМБАЛ „Пълмед“. От тях имунохистохимично са проучени 100 случая.

Хистологичните и имунохистохимичните изследвания на биопсичните материали са изработени в лабораторията на Морфологичния център на МУ-Пловдив и в лабораторията на Отделението по клинична патология на УМБАЛ „Пълмед“ – гр. Пловдив.

Данните от изследваните клинико-морфологични параметри и резултатите от проведените имунохистохимични изследвания на всички проучени пациентки бяха кодирани и въведени в електронна база данни за последваща статистическа обработка.

Материалите са разпределени в 3 основни групи:

I група – Пациентки с ендометриоза

II група – Пациентки с ендометриален карцином

III група – Пациентки с яйчников карцином

В **първата група** пациентките са 32 на брой, със средна възраст 48.65±14.87 г. Най-младата пациентка е на 24 годишна възраст, а най-възрастната – на 69 г.

Във **втората група** пациентките са 34 на брой, със средна възраст 66.45±10.67 г. Най-младата пациентка е на 43 годишна възраст, а най-възрастната – на 82 г.

В **третата група** пациентките са 34 на брой, със средна възраст 67.21 ± 8.94 г. Най-младата пациентка е на 56 годишна възраст, а най-възрастната – на 86 г.

За основните групи работен материал използвахме включващи и изключващи критерии за подбор на случаите.

Включващи критерии:

1. Биопсични случаи на хоспитализирани и оперирани пациентки с потвърдена хистологично клинична диагноза карцином на ендометриума.
2. Случаи с хистологично потвърдена клинична диагноза ендометриоза с различни локализации.
3. Биопсично потвърдени случаи с клинична и хистологична диагноза карцином на яйчника.

Изключващи критерии:

1. Пациенти с хистологичен резултат, различен от ендометриоза, ендометриален или яйчников карцином.

2. Случаи на метастази в яйчниците с неясно първично огнище.
3. Непрезентативни хистологични резултати.
4. Биопсични материали с клинични данни за ендометриоза, но недоказани хистологично.

Имунохистохимичните изследвания с маркерите HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin, β-cathenin, SMA и Fascin са извършени върху оперативен биопсичен материал от случаите с хистологично диагностицирани ендометриоза, ендометриален и яйчников карцином. Всички имунохистохимични изследвания са извършени в Морфологичния център на МУ – Пловдив и в ОКП на УМБАЛ „Пълмед“.

2. МЕТОДИ

2.1. Класическа хистологична техника

Рутинно оцветяване с хематоксилин-еозин /H-E/

Хистологичното изследване на биопсичните материали на всички случаи бе извършено чрез изработване на препарати по класическа хистологична техника. Оперативно отстраненият тъканен материал се фиксира в 10 % буфериран разтвор на формалин. Следва оформяне на тъканен блок и включване в парафин. Парафинови срези с дебелина 5 μm бяха депарафинирани и рехидратирани през алкохоли с низходяща концентрация. Оцветяването с хематоксилин-еозин се извърши по стандартна методика. Срезовете бяха включени в канадски балсам и покрити с покривни стъкла. Следва микроскопско изследване на получените препарати.

При пациентки с **ендометриоза** се определяха възраст, локализация на процеса, наличие на съпътстваща патология, като хиперплазия на ендометриума, цервицит, лейомиоми, карцином на ендометриума, полипи на ендометриума, карцином на маточната шийка, атрофия на ендометриума, карцином на яйчника, кисти на яйчника и съдова инвазия.

При всички случаи с хистологично доказан **ендометриален карцином** определяхме следните клинико-морфологични показатели: възраст на пациента, тип на ендометриален рак, стадий по Фиго, грейдинг при тип I, хистологичен вид на тип I, туморни емболи, лимфо-васкуларна и периневрална инвазия, туморна некроза, стромна реакция и десмоплазия, дълбочина на инвазия и метастази.

При всички случаи с хистологично доказан **яйчников карцином** определяхме следните клинико-морфологични показатели: възраст на пациента, стадий по Фиго, хистологичен вид, хистологична степен на диференциация на тумора, нодален статус, лимфо-васкуларна инвазия и смив от перитонеум за цитологично изследване.

2.2. Имунохистохимично изследване

Имунохистохимичното изследване е извършено в Морфологичния център на МУ – Пловдив и в ОКП на УМБАЛ „Пълмед“ в съответствие със валидирани стандартни протоколи, предоставени от фирмата производител - DAKO (Дания) и Merck/Cell Marque (Германия).

От избраните парафинови блокчета с презентативни тъканни изменения се изготвиха серийни срезове с дебелина 5 μm, които се монтираха върху адхезивни предметни стъкла. Срезите се депарафинираха и рехидратираха в алкохоли с низходяща концентрация. Промиването се извърши съобразно инструкциите за употреба. Преди провеждането на имунохистохимичната реакция се извърши антигенно възстановяване с инкубиране в EnV FLEX Target retrieval solution, pH9 за E-Cadherin, beta-Catenin и SMA за 20 мин., pH6 за Ki-67 за 20 мин., pH9 за HIF-1α за 30 мин., pH6 за Fascin за 30 мин.

Имунохистохимичната реакция се проведе в съответствие със стандартните протоколи на фирмата производител чрез използване на визуализираща система EnVision FLEX Visualization System. Реакцията се счита за положителна при кафеникаво оцветяване. Наблюдава се в различни участъци на клетката (мембрана, цитоплазма, ядро) в зависимост от локализацията на търсения антиген. Използваните антитела срещу E-Cadherin, beta-Catenin, SMA и Ki-67 са на фирма DAKO (FLEX E-Cadherin, клон NCH-38, FLEX beta-Catenin, клон b-Catenin-1, FLEX Ki-67, клон MIB-1 и FLEX SMA, клон 1A4), както и заешко моноклонално антитяло срещу HIF-1α, клон EP118, и мише моноклонално антитяло срещу Fascin, клон 55-к2 на фирмата Merck/Cell Marque, Германия.

ИХХ реакцията беше извършена на апарат на Dako Autostainer Link 48 с автоматизирано оцветяване.

Серийно срези от всеки от изследваните случаи се тестваха за използваните антитела. При всяка серия на изследване с отделните антитела се изготвиха положителна и отрицателна контрола.

Положителната контрола се избра в съответствие с инструкциите на фирмата производител: простата - за Е-кадхерин и beta-Catenin; тънко черво - за SMA; лимфен възел - Fascin, тонзила - за Ki-67 и бъбрек - за HIF-1α. Отрицателната контрола за всяко антитяло се изработи по стандартна имунохистохимична процедура, без да се накапва изследваното антитяло.

Отчитане на резултатите от ИХХ-изследване

Оценката на биопсичните материали с Х-Е оцветяване и отчитането на ИХХ резултати бяха извършени на 2 нива: ниво I - от докторанта и ниво II консултативно - от научния ръководител. За окончателен резултат се приемаше средната стойност от оценките на двете нива.

Използван е светлинен микроскоп Olympus Model № CX21LEDFS2, SN 0E86964. Във всеки случай са избирани поне 10 полета - общо 1000 клетки, наблюдавани при 400 увеличение (окуляр x10, обектив x40).

Методи за отчитане на имунохистохимичната експресия

В настоящото изследване оценката на имунохистохимичната експресия на изследваните маркери бе извършена полуколичествено, като се съблюдаваха специфичната локализация и интензитетът на оцветяването, с оглед на максимална възпроизводимост и обективност. Позитивна имунохистохимична експресия за всеки маркер беше дефинирана при ясно, специфично оцветяване в съответните клетъчни локализации - ядрено, цитоплазмено и/или мембранно, съобразно утвърдени в световната литература подходи.

За оценка на експресията на **E-кадхерин** възприехме подхода, предложен от Takai et al. (2014). Позитивността се дефинира при наличие на ясно мембранно и/или цитоплазмено оцветяване в над 10% от туморните клетки. Интензитетът на имунооцветяване се отчита полуколичествено в четири степени: липсваща (0), слаба (1+), умерена (2+) или силна (3+). Допълнително използвахме модела на оцветяване, предложен от Giurgea et al. (2012), класифицирайки го като фокусен, хетерогенен или дифузен. За отрицателен статус на епително-мезенхимния преход (ЕМП) бяха считани единствено случаите с оценка 3+ и дифузен модел, докато случаите с оценки 0, 1+, 2+ или наличие на участъци с липсваща експресия бяха дефинирани като положителен ЕМП-статус, съответстващ на намалена или изгубена Е-кадхеринова експресия (Giurgea et al., 2012).

Оценката на имуноекспресията на **β-катенин** се извърши аналогично на тази за Е-кадхерин, съгласно подходите описани от Takai et al. (2014). Отчиташе се ясно позитивно мембранно и цитоплазмено оцветяване в повече от 10% от туморните клетки. Освен интензитета (липсваща, слаба, умерена, силна експресия) и модела на оцветяване (фокусен, хетерогенен, дифузен), специално внимание се обърна на клетъчната локализация на експресията - мембранна, цитоплазмена или ядрена, тъй като ядрена локализация се свързва с по-висок злокачествен потенциал и активиран ЕМП (Takai et al., 2014; Giurgea et al., 2012).

Имунохистохимичната експресия на хипоксия-индуцируемия фактор **HIF-1α** беше оценена според ясното наличие на ядрено и/или цитоплазмено оцветяване в над 10% от туморните клетки, като използвахме широко приетия подход за класифициране на интензитета на оцветяване в четири степени: отрицателна, слаба (1+), умерена (2+) и силна (3+). В допълнение, процентът на позитивните клетки бе разделен на категории: липсваща експресия, под

10%, 10-25%, 25-50%, 50-75% и над 75% позитивни клетки. Моделът на оцветяване беше отчетен като перинекротичен, дифузен, смесен или хетерогенен, според критериите, посочени в публикацията на Seeber et al. (2011), разглеждаща експресията на HIF-1α като ключов маркер за туморна хипоксия и агресивност при гинекологични малигнени тумори.

За пролиферативния маркер **Ki-67** беше приложен методът на полуколичественото броене на позитивните туморни ядра спрямо общия брой на изследваните клетки. Позитивна експресия се дефинираше при ясно и специфично ядрено оцветяване. Поради ръчното преброяване и необходимостта от прагматичен подход, позитивните случаи се разделиха на следните категории: липсващи позитивни клетки (0), 1-10% позитивни клетки (1), 10-50% позитивни клетки (2) и над 50% позитивни клетки (3). Този метод, широко възприет в диагностичната патология и проучвания върху ендометриални и овариални карциноми, е в съответствие с международните препоръки за отчитане на Ki-67 при тумори с висока хетерогенност (Dowsett et al., 2011).

Експресията на гладкомускулния актин (**SMA**) беше отчетена при наличие на ясно позитивно мембранно и/или цитоплазмено оцветяване, като се класифицираше по интензитет на липсваща, слаба, умерена или силна експресия. Този метод на отчитане е стандартен за оценка на фиброза и десмопластична реакция в стромата на ендометриални и яйчникови карциноми (Yeung et al., 2013).

Оценката на **Fascin** беше извършена при позитивно цитоплазмено оцветяване в над 10% от туморните клетки. Интензитетът на експресията се класифицираше на липсващ, слаб, умерен и силен, с допълнителна оценка на модела на оцветяване в микросъдовете (дифузен или хетерогенен) и локализацията на експресията (стромални клетки и микросъдове, епителни клетки или смесена локализация). Подобен подход е използван успешно в проучвания върху ролята на Fascin в туморната инвазия и метастазирането при различни солидни тумори, включително ендометриален и овариален карцином (Hashimoto et al., 2005).

2.3. Статистически методи на изследване

В настоящото изследване бяха формулирани и проверени статистически хипотези с прецизно изчисляване на стойността на p (p-value), което позволи обективна оценка на различията между сравняваните групи. За приемане на нулевата хипотеза (H_0), според която стойностите на даден параметър при отделните групи не се различават статистически, беше приет критерият $p>0.05$. Алтернативната хипотеза (H_1), съгласно която съществува статистически

значима разлика между сравняваните групи, се приемаше при $p<0.05$, което съответства на доверителна граница над 95% и допустима грешка от първи род под 5%.

За оценка на количествените параметри при липса на нормално разпределение бяха приложени непараметрични методи, включително тестът на Kruskal-Wallis при сравнение между повече от две независими групи. При установена статистически значима разлика между тях, бе използван последващ Dunn’s post hoc анализ за уточняване на различията по двойки. В случаите, в които се сравняваха само две независими групи, беше използван тестът на Mann-Whitney U.

Анализът на дискретни (категориални) променливи беше извършен с помощта на z-тест за сравнение на относителни дялове. При необходимост, в зависимост от броя на наблюденията и разпределението на очакваните стойности, се прилагаха също така χ^2 тест (хи-квадрат) и Fisher's Exact Test, особено при малки групи или при наличие на клетки с очаквани стойности под 5.

За представянето на описателната (дескриптивна) статистика се използваха параметри като медиана, междуквартилни стойности (25-ти и 75-ти персентил), средна стойност и стандартно отклонение, както и минимални и максимални стойности. Абсолютните и относителните честоти се използваха за описание на категорийни признаци като степен на експресия, модел на имунохистохимично оцветяване и епително-мезенхимен преход (ЕМП).

Графичната визуализация на данните беше реализирана посредством boxplot диаграми при непрекъснати величини, които представят медианата, персентилите и разсейването на стойностите. При дискретни показатели, като различни категории експресия или честотни съотношения между групи, бяха използвани стълбовидни (bar) и секторни (pie) диаграми, нормализирани към 100 процента.

Обработката на данните и провеждането на статистическия анализ бяха извършени с помощта на специализирания софтуер IBM SPSS Statistics, версия 26, както и с Microsoft Excel 2019, използван основно за таблична организация и визуализация на резултатите. Всички анализи са съобразени с методологичните принципи на медицинската статистика и осигуряват необходимата достоверност и възпроизводимост на резултатите от изследването.

IV. РЕЗУЛТАТИ ОТ СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ

Резултати задача 1

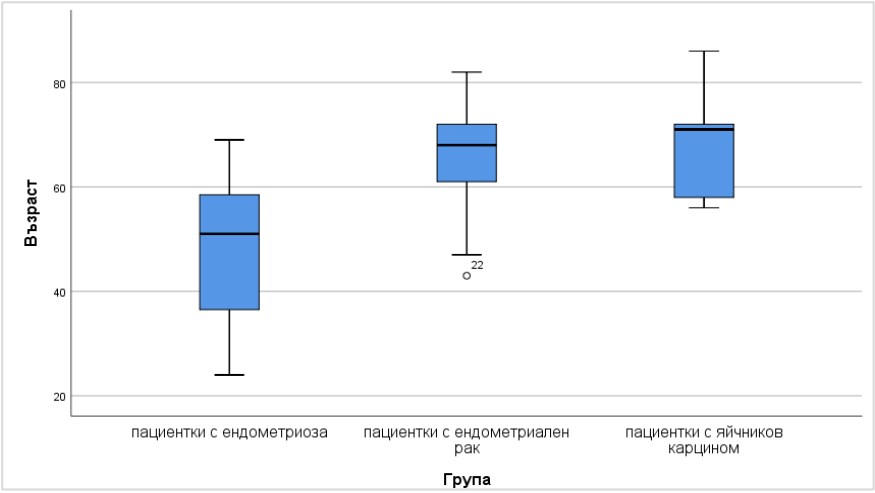
Проучи се разпределението на случаите с ендометриоза, ендометриален и яйчников карциноми по възраст в биопсичния масив на Отделението по Клинична патология на УМБАЛ „Пълмед“ - Пловдив за период от пет години 2019-2023г.

Прегледани бяха общо 343 биопсични случая, от които бяха установени 233 случая с ендометриоза с различна локализация и 110 случая с ендометриални и яйчникови карциноми. Направен беше селективен подбор според включващи и изключващи критерии за тъканни проби от трите изследвани групи. Бяха избрани 100 подходящи случая - 32 пациентки с ендометриоза, 34 с ендометриален и 34 с яйчников карциноми, за имунохистохимично изследване със съответните антитела.

Изследвали сме ретроспективно 100 случая на жени, с медиана на възрастта 64.5 г. (54 г.; 71 г.) разпределени в три групи: с ендометриоза; с ендометриален карцином и с карцином на яйчника в периода 2019-2023 г. Разпределението на броя и процентния дял пациентки в трите групи за посочения период са представени в Табл. 1.

Таблица 1. *Дескриптивна статистика на извадката от пациентки - честотно разпределение по групи и разпределение на възрастта (средни величини, мерки за разсейване)*

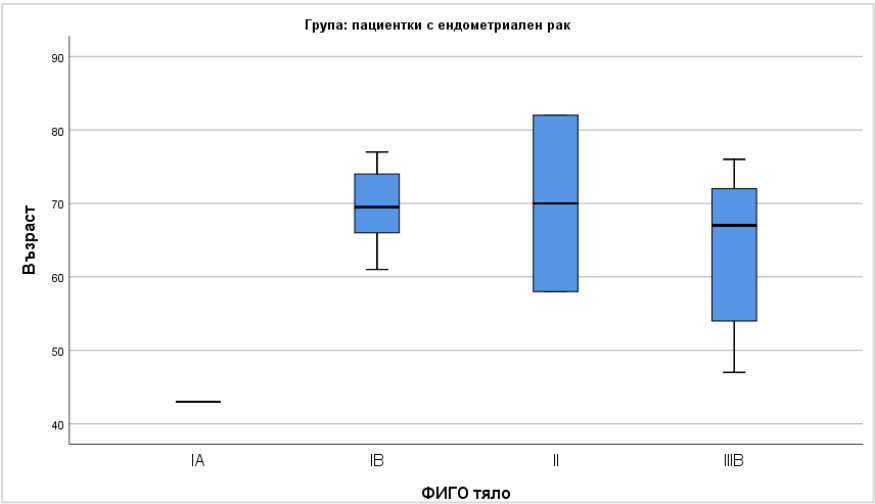
	Пациентки с ендометриоза	**Пациентки с ендометриален карцином**	**Пациентки с яйчников карцином**
Пациентки n (%)	32 (32)	34 (34)	34 (34)
Възраст (г.); средна аритметична ± SD години	48.65 ± 14.87	66.45 ± 10.67	67.21 ± 8.94
Възраст (г.); min – max	24 – 69	43 – 82	56 – 86
Възраст (г.); медиана	51	68	71
Възраст (г.); 25-ти персентил	33.75	59.5	57.5
Възраст (г.); 75-ти персентил	59.25	74	72.5



Фигура 1. *Бокс-плот диаграма с разпределение на възрастта по групи*

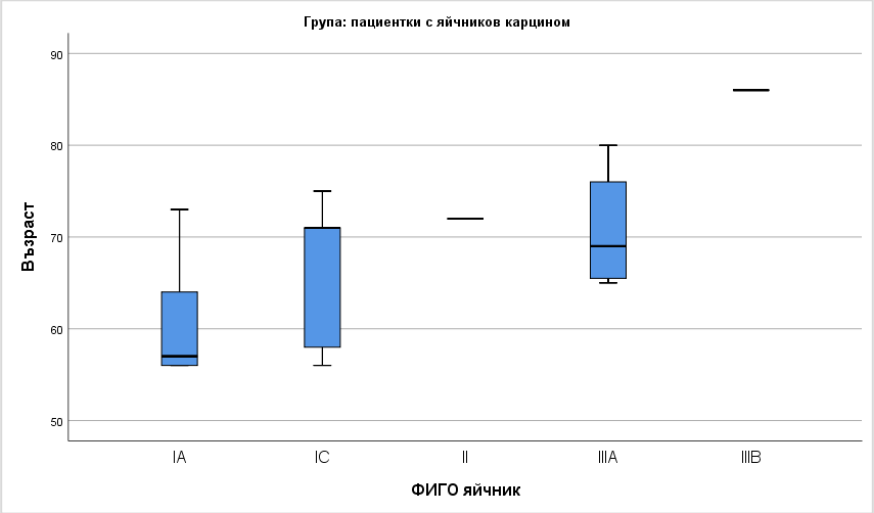
Установи се статистически значима разлика във възрастта на изследваните пациентки по групи (H=16.44, p=0.000). След проведен post hoc тест пациентките с ендометриоза (51 г.) са статистически значимо по-млади от тези с ендометриален рак (68 г.) (p=0.002), както и от тези с яйчников карцином (71 г.) (p=0.001). Не се наблюдава разлика между медианите на възрастта на пациентките с карциноми - ендометриален и яйчников.

Разпределението на пациентките с ендометриален карцином по медиана на възрастта и по ФИГО стадий е както следва: 5.9% – IA; 47.1% – IB; 11.8% – II; 35.2% – IIIB. Не се наблюдава достоверна разлика между медианите на възрастта по ФИГО стадий (H=3.52, p=0.318).



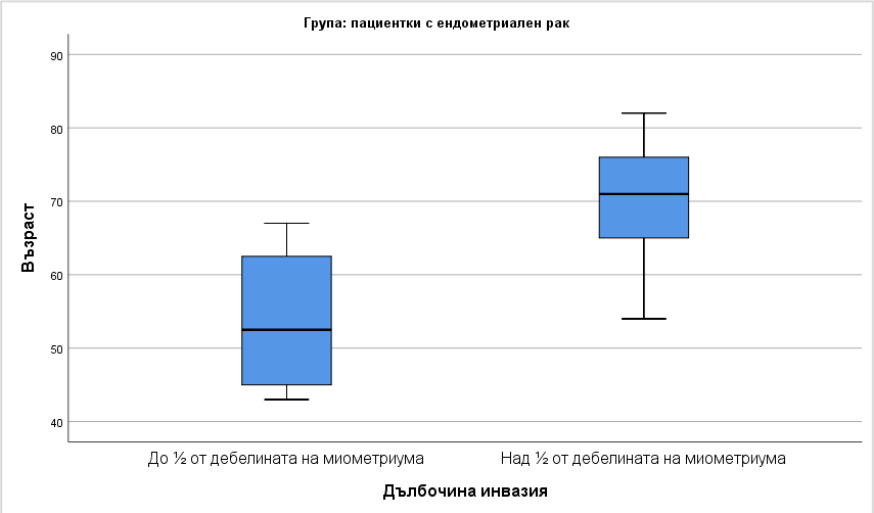
Фигура 2. *Разпределение на пациентките с ендометриален карцином (n=34) по възраст и по FIGO стадий*

Разпределението на пациентките с яйчников карцином по медиана на възрастта и по ФИГО стадий е както следва: 29.4% – IA; 35.3% – IC; 5.9% – II; 23.5% – IIIA; 5.9% – IIIB. Не се наблюдава достоверна разлика между медианите на възрастта по ФИГО стадий (H=5.90, p=0.207).



Фигура 3. *Разпределение на пациентките с яйчников карцином (n=34) по възраст и по ФИГО стадий*

Разпределението на пациентките с ендометриален карцином по медиана на възрастта и по дълбочина на инвазия на миометриума е както следва: 23.5% - до ½ от дебелината на миометриума; 76.5% - над ½ от дебелината на миометриума. След проведен тест на Ман-Уитни пациентките с инвазия до ½ от миометриума са статистически значимо по-млади от тези с инвазия над ½ от миометриума (p=0.015).

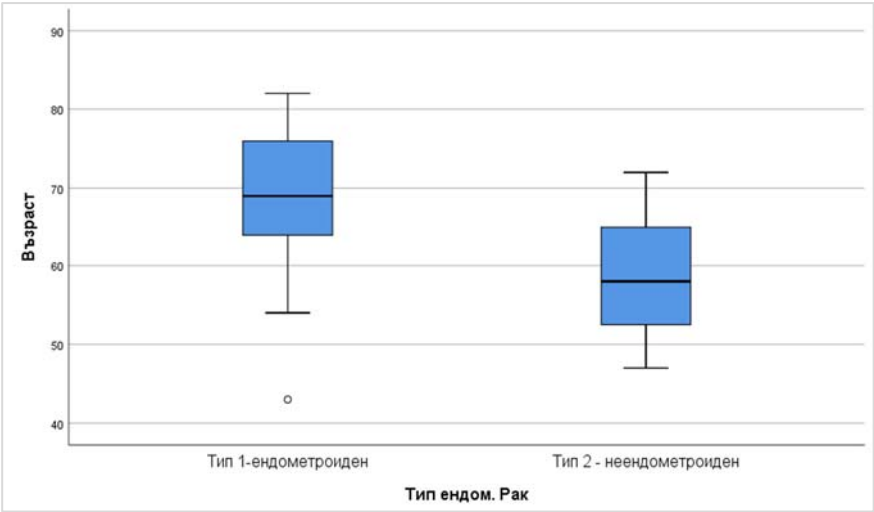


Фигура 4. *Разпределение на пациентките с ендометриален карцином (n=34) по възраст и по дълбочина на инвазия*

Съчетание на ендометриоза с друга маточна патология, представено в процентни дялове. Водещи съчетания са ендометриозата с атрофия на ендометриума и хроничен цервицит. Процентите са над 100, защото променливата включва повече от един възможен отговор.

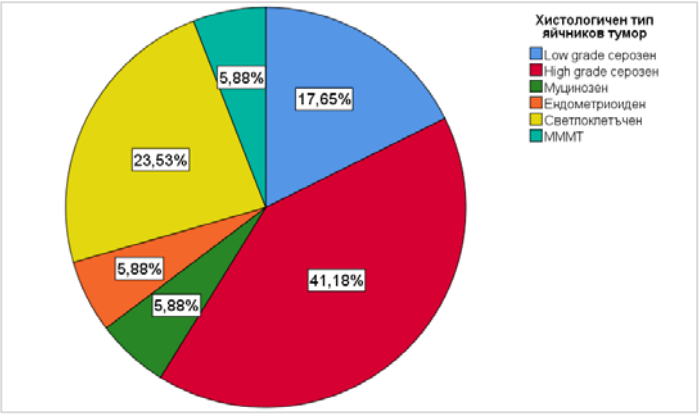
Фигура 5. *Процентен дял на съпътстваща ендометриозата маточна патология.*

Разпределението на пациентките с ендометриален карцином по медиана на възрастта и по хистологичен тип ендометриален карцином е както следва: 82.4% – тип 1 ендометроиден карцином; 17.6% – тип 2 неендометроиден карцином. Не се наблюдава достоверна разлика между медианите на възрастта по хистологичен тип ендометриален карцином (H=1.150, p=0.284).

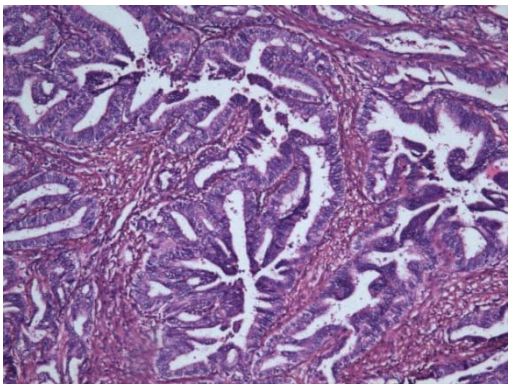


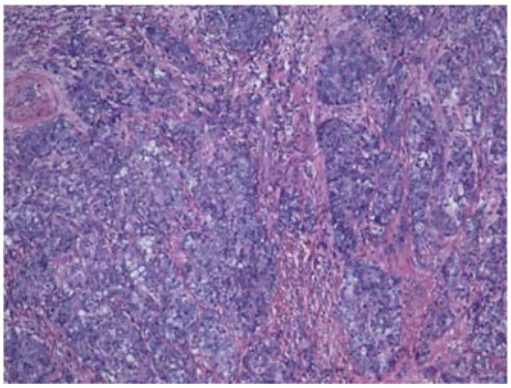
Фигура 6. *Разпределение на пациентките с ендометриален карцином (n=34) по възраст и по хистологичен тип карцином*

На кръговата диаграма е представено разпределението на относителните дялове на пациентките с яйчников карцином по хистологичен тип карцином, като най-висок е относителният дял на high grade серозен (41.18%), следван от светлоклетъчен (23.53%) и low grade серозен (17.65%). Не се доказа статистически значима разлика между относителните дялове по двойки (z-test, p≥0.05).



Фигура 7. *Относителни дялове на пациентките с яйчников карцином (n=34) по хистологичен тип карцином*





Снимка 1. *Умерено диференциран ендометриоиден аденокарцином на ендометриума, H-E x100*

Снимка 2. *High-grade серозен карцином на яйчника, H-E x100*

Резултати задача 2

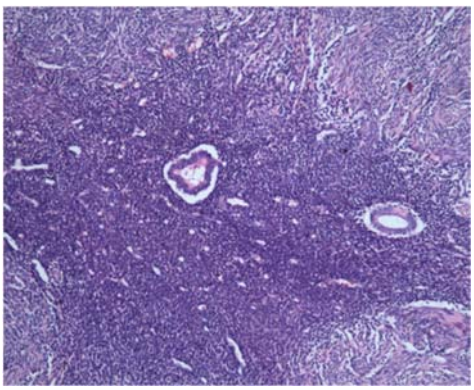
Проучи се експресията на anti HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin и β-cathenin при пациентки с ендометриоза по възраст и по локализация.

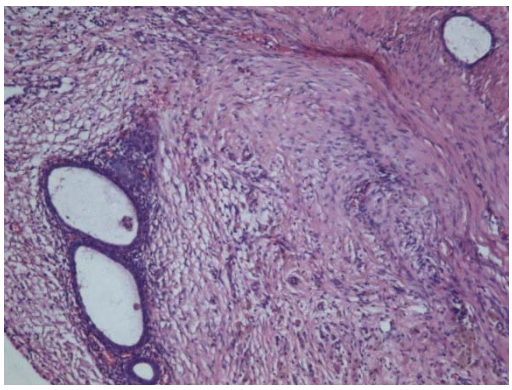
2.1. Разпределение по възраст

Поради факта, че ендометриозата се развива по-често при млади жени, в репродуктивна възраст, разделихме изследваните пациентки на две възрастови групи, съответно под и над 45години, за да сравним имунохистохимичната експресия на изследваните маркери.

Първата група включва 12 броя жени в репродуктивна възраст под 45г. Втората група са 20 на брой жени над 45г. в менопауза.

Извърши се групиране на променливата възраст в две групи - до 45 г. включително (n=12; 37.5%) и над 45 г. (n=20; 62.5%). Не се доказа статистически значима разлика между относителните дялове по двойки (z-test, $p \geq 0.05$).

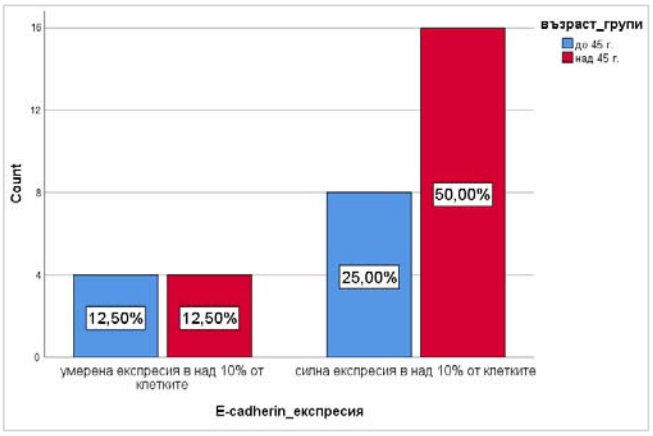




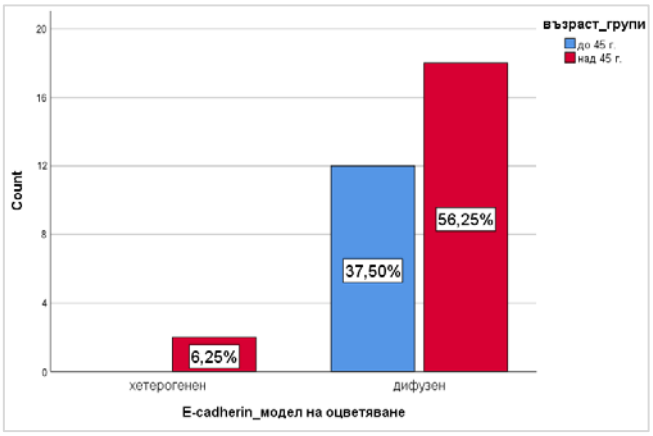
Снимка 3. *Аденомиоза, H-E x100*

Снимка 4. *Огнище с ендометриоза в постоперативен цикатрикс, H-E x100*

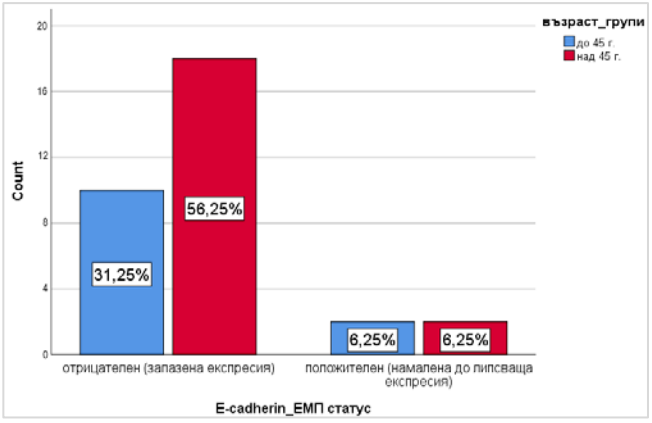
Силна експресия на E-cadherin се откри при пациентки над 45 години (50%), сравнени с жени под 45 години (25%). Установи се по-чест дифузен модел на оцветяване - при пациентки над 45 години (56.25%), и при жени под 45 години (37.5%). И в двете възрастови групи се установи еднакъв процент положителни за ЕМП статус (6.25%).



A



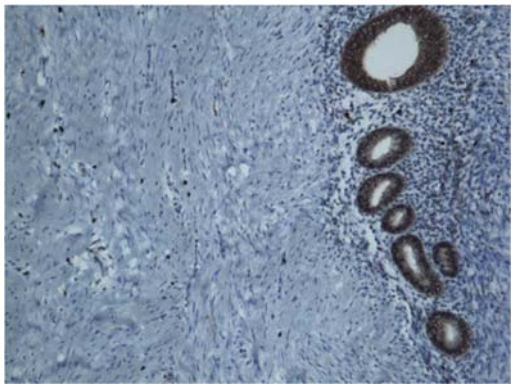
B

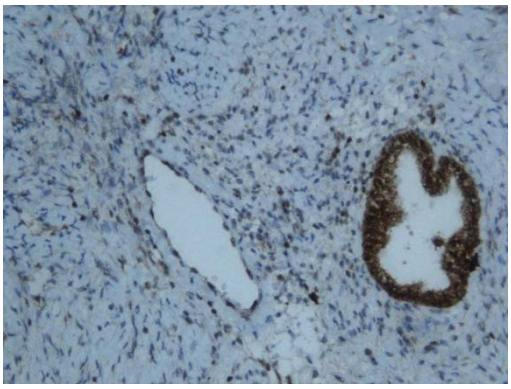


C

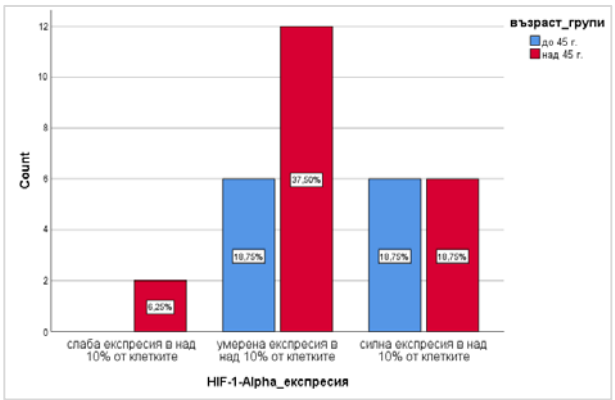
Фигура 8. (A, B, C) *E-Cadherin експресия, модел на оцветяване и ЕМП статус при пациентки с ендометриоза по възрастови групи*

При пациентките над 45 години преобладават умерена (37.5%) и силна (18.75%) експресия на anti HIF-1-alpha в над 10 процента от клетките, както и при тези на възраст под 45 години с умерена (18.75%) и силна (18.75%) експресия на anti HIF-1-alpha. Висок процент позитивни клетки се открива и при двете възрастови групи, както следва при пациентки под 45 години между 50 и 75 процента (31.25%), а при пациентки над 45 години между 50 и 75 процента (25%). Повече от 75 процента позитивни клетки са отчетени само при пациентки над 45 години (12.5%). При модела на оцветяване най-често е отчетен дифузен при жени под 45 години (18.75%), както и при пациентки над 45 години (43.75%).

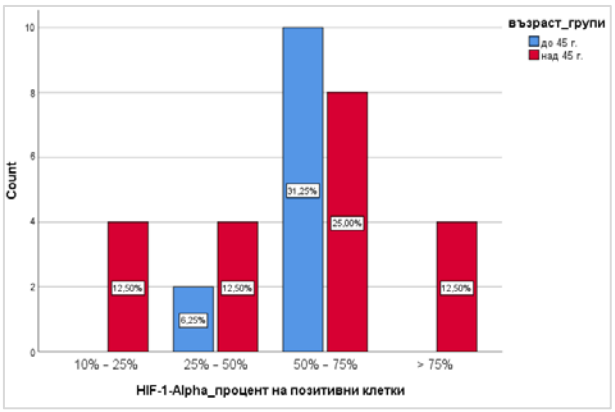




Снимка 5. *HIF-1-alpha, силна ядрена експресия при аденомиоза, ИХХ, x100*
Снимка 6. *HIF-1-alpha, дифузна ядрена експресия при извънматочна ендометриоза, ИХХ, x100*

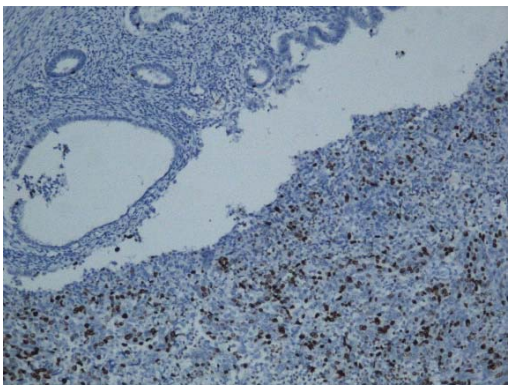
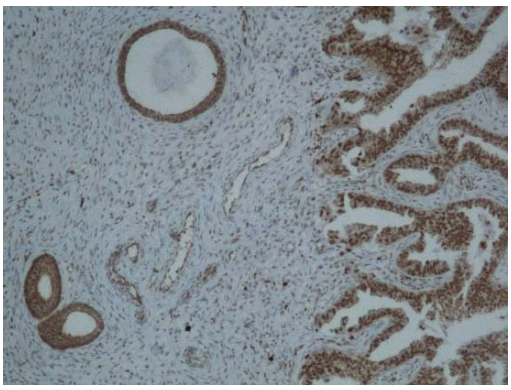


A



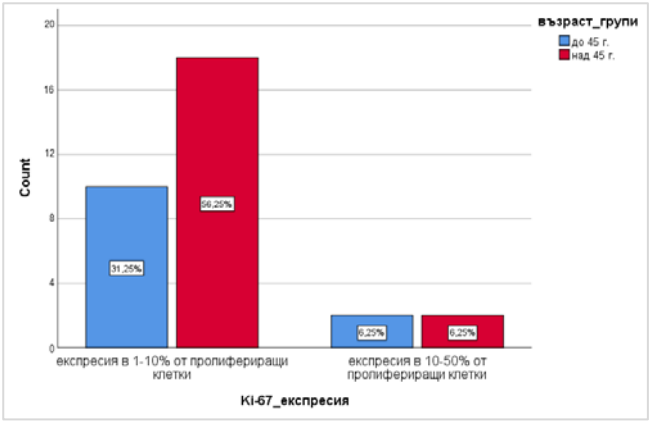
B

Фигура 9. (A, B) *Anti HIF-1-alpha експресия, процент позитивни клетки и модел на оцветяване при пациентки с ендометриоза по възрастови групи*

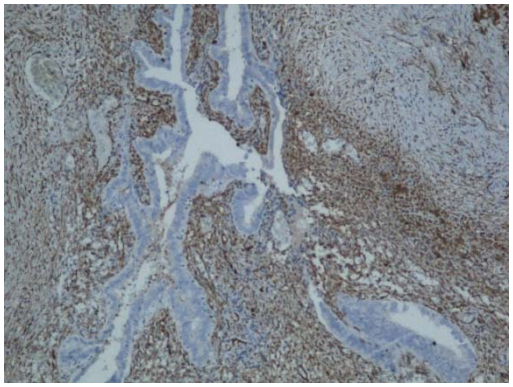
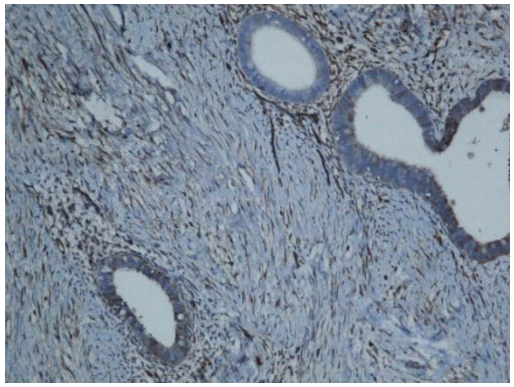



Снимка 7. *Ki 67, сравнителна експресия при ендометриоза и в ниско диференциран карцином на ендометриума, ИХХ, x100*
Снимка 8. *HIF-1-alpha, сравнителна експресия при ендометриоза и в умерено диференциран карцином на ендометриума, ИХХ, x100*

Експресия на Ki-67 в 1 до 10 процента се открипри пациентки над 45 години (56.25%), сравнени с жени под 45 години (31.25%). И в двете възрастови групи се откри експресия в 10 до 50 процента в пролифериращи клетки (6.25%). Установи се по-чест фокусен модел на оцветяване - при пациентки над 45 години (56.25%), и при жени под 45 години (31.25%).



Фигура 10. (А) *Ki-67 експресия и модел на оцветяване при пациентки с ендометриоза по възрастови групи*

Снимка 9. *Fascin, силна цитоплазмена експресия в стромата при аденомиоза, ИХХ, x100*
Снимка 10. *Fascin, умерена цитоплазмена експресия при извънматочна ендометриоза в стромални и епителни клетки, ИХХ, x100*

Умерена експресия на Fascin се откри при пациентки над 45 години (50%), сравнени с жени под 45 години (25%). Установи се по-чест хетерогенен модел на оцветяване на микросъдовете – при пациентки над 45 години (50%), и при жени под 45 години (25%). И в двете възрастови групи се установи различна локализация при пациентки под 45 години – в стромални клетки и микросъдове (25%) и смесен (стромални и епителни клетки, микросъдове) (12.5%), а при жени над 45 години – в стромални клетки и микросъдове (31.25%) и смесен (стромални и епителни клетки, микросъдове) (31.25%).

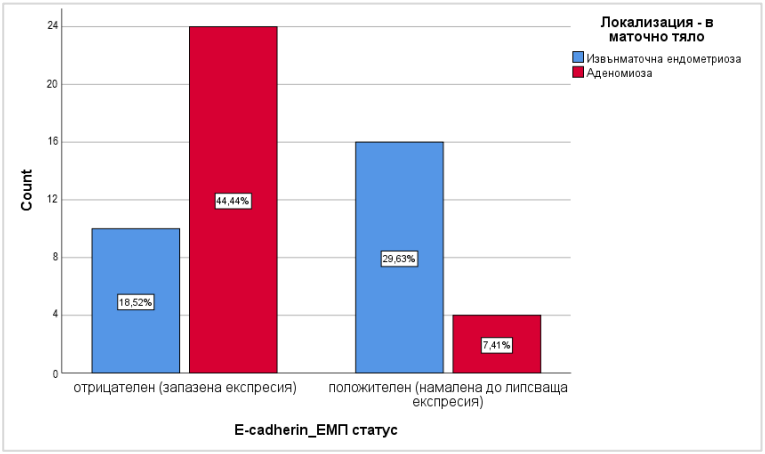
2.2. Разпределение по локализация

Проучи се експресията на anti HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin, β-cathenin и Fascin при случаи с аденомиоза и при извънматочна ендометриоза с различни локализации.

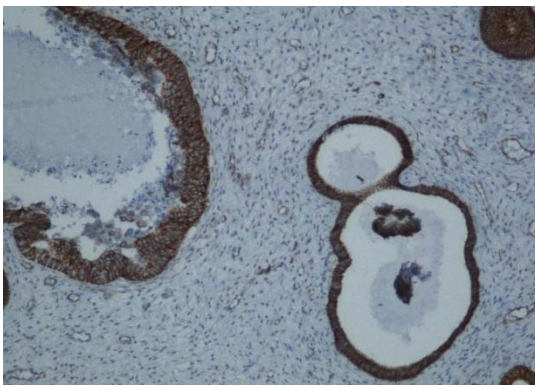
Отчитахме експресията на ИХХ маркерите в ендометриума на матката и в ендометриозното огнище. Всички изследвани пациентки са с тотална хистеректомия.

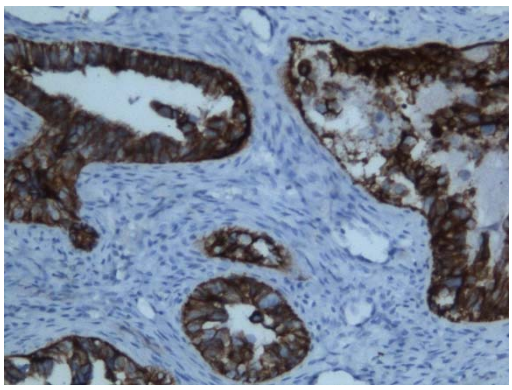
След направения сравнителен анализ се установиха следните разлики между групите:

Статистически значимо по-висок е относителният дял на процент отрицателни за **ЕМП статус** при аденомиоза (44.4%) в сравнение с извънматочната ендометриоза (18.5%) (z-test, $p<0.05$). Също така, статистически значимо по-висок е относителният дял на процент положителни за ЕМП статус при извънматочната ендометриоза (29.6%) в сравнение с аденомиозата (7.4%) (z-test, $p<0.05$).



Фигура 11. *Относителни дялове на категориите ЕМП статус при пациентки с ендометриоза според локализацията ѝ*



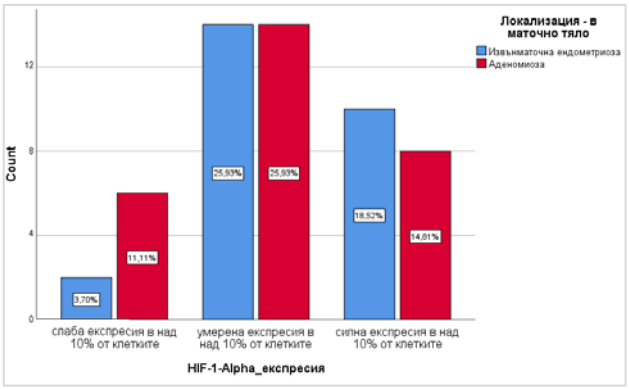


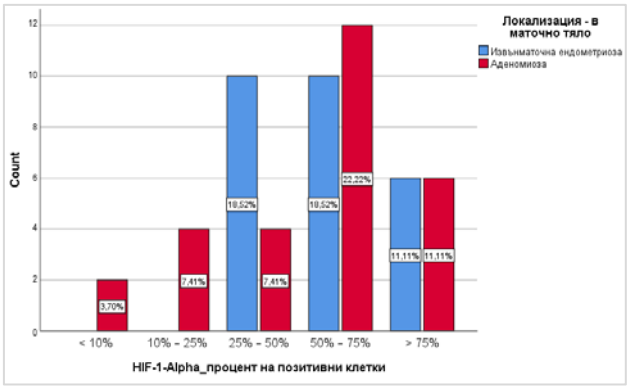
Снимка 11. *Е-кадхерин, дифузна мембранна експресия при аденомиоза, ИХХ, х100*

Снимка 12. *Е-кадхерин, хетерогенна експресия при извънматочна ендометриоза в стромални и епителни клетки, ИХХ, х100*

При пациентките с извънматочна ендометриоза преобладават умерена (25.9%) и силна (18.5%) експресия на anti HIF-1-alpha в над 10 процента от клетките, както и при тези аденомиоза също преобладават умерена (25.9%) и силна (14.8%) експресия на anti HIF-1-alpha. Висок процент позитивни клетки се открива и при двете локализации, както следва при пациентки с извънматочна ендометриоза между 50 и 75 процента (18.5%), а при пациентки с аденомиоза между 50 и 75 процента (22.2%).

Статистически значимо по-висок е относителният дял на дифузния модел на оцветяване при аденомиоза (37%) в сравнение с извънматочната ендометриоза (11.1%) (z-test, $p<0.05$). По-висок е относителният дял на смесения модел на оцветяване при извънматочната ендометриоза (14.8%), като не се наблюдават случаи при аденомиоза (0%).

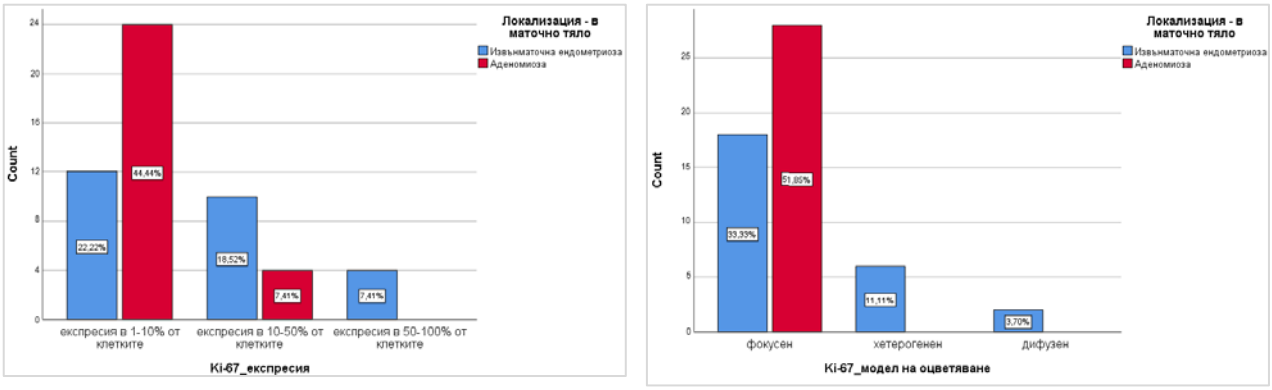




A B

Фигура 12. (A, B) *Относителни дялове на anti HIF-1-alpha експресия, процент позитивни клетки и модел на оцветяване при пациентки с ендометриоза според локализацията ѝ*

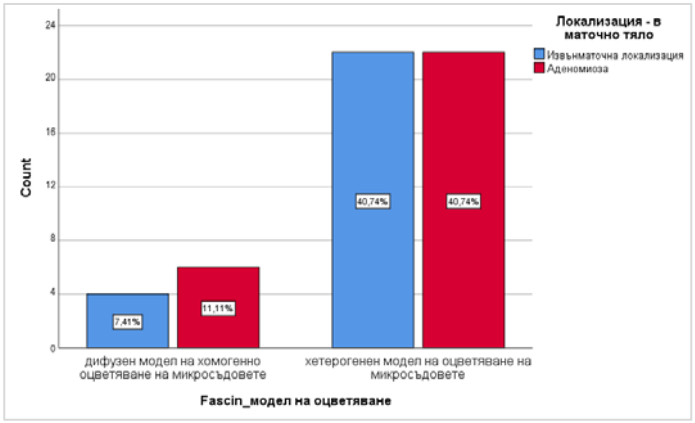
Статистически значима разлика в относителните дялове на експресия на Ki-67 в 1 до 10 процента се откри при пациентки с аденомиоза (44.4%), сравнени с жени с извънматочна ендометриоза (22.2%) (z-test, p<0.05). Установи се по-чест фокусен модел на оцветяване – при пациентки с аденомиоза (51.9%) спрямо пациентки с извънматочна ендометриоза (33.3%) (z-test, p<0.05).



A B

Фигура 13. (A, B) *Ki-67 експресия и модел на оцветяване при пациентки с ендометриоза според локализацията ѝ*

Установи се по-чест хетерогенен модел на оцветяване на микросъдовете и при двете локализации на ендометриозата.



Фигура 14. *Относителни дялове на категориите на Fascin експресията по модел на оцветяване според локализацията на ендометриозата*

В таблица 2 е представено разпределение на относителните дялове на жените с извънматочна ендометриоза по локализация. Преобладават пациентките с локализация в яйчници (64.7%).

Таблица 2. *Разпределение на относителните дялове на жените (n=26) с извънматочна ендометриоза по локализация*

		N*	%
Извънматочна локализация	В маточна тръба	8	23.5%
	В яйчници	22	64.7%
	В кожа (коремна стена)	8	23.5%
	В дебело черво	2	5.9%
	Total	40	117.6%

*броят на случаите е 40, тъй като една жена може да има повече от една извънматочна локализация

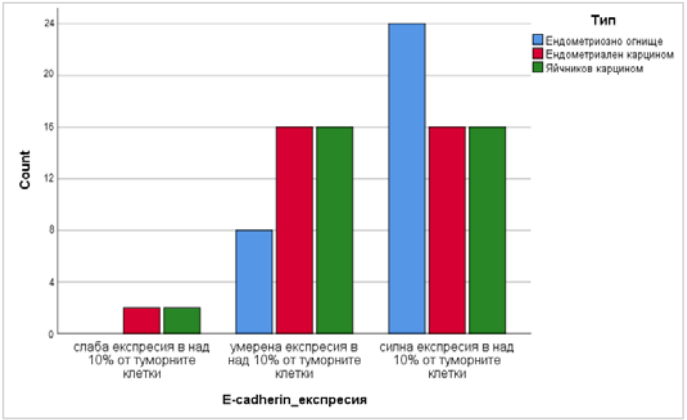
За останалите изследвани маркери не се установиха статистически значими разлики (z-test, p≥0.05).

Резултати задача 3

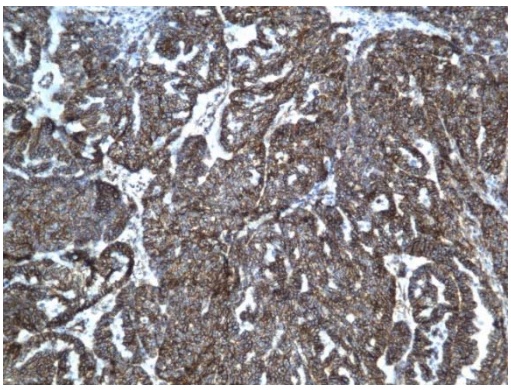
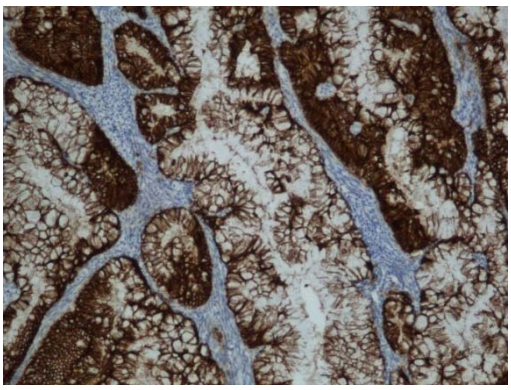
Проучи се експресията на изследваните маркери при случаи с ендометриоза, при ендометриални и яйчникови карциноми и се направи сравнителен анализ на експресията на тези маркери в трите изследвани групи.

Извърши се анализ на шест имунохистохимични маркери – anti HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin, β-cathenin, SMA и Fascin в трите групи – ендометриозно огнище, ендометриален карцином и яйчников карцином с Хи-квадрат и z-test за доказване на статистически значими разлики между относителни дялове.

Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на E-cadherin експресията в трите групи (z-test, p≥0.05).

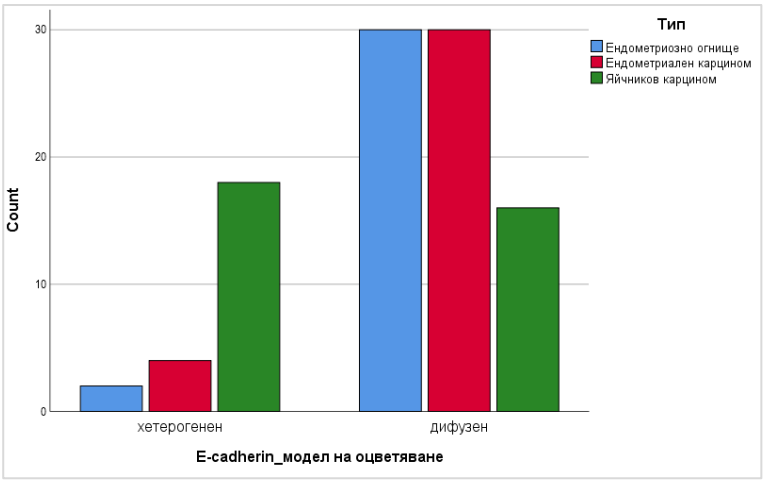


Фигура 15. *Относителни дялове на категориите на E-cadherin експресията по групи*

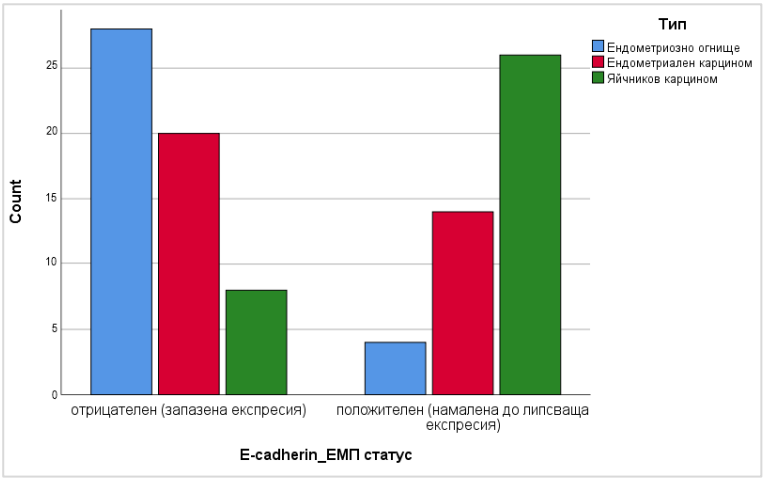
Снимка 13. *E-cadherin, дифузен модел на експресия при ЕК, ИХХ, x100*
Снимка 14. *E-cadherin, хетерогенен модел на експресия при яйчников карцином, положителен ЕМП, ИХХ, x100*

Статистически значимо по-висок е относителният дял на хетерогенния модел на оцветяване на E-cadherin при яйчников карцином (52.9%) в сравнение с останалите две групи - ендометриозно огнище (6.3%) и ендометриален карцином (11.8%) (z-test, $p<0.05$). Също така, статистически значимо по-висок е относителният дял на дифузния модел на оцветяване на E-cadherin при ендометриозно огнище (93.8%) и ендометриален карцином (88.2%) в сравнение с яйчников карцином (47.1%) (z-test, $p<0.05$).



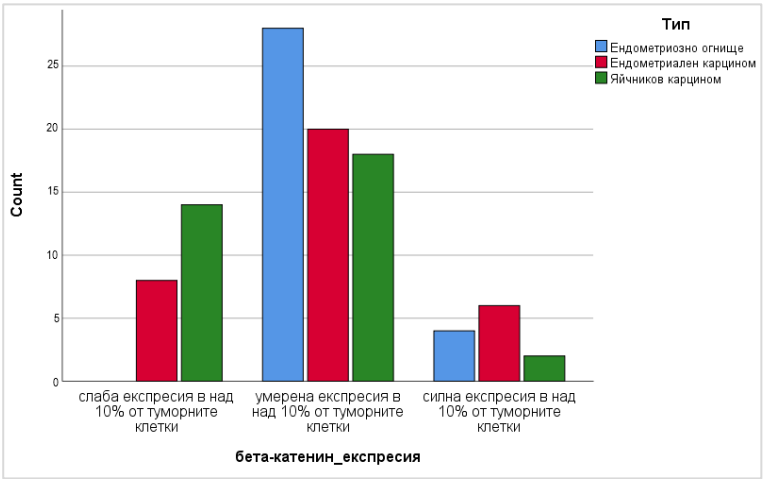
Фигура 16. *Относителни дялове на категориите на E-cadherin експресията по модел на оцветяване по групи*

Статистически значимо по-висок е относителният дял на отрицателния епително-мезенхимен преход (ЕМП) при ендометриоза (87.5%) в сравнение с яйчников карцином (23.5%) (z-test, $p<0.05$). Също така, статистически значимо по-висок е относителният дял на положителния епително-мезенхимен преход (ЕМП) при яйчников карцином (76.5%) в сравнение с ендометриозното огнище (12.5%) (z-test, $p<0.05$).



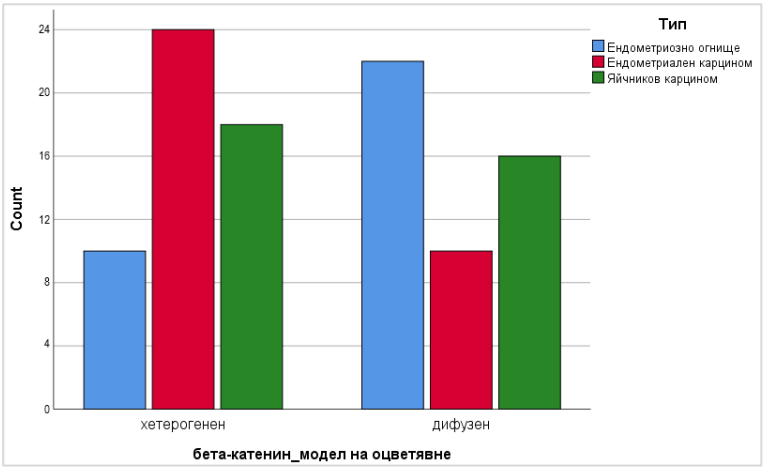
Фигура 17. *Относителни дялове на категориите на E-cadherin експресията по ЕМП статус по групи*

Най-висок е относителният дял на слаба експресия в над 10 процента от клетките при яйчников карцином (41.2%), не се наблюдават случаи в групата пациентки с ендометриозно огнище (0%). Умерена експресия на β-cathenin се откри и в трите изследвани групи със статистически значимо по-висок е относителният дял спрямо слаба и силна експресия при ендометриоза (87.5%), при ендометриален карцином (58.8%) и яйчников карцином (52.9%).



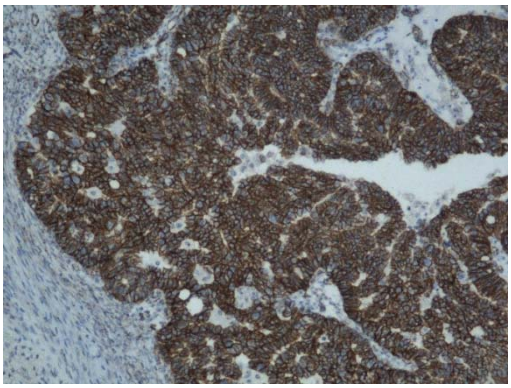
Фигура 18. *Относителни дялове на категориите на β-cathenin експресията по групи*

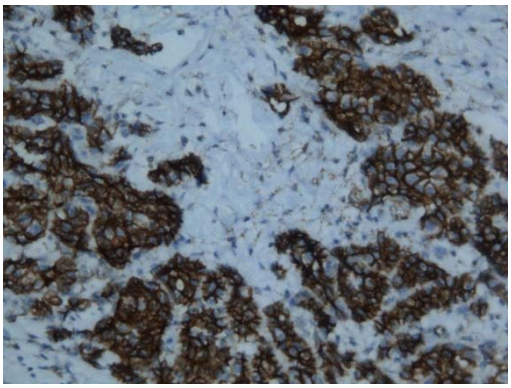
Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на β-cathenin експресията по модел на оцветяване в трите групи (z-test, $p \geq 0.05$).



Фигура 19. *Относителни дялове на категориите на β-cathenin експресията по модел на оцветяване по групи*

Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на β-cathenin експресията по локализация в клетъчна мембрана, цитоплазма и ядро в трите групи (z-test, p≥0.05).

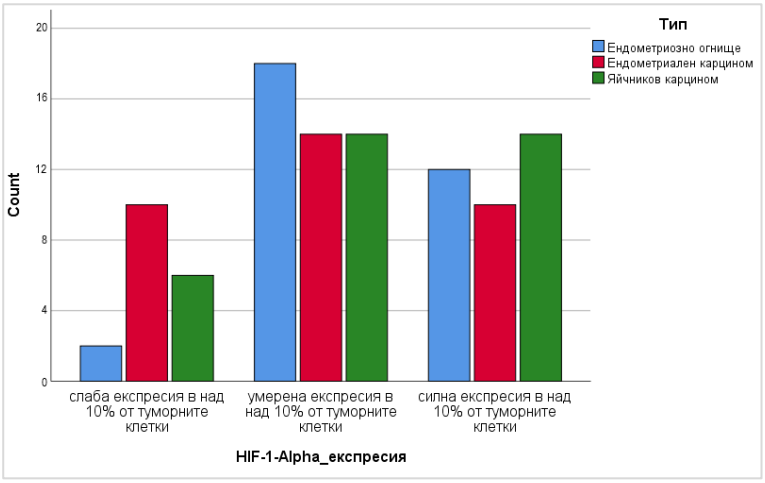




Снимка 15. *β-cathenin, силна ядрена експресия при яйчников карцином, ИХХ, x100*

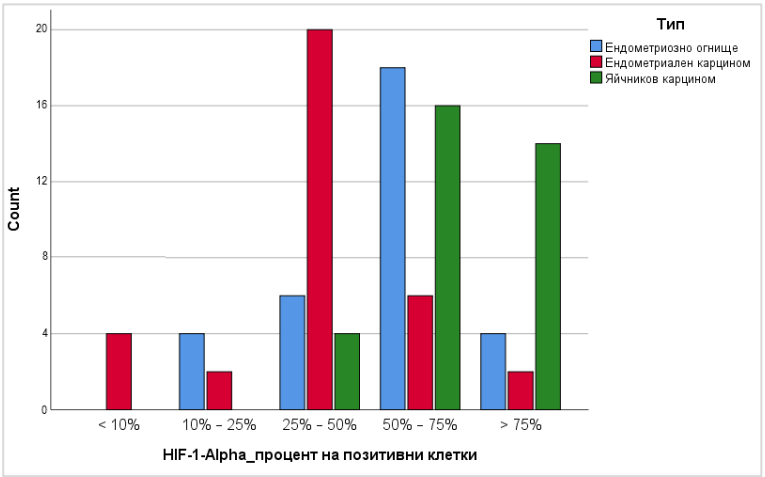
Снимка 16. *β-cathenin, умерена ядрена експресия при яйчников карцином, ИХХ, x100*

Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на anti HIF-1-alpha експресията в трите групи (z-test, p≥0.05).



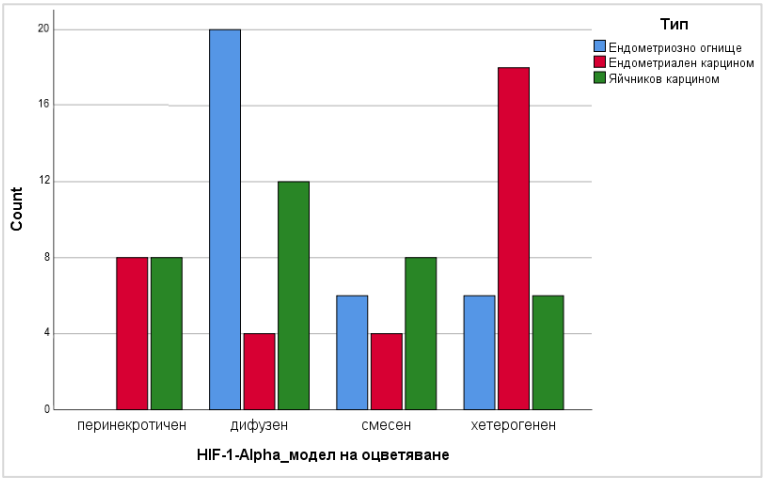
Фигура 20. *Относителни дялове на категориите на anti HIF-1-alpha експресията по групи*

Статистически значимо по-висок е относителният дял на процент позитивни на HIF-1-alpha клетки между 25 и 50 процента при ендометриалния карцином (58.8%) в сравнение с яйчников карцином (11.8%) (z-test, $p<0.05$). Също така, статистически значимо по-висок е относителният дял на процент позитивни на HIF-1-alpha клетки повече от 75 процента при яйчников карцином (41.2%) в сравнение с ендометриален карцином (5.9%) (z-test, $p<0.05$).



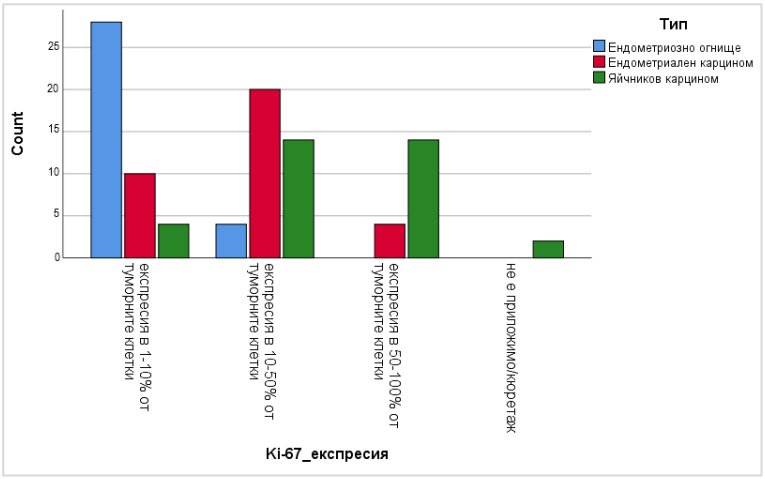
Фигура 21. *Относителни дялове на категориите на anti HIF-1-alpha експресията по процент позитивни клетки по групи*

Статистически значимо по-висок е относителният дял на дифузния модел на оцветяване за HIF-1-alpha при ендометриозно огнище (62.5%) в сравнение с ендометриалния карцином (11.8%) (z-test, $p<0.05$).



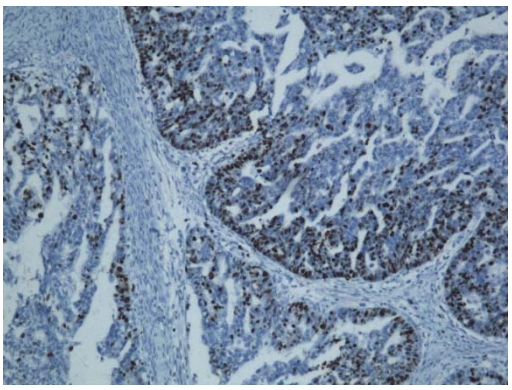
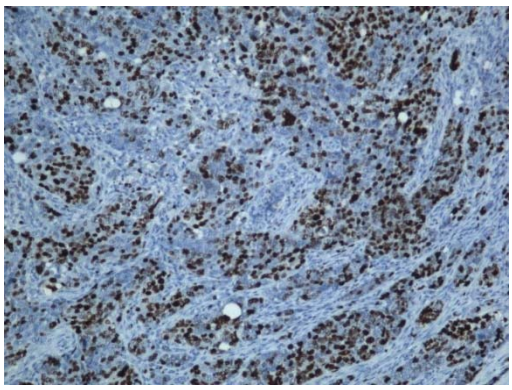
Фигура 22. *Относителни дялове на категориите на anti HIF-1-alpha експресията по модел на оцветяване по групи*

Статистически значимо по-висок е относителният дял на процент позитивни на Ki 67 клетки между 1 и 10 процента при ендометриозно огнище (87.5%) в сравнение с останалите две групи – ендометриалния карцином (29.4%) и яйчников карцином (11.8%) (z-test, $p<0.05$). Също така, статистически значимо по-висок е относителният дял на процент позитивни на Ki 67 клетки между 10 и 50 процента при ендометриален карцином (58.8%) в сравнение с ендометриозното огнище (12.5%) (z-test, $p<0.05$). Най-висок е относителният дял на процент позитивни на Ki 67 клетки повече от 50 процента при яйчников карцином (41.2%), а в останалите две групи ендометриален карцином и ендометриозното огнище се наблюдават следните относителни дялове – 11.8% и 0%, съответно.



Фигура 23. *Относителни дялове на категориите на Ki 67 експресията по групи*

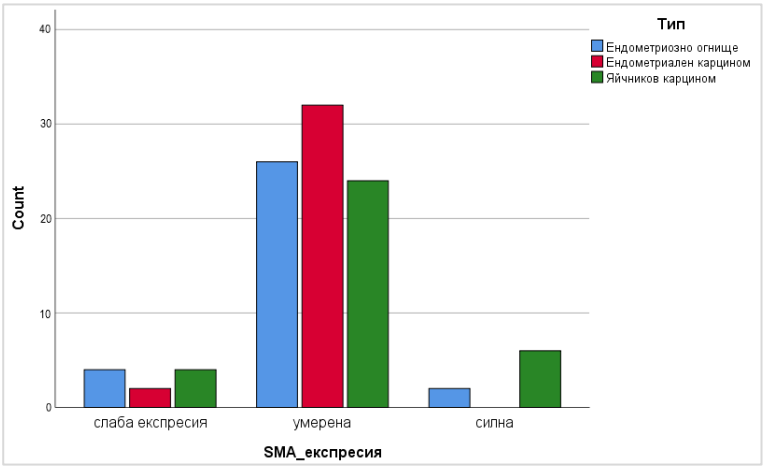
Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на Ki 67 експресията в трите групи (z-test, $p\geq0.05$).

Снимка 17. *Ki 67, силна ядрена експресия при ендометриален карцином, ИХХ, x100*

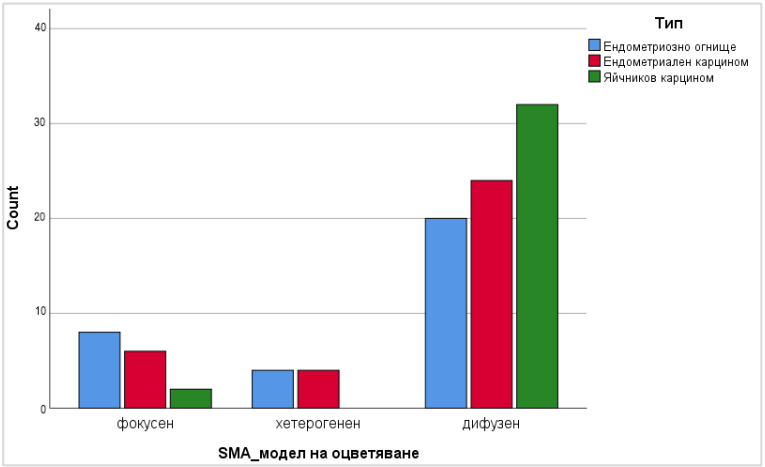
Снимка 18. *Ki 67, умерена ядрена експресия при яйчников карцином, ИХХ, x100*

Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на SMA експресията в трите групи (z-test, p≥0.05).

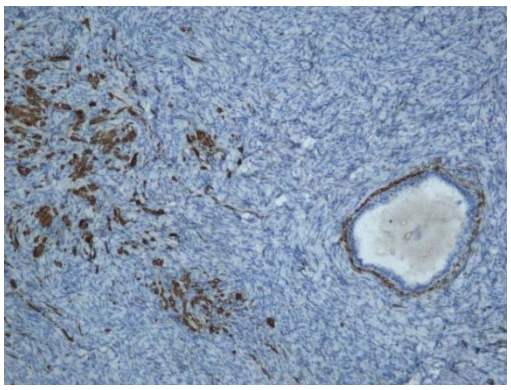
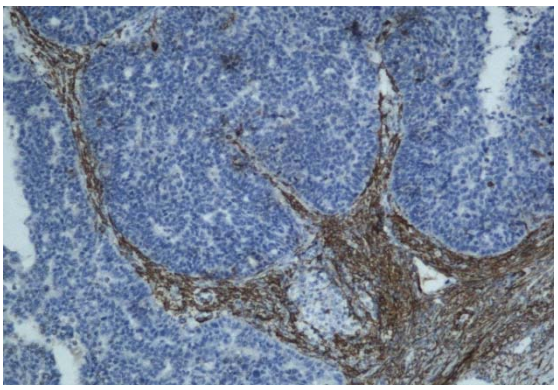


Фигура 24. *Относителни дялове на категориите на SMA експресията по групи*

Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на SMA експресията в трите групи (z-test, p≥0.05).

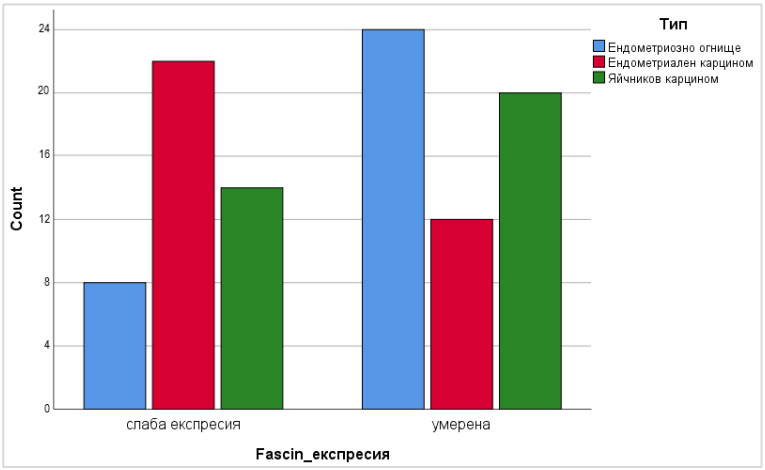


Фигура 25. *Относителни дялове на категориите на SMA експресията по модел на оцветяване по групи*

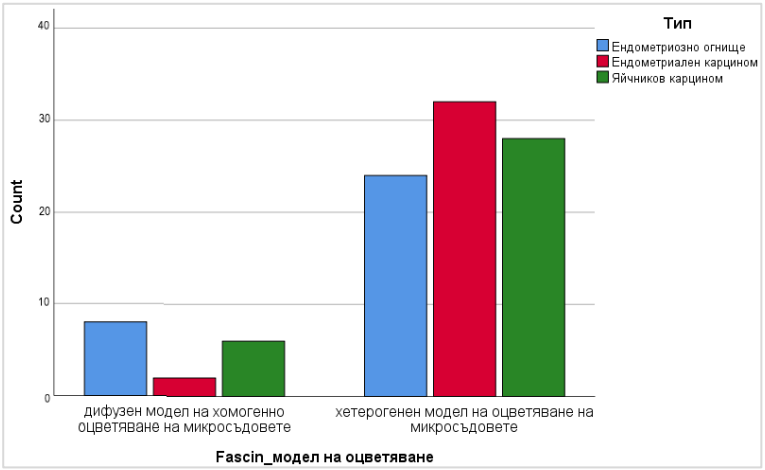
Снимка 19. SMA, силна цитоплазмена експресия при ендометриоза, ИХХ, x100
Снимка 20. SMA, умерена цитоплазмена експресия при яйчников карцином, ИХХ, x100

Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на Fascin експресията в трите групи (z-test, p≥0.05).



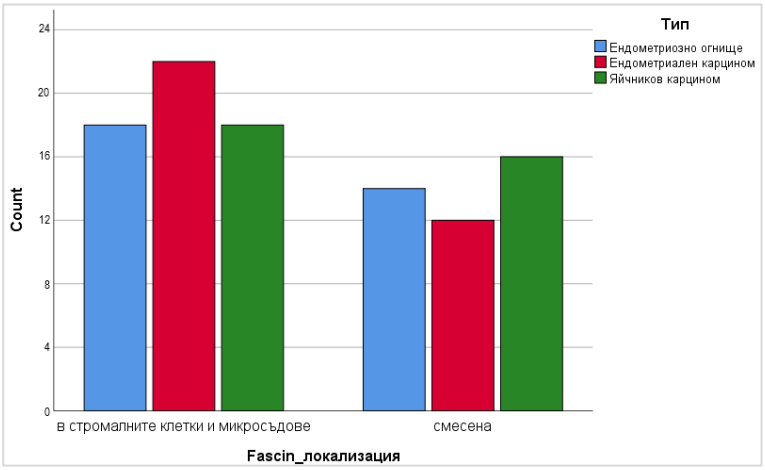
Фигура 26. *Относителни дялове на категориите на Fascin експресията по групи*

Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на Fascin експресията в трите групи (z-test, p≥0.05).

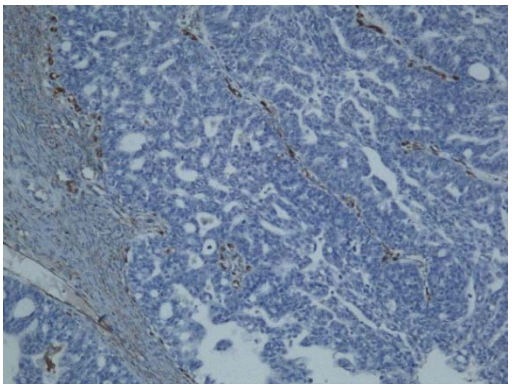


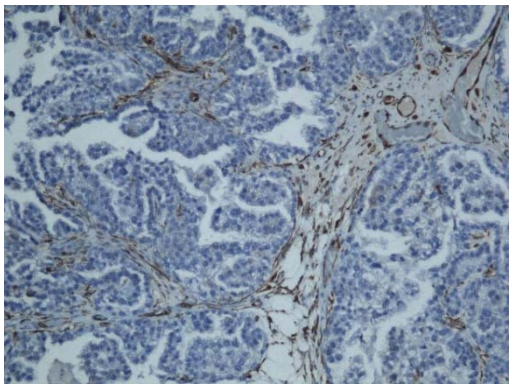
Фигура 27. *Относителни дялове на категориите на Fascin експресията по модел на оцветяване по групи*

Не се наблюдава статистически значима разлика между относителните дялове на категориите на Fascin експресията в трите групи (z-test, p≥0.05).



Фигура 28. *Относителни дялове на категориите на Fascin експресията по локализация по групи*





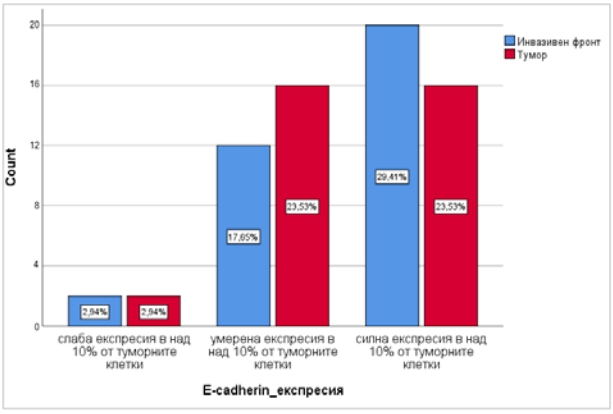
Снимка 21. *Fascin, силна цитоплазмена експресия при ендометриоиден карцином, ИХХ, x100*

Снимка 22. *Fascin, умерена цитоплазмена експресия при яйчников карцином, ИХХ, x100*

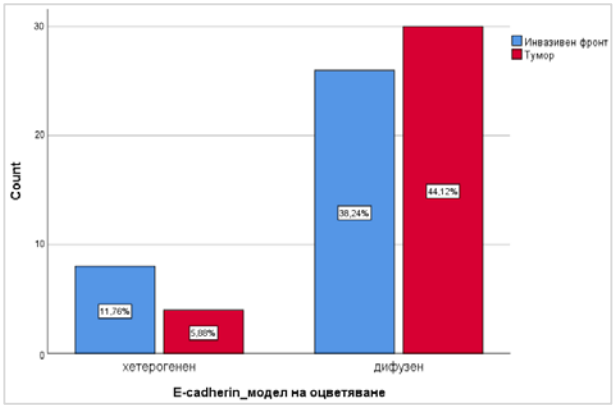
Резултати задача 4

Проучи се сравнително експресията на anti HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin, β-cathenin в инвазивния фронт и около некротични огнища при карциномите на яйчниците и на ендометриума. Извършеният статистически анализ демонстрира следните разлики:

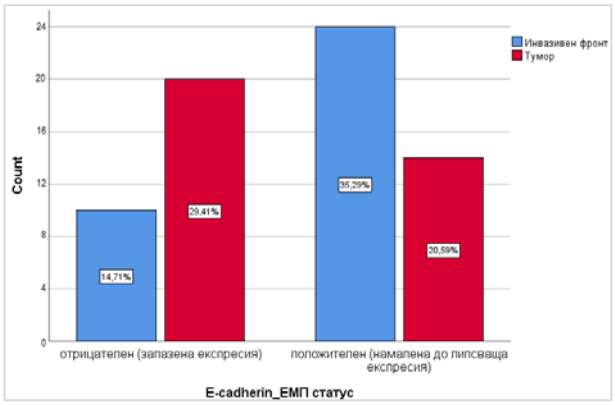
Силна експресия на E-cadherin се откри в ендометриалните карциноми (23.5%) и в техния инвазивен фронт (29.4%). Установи се по-чест дифузен модел на оцветяване – за ендометриалните карциноми (44.1%) и в техния инвазивен фронт (38.2%). Разпределението относно положителен ЕМП статус е както следва – за ендометриални карциноми (20.6%) и за техния инвазивен фронт (35.3%).



A

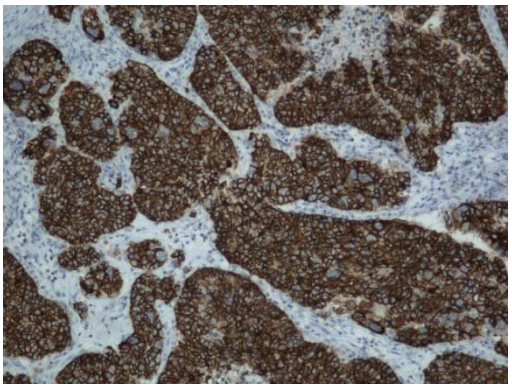


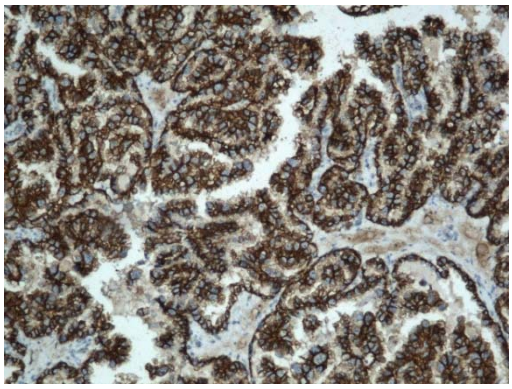
B



C

Фигура 29. (A, B, C) *E- Cadherin експресия, модел на оцветяване и ЕМП статус сравнение в ендометриални карциноми и техния инвазивен фронт*

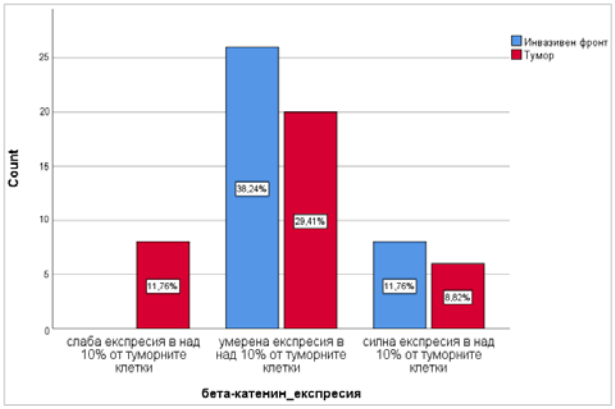




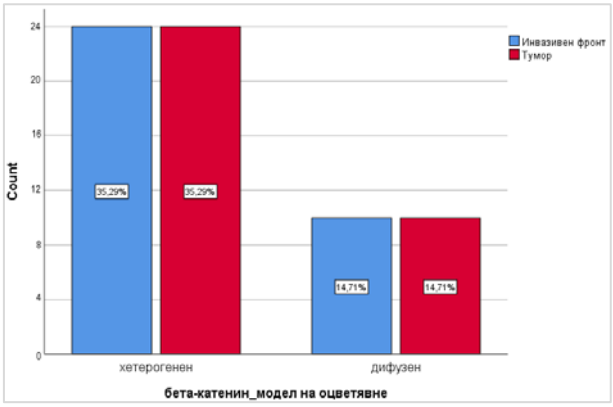
Снимка 23. *E-Cadherin, силна мембранна експресия при ендометриоиден карцином, ИХХ, x100*

Снимка 24. *E-Cadherin, умерена мембранна експресия при яйчников карцином, ИХХ, x100*

Установи се по-честа умерена експресия в над 10 процента от туморните клетки – за ендометриалните карциноми (29.4%) и в техния инвазивен фронт (38.2%). Разпределението в двете групи показа по-чест хетерогенен модел на оцветяване и е както следва – за ендометриални карциноми (35.3%) и за техния инвазивен фронт (35.3%).



A

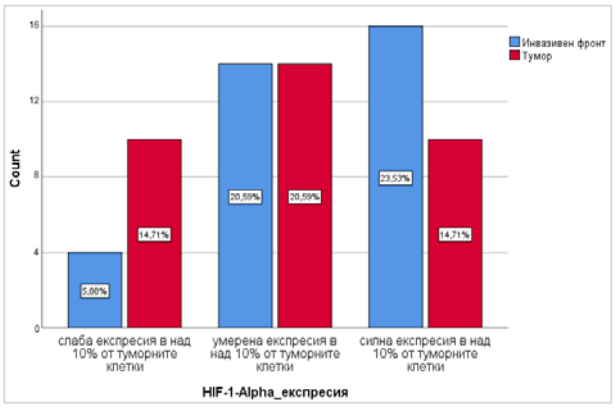


B

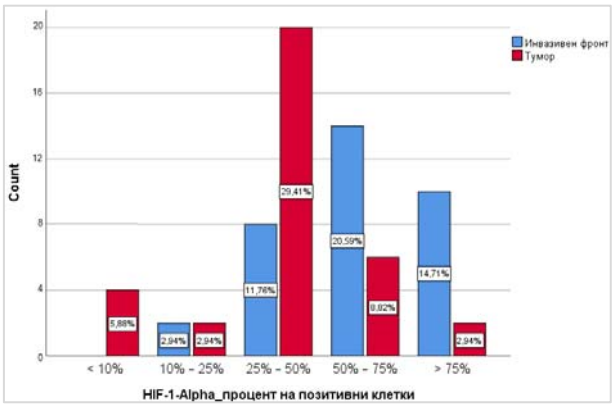
Фигура 30. (A, B) *Относителни дялове на категориите на β-cathenin експресията по интензитет и модел на оцветяване в ендометриални карциноми и техния инвазивен фронт*

При ендометриалните карциноми преобладават умерена (20.6%) и силна (14.7%) експресия на anti HIF-1-alpha в над 10 процента от клетките, както и при инвазивният им фронт също преобладават умерена (20.6%) и силна (23.5%) експресия на anti HIF-1-alpha. При ендометриалните карциноми най-голям дял са с позитивни между 25 и 50 процента клетки (29.4%), а при инвазивните им фронтове най-голям дял заемат тези между 50 и 75 процента позитивни клетки (20.6%).

И в двете групи преобладава хетерогенният модел на оцветяване – при ендометриални карциноми (26.5%) и при инвазивния фронт (26.5%).

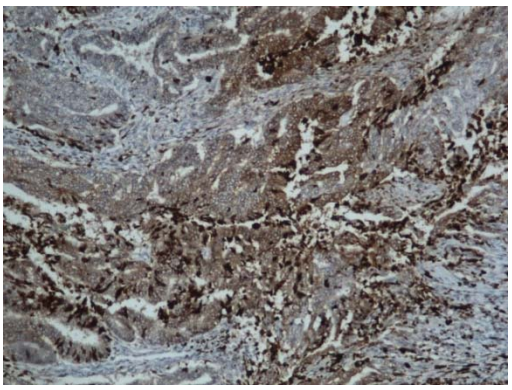
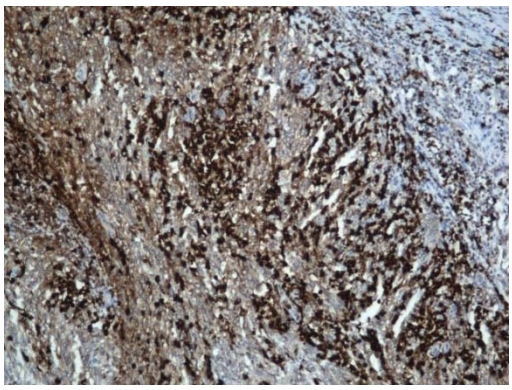


A



B

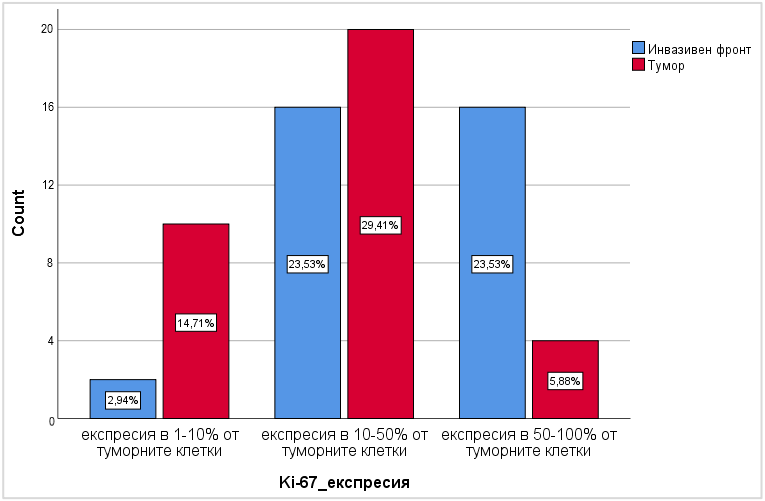
Фигура 31. (A, B) *Относителни дялове на anti HIF-1-alpha експресия, процент позитивни клетки и модел на оцветяване при ендометриални карциноми и техния инвазивен фронт*

Снимка 25. HIF-1-alpha, силна ядрена експресия при G2 ендометриоиден карцином, ИХХ, x100
Снимка 26. HIF-1-alpha, умерена ядрена експресия при G3 ендометриоиден карцином, ИХХ, x100

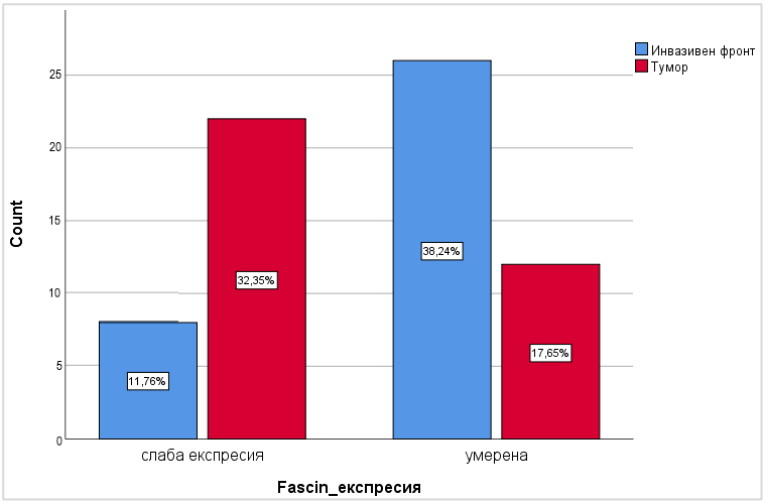
Хетерогенен модел на експресия на HIF-1a при ендометриален карцином тип 1 в ядрото и цитоплазмата на туморните клетки. Наблюдавахме увеличена експресия в инвазивния фронт на тумора.

Статистически значима разлика в относителните дялове на експресия на Ki-67 в 50 до 100 процента се откри при инвазивния фронт на тумора (23.5%), сравнен с ендометриалния карцином (5.9%) (z-test, p<0.05).



Фигура 32. *Ki-67 експресия при пациентки с ендометриални карциноми и техния инвазивен фронт*

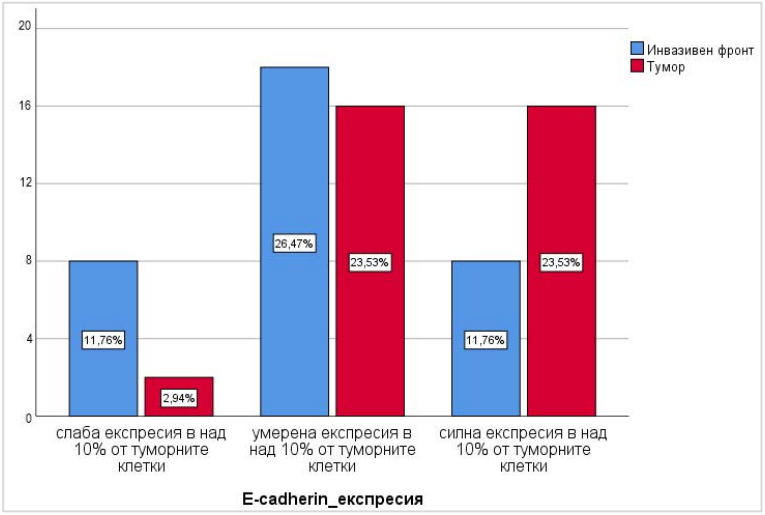
Статистически значима разлика в относителните дялове на силата на експресия на Fascin се откри в слабата експресия, съответно при инвазивния фронт на тумора (11.8%), сравнен с ендометриалния карцином (32.4%) (z-test, p<0.05). Също така, статистически значима разлика в относителните дялове на силата на експресия на Fascin се откри и в умерения интензитет на експресия при инвазивния фронт на тумора (38.2%), сравнен с ендометриалния карцином (17.6%) (z-test, p<0.05).



Фигура 33. *Относителни дялове на категориите на Fascin експресията по интензитет на оцветяване в ендометриалните карциноми и в инвазивния му фронт*

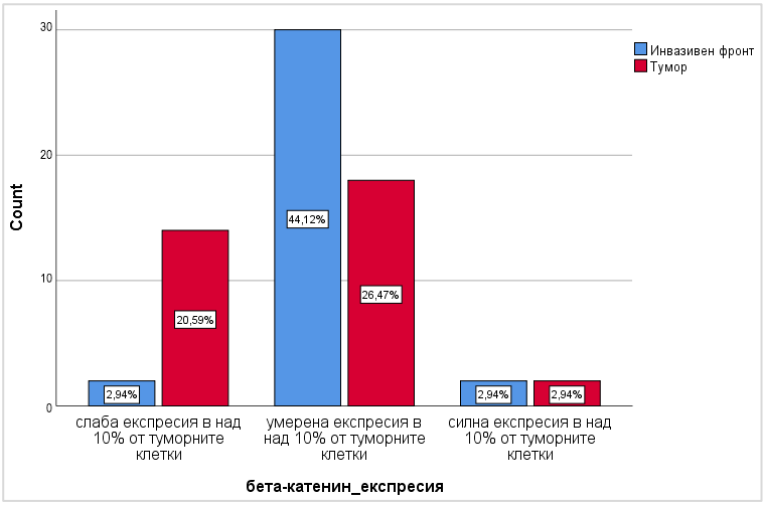
За останалите изследвани маркери не се установиха статистически значими разлики (z-test, $p \geq 0.05$).

Силна експресия на E-cadherin се откри в яйчниковите карциноми (23.5%) и в техния инвазивен фронт (11.8%). Умерената експресия е както следва – в яйчниковите карциноми (23.5%) и в техния инвазивен фронт (26.5%).



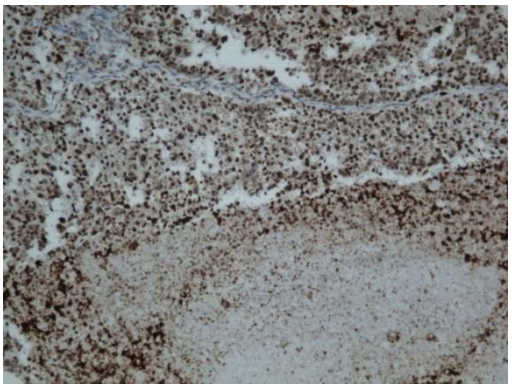
Фигура 34. *E-Cadherin експресия в яйчникови карциноми и техния инвазивен фронт*

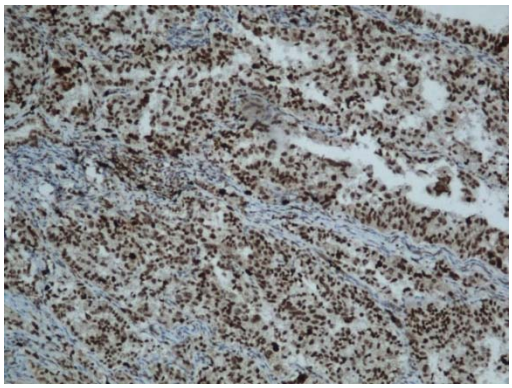
Статистически значима разлика в относителните дялове на силата на експресия на β-cathenin се откри в слабата експресия, съответно при инвазивния фронт на тумора (2.9%), сравнен с яйчниковия карцином (20.6%) (z-test, $p<0.05$). Също така, статистически значима разлика в относителните дялове на силата на експресия на β-cathenin се откри и в умерения интензитет на експресия при инвазивния фронт на тумора (44.1%), сравнен с яйчниковия карцином (26.5%) (z-test, $p<0.05$).



Фигура 35. *Относителни дялове на категориите на β-cathenin експресията в яйчникови карциноми и техния инвазивен фронт*

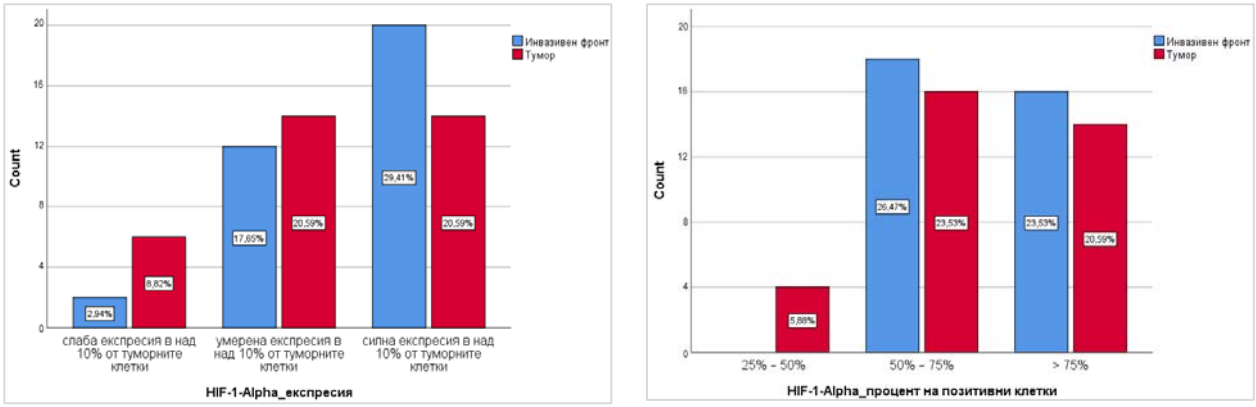
Експресията на HIF-1a при ендометриален карцином тип 1 с различен грейдинг (силата на експресия се увеличава с нарастване грейдинга на тумора).





Снимка 27. *HIF-1-alpha, наличие на перинекротичен модел на експресията, умерена ядрена експресия при ендометриоиден карцином G3, ИХХ, x100*
Снимка 28. *HIF-1-alpha, силна дифузна ядрена експресия при ендометриоиден карцином G2, ИХХ, x100*

При яйчниковите карциноми преобладават умерена (20.6%) и силна (20.6%) експресия на anti HIF-1-alpha в над 10 процента от клетките, както и при инвазивният им фронт също преобладават умерена (17.6%) и силна (29.4%) експресия на anti HIF-1-alpha. При яйчниковите карциноми най-голям дял са с позитивни между 50 и 75 процента клетки (23.5%), както и при инвазивните им фронтове най-голям дял заемат тези между 50 и 75 процента позитивни клетки (26.5%).



A B

Фигура 36. (A, B) *Относителни дялове на anti HIF-1-alpha експресия в яйчникови карциноми и техния инвазивен фронт*

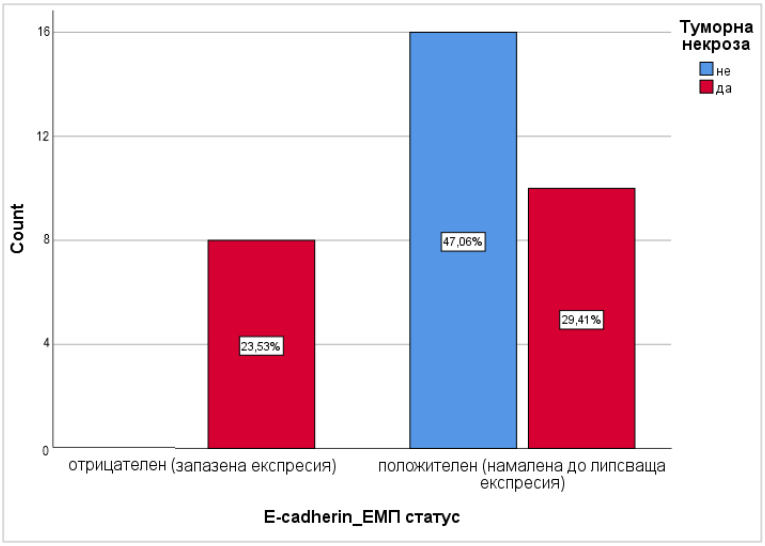
В таблица 3 е представено разпределение на относителните дялове на пациентките с наличие или липса на туморна некроза и положителен епително-мезенхимен преход (ЕМП статус). Преобладават пациентките с положителен ЕМП статус и липса на туморна некроза (47.1%).

Таблица 3. *Разпределение на относителните дялове на пациентките с положителен ЕМП статус и туморна некроза*

			Туморна некроза		Total
			не	да	
E-cadherin ЕМП статус	отрицателен (запазена експресия)	% в туморна некроза	0.0%	44.4%	23.5%
	положителен (намалена до липсваща експресия)	% в туморна некроза	100%	55.6%	76.5%
Total		% в туморна некроза	100%	100%	100%
		% Total	47.1%	52.9%	100%

Проучи се относителният дял на процент отрицателни за ЕМП статус при наличие на туморна некроза (44.4%), не се наблюдават случаи в групата пациентки с липсваща туморна некроза (0%).

Статистически значимо по-висок е относителният дял на процент положителни за ЕМП статус при липсваща туморна некроза (47.1%) в сравнение с пациентките с наличие на туморна некроза (29.4%) (z-test, $p<0.05$).



Фигура 37. *E- Cadherin ЕМП статус (преход) – сравнение според наличие на туморна некроза*

За останалите изследвани маркери не се установиха статистически значими разлики (z-test, p≥0.05).

Резултати задача 5

Сравниха се групите с ендометриален и яйчников карцином, съчетани или не с ендометриоза и се потърси връзка между ендометриозата и развитието на карциномите на базата на експресия на изследваните ИХХ-маркери.

През 1925 г. Sampson предлага 3 критерия за диагностициране на злокачествено заболяване, възникващо при ендометриоза:

- демонстрация както на доброкачествени, така и на неопластични ендометриални тъкани в тумора,
- хистология, съвместима с произход от ендометриума
- не са открити други първични туморни в маточното тяло и/или яйчника.

По-късно Скот въвежда четвърти критерий: метаплазия между ендометриоза и карцином.

Поради малкия брой жени със съчетания на карцином и ендометриоза в нашето проучване и невъзможността да бъдат събрани данни за експресията на съответните маркери при диагностициране с предхождаща ендометриоза не е възможно да бъдат направени сравнения между групите. Представена е описателна статистика на разпределението на експресията в инвазивен фронт и в тумор при пациентки с карцином, при които се намериха и огнища с ендометриоза. Проследихме 12 пациентки с ендометриален карцином и ендометриоза и 10 пациентки с яйчников карцином и ендометриоза, като сравнихме резултатите от имунохистохимичното изследване.

Таблица 4. *HIF-1-Alpha_експресия – инвазивен фронт*

		Брой	**%**
пациентки с ендометриален рак	слаба експресия в над 10% от туморните клетки	2	16.7
	умерена експресия в над 10% от туморните клетки	4	33.3
	силна експресия в над 10% от туморните клетки	6	50.0
	Общо	**12**	**100.0**
пациентки с яйчников карцином	умерена експресия в над 10% от туморните клетки	4	40.0
	силна експресия в над 10% от туморните клетки	6	60.0
	Общо	**10**	**100.0**

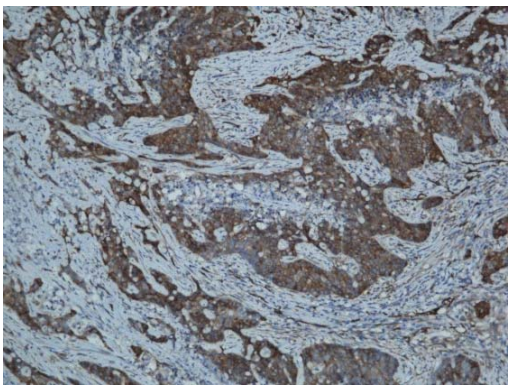
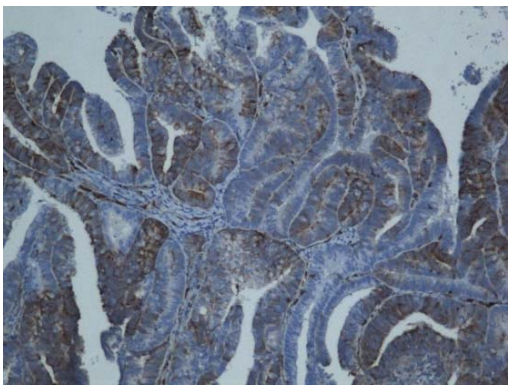
Таблица 5. *HIF-1-Alpha_експресия - тумор*

		Брой	**%**
пациентки с ендометриален рак	слаба експресия в над 10% от туморните клетки	4	33.3
	умерена експресия в над 10% от туморните клетки	4	33.3
	силна експресия в над 10% от туморните клетки	4	33.3
	Общо	**12**	**100.0**
пациентки с яйчников карцином	слаба експресия в над 10% от туморните клетки	2	20.0
	умерена експресия в над 10% от туморните клетки	6	60.0
	силна експресия в над 10% от туморните клетки	2	20.0
	Общо	**10**	**100.0**

Преобладават умерена и силна експресия на HIF-1-Alpha и в двете групи карциноми (ендометриален и яйчников).

Таблица 6. *Fascin_експресия – инвазивен фронт*

		Брой	**%**
пациентки с ендометриален рак	слаба експресия	2	16.7
	умерена	10	83.3
	Общо	**12**	**100.0**
пациентки с яйчников карцином	слаба експресия	4	40.0
	умерена	6	60.0
	Общо	**10**	**100.0**

Снимка 29. *Fascin, силна дифузна цитоплазмена експресия при ендометриоиден карцином G3, ИХХ, х100*

Снимка 30. *Fascin, умерена цитоплазмена експресия, хетерогенен модел на експресията при ендометриоиден карцином G1, ИХХ, х100*

Таблица 7. *Fascin_експресия – тумор*

		Брой	**%**
пациентки с ендометриален рак	слаба експресия	6	50.0
	умерена	6	50.0
	Общо	**12**	**100.0**
пациентки с яйчников карцином	слаба експресия	4	40.0
	умерена	6	60.0
	Общо	**10**	**100.0**

Преобладава умерена експресия на Fascin и в двете групи карциноми (ендометриален и яйчников).

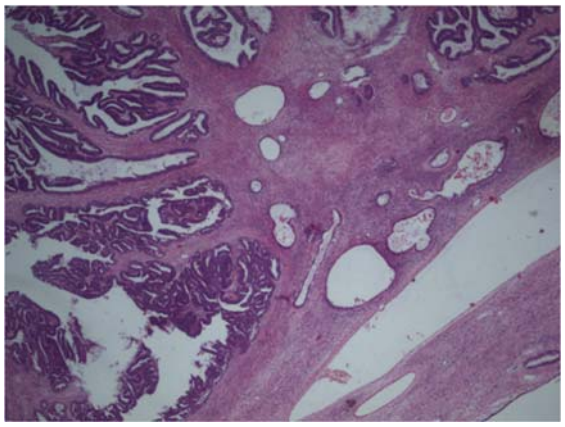
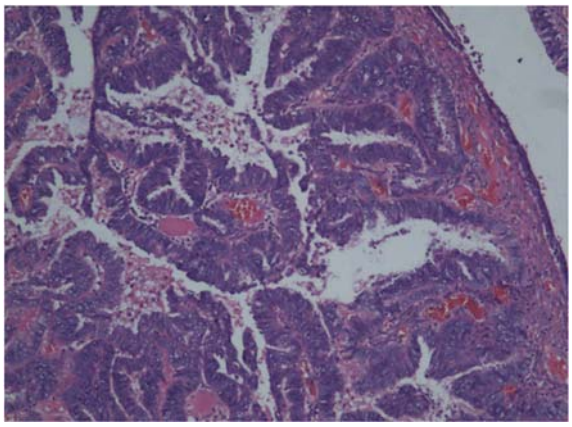
Таблица 8. *Ki-67 експресия – инвазивен фронт*

		Брой	**%**
пациентки с ендометриален рак	експресия в 1-10% от туморните клетки	2	16.7
	експресия в 10-50% от туморните клетки	8	66.7
	експресия в 50-100% от туморните клетки	2	16.7
	Общо	**12**	**100.0**
пациентки с яйчников карцином	експресия в 1-10% от туморните клетки	2	20.0
	експресия в 10-50% от туморните клетки	4	40.0
	експресия в 50-100% от туморните клетки	4	40.0
	Общо	**10**	**100.0**

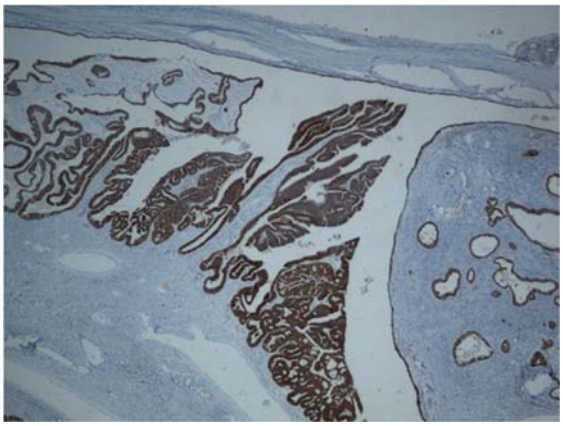
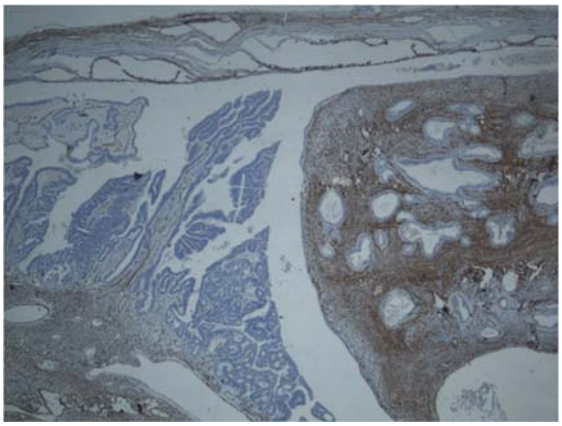
Таблица 9. *Ki-67_експресия – тумор*

		Брой	**%**
пациентки с ендометриален рак	експресия в 1-10% от туморните клетки	6	50.0
	експресия в 10-50% от туморните клетки	6	50.0
	Общо	**12**	**100.0**
пациентки с яйчников карцином	експресия в 1-10% от туморните клетки	2	20.0
	експресия в 10-50% от туморните клетки	4	40.0
	експресия в 50-100% от туморните клетки	4	40.0
	Общо	**10**	**100.0**

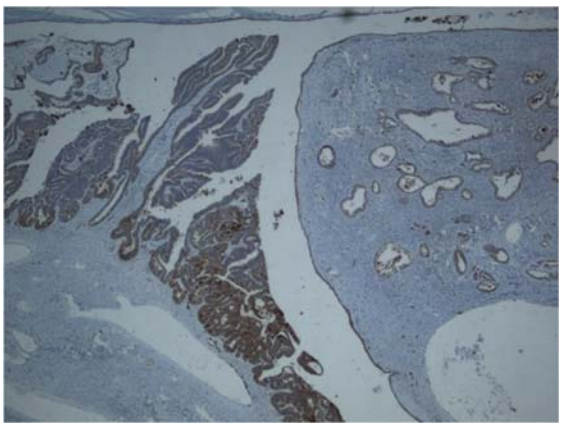
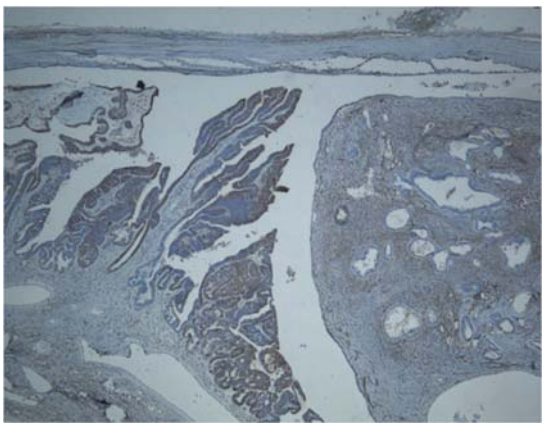
Преобладаваа експресия в 50-100% от туморните клетки на Ki-67 и в двете групи карциноми (ендометриален и яйчников).

Снимки 31 и 32. Случай с ендометриален карцином, възникнал в огнище на дълбока тазова ендометриоза.

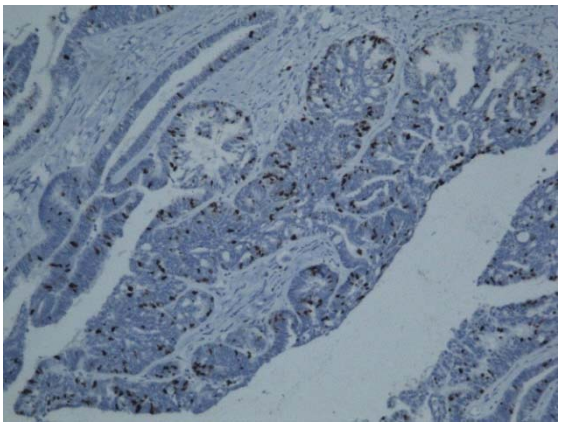
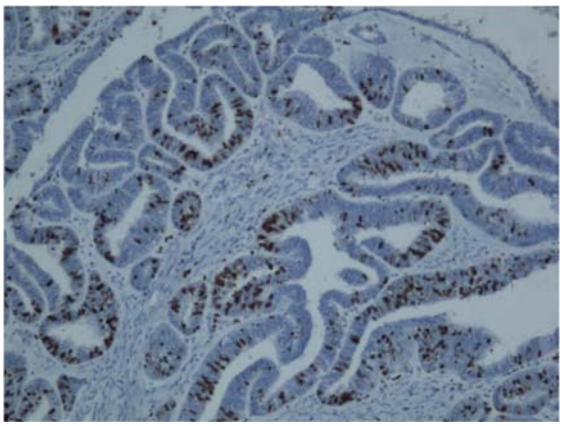



Снимка 33. Паралелно са представени огнища от ендометриалния аденокарцином и огнища с ендометриоза ИХХ-експресия на E-Cadherin, Х100
Снимка 34. Паралелно са представени огнища от ендометриалния аденокарцином и огнища с ендометриоза ИХХ-експресия на SMA, Х100

Снимка 35. Паралелно са представени огнища от ендометриалния аденокарцином и огнища с ендометриоза ИХХ-експресия на HIF-1 Alpha, X100

Снимка 36. Паралелно са представени огнища от ендометриалния аденокарцином и огнища с ендометриоза ИХХ-експресия на Fascin, X100

Снимка 37. ИХХ-експресия на Ki 67, силна ядрена експресия при ендометриоиден карцином на яйчника, X100

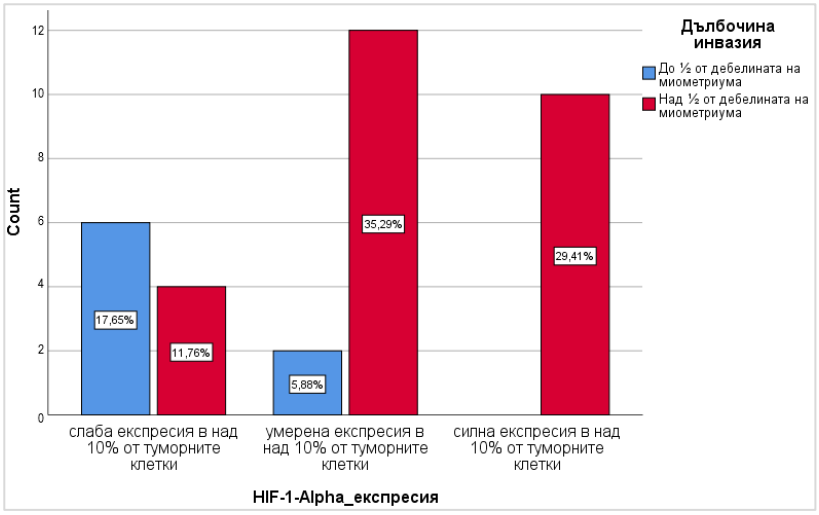
Снимка 38. ИХХ-експресия на Ki 67, силна ядрена експресия в ендометриоиден карцином на ендометриума, X100

Резултати задача 6

Сравни се имунохистохимичната експресия на посочените маркери във връзка с разпределението на туморите по FIGO стадий, дълбочина на инвазията и хистологичен подвид и се изведе ИХХ-панел за оценка на риска от прогресия в трите групи.

Статистически значимо по-висок е относителният дял на слабата експресия на anti HIF-1-alpha в над 10 процента от клетките при инвазия до ½ от дебелината на миометриума (17.6%) в сравнение с инвазия над ½ от дебелината на миометриума (11.8%) (z-test, $p<0.05$).

При пациентките с инвазия до ½ от дебелината на миометриума преобладава слаба (17.6%) и умерена (5.9%) експресия на anti HIF-1-alpha в над 10 процента от клетките, както при тези с инвазия над ½ от дебелината на миометриума преобладават умерена 35.3%) и силна (29.4%) експресия на anti HIF-1-alpha.

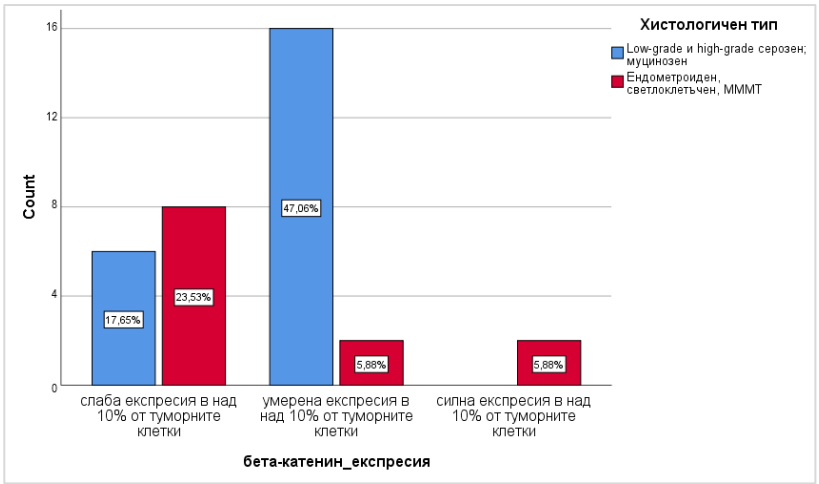


Фигура 38. *Относителни дялове на anti HIF-1-alpha експресия при ендометриални карциноми спрямо дълбочината на инвазия в миометриума*

За останалите изследвани маркери не се установиха статистически значими разлики (z-test, p≥0.05).

Поради малкия обем на извадката и големия брой категории за всяка една променлива - грейдинг на първи тип ендометриален карцином и експресиите на съответните маркери не е възможно да бъдат направени сравнения между групите.

Статистически значимо по-висок е относителният дял на умерената експресия на β-cathenin в над 10 процента от клетките при low - grade и high - grade серозни тумори и муцинозни тумори (47.1%) в сравнение ендометроидни, светлоклетъчни и MMMT (5.9%) (z-test, p<0.05).



Фигура 39. *Относителни дялове на β-cathenin експресията по хистологичен тип яйчников карцином*

За останалите изследвани маркери не се установиха статистически значими разлики (z-test, p≥0.05).

На базата на резултатите от нашето ИХХ-изследване се опитахме да съставим **Прогностични имунохистохимични панели за оценка на риска от малигнизация** при ендометриоза и риска от прогресия при ендометриален карцином и при овариален карцином в следните три таблици:

Таблица 10. *Прогностичен имунохистохимичен панел за оценка на риска от прогресия при ендометриоза*

Маркер	Нисък риск от малигнизация	Среден риск от малигнизация	Висок риск от малигнизация
HIF-1α	<10%, слаба експресия; липса на ясна перине-кротична зона	10-50%, умерена експресия; възможни малки хипоксични фокуси	>50%, силна и дифузна експресия с ясно изразени хипоксични зони
Ki-67	<5% позитивни клетки	5-10% позитивни клетки	>10% позитивни клетки с огнища на клетъчна атипия
E-cadherin	Силна мембранна експресия	Частично намалена мембранна експресия	Значително намалена или липсваща мембранна експресия (белег за ЕМТ)
β-катенин	Мембранна експресия, без ядрена позитивност	Слаба фокална ядрена позитивност	Аберантна, значима ядрена позитивност
α-SMA (строма)	Липсваща или слаба фиброзна реакция	Умерена фокална стромална фиброза	Изразена десмопластична стромална реакция с дифузна експресия
Fascin	Липсваща експресия	Огнищна слаба експресия	Дифузна или силна експресия с инвазивен фенотип

Таблица 11. *Прогностичен имунохистохимичен панел за оценка на риска от прогресия при ендометриален карцином*

Маркер	Нисък риск (FIGO IA, G1)	Среден риск (FIGO IB-II, G2)	Висок риск (FIGO III-IV, G3, неендометриоиден)
HIF-1α	<10%, слаба експресия	10-50%, умерена експресия	>50%, силна експресия и наличие на хипоксична зона
Ki-67	<10% позитивни клетки	10-40% позитивни клетки	>40%, силна експресия
E-cadherin	Запазена мембранна експресия	Частично намалена експресия	Значително намалена или липсваща експресия
β-катенин	Мембранна експресия, слаба ядрена	Умерена ядрена позитивност	Дифузна ядрена експресия (активен Wnt път)
α-SMA (строма)	Слаба или фокална фиброза	Умерена десмопластична реакция	Изразена реактивна фиброза
Fascin	Липсваща или много слаба експресия	Огнищна умерена експресия	Дифузна и силна експресия с инвазивен модел

Таблица 12. Прогностичен имунохистохимичен панел за оценка на риска от прогресия при овариален карцином

Маркер	Нисък риск (FIGO I, нискостепенен)	Среден риск (FIGO II-III, G2)	Висок риск (FIGO III-IV, високостепенен серозен/светлоклетъчен)
HIF-1α	<25%, ниска експресия	25-50%, умерена експресия	>50%, силна експресия с хипоксични зони
Ki-67	<15%, нисък пролиферативен индекс	15-40% умерен индекс	>40%, висок пролиферативен индекс
E-cadherin	Запазена мембранна експресия	Частично намалена	Значително намалена или липсваща експресия
β-катенин	Мембранна експресия	Умерена ядрена позитивност	Ясна ядрена експресия (активиране на Wnt)
α-SMA (строма)	Слаба или липсваща реакция	Умерена десмопластична реакция	Изразена стромална реакция и инвазия
Fascin	Слаба или огнищна експресия	Умерена фокална експресия	Дифузна силна експресия - маркер за инвазивност

V. ДИСКУСИЯ

По Задача 1

Високата честота на ендометриозата и нейната роля като потенциален предшественик на ендометриални и яйчникови карциноми (Sampson, 1927; Nezhat et al., 2014) обуславят необходимостта от детайлно проучване на възрастовото разпределение на тези заболявания. Ендометриозата е хронично възпалително състояние, което засяга 10-15% от жените в репродуктивна възраст и е установено, че повишава риска от развитие на карциноми, особено на яйчниците (Guo, 2009). Според нашите данни средната възраст на пациентките с ендометриоза е 48.65 ± 14.87 години, докато тази на пациентките с ендометриален карцином е 66.45 ± 10.67 години, а при яйчников карцином - 67.21 ± 8.94 години. Тези резултати съответстват на данните в литературата, които показват, че ендометриозата засяга предимно жени в репродуктивна възраст, докато карциномите на ендометриума и яйчниците се диагностицират по-често в постменопаузалния период (Zaino et al., 2011; Pearce et al., 2012).

Разглеждайки възрастовото разпределение в нашето изследване, установихме, че пациентките с ендометриален карцином най-често попадат във възрастовия диапазон 61-70 години, което съответства на наблюденията на Morice et al. (2019). Този резултат отразява типичния профил на пациентките с този вид неоплазия, който е свързан с хормонални и генетични фактори, като мутации в PTEN, PIK3CA и β-катенин (β-catenin) пътя (McCluggage, 2020). Важно е да се подчертае, че пациентките с яйчников карцином също попадат в сходен възрастов диапазон, като най-често срещаният подтип е high-grade серозният карцином (41.18%). Тези данни са в съответствие с проучванията на Kurman & Shih (2016), които установяват, че този агресивен подтип е водещ сред яйчниковите карциноми и обикновено се диагностицира в напреднали стадии.

Освен това, анализът на FIGO стадия в нашето проучване показа, че при ендометриалния карцином най-честият стадий е IB (47.1%), докато при яйчниковите карциноми преобладават IA (29.4%) и IC (35.3%). Това съответства на клиничните наблюдения, че ендометриалният карцином често се диагностицира в по-ранен стадий поради симптоми като абнормно маточно кървене, докато яйчниковият карцином остава асимптоматичен до по-напреднали стадии (McCluggage, 2020).

Допълнително, анализирайки хистологичния подтип на карциномите, установихме, че ендометриоидният вариант доминира при ендометриалния карцином (82.4%), докато high-grade серозният подтип е най-чест при яйчниковите карциноми (41.18%). Това съвпада с данните от литературата, където серозните карциноми представляват над 60% от всички случаи на яйчников рак (Bodnar et al., 2014). Важно е да се отбележи, че при част от пациентките с яйчников карцином е установена и съпътстваща ендометриоза,

което подкрепя теорията за възможна малигнена трансформация на ендометриозните лезии в някои случаи (Pearce et al., 2012).

Анализът на нашите резултати потвърждава, че възрастовото разпределение на пациентките с ендометриоза, ендометриален и яйчников карцином съответства на литературните данни и подчертава необходимостта от по-ранно проследяване на пациентките с дългогодишна анамнеза за ендометриоза. Подобряването на диагностичните стратегии и разпознаването на рисковите фактори може да спомогне за ранното откриване на злокачествени трансформации, особено при пациентки с атипична ендометриоза (Pavone et al., 2018).

По Задача 2

Данните от проведеното изследване показват важни различия в експресията на HIF-1α, Ki-67, E-кадхерин и β-катенин при ендометриоза в различни възрастови групи, както и тяхното значение за оценка на риска от малигнена прогресия. Ендометриозата е призната като хронично, системно възпалително заболяване на жените в репродуктивна възраст с разпространение около 10% (Allaire et al., 2023). Макар по природа да е доброкачествена, тази хетерогенна патология споделя някои характеристики с неопластичните процеси - инфилтративен растеж, рецидивиращ ход и дори потенциал за малигнена трансформация. Установено е, че злокачествено израждане настъпва в приблизително 1-2% от случаите на ендометриоза, като рискът нараства с възрастта (Hablase et al., 2024). В нашето проучване не бе установена съществена разлика в честотата на експресия на HIF-1α между двете възрастови групи, но направи впечатление тенденция към по-висока експресия при пациентките в менопауза. При тях по-често се наблюдава умерена до силна експресия на HIF-1α в над 10% от клетките, като само в тази група имаше случаи с над 75% позитивни клетки (12.5% от менопаузалните случаи) - нещо, което не се срещна при по-младите жени. Освен това, дифузният модел на оцветяване за HIF-1α беше по-характерен за ендометриозните огнища след менопауза (при 44% от тях срещу 19% при репродуктивна възраст). Тези наблюдения насочват към по-изразена хипоксия или хипоксична адаптация в лезиите на по-възрастните пациентки. Известно е, че ендометриозните импланти често съществуват в хипоксична микросреда, особено при по-дълбоките инфилтриращи огнища и овариални ендометриоми. Периодичното кръвонапълване и кръвоизливи в ектопичната ендометриална тъкан (например в „шоколадови“ кисти) водят до натрупване на железни йони и локална аноксия, която стимулира експресията на хипоксия-индуцируемия фактор HIF-1α. HIF-1α от своя страна задейства каскада от гени, свързани с проангиогенезата (напр. съдов ендотелен растежен фактор, VEGF), локалната естрогенна продукция (чрез повишена ароматазна експресия), усиления възпалителен отговор и метаболитната адаптация на клетките. В резултат ендометриозните огнища успяват да преживяват и прогресират дори

извън нормалната имунна и хормонална среда на матката. В литературата HIF-1α все повече се утвърждава като ключов фактор в патогенезата на ендометриозата и възможна мишена за терапия (Dai et al., 2024), аналогично на ролята му в множество тумори. Важно е да се отбележи, че хипоксията не само подпомага преживяемостта на ектопичните ендометриални клетки, но и може да задвижи техния фенотипен преход към по-инвазивен такъв. Едно от ключовите последствия на хроничния хипоксичен стрес е инициирането на епително-мезенхимен преход (ЕМП) в ендометриозните клетки (Liu et al., 2018). Такъв механизъм улеснява инвазията на ендометриозните жлези в околните тъкани и прогресията на заболяването (Martire et al., 2024). Именно тези дългогодишни хипоксично-ремоделирани ендометриозни тъкани се считат за огнища с най-висок риск от малигнена трансформация - наблюдение, което съответства на клиничния факт, че ендометриоза-асоциираните карциноми се откриват предимно при жени около и след менопауза (Hablase et al., 2024). Маркерът на клетъчна пролиферация Ki-67 е утвърден прогностичен маркер при редица тумори, включително ендометриалния карцином (Kitson et al., 2017). Нашите резултати показаха ниска пролиферативна активност в по-голямата част от изследваните случаи, особено при пациентките в менопауза - при 56.3% от тях Ki-67 бе позитивен едва в 1-10% от клетките, докато този дял при по-младите жени бе 31.3%. Макар делът на случаите с над 10% Ki-67-позитивни клетки да не се различаваше значимо между двете групи, прави впечатление, че в постменопаузалната група нито един случай не показа висока пролиферация (>50% Ki-67 позитивни клетки). Това отговаря на клиничните очаквания - след отпадане на цикличната хормонална стимулация огнищата с ендометриоза обикновено атрофират или стават неактивни (Vallée et al., 2024). При липса на естрогени епителните жлезисти клетки остават в покой, което обяснява минималната Ki-67 експресия в нашата менопаузална група. Обратно, при репродуктивно активните пациентки в нашето изследване дори ектопичната ендометриална тъкан периодично се стимулира от естроген, което може да се прояви с фокална пролиферация. В нашето изследване при 6.3% от по-младите жени се наблюдаваше Ki-67 експресия в умерена степен на пролиферация на клетките (10-50%), докато при нито една от менопаузалните случаи не бе над 10%. Тези разлики съвпадат с представата, че след менопаузата ендометриозата е „по-малко активна и по-ограничена" (Benagiano and Guo, 2022). От клинична гледна точка обаче именно редките случаи с по-висока пролиферативна активност в ендометриозните огнища представляват интерес, тъй като могат да сигнализират за по-агресивно поведение или предракови изменения.

По отношение на локализацията резултатите от проведеното изследване разкриват съществени разлики в експресията на проучваните маркери между аденомиозата и екстраутеринната ендометриоза с различни локализации. Аденомиозата не е просто „ендометриоза на матката", а се характеризира с отличителен молекулярен профил (Guo S-W., 2020). Наблюдаваните различия в

степента на хипоксия, пролиферативния индекс, адхезионните свойства на жлезистите клетки и стромалната реорганизация подкрепят схващането, че отделните типове ендометриозни лезии (перитонеални, овариални, дълбоко инфилтриращи) са хетерогенни по своята биология (Fukunaga, 2000) и се отличават от аденомиозата.

Имунохистохимичната експресия на хипоксия-индуцируемия фактор 1α (HIF-1α) беше силно положителна в по-голямата част от изследваните случаи, без значими разлики между отделните подгрупи. В аденомиозните огнища, както и във всички варианти на извънматочна ендометриоза, се наблюдаваше дифузна експресия на HIF-1α в жлезистите и стромалните клетки. Това отразява състоянието на хронична тъканна хипоксия, характерно за ектопично имплантираната ендометриална тъкан. Нашите данни съвпадат с литературните сведения, според които ендометриозните лезии демонстрират предимно дифузно разпределение на HIF-1α, за разлика от злокачествените тумори, при които хипоксията и HIF-1α са ограничени главно в зони на перинекротична некроза. Анализът на маркера Ki-67 показва значимо по-висока пролиферативна активност в жлезистия епител на аденомиозата в сравнение с извънматочните ендометриозни импланти. В аденомиозните лезии делящите се клетки (с Ki-67-позитивни ядра) са в по-голям процент. Наблюдавахме висок пролиферативен индекс в тази група, статистически значимо надвишаващ този при екстраутеринната ендометриоза (Istrate-Ofiţeru et al., 2022). Обратно, повърхностните перитонеални и овариални ендометриозни огнища показват по-нисък Ki-67, което говори за по-слаба клетъчна пролиферация. Възможно е вътрематочната локализация и по-доброто кръвоснабдяване на аденомиозните огнища да поддържат по-висока клетъчна пролиферация. Някои изследвания сочат, че дори еутопичният ендометриум при пациентки с ендометриоза показва повишена митотична активност в сравнение с контроли, което подкрепя хипотезата за вродени или ранно придобити свойства на ендометриума, предразполагащи към развитие на ектопични лезии. В аденомиозните жлези мембранната експресия на E-cadherin е относително добре запазена (дифузно положителна в повечето жлезисти клетки), докато при овариалната и особено при перитонеалната ендометриоза се наблюдава по-слаба и често хетерогенна E-cadherin имунореактивност. Нашите данни сочат, че жлезистият епител в извънматочните лезии по-често претърпява загуба на E-cadherin, което е белег на започнала епително-мезенхимна трансформация и придобиване на по-инвазивен фенотип. Литературните сведения подкрепят подобно наблюдение - установено е умерено намаление на E-cadherin (както и на свързаните с него катенини) в епитела на пациентки с ендометриоза, като спадът е най-отчетлив в самите ендометриозни огнища (Yoo et al., 2020). Стромална реакция и инвазивност (SMA и Fascin). Едно от отличителните открития при сравняване на аденомиозата с екстраутеринната ендометриоза е характерът на стромалната компонента. В аденомиозните огнища ендометриалната строма се намира сред

миометриума и е в непосредствен контакт с гладкомускулните клетки на матката. При класическата дълбоко инфилтрираща ендометриоза (напр. ретроцервикална) също се наблюдава обилна фиброза и навлизане на гладкомускулни влакна в лезията, поради което тези лезии често се означават като „аденомиоматозни“ възли. Нашите резултати потвърждават подчертаната гладкомускулна трансформация на стромата при екстраутеринната ендометриоза: в почти всички изследвани случаи на тазова (перитонеална и дълбока) и овариална ендометриоза стромалните клетки експресират дифузно α-гладкомускулен актин (α-SMA), съпроводено с изразена колагенна фиброза. В контраст, при повърхностните перитонеални импланти без масивна фиброзна реакция експресията на SMA може да бъде фокална или слаба. Независимо от произхода, наличието на α-SMA позитивни миофибробласти е белег за ремоделиране на микросредата - стромата се уплътнява и свива лезията, но същевременно може да подпомага инвазията чрез контрактилните си свойства. В аденомиозата ситуацията е сходна по проявление, макар и различна по произход: там ендометриалната строма навлиза между гладкомускулните снопчета на миометриума.

В нормалния ендометриум Fascin-1 практически не се експресира, но при злокачествените образувания на ендометриума е установена повишена експресия, свързана с по-агресивно поведение на тумора (Kabukcuoglu et al., 2006). Данните от нашето изследване сочат тенденция към по-силна експресия на фасцин в по-инвазивните лезии. В аденомиозните огнища и повърхностните перитонеални импланти експресията на фасцин беше ниска и огнищна. Тези резултати съответстват на биологичното поведение на лезиите - дълбоко инфилтриращата ендометриоза притежава най-висока инвазивност, докато аденомиозата расте по-ограничено в границите на маточната стена.

По Задача 3

В изследваната от нас серия потвърдихме известни паралели между ендометриозните лезии и карциномите, като хипоксията беше свързващото звено. HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha) беше експресиран дифузно в по-голямата част от ендометриозните огнища, докато при карциномите експресията му беше хетерогенна с участъци на силна позитивност. Това отразява състоянието на микросредата: ендометриозните импланти преживяват при хронична хипоксия и HIF-1α подпомага тяхното оцеляване и инвазия (Liu et al., 2017). Известно е, че в ектопичния ендометриум на пациентки с яйчникова ендометриоза HIF-1α е свръхекспресиран и стимулира миграцията на стромалните клетки чрез индуциране на автофагия (Liu et al., 2017). Това допринася за „инвазивното“ поведение на ендометриозата, въпреки доброкачествения ѝ характер. В същото време, карциномните клетки често изпитват остър кислороден дефицит при нарастване на тумора, което води до мозаечна HIF-1α експресия, която е силно положителна в хипоксичните зони

(обичайно перинекротични) и по-слаба в по-добре васкуларизираните части на тумора (Al-Sharaky et al., 2016). Нашите резултати отразяват точно тази картина: при ендометриалните карциноми относителният дял на случаите с междинна HIF-1α позитивност (25-50% от туморните клетки) беше значимо по-висок, докато овариалните карциноми по-често показваха екстензивна HIF-1α експресия (>75% позитивни клетки). Този модел корелира с по-агресивния фенотип на овариалния карцином и по-изразената хипоксия в тези тумори. В подкрепа на това, мета-анализи сочат, че свръхекспресията на HIF-1α се асоциира с напреднал стадий и по-неблагоприятна прогноза при ендометриален карцином (Zhu et al., 2020), както и с по-кратка преживяемост при овариален карцином (Rahman et al., 2025). В нашето проучване високите нива на HIF-1α статистически корелираха с по-дълбока инвазия в миометриума - при ендометриалните карциноми с инфилтрация >1/2 от дебелината на миометриума преобладаваше силна HIF-1α експресия, докато при ограничена инвазия доминираше слаба експресия. Това съответства на литературата, където високата експресия на HIF-1α статистически корелира с по-висок хистологичен грейдинг, дълбока миометриална инвазия и наличие на лимфно-съдова инвазия (Abouhashem et al., 2016). HIF-1α стимулира туморната прогресия чрез активиране на ангиогенеза, метаболитна адаптация и дори епително-мезенхимен преход (ЕМП) (Rahman et al., 2025). Действително, в нашето изследване наблюдавахме връзка между HIF-1α и ЕМП: всички случаи с изразена загуба на E-cadherin (положителен ЕМП статус) показаха висока HIF-1α експресия. Тези данни подкрепят хипотезата, че туморната хипоксия (чрез HIF-1α) може да индуцира ЕМТ-промени и така да насърчи инвазивността на туморните клетки (Abouhashem et al., 2016). В литературата е описано, че HIF-1α активира ЕМТ-механизми чрез регулатори като Snail, водещо до потискане на E-cadherin (Abouhashem et al., 2016). Нашите резултати съответно показват значимо по-чест „положителен ЕМП“ (намалена E-cadherin експресия) при тумори с висока HIF-1α. Дори установиха тенденция тези тумори по-рядко да развиват обширна некроза. Установихме статистически значимо по-нисък дял на ЕМТ-позитивните тумори сред карциномите с наличие на некроза в сравнение с тези без некроза. Възможно е туморите, които преживяват без обширна некроза, да постигат инвазия чрез ЕМТ-пътища, докато при обемните бързо растящи тумори некрозата е признак на хипоксия, но те може би все още задържат някои епителни връзки. Необходими са допълнителни проучвания за изясняване на тази обратна зависимост между некрозата в туморите и ЕМТ-статуса.

Клетъчната пролиферация очаквано се отличаваше между доброкачествените и малигнените лезии. Ki-67 - маркер за пролиферативна активност - показа ниски стойности при ендометриозата (в 87.5% от случаите <10% Ki-67-позитивни ядра). Това съответства на клиничното поведение на ендометриозните огнища, които обикновено са хормонално зависими и с бавен клетъчен растеж, наподобявайки нормален ендометриум в секреторна фаза.

Обратно, при карциномите индексът Ki-67 беше значимо по-висок: около 60% от ендометриалните карциноми демонстрираха умерена пролиферация (10-50% позитивни клетки), а 41.2% от овариалните карциноми - изключително висока пролиферация (>50% Ki-67-позитивни). Тези разлики са статистически значими и подчертават значението на пролиферативния индекс, доказан с маркера Ki-67 като отличителен белег на агресивните тумори. Известно е, че по-високата пролиферативна активност корелира с по-висок туморен грейдинг и по-напреднал стадий при ендометриалния карцином (Kitson et al., 2017), както и с по-неблагоприятна прогноза (в някои проучвания Ki-67 ≥35% се свързва с по-ниска преживяемост). Нашите данни потвърждават тази тенденция, най-висок Ki-67 индекс наблюдавахме при серозните овариални карциноми, които клинично протичат и най-агресивно. Интерес представлява и локалното увеличение на пролиферацията във фронтовата зона на инвазия при карциномите в нашето проучване. При ендометриалния карцином делът на туморите с много висок Ki-67 (над 50% положителни) нарастваше значимо в инвазивния им фронт (23.5% от случаите) спрямо централната туморна част (едва 5.9%). Това подкрепя концепцията, че периферните туморни клетки, водещи инвазията, се делят по-активно, вероятно под влияние на стимулите на туморната среда (хипоксия, растежни фактори и др.). Повишената периферна пролиферация може да улеснява туморното разпространение в съседни тъкани.

Експресията на E-cadherin също показа съществени разлики между изследваните групи, отразявайки степента на загуба на клетъчната адхезия при злокачествена трансформация в туморите. В ендометриозните огнища E-cadherin бе съхранен дифузно по мембраните на жлезистите клетки (дифузен положителен модел при 93.8% от случаите). При ендометриалните карциноми преобладаваше дифузна мембранна експресия на E-cadherin (88.2% от случаите), особено при високо диференцираните тумори, макар и с известно хетерогенно отслабване на оцветяването в отделни огнища. Овариалните карциноми обаче демонстрираха значима хетерогенност: при цели 52.9% от тях E-cadherin имаше мозаечен/фокално липсващ модел на експресия. Статистически, делът на случаите с хетерогенна или липсваща E-cadherin експресия беше значимо по-висок при овариалния карцином спрямо ендометриозата и ендометриалния карцином. Това ясно корелира с биологията на тези тумори - особено серозният овариален карцином, който е склонен към дискохезивно разпространение в коремната кухина, често губи E-cadherin в резултат на ЕМТ (Божкова Д, Порязова Е, 2019). В нашето изследване положителен ЕМТ-статус (т.е. намалена или липсваща E-cadherin експресия) се установи при 76.5% от овариалните карциноми срещу едва 12.5% при ендометриозните лезии. Това потвърждава, че епително-мезенхимният преход е характерен за малигнените тумори и отсъства при доброкачествените ендометриални клетки.

По отношение на стромалните компоненти и цитоскелетните белтъци, изследвани в нашето проучване чрез маркерите α-SMA (гладкомускулен актин)

и Fascin, SMA се експресираше при ендометриозата в преобладаващия брой изследвани случаи. В ендометриозни огнища често се наблюдава гладкомускулна метаплазия на стромата, като ендометриалните стромални клетки могат да се диференцират в миофибробласти и дори истински гладкомускулни клетки, особено при дълго съществуващи и дълбоко инфилтриращи лезии (Fukunaga, 2000). За разлика от SMA, нашите случаи сендометриоза практически не експресираха Fascin (при 0% от случаите със значима експресия). В карциномите на ендометриума обаче открихме Fascin позитивност в туморните клетки в значителен дял от случаите (около 74% общо, ако включим всички степени на експресия), макар и предимно с нисък до умерен интензитет. Подобно, Kabukcuoglu и сътр. съобщават, че 74% от ендометриоидните карциноми са Fascin-позитивни, срещу едва 39% от доброкачествените ендометриални биопсии (Kabukcuoglu et al., 2006). Нашите резултати показаха тенденция високостепенните ендометриални карциноми да имат по-силна Fascin експресия, което съвпада с описаното в литературата значимо повишение на Fascin при G3 тумори. При овариалните карциноми наблюдавахме сходен феномен: в инвазивните им фронтове делът на туморите с умерена Fascin експресия беше по-висок, отколкото в центъра на тумора. Макар тези разлики да не достигнаха статистическа значимост за Fascin между групите, динамиката вътре в тумора подчертава ролята на Fascin при инвазия. Клиничните следствия от високата експресия на Fascin са обект на засилен интерес в литературата, като се асоциира с по-агресивно поведение и по-лош изход.

По Задача 4

Разликите в туморната микросреда между инвазивния туморен фронт и зоните около некрози имат важно биологично значение при карциномите на яйчника и ендометриума. В нашето изследване туморните клетки в непосредствена близост до некротични огнища показват засилена експресия на HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor 1α). Това съответства на известния модел на „перинекротична“ активация на HIF-1α, наблюдаван в редица солидни тумори (Proestling et al., 2015). Birner и сътр. описват повишена експресия на HIF-1α в овариални карциноми, концентрирана в туморни клетки около зони на некроза. Подобно, при ендометриалния карцином високите нива на HIF-1α често съвпадат с наличие на туморна некроза и агресивно поведение на тумора. Проучване на Seeber и колеги показва, че перинекротичната експресия на HIF-1α в ендометриоидните карциноми на ендометриума е значим неблагоприятен прогностичен белег - наличието на туморна некроза и свързаната с нея HIF-1α активация корелират с по-кратка преживяемост (Seeber et al., 2010). Стабилизирането на HIF-1α в хипоксичните участъци активира транскрипцията на редица гени, подпомагащи туморното преживяване. Това стимулира ангиогенезата, метаболитната адаптация и инвазивността на клетките. Нашите резултати за повишена експресия на HIF-1α около некротичните огнища

потвърждават ролята на хипоксичната микросреда като стимул за туморна прогресия. Те са в подкрепа на данни от литературата, че свръхекспресията на HIF-1α е чест феномен в солидните тумори и се свързва с по-лоша прогноза (Braicu et al., 2014).

Интересна е връзката между хипоксията и епително-мезенхимния преход (EMT) в нашето изследване. В перинекротичните зони, наред с повишения HIF-1α, наблюдавахме белези на EMT с понижена експресия на E-cadherin в туморните клетки и промени в цитоскелетните протеини. Хипоксичните условия могат да стимулират EMT в туморните клетки. Това се подкрепя от литературни източници, които демонстрират, че HIF-1α директно участва в потискането на E-cadherin чрез регулация на EMT-транскрипционни фактори. Например Cheng и сътр. установяват, че в овариални туморни клетки HIF-1α медиира EGF-индуцираната активация на Snail/Slug с последваща загуба на E-cadherin, водеща до повишена инвазия и метастази (Cheng et al., 2013). Нашето наблюдение за отслабване на E-cadherin експресията около некрозите съответства на този механизъм. Допълнително, в тези зони с ниско кислородно насищане туморните клетки вероятно преживяват стрес, който води до придобиване на мезенхимен фенотип с цел по-лесно инвазиране на околната тъкан. Резултатите ни откриха значими разлики в пролиферативната активност на туморните клетки в различните региони на тумора. Имунореактивността за Ki-67 беше по-висока в периферните инвазивния фронт на тумора в сравнение с клетките около некротичните огнища. Литературни данни потвърждават тази хетерогенност при ендометриоза например, периферно разположените туморни клетки показват силно Ki-67 имуноцветяване, докато централните части на лезията имат значимо по-нисък пролиферативен индекс (Yalcin et al., 2017). Те описват и подобен модел при ендометриален карцином със силна Ki-67 експресия в периферията на туморните жлези и редуцирана в централните им части (Yalcin et al., 2017). В контекста на прогнозата, високият пролиферативен индекс (напр. Ki-67) и наличието на обширна туморна некроза независимо се свързват с по-неблагоприятен изход при редица карциноми. Нашите данни потвърждават значението на тези показатели и подчертават, че пространственото им разпределение в тумора (периферия срещу център) отразява различни еволюционни стратегии на туморните клетки.

Експресията и клетъчното разпределение на адхезионната молекула E-cadherin показаха значими изменения в зависимост от туморната зона, които корелират с коментираните хипоксични и инвазивни процеси. В добре оксигенирания инвазивен фронт на карциномите наблюдавахме относително запазена мембранна експресия на E-cadherin в туморните жлезни комплекси, особено при високо диференцираните тумори. Обратно, около некротичните огнища E-cadherin беше почти изцяло загубен от мембраните на туморните клетки. Това потвърждава, че клетъчната адхезия се нарушава именно в стресовите хипоксични зони, факт който подкрепя настъпването на EMT. В

литературата загубата на E-cadherin е универсален белег на инвазия и метастази при епителните тумори. Множество изследвания сочат, че намалената E-cadherin експресия улеснява дисоциацията на туморните клетки и инвазията в подлежащата тъкан при карциноми на гърда, яйчник, ендометриум и др. (Mateva et al., 2021). В съгласие с това, в нашето изследване около некрозите, където условията диктуват инвазивно поведение - туморните клетки практически са изгубили E-cadherin-медиираните си връзки. При ендометриалните карциноми специфично е описано, че участъците с активна инвазия (напр. MELF-структурни промени на инвазия) се отличават с фокална загуба на мембранния E-cadherin, за разлика от конвенционалните жлезни области, където E-cadherin остава интактно експресиран. Матева и сътр. установяват, че именно зоните на дълбока инвазия в миометриума показват силно намалена E-cadherin експресия, съпътствана от поява на мезенхимни маркери, което е директно доказателство за EMT (Mateva et al., 2021). Тясно свързан с E-cadherin е и β-катенин. При загуба на E-cadherin или при активация на Wnt/β-катенин сигналния път, β-катенин се натрупва в цитоплазмата и транслоцира в ядрото, където действа като транскрипционен коактиватор на пролиферативни и EMT-свързани гени. В нашето изследване не проведохме детайлен клетъчен анализ на субклетъчната локализация на β-катенин, но съдейки по сведената E-cadherin експресия и настъпващия EMT в определени зони, можем да предположим, че β-катенин в тези клетки е бил дисоцииран от клетъчната мембрана и потенциално активен в ядрото. Миофибробластите играят активна роля в туморната прогресия, като ремоделират екстрацелуларния матрикс, секретират растежни фактори и цитокини (напр. TGF-β1, HGF, VEGF) и подпомагат инвазията и ангиогенезата (Otranto et al., 2012). Lewis и сътр. доказват, че туморните клетки могат директно да индуцират диференцирането на нормални фибробласти към миофибробласти чрез секреция на TGF-β1, като получените миофибробласти ускоряват инвазията на туморните клетки (Lewis et al., 2004). Следователно, констатацията ни за засилена SMA-експресия в инвазивната периферия при карциномите на яйчника и ендометриума е в пълно съответствие с концепцията за „реактивна строма“, която активно подпомага малигнения процес. В нашия труд не оценихме директно прогностичното значение на стромалните показатели, но получените разлики подсказват, че агресивните карциноми вероятно индуцират по-мощна стромална реакция по периферията си. Fascin-1 се експресира de novo, особено в инвазивните клетъчни субпопулации (Zhang et al., 2022). Нашите резултати потвърждават това: имунохистохимичното позитивиране за Fascin беше подчертано по-силно в туморните клетки на инвазивния фронт, докато в областите около некрози туморните клетки показваха по-слаба или липсваща Fascin експресия. Този контраст между периферия и център отразява функционалната специализация на клетките - на инвазивния ръб туморните клетки придобиват подвижност и инвазираща способност, за което допринася засилената експресия на Fascin, улесняваща формирането на стабилни актинови

снопчета и филоподии за миграция (Zhang et al., 2022). При слабо диференцираните, активно инвазивни компоненти на туморите на яйчника и ендометриума Fascin бе значимо по-експресиран. Това подсказва, че Fascin е маркер за инвазивен потенциал на туморните клетки и неговата експресия може да отличава по-агресивните клетъчни клонове.

По Задача 5

В настоящото изследване сравнихме случаи с ендометриоза, с овариален карцином и с ендометриален карцином по отношение на експресията на следните имунохистохимични маркери - *HIF-1α*, *Ki-67*, *E-cadherin*, *β-катенин*, *α-SMA* и *fascin-1*. Опитахме се да установим отличителни модели на експресия, които могат да подсказват връзка между наличието на ендометриоза и развитието на карцином. Получените резултати разкриха съществени разлики между групите, отразяващи биологичните особености на доброкачествената и малигнената тъкан.

На първо място, хипоксията и свързаните с нея молекулни пътища изглежда играят роля както при ендометриозата, така и при раковите образувания. Известно е, че HIF-1α е основният транскрипционен регулатор, чрез който клетките се адаптират към ниско кислородно насищане. В изследваните от нас тъканни проби установихме *повишена експресия на HIF-1α* и в трите изследвани групи в сравнение с нормалния ендометриум, като интензивността и разпределението варираха. В огнищата на ендометриоза HIF-1α беше умерено експресиран дифузно в жлезистия и стромален компонент, докато при карциномите се наблюдаваха много по-интензивно позитивни зони, особено в туморните инвазивни фронтове и около некротичните участъци. Най-силна и дифузна HIF-1α имунореактивност (>75% от туморните клетки) отчетохме при значителна част от овариалните карциноми, докато ендометриалните карциноми по-често показваха средни нива на позитивни клетки (25-50%). Количествено, делът на случаите с умерена HIF-1α позитивност беше статистически значимо по-голям при ендометриалния карцином (например 88,2% от случаите с 25-50% положителни клетки) в сравнение с овариалния (11,8%). Обратно, силната HIF-1α експресия (над 75% от клетките) преобладаваше в групата на овариалния карцином (около 41,2% от случаите, спрямо едва 5,9% при ендометриалния карцином). Тези различия корелират и с хистологичната диференциация - *клетките на ниско диференцираните аденокарциноми* в нашата серия демонстрираха по-силен HIF-1α сигнал, съпроводен от активна пролиферация (висок Ki-67) и намалена адхезия (редуциран E-cadherin), което е характерно за по-агресивния фенотип. Констатациите ни съответстват на литературните данни, според които напредналите и високостепенни карциноми често протичат със значима туморна хипоксия и свръхекспресия на HIF-1α, асоциирана с по-лоша прогноза (Park et al., 2018). Повишената HIF-1α активност стимулира образуването на нови съдове и подпомага оцеляването на клетките в

неблагоприятна среда, което вероятно играе роля и при персистирането и прогресията на ендометриозните импланти. Всъщност ектопичната ендометриоза е съпроводена от хронично рецидивиращо кървене, което води до *локална тъканна хипоксия* - считана за един от ключовите фактори за инвазивния й растеж и потенциална малигнена еволюция. Нашето изследване демонстрира повишени нива на HIF-1α в ендометриозната тъкан спрямо нормалния ендометриум, което потвърждава хипотезата за "хипоксичен предпусков механизъм" при ендометриозата, сходен с този при солидните тумори.

Експресията на пролиферативната активност (с маркера Ki-67) между групите ясно подчерта доброкачествения характер на ендометриозата спрямо злокачествените процеси. При *почти всички случаи на ендометриоза* (87,5%) установихме изключително нисък Ki-67 - под 10% Ki-67-позитивни клетъчни ядра. Обратно, карциномите демонстрираха значително по-висок пролиферативен индекс. При около 58,8% от *ендометриалните карциноми* Ki-67 беше в междинния диапазон 10-50% положителни клетки, което е статистически значимо повече спрямо ендометриозата (едва 12,5% от последната показва такава активност). Най-високите Ki-67 стойности (>50% позитивни клетки) наблюдавахме при *овариалните карциноми* - 41,2% , като нито един случай на ендометриоза не достигаше подобни нива. Тези разлики са очаквани, тъй като отразяват присъщото ускоряване на клетъчния цикъл при злокачествената трансформация. Известно е, че по-високият Ki-67 индекс обикновено корелира с по-напреднал стадий и по-агресивно поведение при редица карциноми (Chidananda Murthy, 2023). В нашата серия също по-често наблюдавахме високи Ki-67 стойности при ниско диференцираните и инвазивни карциноми (със съпътстваща загуба на E-cadherin), отколкото при добре диференцираните тумори. Важно е да се отбележи, че ендометриозата не е хиперпластична лезия - ниският ѝ пролиферативен индекс потвърждава бенигнения й характер. Любопитен факт, докладван в литературата е, че дори *еутопичният ендометриум при жени с ендометриоза* показва малко по-висока пролиферативна активност в сравнение с контроли, което може да отразява споделен хормонален дисбаланс или други системни фактори (Keita et al., 2016). Независимо от това, малигнената трансформация на ендометриозата изисква натрупване на допълнителни генетични увреждания - едва тогава клетъчната пролиферация се "отключва" и достига нивата, наблюдавани при рак.

Оценката на адхезионните молекули E-cadherin и β-catenin показа интересни тенденции. В изследването ни дифузната мембранна експресия на E-cadherin преобладаваше при *ендометриозата* и при *ендометриалния карцином* - съответно в 93,8% и 88,2% от случаите, т.е. почти всички проби от тези групи имаха равномерен E-cadherin по клетъчните мембрани. Обратно, при *овариалните карциноми* наблюдавахме значимо по-често хетерогенна или намалена E-cadherin експресия. В повече от половината от случаите (52,9%) E-cadherin беше частично или почти напълно изгубен в туморните жлезисти

структури. Тези разлики са статистически значими и показват, че ЕМТ настъпва много по-често при овариалните карциноми, особено при тези, асоциирани с ендометриоза. Загубата на E-cadherin води до отслабване на клетъчната адхезия и позволява на туморните клетки по-лесно да инфилтрират околната тъкан и да се дисеминират. Известно е, че при ендометриалния карцином запазената E-cadherin експресия корелира с по-добра диференциация и по-добра преживяемост на пациентите (Zheng et al., 2019). Въпреки че понякога E-cadherin парадоксално се среща ко-експресиран с високи Ki-67 нива (т.е. тумор с активна пролиферация, но непокътнати междуклетъчни връзки), неговото наличие все пак се утвърждава като независим благоприятен прогностичен фактор при рак на ендометриума. Нашите резултати съответстват на тази констатация - ендометриозата и свързаният с нея ендометриален карцином, които обикновено са хормонално обусловени и по-индолентни, запазват E-cadherin и на практика не проявяват ЕМТ, докато ендометриозо-асоциираните овариални карциноми (ОССС и ендометриоиден) много по-рано придобиват *E-cadherin негативен/ЕМТ-позитивен фенотип* с всички произтичащи от това последици за туморната инвазивност. Ядрена експресия на β-catenin се наблюдава при част от ендометриоидните карциноми на матката и яйчника и обикновено е индикатор за мутация в гена *CTNNB1*. В литературата е описано, че около 20% от ендометриалните ендометриоидни карциноми и до 40-50% от овариалните ендометриоидни карциноми са с мутация в *CTNNB1*, която води до стабилизиране на β-catenin и натрупването му в ядрото. Ние също наблюдавахме отделни случаи в нашата серия (ендометриоиден овариален карцином) с аберантна *ядрена β-catenin* имунореактивност. По отношение на резултатите от експресията на стромалните и цитоскелетни маркери - SMA и Fascin, данните ни показаха, че стромата на ендометриозата и на карциномите не се различава съществено по SMA-експресия. И в трите изследвани групи биопсии имаше случаи със силно дифузно SMA-позитивни стромални клетки. Количествено не открихме значима разлика в разпределението на категориите SMA-позитивност между ендометриоза, ендометриален и овариален карцином. Освен това, почти във всички изследвани ендометриозни огнища бе налице изразена фиброзна строма с дифузно SMA-имунооцветяване, включително в случаите на тазова перитонеална ендометриоза и особено при овариалните ендометриоми. Това потвърждава известния феномен на гладкомускулна (миофибробластна) метаплазия в ендометриозната строма, описан още в класическите хистологични проучвания.

Настоящият сравнителен анализ на имуномаркери в ендометриоза, ендометриален и овариален карцином показва, че ендометриозата притежава молекулярни характеристики, припокриващи се с тези на злокачествените тумори, макар и проявени в по-малка степен. Хипоксичната среда (HIF-1α), локалната хиперплазия (Ki-67), частичната загуба на адхезия (намален E-cadherin, пренасочване на β-catenin) и фиброзната строма (SMA) при

ендометриозните лезии са свидетелство за *„неопластично-подобно" поведение*, което вероятно обяснява епидемиологичната връзка с определени туморни заболявания. Когато тези промени допълнително се утежнят с натрупването на генетични мутации (ARID1A, PTEN, PIK3CA, *TP53* и др.), ендометриозата може да прерасне в карцином - най-често овариален светлоклетъчен или ендометриоиден. Сравнението между случаи с и без ендометриоза подкрепя тази концепция: при наличие на ендометриоза се наблюдава предразположение към развитието на специфични подтипове малигнени тумори, които се отличават с особени молекулярни профили (напр. Wnt-активация, ARID1A мутации) и клинично поведение. По-задълбоченото разбиране на тази връзка ще спомогне за по-добро прогнозиране и индивидуализирано наблюдение на пациентките с ендометриоза, с оглед превенция или навременно откриване на асоциираните с нея карциноми.

По Задача 6

Карциномите на ендометриума и яйчниците демонстрират характерни имунохистохимични профили, които се асоциират с традиционните прогностични фактори, като стадий по FIGO, дълбочина на инвазия и хистологичен подтип. Резултатите от проведеното изследване показват, че напредналите стадии и по-агресивните туморни варианти имат по-висока експресия на хипоксичния маркер HIF-1α и пролиферативния индекс Ki-67, съпроводено с намалена експресия на адхезионната молекула E-cadherin. Тези промени отразяват преминаването към по-инвазивен фенотип и корелират със склонност към туморна прогресия и метастази (Koyuncuoglu et al., 2012). В съответствие с литературата, имунохистохимичният анализ в нашето изследване потвърждава, че по-високите FIGO стадии и по-дълбоката инвазия се характеризират с биологични белези на по-висок малигнен потенциал.

Установихме, че експресията на HIF-1α се повишава при по-агресивните тумори. При ендометриалните карциноми от ендометриоиден тип (тип I) дифузната експресия на HIF-1α се среща по-често при слабо диференцираните и напреднали по FIGO стадий случаи, за което съобщават и други автори. Обратно, при неендометриоидните високостепенни карциноми (тип II) се наблюдава равномерно силна експресия на HIF-1α във всички изследвани случаи - включително перинекротична позитивност, независимо от дълбочината на инвазия, васкуларната инвазия или стадия на тумора. Това подсказва, че при тип II карциноми хипоксичният отговор е максимално активиран още в ранните стадии на развитие. В нашата серия високата HIF-1α експресия беше по-честа и по-интензивна при овариалните карциноми в сравнение с ендометриалните (значимо повече случаи в нашата серия бяха с >75% позитивни клетки при туморите на яйчника). Тези данни съответстват на известния факт, че яйчниковите карциноми, особено високостепенните серозни, често растат в хипоксична среда поради бързия си растеж и недостатъчно кръвоснабдяване. В

литературата се отбелязва, че повишената експресия на HIF-1α е свързана с по-неблагоприятна прогноза при овариален карцином (Qin et al., 2017). Хипоксията в туморната микросреда не само стимулира ангиогенезата, но и подпомага инвазията и резистентността към терапия, което обяснява защо HIF-1α-позитивните тумори са по-агресивни.

В съответствие с нашите резултати, редица изследвания показват, че високият Ki-67 индекс корелира с по-агресивно поведение на тумора. При ендометриалните карциноми повишената експресия на Ki-67 се наблюдава при ниско диференцирани и напреднали тумори, а стойността на индекса нараства значимо в по-напредналите FIGO стадии. По-високият Ki-67 индекс се свързва с по-неблагоприятен клиничен ход и по-кратка преживяемост (Martin-Salamanca et al., 2023). Ние установихме, че при случаите с висока пролиферативна активност по-често са налице и белези на епително-мезенхимна трансформация (EMT) - например зоните с висок Ki-67 индекс в тумора често съвпадат с огнища на понижена E-cadherin експресия и обратно. Това наблюдение подсказва, че клетъчната пролиферация и инвазивният фенотип вървят ръка за ръка при бързо прогресиращите карциноми. В подкрепа на това, Ki-67 е идентифициран като независим неблагоприятен прогностичен фактор при ендометриален карцином - тумори с висок Ki-67 имат значимо по-кратка преживяемост при дългосрочно проследяване (Martin-Salamanca et al., 2023). Подобна тенденция се отчита и при овариалните карциноми, където случаите с висок Ki-67 (особено сред високостепенните серозни карциноми) показват по-висок риск от рецидив и по-лош отговор на химиотерапия (Ismail et al., 2023).

Настоящият сравнителен анализ на експресията на HIF-1α, Ki-67, E-cadherin, β-катенин, SMA и Fascin при карциноми на ендометриума и яйчниците показва, че тези имунохистохимични маркери отразяват степента на туморна агресивност и могат да служат за прогноза. По-високите FIGO стадии и дълбоката инвазия се характеризират с активиране на хипоксични механизми (HIF-1α), засилена клетъчна пролиферация (Ki-67), загуба на епителна адхезия (понижен E-cadherin, аберантен β-катенин) и придобиване на мезенхимен фенотип (експресия на SMA и Fascin) в туморната тъкан. Различните хистологични подтипове показват различен профил - ендометриоидните карциноми по-често преминават през EMT и имат Wnt активация, докато серозните запазват епителни белези, което корелира с разликите в тяхната биология и пътища на разпространение. Тези резултати са в съответствие със съвременните научни данни и подкрепят идеята, че имунохистохимичните панели могат да допълнят установените прогностични фактори. Чрез количественото оценяване на маркери като Ki-67, HIF-1α, E-cadherin и Fascin патологът би могъл по-добре да стратифицира туморите по риск и да съдейства за оптимизиране на терапевтичния подход при карциномите на ендометриума и яйчниците.

VI. ИЗВОДИ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИЗВОДИ

1. Ендометриозата засяга предимно жени в репродуктивна възраст, докато карциномите на ендометриума и яйчниците се диагностицират по-често в постменопаузалния период и в по-напреднала възраст. Средната възраст на пациентките с ендометриоза беше 48.65 ± 14.87 години, докато тази на пациентките с ендометриален карцином беше 66.45 ± 10.67 години, а при яйчников карцином - 67.21 ± 8.94 години.

2. Анализът на FIGO стадия в нашето проучване показа, че ендометриалният карцином се диагностицира в по-ранен стадий. При ендометриалния карцином най-честият стадий е IB (47.1%), докато при яйчниковите карциноми преобладават IA (29.4%) и IC (35.3%).

3. Ендометриозните лезии демонстрираха предимно дифузно разпределение на HIF-1α в жлезистия епител и в стромалните клетки, за разлика от злокачествените тумори, при които хипоксията и HIF-1α са ограничени главно в перинекротичните зони. Най-силна и дифузна HIF-1α имунореактивност (>75% от туморните клетки) отчетохме при значителна част от овариалните карциноми.

4. Високите нива на HIF-1α статистически корелираха с по-дълбока инвазия в миометриума при ендометриалните карциноми с инфилтрация >1/2 от дебелината на миометриума преобладаваше силна HIF-1α експресия, докато при ограничена инвазия доминираше слаба експресия.

5. Наблюдавахме връзка между HIF-1α и ЕМП: всички случаи с изразена загуба на E-cadherin (положителен ЕМП статус) показаха висока HIF-1α експресия.

6. Относителният дял на случаите с хетерогенна или липсваща E-cadherin експресия (положителен ЕМП статус) беше значимо по-висок при овариалните карциноми спрямо ендометриозата и ендометриалните карциноми.

7. Установихме гладкомускулна трансформация на стромата при екстраутеринната ендометриоза: в почти всички изследвани случаи стромалните клетки експресираха дифузно α-гладкомускулен актин (α-SMA).

8. Експресията на Fascin беше подчертано по-силна в туморните клетки на инвазивния фронт при тъканните проби от карциноми, докато в областите около некрози беше по-слаба до липсваща.

9. По-високите FIGO стадии и дълбоката инвазия се характеризират с активиране на хипоксични механизми (силна HIF-1α експресия), засилена клетъчна пролиферация (Ki-67), загуба на епителна адхезия (понижен E-cadherin, аберантен β-катенин) и придобиване на мезенхимен фенотип (експресия на SMA и Fascin) в туморната тъкан.

10. Установихме статистически значимо по-нисък дял на EMT-позитивни тумори сред карциномите с наличие на макроскопска некроза в сравнение с тези без некроза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ендометриозата, ендометриалният и яйчниковият карцином споделят общи ключови молекулни механизми, свързани с хипоксия, клетъчна пролиферация, промени в клетъчната адхезия и цитоскелетното ремоделиране. Анализът на експресията на HIF1alpha, Ki-67, E-cadherin, β-catenin, SMA и Fascin разкрива значими разлики и общи черти между тези заболявания, които могат да обяснят тяхната прогресия и биологично поведение.

VII. ПРИНОСИ

Теоретични приноси с оригинален характер

1. За първи път в България е извършен обстоен анализ, основан на ИХХ-експресия, за ролята на хипоксията в канцерогенезата при ендометриоза, ендометриални и яйчникови карциноми с HIF1alpha, Ki-67, E-cadherin, β-catenin, SMA и Fascin.
2. Повишената експресия на HIF-1α в туморите на ендометриума и яйчниците около некротичните огнища потвърждава ролята на хипоксичната микросреда като стимул за туморна прогресия и ЕМП.
3. Умерената до висока експресия на HIF1alpha в дълбоките инфилтративни форми на ендометриоза потвърждава, че хипоксичната микросреда поддържа тяхното оцеляване и играе роля в прогресията.

Приноси с научно-приложен характер

1. Аденомиозата и извънматочната ендометриоза имат ясно различаващи се молекулни профили. Извънматочната ендометриоза демонстрира по-високи нива на HIF1alpha, Ki-67 и β-catenin, докато аденомиозата има по-висока SMA експресия и запазена E-cadherin експресия, което я прави по-локализирана.
2. Случаи с ендометриоза, показващи абнормна експресия на определени маркери (напр. повишен HIF-1α или фокална загуба на E-cadherin), биха могли да се разглеждат като рискови за прогресия и подлежат на по-стриктно наблюдение.
3. При вече диагностицирани карциноми, имунохистохимичният профил допълва традиционните прогностични фактори (стадий, грейдинг) и може да насочи към риск от прогресия - напр. HIF-1α-позитивни, E-cadherin-негативни тумори с висока Ki-67 изискват мониториране за рецидиви.

Приноси с потвърдителен характер

1. Най-честата локализация на извънматочната ендометриоза са яйчниците, по-рядко са засегнати маточните тръби и коремната стена.
2. Ендометриоидният вариант доминира при ендометриалния карцином, докато high-grade серозният подтип е най-чест при яйчниковите карциноми.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Списък на научни публикации по темата на дисертацията

1. **Daniel Markov**, Elena Poryazova, Ralitsa Raycheva, Galabin Markov. ***Expression of HIF-1α, Ki67, SMA and E-Cadherin in Endometriosis, Endometrial and Ovarian Carcinoma***. Folia Medica 2024;66(1):97-103. doi: 10.3897/folmed.66.e112757.
2. **Markov D**, Uchikov P, Timonov P, Markov G, Poryazova E. ***Primary pleomorphic breast sarcoma - a case report***. Folia Medica 2024; 66(4): 568-573. doi: 10.3897/folmed.66.e120391.
3. **Markov D**., Serteva D., Bozhkova D., Poryazova E. ***EXPRESSION OF p53 AND Ki67 IN TYPE 1 AND TYPE 2 ENDOMETRIAL CARCINOMAS AND IN LOW AND HIGH GRADE SEROUS OVARIAN CARCINOMAS.*** Znanstvena misel journal 2023; ISSN 3124-1123 №82 p. 11-16.
4. **Markov Daniel**, Poryazova Elena. ***ENDOMETRIOSIS AND RELATED NEOPLASMS OF THE OVARY AND ENDOMETRIUM. REPORTING 11 CASES.*** Eurasian Union of Scientists (Евразийский Союз Ученых) 2023; ISSN: 2413-9335; №8 (109), p. 3-8.

Списък на участия в национални и международни научни прояви

1. Иновативни подходи в патологията: Експресия на имунохистохимични маркери при ендометриоза и ендометриален рак във връзка с хипоксията и епително-мезенхимния преход за диагностика и прогноза с помощта на изкуствения интелект, **Даниел Марков**, Ежегодна годишна докторантска стипендия, Фондация Карол Знание 2025г. 15.01. гр. София.
2. Експресия на anti HIF1alpha, Ki 67, E-cadherin, β-cathenin, SMA в огнища с ендометриоза, при ендометриални и яйчникови карциноми, **Даниел Марков**, Дни на медицинската наука 19.04.2024г., МУ-Пловдив, p.160-161.
3. Експресия на HIF1Алфа при ендометриоза и ендометриални карциноми, **Даниел Марков**, Елена Порязова, Национална конференция по патология 01-04.06.2023, к.к. Златни пясъци, стр. 31-32.
4. Представяне на два редки случая на съчетание на ендометриоза с ендометриален карцином и стромален сарком, **Даниел Марков**, Деница Сертева, Елена Порязова, Национална конференция по патология 01-04.06.2023, к.к. Златни пясъци, стр. 32-33.
5. A Rare Case of Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma of the Mammary Gland, **Daniel Markov**, Galabin Markov, Denitsa Serteva, Elena Poryazova, SCIENCE and YOUTH Conference 2022, Plovdiv, p.31-32.

6. ЕМП при гинекологични неоплазми и ендометриоза, Елена Порязова, Десислава Божкова, Деница Сертева, **Даниел Марков**, Национална конференция по патология 17-18.06.2022, гр. Луковит, стр. 19-20.
7. Имунохистохимична експресия на p53 и Ki67 при ендометриални и яйчникови карциноми, Елена Порязова, Десислава Божкова, Деница Сертева, **Даниел Марков**, Национална конференция по патология 17-18.06.2022, гр. Луковит, стр. 22.
8. Рядък случай на недиференциран плеоморфен сарком на млечната жлеза, **Даниел Марков**, Гълъбин Марков, Деница Сертева, Елена Порязова, Национална конференция по патология 17-18.06.2022, гр. Луковит, стр.27-28.

Благодарности

Бих искал да изкажа своята искрена благодарност към научния ми ръководител доц. д-р Илия Биволарски, дм за подкрепата и търпението по време на разработването на дисертационния труд. Изказвам специална благодарност и на ръководителя на Катедрата по обща и клинична патология, проф. д-р Веселин Беловеждов, дм, както и на всички колеги от Катедрата – за създадената колегиална и спокойна атмосфера, както и за оказаната професионална помощ.

Благодаря на семейството ми за любовта, търпението и безрезервната подкрепа при изпълнението на този научен труд.

Истинското посвещаване започва едва когато човек открие, че животът не е само онова, което се вижда, а и онова, което се усеща.