



Медицински Университет – Плевен

Факултет „Медицина“

Катедра „Патологоанатомия“

Д-р Елица Петрова Краевска

**Мускулно-инвазивен карцином на пикочния мехур -
морфологични и имунохистохимични
характеристики с фокус върху прогностични и
предиктивни биомаркери**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“**

Плевен, 2026 г.

Медицински Университет – Плевен
Факултет „Медицина“
Катедра „Патологоанатомия“

Д-р Елица Петрова Краевска

**Мускулно-инвазивен карцином на пикочния мехур -
морфологични и имунохистохимични характеристики с фокус
върху прогностични и предиктивни биомаркери**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен

„Доктор“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.1 Медицина
Докторска програма: „Патологоанатомия и цитопатология“

Научен ръководител:

Проф. д-р Савелина Любенова Поповска, д.м.н.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Владислав Росенов Дунев, д.м.
Проф. д-р Веселин Тодоров Беловежков, д.м.

Плевен, 2026 г.

*С благодарност към моя научен ръководител, от когото научих, че науката
е не само сбор от факти, а начин на мислене – диалог между
любопитството и отговорността!*

Дисертационният труд е представен на 202 стандартни страници и е онагледен с 14 таблици, 14 фигури, 17 микрофотографии и 1 приложение. Литературният обзор включва 221 заглавия, от които 1 на кирилица и 220 на латиница, като 178 от тях са от последните 10 години.

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

Забележка: номерацията на фигурите и таблиците не отговаря на тази в дисертационния труд.

Дисертацията е обсъдена и определена за публична защита на разширен Катедрен съвет на катедра „Патологоанатомия“, Факултет по Медицина, Медицински университет – Плевен, състоял се на 26.11.2025 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 05.02.2026 г. от 13:00 часа в зала „Амброаз Паре“ на МУ- Плевен, ул. Климент Охридски 1.

Научно жури в състав:

Председател: Проф. д-р Владислав Росенов Дунев, д.м.

Членове:

Проф. д-р Веселин Тодоров Беловеждов, д.м.

Проф. д-р Юлиан Руменов Ананиев, д.м

Доц. д-р Свитлана Юриевна Бачурска, д.м.

Доц. Д-р Зорница Веселинова Горчева, д.м.

Резервни членове:

Проф. д-р Радиана Стефанова Иванова-Боянова, д.м.н.

Проф. д-р Сергей Димитров Илиев, д.м.

Материалите по защитата са на разположение на сайта на МУ-Плевен:

www.mu-pleven.bg.

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	7
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	10
Цел.....	10
Задачи	10
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	11
Клиничен контингент	11
Диагностични методи за оценка:.....	13
Статистически методи:.....	15
Резултати	16
АНАЛИЗ НА ЧЕСТОТАТА НА РАЗЛИЧНИ ХИСТОЛОГИЧНИ СУБТИПОВЕ МУСКУЛНО-ИНВАЗИВЕН КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР	16
АНАЛИЗ НА ОСНОВНИТЕ МОЛЕКУЛЯРНИ ВАРИАНТИ НА МИКПМ И ПРОУЧВАНЕ НА ЧЕСТОТАТА ИМ	21
АНАЛИЗ НА КОРЕЛАЦИОННИ ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ ХИСТОЛОГИЧНАТА И МОЛЕКУЛЯРНАТА КЛАСИФИКАЦИЯ.....	24
АНАЛИЗ НА HER2 ЕКСПРЕСИЯТА ПРИ РАЗЛИЧНИ МОЛЕКУЛЯРНИ ВАРИАНТИ И ХИСТОЛОГИЧНИ СУБТИПОВЕ.....	28
АНАЛИЗ НА P16 ЕКСПРЕСИЯТА	37
Обсъждане	42
Изводи:.....	51
Приноси на научния труд	53
Приложения	56
ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, КУРСОВЕ И ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:	57
ПУБЛИКАЦИИ НА НАУЧНИ РЕЗУЛТАТИ В ПЪЛНОТЕКСТОВИ СТАТИИ:.....	57
УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	58
УЧАСТИЕ В СПЕЦИАЛИЗИРАНИ КУРОВЕ В ОБЛАСТТА НА ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:.....	59

Списък с използваните съкращения:

- КПМ – Карцином на пикочния мехур
- МИКПМ – Мускулно-инвазивен карцином на пикочния мехур
- УК – Уротелен карцином
- ИХХ – Имунохистохимия
- РЦ – Радикална цистектомия
- ТУР – Трансуретрална резекция
- ХТ – Химиотерапия
- НХТ – Неоадювантна химиотерапия
- ИЧИ – Иmunни чек-пойнт инхибитори
- HER2 – Човешки епидермален растежен фактор рецептор 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
- FISH/CISH – Флуоресцентна/Хромогенна хибридизация на място (*Fluorescence/Chromogenic in situ hybridization*)
- ADC – Антитяло-лекарствен конюгат (Antibody–Drug Conjugate)
- FGFR3 – Рецептор за фибробластен растежен фактор 3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3)
- BCG – БЦЖ (Bacillus Calmette-Guérin)
- ASCO/CAP – Американско дружество по клинична онкология/Колеж на американските патолози (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist)
- EAU – Европейска асоциация по урология (European Association of Urology)
- ESMO – Европейско дружество по медицинска онкология (European Society for Medical Oncology)
- NCCN – Национална мрежа за всеобхватна борба с рака, САЩ (National Comprehensive Cancer Network)
- ISUP – Международна асоциация по уропатология (International Society of Urological Pathology)
- OS – Обща преживяемост (Overall Survival)
- DFS – Преживяемост без болест (Disease-Free Survival)

“Аз принадлежа към числото на онези, които виждат в науката велика красота”

Мария Склодовска-Кюри

ВЪВЕДЕНИЕ

Карциномът на пикочния мехур (КПМ) представлява значим здравен проблем. Според последни данни на GLOBOCAN (2022), заболяването заема девето място по честота с 614 298 новодиагностицирани случаи и 220 596 смъртни случаи в световен мащаб. Развитието на КПМ е свързано с различни рискови фактори, включително тютюнопушене, професионални и химически експозиции, хронични възпаления (например, инфекция с *Schistosoma*), както и генетични предиспозиции. Приблизително 25% от пациентите, диагностицирани с КПМ, се представят с мускулно-инвазивна форма на заболяването при поставяне на диагнозата (стадий $\geq$ pT2). Мускулно-инвазивният карцином на пикочния мехур (МИКПМ) се отличава с агресивно протичане и висока смъртност, което налага ранна диагностика и оптимизиране на терапевтичните подходи.

Карциномът на пикочния мехур е морфологично разнообразен. Уротелният карцином (УК) се среща в над 90% от диагностицираните случаи. СЗО-класификацията (2022) стратифицира УК в морфологично различни групи: папиларен УК, микропапиларен УК, микрокистичен УК, саркоматоиден УК, плазмоцитоиден УК, светлоклетъчен УК, обогатен с липиди УК, гнезден УК, лимфоепителиома-подобен УК и гигантоклетъчен УК. Морфологичните субтипове представляват уротелен карцином с морфология, различна от конвенционалната. Те се срещат в 20-30% от резецираните тумори. Различната хистология е задължителен елемент, който трябва да бъде описан като процентно съдържание в патологичния доклад. Често идентифицирането на такава хистология при иначе конвенционален уротелен карцином е свързано с агресивно поведение на тумора и играе ключова роля както в диагностиката, така и в прогностичната оценка и лечението.

През последното десетилетие ускорените научни изследвания доведоха до по-задълбочено разбиране на молекулярната биология на уротелните тумори. Проучвания, базирани на високотехнологични експресионни генетични анализи, доведоха до

откриването на молекулярни варианти на уротелния карцином, сходни с тези при карцином на гърда. През 2020 г. Kamoun и сътр. създадоха консенсусна молекулярна класификация, базирана на мета-анализ на 1750 МИКПМ транскриптомни профили от общо 18 публикувани бази данни. Те идентифицираха 6 различни молекулярни варианта: базо-сквамозен (Ba/Sq); луминален папиларен (LumP); луминален нестабилен (LumU); луминален неспецифичен (LumNS); невроендокринно-подобен (NE-like) и богат на строма (Stroma-rich). Молекулярното типизиране е независим предиктор за карцинома на пикочния мехур. То позволява разделянето на туморите в клинично значими групи, които демонстрират специфични молекулярни профили, различни прогностични характеристики и отговор към терапия.

Високата цена, свързана с молекулярния анализ и ограничената наличност на технологични платформи, необходими за извършването му, са причина за ниската приложимост. Необходими са ясно дефинирани и лесни за използване сурогатни молекулярни категории, базирани на имунохистохимия (ИХХ), за да направят типизирането рентабилно и полезно в рутинната ежедневна практика. За по-добро разбиране на заболяването е важно да се изследва връзката между хистологичния субтип и молекулярния профил на тумора.

Ролята на прогностичните и предиктивни биомаркери при карцинома на пикочния мехур е от съществено значение за оценката на клиничния ход на заболяването и определянето на подходящи терапевтични стратегии. Прогностичните биомаркери предоставят информация за вероятния изход от заболяването, включително риска от рецидив, прогресия и обща преживяемост. Предиктивните биомаркери играят ключова роля в персонализираната медицина, като позволяват адаптиране на лечението спрямо индивидуалните характеристики на пациента.

Човешкият епидермален растежен фактор рецептор 2 (HER2) е добре проучен биомаркер при рак на гърда и стомах. HER2, известен също като ERBB2, е рецептор от семейството на тирозин киназите, който играе роля в клетъчната пролиферация, диференциация и туморогенезата. Ролята на HER2 при уротелния карцином е обект на значителен научен интерес, като изследванията се фокусират върху честотата на експресия, методологията на изследване и връзката с клиничните резултати и прогнозата. Честотата на експресия на HER2 и методите за откриване (имунохистохимия и *in situ* хибридизация) при УК разкриват значителна хетерогенност, което изисква стандартизиран и персонализиран подход за оценка. Разликите в HER2 позитивността между различните хистологични субтипове и стадии на заболяването

подчертават необходимостта от индивидуализирани диагностични и терапевтични стратегии, които отговарят на специфичните нужди на пациентите. Клиничната значимост на HER2-статуса е свързана с неговата прогностична и предиктивна стойност. Пациентите с HER2-позитивни тумори често демонстрират по-агресивно заболяване и по-висок риск за метастази. Терапевтичните подходи, включващи анти-HER2 терапии, предлагат нови възможности за лечение, особено при напреднали или рефрактерни случаи. Предварителните данни от клинични изпитвания показват обещаваща активност на нови терапии, което е обнадеждаващо за бъдещото лечение на пациенти с HER2-позитивен уротелен карцином.

Тумор-супресорният протеин p16INK4A се използва рутинно като индиректен индикатор за нарушения в пътя RB1 (ретинобластомния протеин). При уротелния карцином загубата на функция по оста p16–RB може да настъпи или чрез делеция/метиране на гена *CDKN2A* (водеща до липса на p16), или чрез мутация на *RB1* (водещо до постоянно високи нива на p16). Съответно, експресията на p16 варира при различните молекулярните варианти. Публикувани данни показват почти универсална експресия на p16 при невроендокринно-подобни туморите (NE-like) и честа експресия при базалните, докато луминалните папиларни тумори най-често са p16-негативни. Проучването на тези зависимости би могло да подпомогне диагностиката (чрез използване на p16 като сурогатен маркер за молекулярен вариант) и да осигури нови прогностични показатели.

Настоящата дисертация е посветена на изследването на морфологичните и имунохистохимични характеристики на мускулно-инвазивния карцином на пикочния мехур, с фокус върху *прогностични и предиктивни биомаркери*. Чрез систематичен анализ на 100 последователни случая на мускулно-инвазивен карцином на пикочния мехур за период от 4 години (2021-2024) се цели да се дефинират, чрез имунохистохимични методи, молекулярните варианти съгласно консенсусната молекулярна класификация, както и да се оцени експресията на HER2 в различните туморни категории. Работната хипотеза е, че комбинацията от класическа морфологична класификация и имунохистохимичен профил може да стратифицира МИКПМ в клинично значими групи, които имат потенциал да служат като предиктивни и прогностични биомаркери.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Да се проучи морфологичната характеристика на мускулно-инвазивния карцином на пикочния мехур и да се дефинират молекулярни варианти съгласно консенсусната молекулярна класификация на МИКПМ с помощта на сурогатни имунохистохимични маркери. Също така да се проучи експресията на HER2 протоонкогена и да се потърси корелация с различните морфологични субтипове и молекулярни варианти.

За реализирането на тази цел си поставихме следните задачи:

Задачи

1. Да се проучи честотата на различните хистологични субтипове МИКПМ в изследваната кохорта ($n = 100$).
2. Да се определи молекулярният вариант на различните хистологични субтипове МИКПМ чрез методите на ИХХ и да се проучи честотата им.
3. Да се потърси корелация между класическата (хистологична) и молекулярната класификации.
4. Да се определи HER2-експресията при различните хистологични субтипове и молекулярни варианти и да се проучи честотата им.
5. Да се проучи експресията на p16 при различни молекулярни варианти.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Клиничен контингент

Изследвани са 100 последователни пациенти с хистологично доказан мускулно-инвазивен карцином на пикочния мехур. Пациентите са лекувани в Клиниката по урология на УМБАЛ „Св.Марина“, гр. Плевен, България, за 4-годишен период (януари 2021 – декември 2024 г.). На 66 пациенти (66%) е извършена трансуретрална резекция (ТУР), а на останалите 34 (34%) – радикална цистектомия (РЦ) (Фиг. 1).

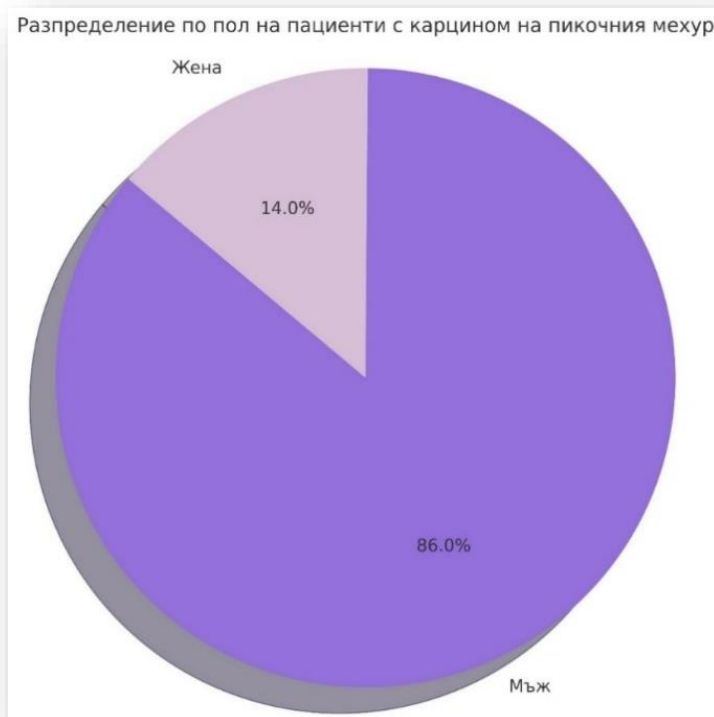
Фигура 1. Честотно разпределение на пациентите в зависимост от извършената оперативна интервенция.



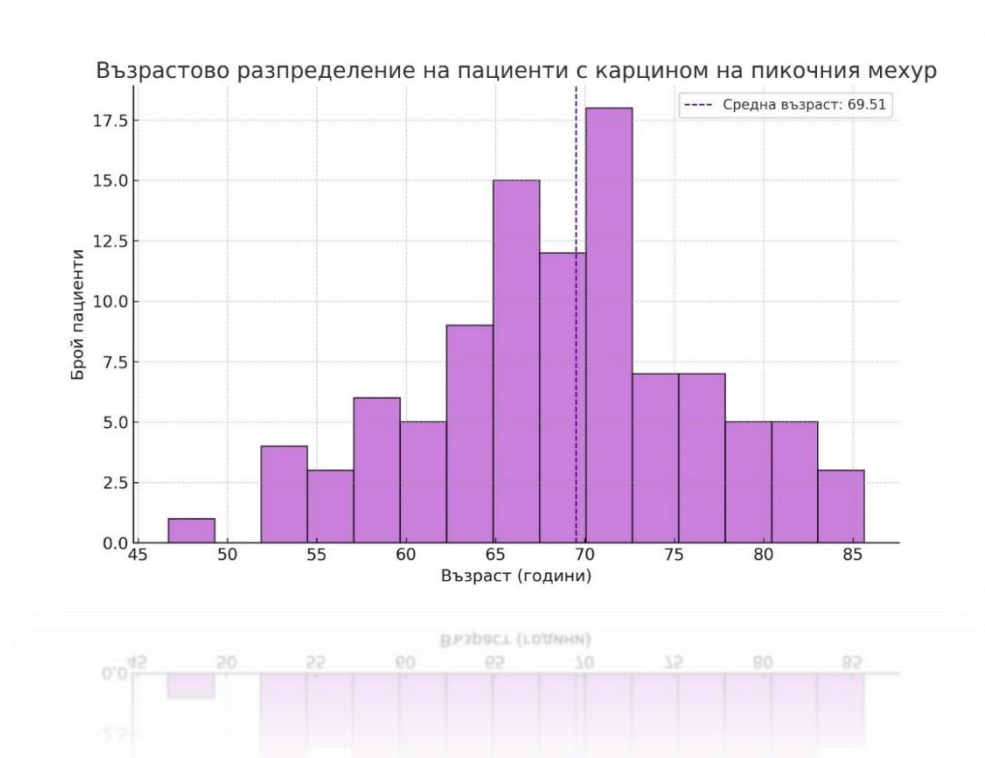
Изследваната група включва 86 мъже (86%) и 14 жени (14%), което в голяма степен съответства на известното съотношение между половете в полза на мъжете (фиг. 2). Средната възраст на пациентите е 69.5 години (стандартно отклонение ± 8.7 г.), варираща от 47 до 87 години (фиг. 3). Това подсказва, че заболяването засяга предимно

възрастни хора, типично над 55-60 години, което съвпада с епидемиологичните данни в литературата.

Фигура 2. Честотно разпределение на пациентите по пол (n=100).



Фигура 3. Възрастово разпределение на пациентите.



Диагностични методи за оценка:

Всички туморни проби бяха фиксирани в неутрален буфериран формалин и вградени в парафин по стандартен протокол. Изготвени са хистологични срезове с дебелина 4 μm , оцветени с хематоксилин-еозин (H&E) за рутинна морфологична оценка. Въз основа на H&E оцветяване на препарата за всеки случай е поставена хистологична диагноза, съгласно препоръките на C3O (5-то издание, 2022) и UICC TNM (8-мо издание), като специално внимание е обърнато на хистологичния субтип. Комбинирани тумори, съдържащи повече от един хистологичен компонент, се класифицират като смесен субтип (≥ 2 морфологично различни тумора).

Забележка: Всички микрофотографии в настоящия труд са личен архив на автора и включват случаи от изследваната кохорта.

Имунохистохимия (ИХХ):

Парафинови блокчета са използвани за изготвяне на допълнителни срезове, предназначени за имунохистохимично (ИХХ) оцветяване. С помощта на избран панел от сурогатни имунохистохимични маркери беше определен молекулярният профил на всеки тумор. Конкретно, бяха използвани следните първични антители:

СК5/6 (цитокератин 5/6, мише моноклонално антитяло, клон D5/16 B4, готово за употреба, *Dako/Agilent*) и **СК20** (цитокератин 20, мише моноклонално антитяло, клон Ks20.8, готово за употреба, *Dako/Agilent*) – за разграничаване на базален от луминален имунофенотип. СК5/6 нормално се експресира в базални клетки, а СК20 – в диференцирания повърхностен слой на уротела (чадърести клетки). Бяха използвани подходящи контроли за всеки от двата маркера: бенигнена простатна хиперплазия за СК5/6 и апендикс за СК20.

P16 - готово за употреба моноклонално антитяло, клон JC2 (Diagnostic BioSystems, Калифорния, САЩ). Като позитивна контрола за p16 беше използван цервикален плоскоклетъчен карцином, асоцииран с HPV и свръхекспресиращ p16. Критериите за интерпретация на p16-оцветяването: считаме резултата за позитивен, ако се наблюдава силно или умерено ядрено оцветяване (независимо от цитоплазмено) в $\geq 50\%$ от

туморните клетки. Липсващ, слаб или фокален (<50%) ядрен сигнал, както и само цитоплазмено оцветяване се отчете като негативен резултат.

Допълнително беше извършено имунохистохимично оцветяване за HER2. Използвана е стандартизирана диагностична система **HercepTest™** (Dako/Agilent), поликлонално заешко антитяло (код A0485), по протокол, аналогичен на този при рак на гърда. Във всеки цикъл на оцветяване бяха включени вътрешни контролни проби – предоставен мултиконтролен слайд (четири клетъчни линии с нива на експресия 0, 1+, 2+, 3+) и допълнителни собствени отрицателни контроли от туморната тъкан за всеки пациент. По този начин се гарантират специфичността и възпроизводимостта на реакцията.

В допълнение към материалите, беше използвана стандартна ИХХ-лаборатория с оборудване, предоставена от Медицински университет-Плевен, „Център за компетентност по персонализирана медицина, 3Д и телемедицина, роботизирана и минимално-инвазивна хирургия“. ИХХ оцветяванията са извършени на автоматизирана платформа *Dako AutostainerLink48*. Използван е метод за визуализация чрез DAB хромоген и ензимен маркер полимер (EnVision™ FLEX) след подходящо епитопно разкриване (PT Link, буфер с ниско pH).

Определяне на молекулярния вариант: За класификацията на туморите към определен молекулярен вариант е използвана комбинация от гореспоменатите ИХХ маркери, съгласно следния ИХХ алгоритъм:

- ☒ Базален вариант: CK5/6 (позитивен в >10% от туморните клетки), CK20 (негативен).
- ☒ Луминален папиларен вариант: CK5/6 (негативен), CK20 (позитивен в >10% от туморните клетки), p16 (негативен).
- ☒ Луминален нестабилен вариант: подобен на луминален папиларен по CK5/6/CK20, но p16 е силно и дифузно позитивен в над 50% от ядрата на туморните клетки.
- ☒ Луминален неуточнен вариант: CK5/6 (негативен), CK20 (фокално в <10% от туморните клетки) с уротелна морфология. Представлява междинен профил, който не попада в горните луминални категории.
- ☒ Строма-обогатен вариант: характеризира се главно с изобилна строма и възпалителен инфилтрат; имунофенотипът е двойно негативен за CK5/6 и CK20. В нашето изследване този вариант трудно се разпознава само с ИХХ. Затова случаи без ясно изразен базален или луминален профил, но с изобилна строма,

бяха отнесени към тази категория.

- ☑ Невроендокрино-подобен вариант: при наличие на невроендокринна морфология +/- имунохистохимична експресия на синаптофизин, хромогранин, CD56. Тези тумори са CK5/6 и CK20-негативни и имат отличителна чести двойни мутации *TP53+RB1* и дифузна p16 експресия.
- ☑ Базолуминален вариант: коекспресия на двата маркера (CK5/6 и CK20) в различни участъци на тумора (двойно позитивен).

Всеки случай в проучването е класифициран в една от посочените категории въз основа на резултатите от комбинация на имунохистохимични маркери, подкрепени от морфологичната картина. При смесени тумори (с повече от един хистологичен компонент) е оценен отделен ИХХ-профил за всеки компонент, доколкото това е технически осъществимо, и класифициран според описания алгоритъм. При наличие на коекспресия на двата маркера (CK5/6 и CK20), туморът е поставен в отделна категория на базолуминален молекулярен вариант.

Статистически методи:

Данните са обработени с помощта на софтуерния пакет Statistical Package for the Social Sciences v.25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Качествени променливи (например, пол, тип операция, честоти на хистологични субтипове и молекулярни варианти, експресия на HER2) са описани чрез тяхната абсолютна и относителна честота (брой и процент). За количествените променливи (например, възраст) бяха пресметнати медиана, минимална и максимална стойност (Mdn, Min-Max) поради асиметричното разпределение на случаите. Корелационната зависимост между хистологичната класификация и молекулярната класификация е оценена чрез кръстосани таблици. Различията в групите са проверени с хи-квадрат (χ^2 критерий) на Пирсън. Ниво на значимост $p < 0,05$ се приема за статистически значимо.

Резултати

АНАЛИЗ НА ЧЕСТОТАТА НА РАЗЛИЧНИ ХИСТОЛОГИЧНИ СУБТИПОВЕ МУСКУЛНО-ИНВАЗИВЕН КАРЦИНОМ НА ПИКОЧНИЯ МЕХУР

От изследваните 100 случая с МИКПМ, значителна част (66%, включително смесените тумори) демонстрира поне един различен хистологичен компонент. Най-често срещани в изследваната кохорта са папиларният уротелен карцином - 27 случая (27%) и комбинирани/смесени тумори, също 27%. Следва уротелен карцином с плоскоклетъчна диференциация – 17% от случаите. По-редки, но значими субтипове в нашата серия са: саркоматоиден уротелен карцином (5%), дребноклетъчен карцином (5%), микропапиларен субтип (4%), уротелен карцином с жлезиста диференциация (3%), плазмцитоиден субтип (3%), гнезден (2%) и слабо диференциран (анапластичен) уротелен карцином (3%). В 4% от случаите туморът не показва специфична морфология и се класифицира като високостепенен уротелен карцином (обозначен като NOS – not otherwise specified).

Данните за относителния дял на основните хистологични категории са обобщени в таблица 1:

Таблица 1: Честотно разпределение на хистологичните типове в изследваната кохорта.

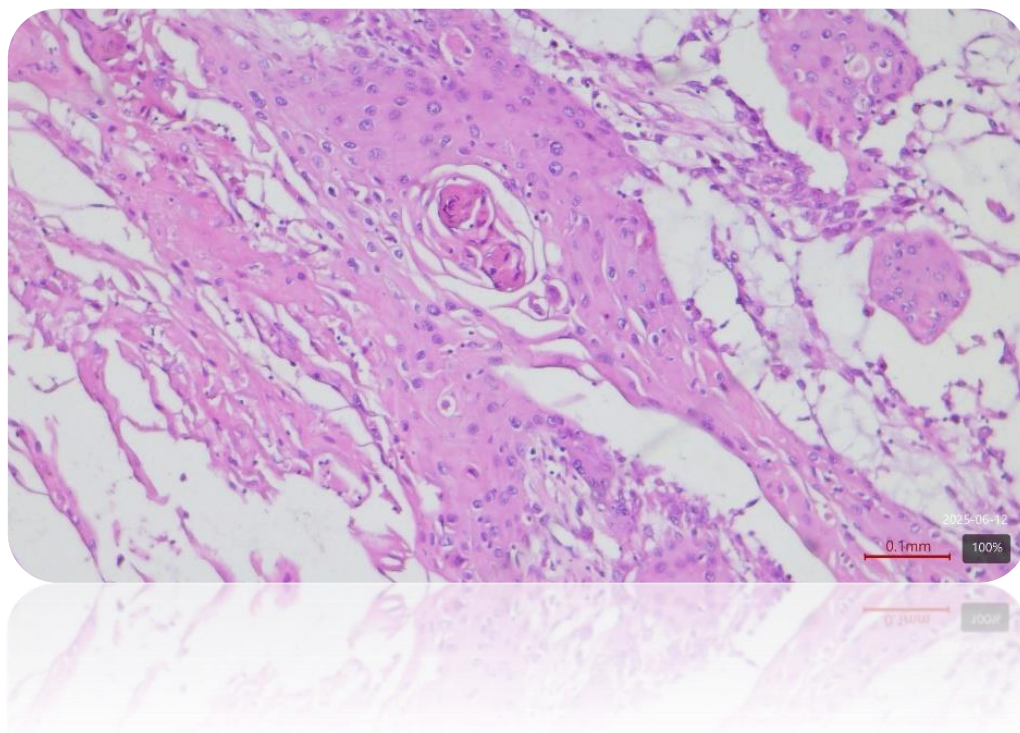
Хистологичен тип	Брой случаи (n)	Дял (%)
Папиларен уротелен карцином	27	27.0%
Смесен (≥ 2 компонента)	27	27.0%
УК с плоскокл. диференциация	17	17.0%
Саркоматоиден уротелен карцином	5	5.0%
Дребноклетъчен карцином	5	5.0%
Микропапиларен УК	4	4.0%
УК (NOS)	4	4.0%
УК с жлезиста диференциация	3	3.0%
Плазмцитоиден субтип	3	3.0%
Слабо диференциран УК	3	3.0%
Гнезден	2	2.0%
Общо	100	100%

От *таблица 1* се вижда, че папиларните и смесените карциноми формират най-големите подгрупи (по 27% всяка). Предполага се, че при детайлно хистологично изследване, повечето УК демонстрират някаква форма на дивергентна диференциация или различна морфология. Нашите резултати отразяват и факта, че всички случаи са $\geq$ pT2 (мускулно-инвазивни). Известно е, че морфологично различните субтипове се срещат по-често в напреднал стадий на заболяването.

Микроскопски находки:

Всеки хистологичен субтип от серията беше валидиран с характерните си морфологични белези. Например, плоскоклетъчната диференциация се проявява с участъци на кератинизация или междуклетъчни мостчета в тумора. Такива бяха открити в 17% от случаите, което съответства на докладваната честота от 10–25%.

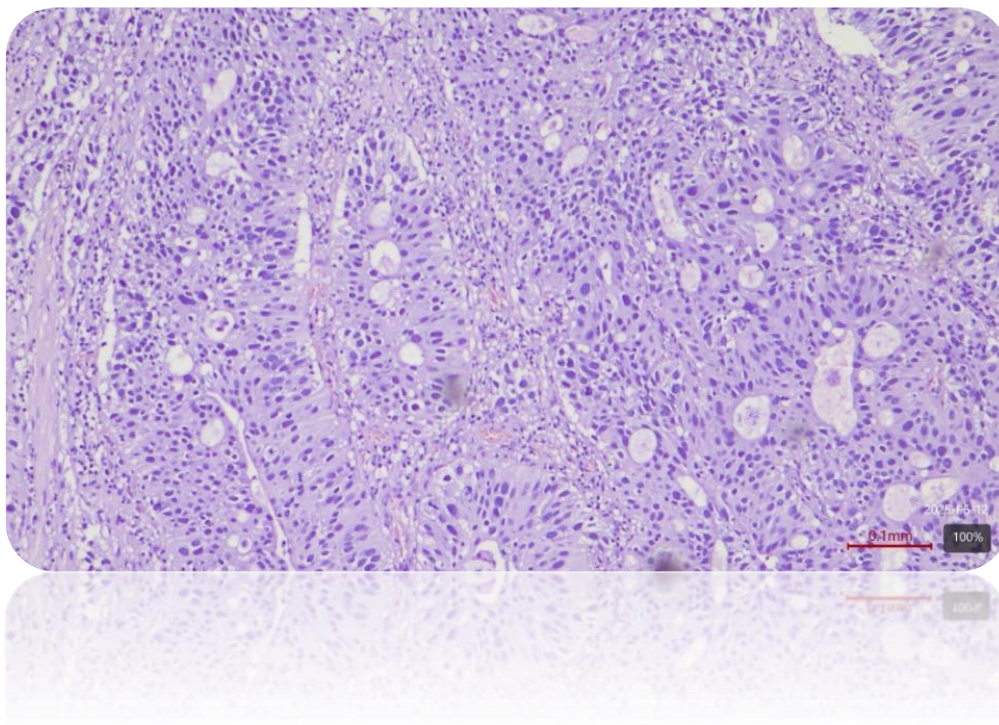
Микрофотография 1: УК с плоскоклетъчна диференциация, увеличение x100



- **Жлезистата диференциация** (гландуларни структури в уротелен тумор) порядко се наблюдава – при 3% от нашите случаи, според литературните данни

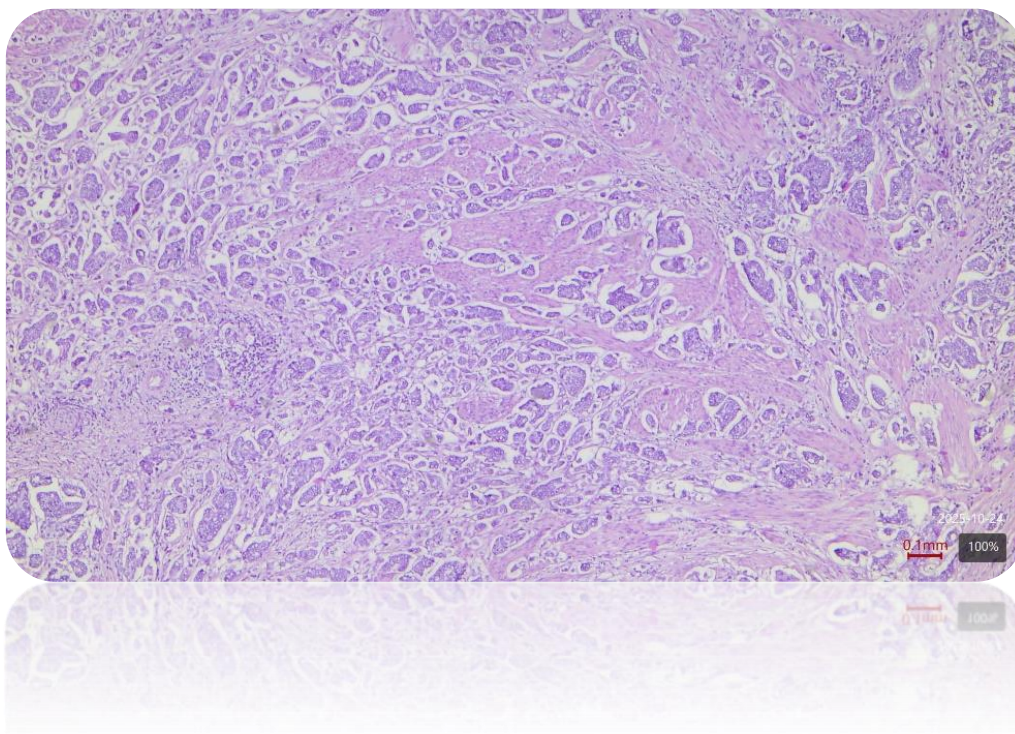
(~5-6%).

Микрофотография 2: УК с жлезиста диференциация, увеличение x100



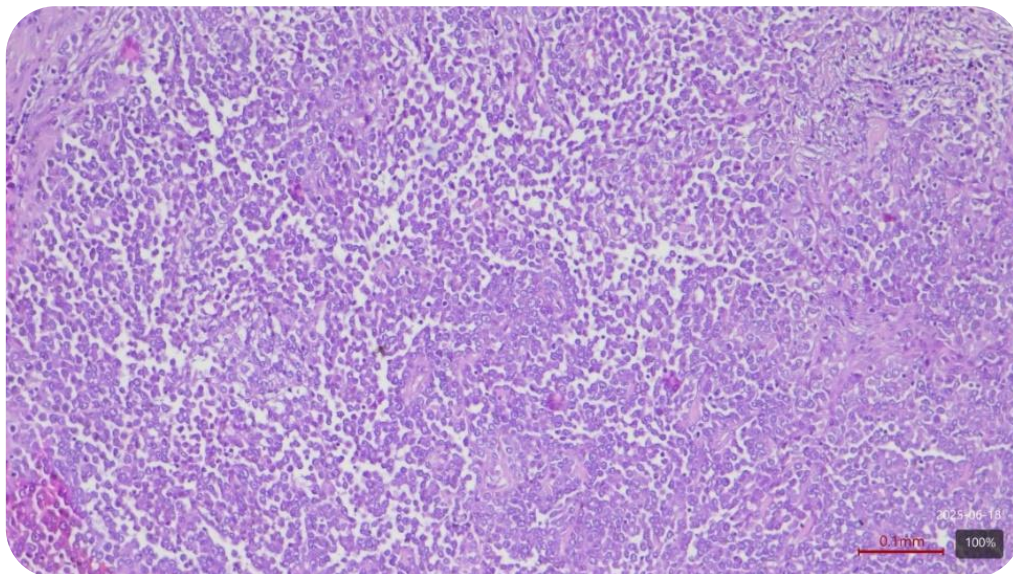
- Микропапиларният субтип (характеризиращ се с деликатни папиларни структури без фиброваскуларна ос) беше идентифициран в 4% от случаите. Стойност, съответстваща на публикувания диапазон (обикновено 2–5%).

Микрофотография 3: Микропапиларен УК, увеличение x40.



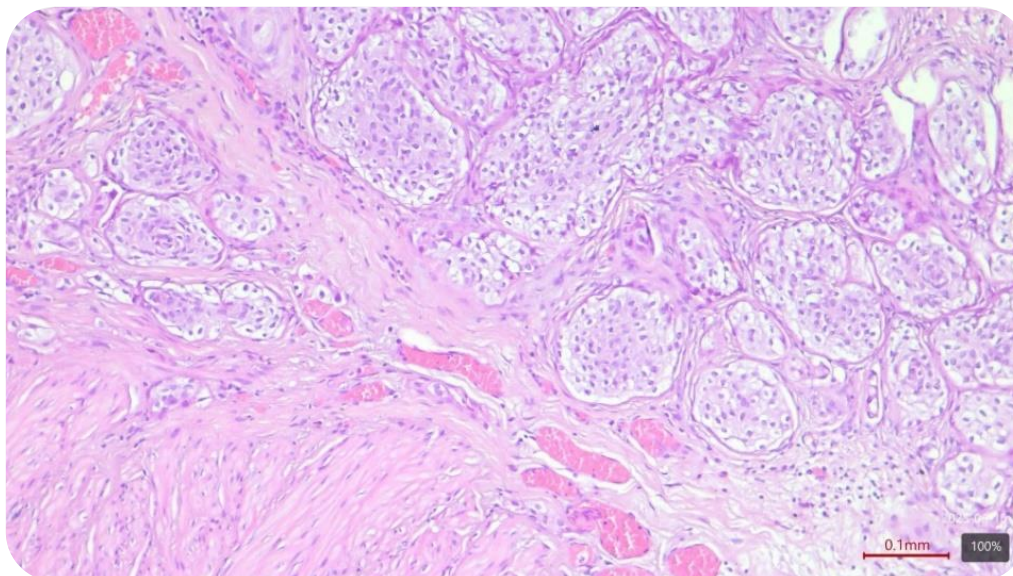
- Плазмоцитоидният субтип (дифузен, с клетки, наподобяващи плазматични) срещнахме в 3% от случаите, което попада в известните граници 1–5%.

Микрофотография 4: Плазмоцитоиден УК, увеличение x100.



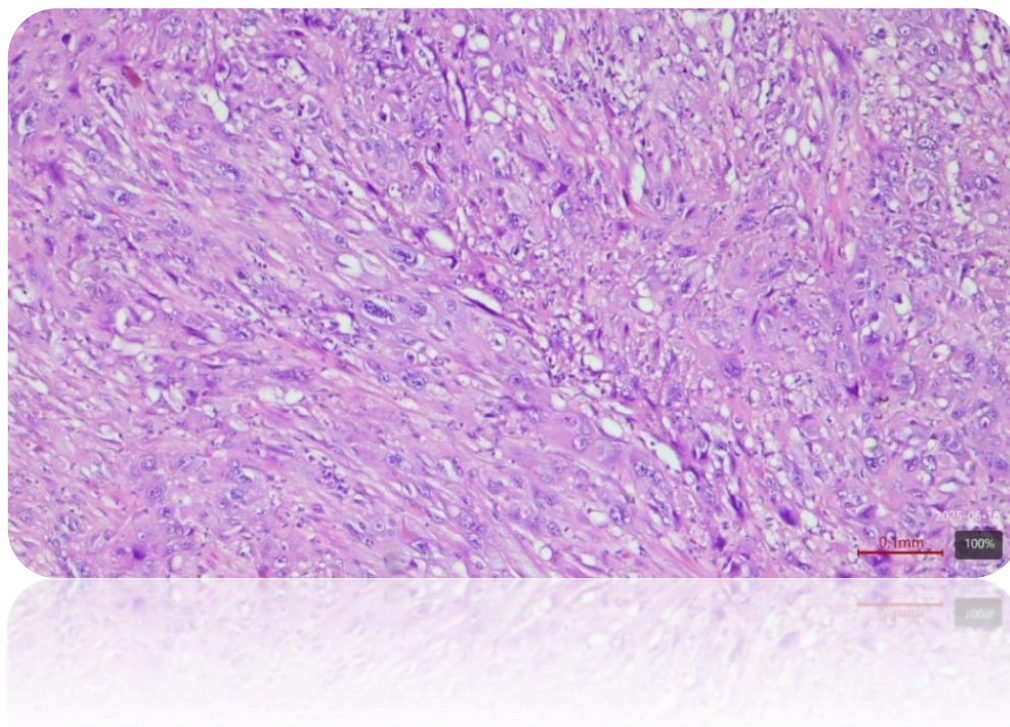
- Гнездният субтип установихме в 2% от туморите. Това е малко над очакваното за този изключително рядък вариант (около 1%).

Микрофотография 5: Гнезден субтип УК, увеличение x100.



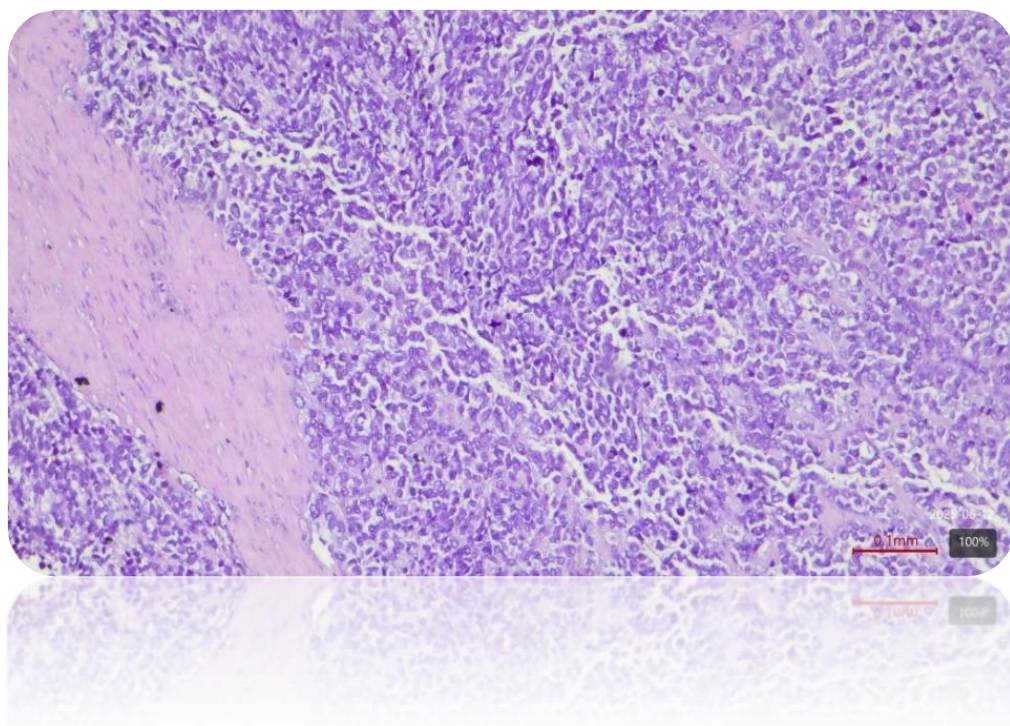
- Саркоматоидният (веретеновидно-клетъчен) карцином се наблюдава в 5% от случаите, което е значително над типичните <1% според литературата.

Микрофотография 6: Саркоматоиден УК, увеличение x100



- Дребноклетъчният карцином също е 5% в нашата серия, при очаквана честота под 1%.

Микрофотография 7: Дребноклетъчен карцином, увеличение x100.



Това повишено представяне на някои редки субтипове (саркоматоиден, дребноклетъчен и гнезден) може да се дължи и на насочване на сложни случаи към университетските клиники, както и на малкия размер на извадката, което позволява статистически флуктуации. Независимо от това, наличието на тези субтипове подчертава агресивността на изследваната кохорта и необходимостта от точната им идентификация поради влиянието им върху прогнозата и терапевтичното поведение.

АНАЛИЗ НА ОСНОВНИТЕ МОЛЕКУЛЯРНИ ВАРИАНТИ НА МИКПМ И ПРОУЧВАНЕ НА ЧЕСТОТАТА ИМ

Към момента дефинираните молекулярни категории се отнасят за научни изследвания, базирани на ДНК или РНК изследвания. За нуждите на клиниката е по-рентабилно да бъде използван ИХХ метод. Трябва да се уточни, че при двата метода няма пълно припокриване и е важно да се отбележи коя методика се използва. В настоящия труд използваната методика е имунохистохимия, но имената на вариантите ще бъдат използвани независимо от метода на дефиниране.

За всеки от 100-те МИКПМ е определен молекулярен вариант съгласно консенсусната класификация (Ba/Sq, LumP, LumU, LumNS, Stroma-rich, NE-like). Разпределението на случаите по варианти е показано в таблица 2:

Таблица 2: Честотно разпределение на молекулярните варианти в нашата кохорта, съгласно консенсусната молекулярна класификация на МИКПМ (2020).

Молекулярен вариант	Брой случаи (n)	Дял (%)
Базално/сквамозен (Basal/Squamous)	33	33,0%
Луминален папиларен (Luminal Papillary)	24	24,0%
Луминален нестабилен (Luminal Unstable)	16	16,0%
Базолуминален (Basal/Luminal)	9	9,0%
Невроендокринно-подобен (NE-like)	6	6,0%
Строма-обогатен (Stroma-rich)	2	2,0%
Луминален неуточнен (Luminal NS)	10	10,0%
Общо	100	100%

 **Забележка:** Честотата на молекулярните варианти при МИКПМ в изследваната серия (N = 100). Отчетени са седем категории: базален, луминален папиларен, луминален нестабилен, луминален неуточнен, базолуминален, невроендокринно-подобен и строма-обогастен. Базолуминалният (двойно позитивен) вариант е дефиниран като отделна категория в настоящото изследване.

Както се вижда от таблица 2, базалният молекулярен вариант е идентифициран при 33% от случаите (33/100), а луминалните варианти (папиларен, нестабилен и неуточнен) съставляват сумарно около 50% (24% + 16% + 10%) от всички тумори. Допълнително обособихме група от „базолуминални“ тумори (9%), които коекспресират базални и луминални маркери в различни компоненти на тумора. Тези случаи отразяват тумори, най-често класифицирани като „смесен хистологичен субтип“ и очаквано показват различия и в молекулярния си имунопрофил. Останалите тумори попадат в двойно-негативните категории: невроендокринно-подобни (NE-like) – 6%, и строма-обогащени – 2% от серията. Полученото разпределение на вариантите в нашето проучване е много близко до публикуваните данни в големи серии.

В таблица 3 е представена съпоставка между честотите на вариантите в нашата кохорта и две ключови референтни проучвания – консенсусната класификация на Kamoun и сътр. (2020) и The Cancer Genome Atlas (TCGA, 2017).

Таблица 3. Съпоставка на процентното разпределение на молекулярните варианти между настоящото проучване (n = 100) и публикувани източници:

Молекулярен вариант	Нашето проучване (N=100)	Kamoun et al. 2020 (N≈1750)	TCGA 2017 (N=408)
Базален (Basal/Squamous)	33%	35%	35% (Basal/Sq)
Луминален папиларен	24%	24%	35% (Luminal-papillary)
Луминален нестабилен	16%	15%	– (включен в Lum. Inf.)
Луминален неуточнен	10%	8%	6% (“Luminal, umbrella”)
Строма-обогастен (инфилтр.)	2%	15%	19% (“Luminal-infiltrated”)
Невроендокриноподобен	6%	3%	5% (“Neuronal”)
Базолуминален (двойн.позитивен)	9%	няма самостоятелен клас	няма самостоятелен клас

 **Източници:** Kamoun et al., Eur Urol 2020; Robertson et al., Cell 2017 (TCGA)

Нашите резултати показват висока степен на съответствие с консенсусната класификация. Например, базалните тумори са около 33%, което на практика съвпада с около 35% в големите серии. Сходно, луминалният папиларен вариант представлява 24%, което е идентичен дял както при Kamoun et al. (2020). Луминалният нестабилен вариант е 16% при нас, което е почти идентично на около 15% в консенсуса. Луминалният неуточнен е 10% спрямо около 8% в публикуваните данни. Малко по-различно е представянето на строма-обогатения вариант: само 2% в нашето проучване, спрямо около 15–19% в други източници. Това може да се дължи на ограниченията на използваната ИХХ методика – вероятно сме класифицирали някои стромално богати тумори по епителния им компонент (базален или луминален), вместо като отделна група. Някои саркоматоидни или конвенционални УК, които са преминали през ЕМТ и означени в предходни проучвания като „Mes-подобни“, при нас са по-малка част в сравнение с отчетения РНК-клас Stroma-rich. Накратко, богат на строма не е само биологичен подтип, но зависи и от други фактори, който вероятно се заобикалят с *in situ* методи. Заслужава отбелязване фактът, че идентифицирахме базолуминален (двойно-позитивен) вариант при 9% от случаите – самостоятелен клас, който не е отделен в транскриптомните класификации, но присъствието на такива хибридни тумори е отбелязано и от други автори. Нашите базолуминални случаи (9%) имат едновременно базална и луминална имуноекспресия и подчертават, че част от туморите реално не се вписват еднозначно само в една от двете основни групи. Уместно е изследването на тази категория да продължи с други методики, например РНК-секвениране.

Обобщено, луминалните и базалните категории сред нашите 100 случая са в съотношение около 60:40, което подкрепя двуосновната (“luminal vs. basal”) концепция при МИКПМ. Сумарният дял на луминалните варианти (LumPap, LumU, LumNS) при нас е около 50%, сравним с приблизително 47% от консенсуса. Базалните тумори са 33% (близо до 35% в големи серии). Основните разлики са по-ниският дял на строма-обогатените тумори в нашата серия (2% спрямо около 15%) и наличието на отделна базолуминална категория.

АНАЛИЗ НА КОРЕЛАЦИОННИ ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ ХИСТОЛОГИЧНАТА И МОЛЕКУЛЯРНАТА КЛАСИФИКАЦИЯ

Изследването на връзката между морфологичния тип на тумора и неговия молекулярен вариант разкрива няколко значими тенденции. Наблюдаваме, че определени хистологични субтипове предпочитат конкретни молекулярни категории. За оценка на тази корелация, бяха изградени кръстосани таблици между хистологичната и молекулярната класификация и беше приложен χ^2 тест. Резултатите показват статистически значима зависимост между двата класификационни подхода (χ^2 , $p < 0.001$).

Таблица 4: Кръстосана таблица, изследваща корелацията между хистологичния субтип и молекулярния вариант.

			Молекулярен вариант							Total
			Базален	Луминален папиларен	Луминален нестабилен	Базолуминален	Нервоендокрино-подобен	Stroma-rich	Луминален неспецифичен	
Хистологичен субтип	Уротелен карцином (NOS)	Count	1	0	0	0	0	0	3	4
		% within Хистологичен субтип	25,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	75,0%	100,0%
		% within Молекулярен вариант	3,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	30,0%	4,0%
		% of Total	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	3,0%	4,0%
	Папиларен УК	Count	0	17	6	2	0	0	2	27
		% within Хистологичен субтип	0,0%	63,0%	22,2%	7,4%	0,0%	0,0%	7,4%	100,0%
		% within Молекулярен вариант	0,0%	70,8%	37,5%	22,2%	0,0%	0,0%	20,0%	27,0%
		% of Total	0,0%	17,0%	6,0%	2,0%	0,0%	0,0%	2,0%	27,0%
	УК с плоскоклетъчна диференциация	Count	17	0	0	0	0	0	0	17
		% within Хистологичен субтип	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% within Молекулярен вариант	51,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	17,0%
		% of Total	17,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	17,0%
	УК с жлезиста диференциация	Count	1	0	2	0	0	0	0	3
		% within Хистологичен субтип	33,3%	0,0%	66,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% within Молекулярен вариант	3,0%	0,0%	12,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	3,0%
		% of Total	1,0%	0,0%	2,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	3,0%
	Саркоматоиден УК	Count	3	0	0	0	0	2	0	5
		% within Хистологичен субтип	60,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	40,0%	0,0%	100,0%

		% within Молекулярен вариант	9,1 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	100,0 %	0,0 %	5,0%
		% of Total	3,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	2,0 %	0,0 %	5,0%
	Плазмоцитоиден УК	Count	0	1	0	1	0	0	1	3
		% within Хистологичен субтип	0,0 %	33,3 %	0,0 %	33,3 %	0,0%	0,0 %	33,3 %	100,0%
		% within Молекулярен вариант	0,0 %	4,2 %	0,0 %	11,1 %	0,0%	0,0 %	10,0%	3,0%
		% of Total	0,0 %	1,0 %	0,0 %	1,0 %	0,0%	0,0 %	1,0 %	3,0%
	Гнезден УК	Count	0	2	0	0	0	0	0	2
		% within Хистологичен субтип	0,0 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	0,0 %	0,0 %	100,0%
		% within Молекулярен вариант	0,0 %	8,3 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	0,0 %	0,0 %	2,0%
		% of Total	0,0 %	2,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	0,0 %	0,0 %	2,0%
	Микропапиларен УК	Count	0	1	3	0	0	0	0	4
		% within Хистологичен субтип	0,0 %	25,0 %	75,0 %	0,0 %	0,0%	0,0 %	0,0 %	100,0%
		% within Молекулярен вариант	0,0 %	4,2 %	18,8 %	0,0 %	0,0%	0,0 %	0,0 %	4,0%
		% of Total	0,0 %	1,0 %	3,0 %	0,0 %	0,0%	0,0 %	0,0 %	4,0%
	Дребноклетъчен карцином	Count	0	0	0	0	5	0	0	5
		% within Хистологичен субтип	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0%
		% within Молекулярен вариант	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	83,3 %	0,0 %	0,0 %	5,0%
		% of Total	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	5,0%	0,0 %	0,0 %	5,0%
	Слабодиферен-	Count	2	0	0	0	1	0	0	3
		% within	66,7 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	33,3 %	0,0 %	0,0 %	100,0%

	циран УК	Хистологичен субтип	7%	%	%	%	%	%	%	0%
		% within Молекулярен вариант	6,1 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	16,7 %	0,0 %	0,0 %	3,0%
		% of Total	2,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,0%	0,0 %	0,0 %	3,0%
	Смесен субтип	Count	9	3	5	6	0	0	4	27
		% within Хистологичен субтип	33, 3%	11, 1%	18, 5%	22, 2%	0,0%	0,0 %	14, 8%	100, 0%
		% within Молекулярен вариант	27, 3%	12, 5%	31, 3%	66, 7%	0,0%	0,0 %	40, 0%	27,0 %
		% of Total	9,0 %	3,0 %	5,0 %	6,0 %	0,0%	0,0 %	4,0 %	27,0 %
	Total	Count	33	24	16	9	6	2	10	100
% within Хистологичен субтип		33, 0%	24, 0%	16, 0%	9,0 %	6,0%	2,0 %	10, 0%	100, 0%	
% within Молекулярен вариант		100 ,0 %	100 ,0 %	100 ,0 %	100 ,0 %	100,0 %	100 ,0 %	100 ,0%	100, 0%	
% of Total		33, 0%	24, 0%	16, 0%	9,0 %	6,0%	2,0 %	10, 0%	100, 0%	

От таблицата се вижда например, че всички дребноклетъчни карциноми попадат изцяло в невроендокринно-подобния молекулярен вариант. Плоскоклетъчната диференциация съответства на базалния молекулярен вариант (100%). Всички саркоматоидни случаи попадат в базалния или двойно негативния спектър. Микропапиларните тумори се разпределят главно в луминалните категории, а гнездните – също преимуществено луминални. Плазоцитоидният субтип показва по-нехомогенно разпределение, но преимуществено в луминалния спектър. Папиларните уротелни карциноми очаквано попадат главно в луминалния папиларен вариант. Смесените случаи бяха разпределени между различни варианти в зависимост от доминиращия компонент. Интересното е, че при 9 от 27-те смесени тумора се установи „базолуминален” профил, т.е., експресия на маркери за двата типа – което потвърждава нуждата тези случаи да бъдат допълнително изследвани посредством други методи (например, РНК-секвениране).

Статистическият анализ показва, че зависимостта между хистологичния субтип и молекулярния вариант не е случайна (χ^2 -тест с 60 степени на свобода, $p < 0,001$).

🔔 Обобщено, луминалните молекулярни варианти обхващат предимно тумори с папиларна, микропапиларна, плазмоцитовидна и гнездна морфология, докато базалният вариант включва основно тумори с плоскоклетъчна диференциация и саркоматозен хистологичен субтип. Дребноклетъчният карцином попада в категорията на невроендокринно-подобен (NE-подобен) вариант. Тези зависимости подсказват, че познаването на хистологичния субтип може да ориентира към вероятния молекулярен профил и обратно – имунохистохимичния профил може да предскаже наличието на скрити морфологични компоненти.

АНАЛИЗ НА HER2 ЕКСПРЕСИЯТА ПРИ РАЗЛИЧНИ МОЛЕКУЛЯРНИ ВАРИАНТИ И ХИСТОЛОГИЧНИ СУБТИПОВЕ

Изследвана е експресията на онкогена HER2 (ERBB2) във всички 100 случая МИКПМ посредством имунохистохимия, следвайки критериите на ASCO/CAP (2025), използвани при рак на гърда. Всеки случай беше категоризиран с резултат HER2: 0 (пълна липса на мембранно оцветяване), 0+ (с минимално мембранно оцветяване, което е непълно и слабо в $\leq 10\%$ от туморните клетки) 1+ (непълно и слабо/трудно доловимо мембранно оцветяване в $>10\%$ от туморните клетки), 2+ (пълно и слабо до умерено мембранно оцветяване в $>10\%$ от туморните клетки или интензивно пълно мембранно оцветяване, но в $< 10\%$ от туморните клетки – граничен резултат) или 3+ (пълно, силно мембранно оцветяване в $>10\%$ от туморните клетки). При попадане в категория граничен резултат (2+), е уместно изследването да продължи с ин ситу хибридизационни методи (ISH). В настоящото изследване не е извършена допълнителна ин ситу хибридизация и това ще бъде обект на продължаващо проучване. HER2-low (ниска експресия) отговаря на HER2 1+ или HER2 2+ с негативен резултат от ин ситу хибридизационен метод. В тесен смисъл, за HER2-позитивни се считат случаите 3+ или 2+ с доказана амплификация. В последните години набира популярност и терминът „HER2-ultra low”, отнасящ се до минимална непълна

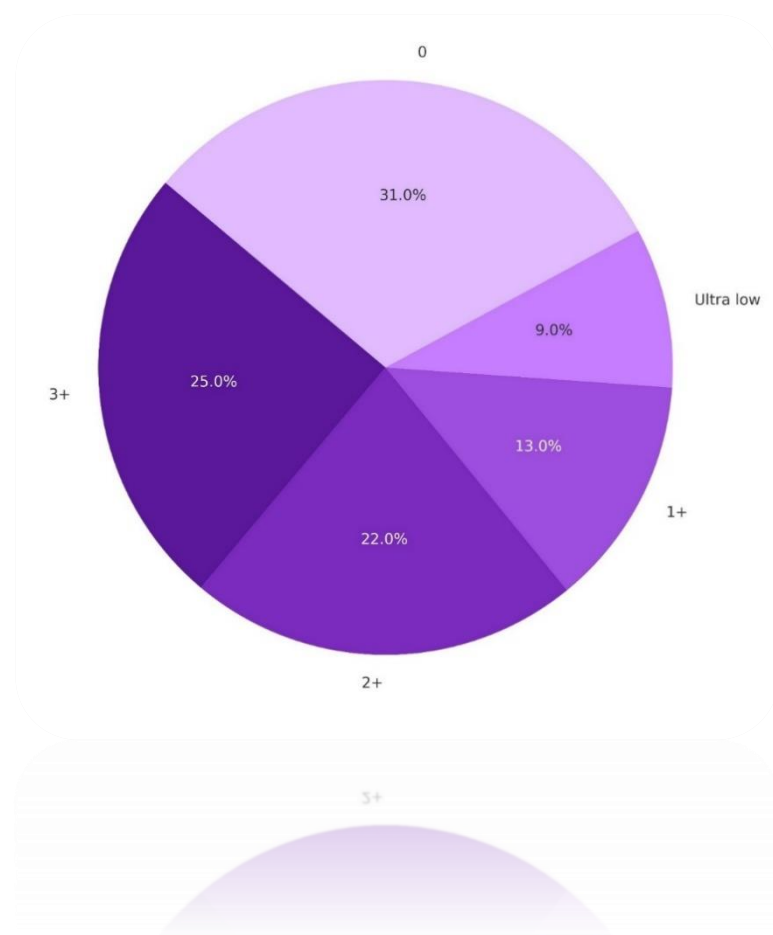
мембранна експресия в $\leq 10\%$ от туморните клетки. Такива случаи традиционно биха били класифицирани като 0, но ние ги причислихме в отделна категория (0+) с оглед на възможна полза от новите таргетни терапии, които показват резултат дори при ниска експресия на HER2.

Разпределение на HER2 статуса:

От 100-те случая, една четвърт (25%) са със силна HER2 експресия (3+), а допълнително 22 случая са 2+ (умерена, непотвърдена експресия). Това означава, че общо 47% от туморите имат поне умерено повишена HER2 експресия, като 25% от тях показват HER2 свръхекспресия (3+). Останалите тумори са разпределени както следва: HER2-0 (отрицателни) – 31%, HER2-1+ – 13%, и HER2-ultra low – 9%. Графично това е представено на *фиг.4*.

Фигура 4: Общо разпределение на HER2 експресията в 100 случая МИКПМ.

Секторната диаграма показва процентите на тумори във всяка категория: 0 (31%), ultralow/0+ (9%), 1+ (13%), 2+ (22%) и 3+ (25%). Видно е, че над половината от



случаите (69%) проявяват някаква HER2 позитивност, макар че само 25% са силно позитивни (3+).

Тези резултати показват по-висок дял на HER2-позитивни тумори в сравнение с някои по-стари проучвания. Възможно обяснение за разликата е, че нашата серия включва специфични хистологични субтипове и молекулярни варианти, при които HER2 се среща по-често, или поради напреднал стадий (pT2+). Това „обогатяване” на кохортата може да доведе до по-висока обща честота на HER2.

HER2 и молекулярни варианти:

Проведен е подробен анализ на HER2 статуса по молекулярни варианти, резултатите от който са обобщени в Таблица 5:

Таблица 5: Кръстосаната таблица показва разпределението на HER2 експресията по молекулярни варианти. За всеки молекулярен клас е представено процентното съотношение на случаите с определен HER2 статус (0, 0+, 1+, 2+, 3+). Ясно се вижда контрастът между базалните и луминалните групи: HER2-отрицателните тумори преобладават при базалните, докато при луминалните се наблюдават големи дялове с 2+ и 3+.

			HER-2 статус					Total
			0	1+	2+	3+	0+	
Молекулярен вариант	Базален	Count	18	6	3	0	6	33
		% within Молекулярен вариант	54,5 %	18,2 %	9,1 %	0,0 %	18,2 %	100,0%
		% within HER-2 статус	58,1 %	46,2 %	13,6 %	0,0 %	66,7 %	33,0%
		% of Total	18,0 %	6,0 %	3,0 %	0,0 %	6,0%	33,0%
	Луминален папиларен	Count	3	2	9	8	2	24
		% within Молекулярен вариант	12,5 %	8,3 %	37,5 %	33,3 %	8,3%	100,0%
		% within HER-2 статус	9,7 %	15,4 %	40,9 %	32,0 %	22,2 %	24,0%
		% of Total	3,0 %	2,0 %	9,0 %	8,0 %	2,0%	24,0%
	Луминален нестабилен	Count	1	1	5	9	0	16
		% within Молекулярен вариант	6,3 %	6,3 %	31,3 %	56,3 %	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	3,2 %	7,7 %	22,7 %	36,0 %	0,0%	16,0%
		% of Total	1,0 %	1,0 %	5,0 %	9,0 %	0,0%	16,0%
	Базолуминален	Count	0	4	2	3	0	9
		% within Молекулярен вариант	0,0 %	44,4 %	22,2 %	33,3 %	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	0,0 %	30,8 %	9,1 %	12,0 %	0,0%	9,0%
		% of Total	0,0 %	4,0 %	2,0 %	3,0 %	0,0%	9,0%
	NE-like	Count	6	0	0	0	0	6
		% within Молекулярен вариант	100,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	19,4 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	6,0%
		% of Total	6,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	6,0%

	Stroma-rich	Count	1	0	0	0	1	2
		% within Молекулярен вариант	50,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	50,0 %	100,0%
		% within HER-2 статус	3,2 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	11,1 %	2,0%
		% of Total	1,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,0%	2,0%
	Луминален неуточнен	Count	2	0	3	5	0	10
		% within Молекулярен вариант	20,0 %	0,0 %	30,0 %	50,0 %	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	6,5 %	0,0 %	13,6 %	20,0 %	0,0%	10,0%
		% of Total	2,0 %	0,0 %	3,0 %	5,0 %	0,0%	10,0%
Total		Count	31	13	22	25	9	100
		% within Молекулярен вариант	31,0 %	13,0 %	22,0 %	25,0 %	9,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0%
		% of Total	31,0 %	13,0 %	22,0 %	25,0 %	9,0%	100,0%

Конкретно, при базалния вариант (33 случая) не беше установен нито един тумор със силна експресия 3+. При повече от 50% от базалните тумори HER2 беше напълно отрицателен (0), а останалите показаха слаб сигнал (1+ или рядко 2+), като около 18% бяха класифицирани като „ultra low“. Обратно, луминалните варианти (LumP, LumU, LumNS) проявяват значително по-висока експресия на HER2. Например, от 24-те луминално-папиларни тумора, 33% са 3+, а 38% са 2+, т.е. общо 71% имат умерена към силна HER2 експресия. При луминалния нестабилен вариант (16 случая) този дял е още по-висок: 56% са 3+, а 31% са 2+, или общо 87% HER2-позитивни, включително над половината с 3+. Луминалният неуточнен вариант (10 случая) също показва висока честота на HER2: 50% са 3+, а 30% са 2+, което прави общо 80%. Интересно, базолуминалният хибриден вариант (9 случая) заема междинно положение – при него 33% са 3+, 22% са 2+, а останалите 44% са 1+; нито един базолуминален тумор не беше HER2-нула. Двойно-негативните категории (строма-обогатени и NE-like) очаквано нямаха нито един случай на HER2 свръхекспресия (0% 3+). Всички NE-like тумори (6/6) бяха HER2-0, докато при двата Stroma-rich тумора единият показва 0, а другият – ultra low експресия. Тези данни убедително демонстрират, че HER2-статусът е тясно свързан с молекулярния профил на тумора: луминалните карциноми експресират много по-често HER2 в сравнение с базалните (разликата е статистически значима, $p<0,001$). Следователно, силната мембранна HER2-имунореактивност може да служи и като насочваща към луминален фенотип на тумора.

HER2 и хистологични субтипове

Анализирана беше връзката между HER2 експресията и конкретните морфологични субтипове. От 27 папиларни карциноми в нашето проучване, 12 (44%) демонстрират 3+ HER2-експресия, други 7 (26%) са 2+. Това означава, че приблизително 70% имат поне известна експресия, включително висок процент са силно положителни случаи. Установи се, че микропапиларните карциноми са почти винаги HER2-позитивни – и четирите случая показаха $\geq 2+$ експресия, като три от тях са 3+ и един 2+. Това е важен резултат, тъй като микропапиларният субтип е известен с агресивността си. Също така, литературните данни показват честа HER2 експресия, което се потвърждава и от нашите данни. Уротелните карциноми с жлезиста диференциация (3 случая) демонстрираха противоречиви данни за HER2: 2 случая бяха 0, а един случай 2+, малкият брой на тези случаи не позволява да се правят статистически значими констатации. Плазмочитоидните тумори (3 случая) показаха резултати съответно 1+, 2+ и 3+, което също затруднява преценката, но ги отнася по-скоро към групата на HER2-експресиращите тумори, както е и според литературни данни. Това съответства на факта, че плазмочитоидните тумори обикновено принадлежат към луминалната категория. Те имат и други молекулярни особености, като например загуби на *CDH1*. Гнездните карциноми (2 случая) бяха на двете крайности: по един случай HER2-0 и 3+, съответно. Можем да очакваме HER2 свръхекспресия при тях, но е необходимо изследване върху по-големи кохорти. Саркоматоидните (5 случая) са 0 (4 случая) или 0+ (1 случай), което е донякъде очаквано предвид честия им базален профил. Дребноклетъчните (5 случая) са 0 (съответстващо на NE-like). Слабо диференцираните (3 случая) са негативни (0). Плоскоклетъчните диференциации (17 тумора) са преобладаващо HER2-отрицателни: осем случая са 0, пет – 1+, четири – 0+; няма 3+ или 2+.

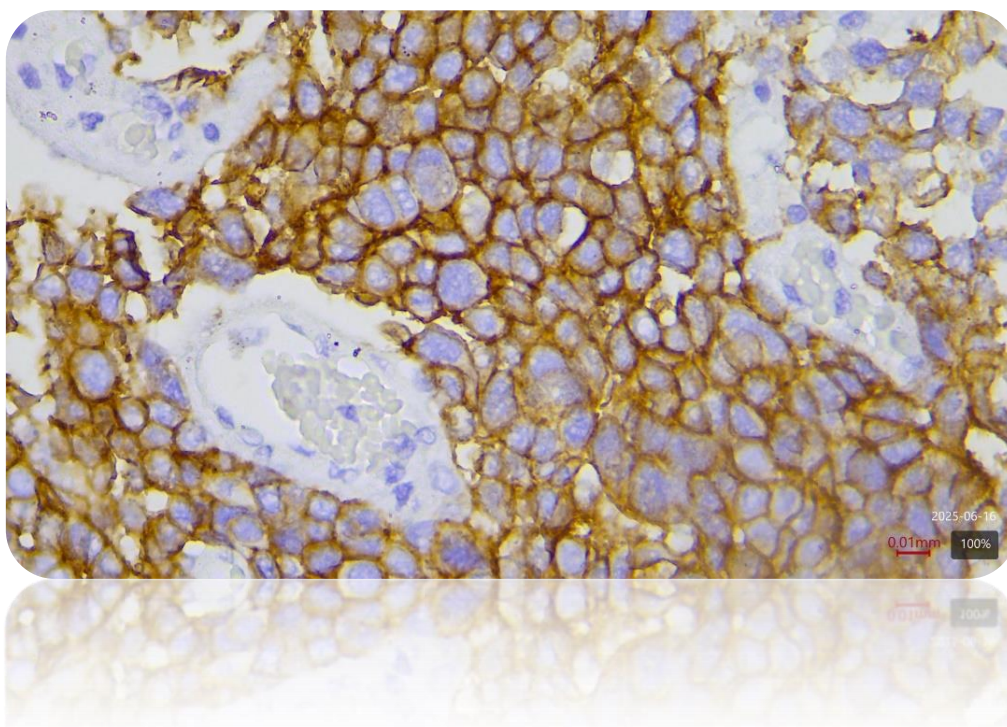
Таблица 6: Кръстосаната таблица показва разпределение на HER2 експресията по хистологичен субтип на уротелния карцином. Показани са процентните дялове на HER2-статусите (0, 0+, 1+, 2+, 3+) за всеки субтип.

			HER-2 статус					Total
			0	1+	2+	3+	0+	
Хистологичен тип	Уротелен карцином NOS	Count	3	0	1	0	0	4
		% within Хистологичен тип	75,0%	0,0%	25,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	9,7%	0,0%	4,5%	0,0%	0,0%	4,0%
		% of Total	3,0%	0,0%	1,0%	0,0%	0,0%	4,0%
	Папиларен УК	Count	2	4	7	12	2	27
		% within Хистологичен тип	7,4%	14,8%	25,9%	44,4%	7,4%	100,0%

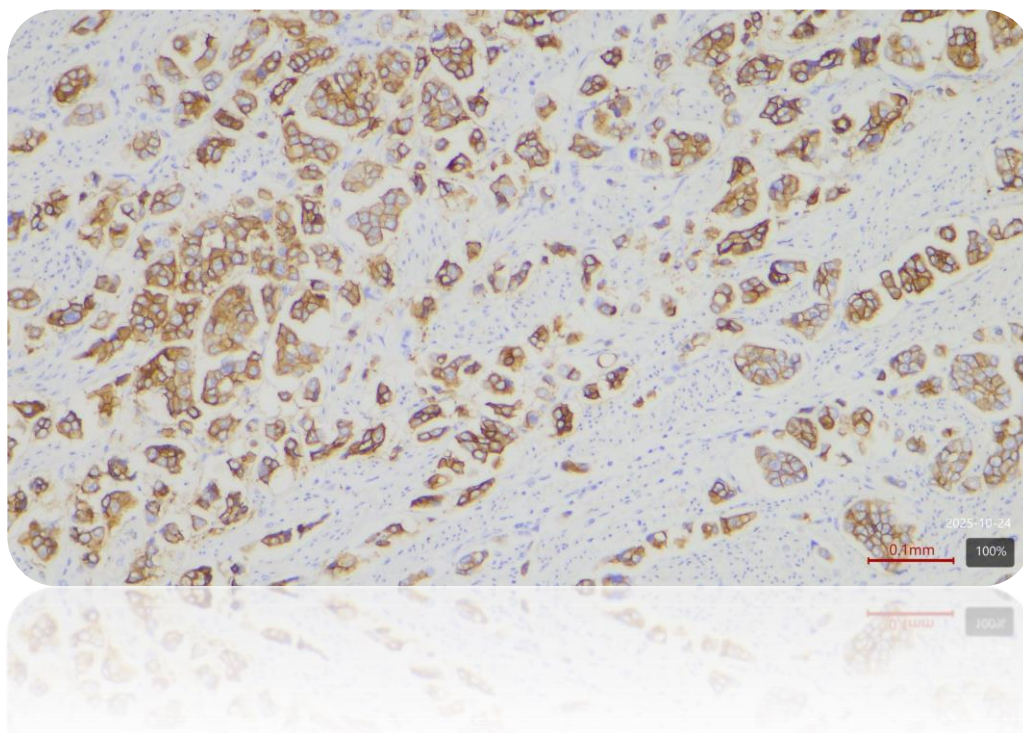
Total		% within HER-2 статус	6,5 %	30, 8%	31, 8%	48, 0%	22,2 %	27,0%
		% of Total	2,0 %	4,0 %	7,0 %	12, 0%	2,0%	27,0%
	УК с плоскоклетъчна диференциация	Count	8	5	0	0	4	17
		% within Хистологичен тип	47, 1%	29, 4%	0,0 %	0,0 %	23,5 %	100,0%
		% within HER-2 статус	25, 8%	38, 5%	0,0 %	0,0 %	44,4 %	17,0%
		% of Total	8,0 %	5,0 %	0,0 %	0,0 %	4,0%	17,0%
	УК с жлезиста диференциация	Count	2	0	1	0	0	3
		% within Хистологичен тип	66, 7%	0,0 %	33, 3%	0,0 %	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	6,5 %	0,0 %	4,5 %	0,0 %	0,0%	3,0%
		% of Total	2,0 %	0,0 %	1,0 %	0,0 %	0,0%	3,0%
	Саркоматоиден УК	Count	4	0	0	0	1	5
		% within Хистологичен тип	80, 0%	0,0 %	0,0 %	0,0 %	20,0 %	100,0%
		% within HER-2 статус	12, 9%	0,0 %	0,0 %	0,0 %	11,1 %	5,0%
		% of Total	4,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,0%	5,0%
	Плазмоцитоиден УК	Count	0	1	1	1	0	3
		% within Хистологичен тип	0,0 %	33, 3%	33, 3%	33, 3%	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	0,0 %	7,7 %	4,5 %	4,0 %	0,0%	3,0%
		% of Total	0,0 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %	0,0%	3,0%
	Гнезден УК	Count	1	0	0	1	0	2
		% within Хистологичен тип	50, 0%	0,0 %	0,0 %	50, 0%	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	3,2 %	0,0 %	0,0 %	4,0 %	0,0%	2,0%
		% of Total	1,0 %	0,0 %	0,0 %	1,0 %	0,0%	2,0%
	Микропапиларен УК	Count	0	0	1	3	0	4
		% within Хистологичен тип	0,0 %	0,0 %	25, 0%	75, 0%	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	0,0 %	0,0 %	4,5 %	12, 0%	0,0%	4,0%
		% of Total	0,0 %	0,0 %	1,0 %	3,0 %	0,0%	4,0%
	Дребноклетъчен карцином	Count	5	0	0	0	0	5
		% within Хистологичен тип	100, 0%	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	16, 1%	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	5,0%
		% of Total	5,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	5,0%
	Слабодиференциран УК	Count	3	0	0	0	0	3
		% within Хистологичен тип	100, 0%	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	100,0%
		% within HER-2 статус	9,7 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	3,0%
		% of Total	3,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0%	3,0%
	Смесен вариант	Count	3	3	11	8	2	27
		% within Хистологичен тип	11, 1%	11, 1%	40, 7%	29, 6%	7,4%	100,0%
		% within HER-2 статус	9,7 %	23, 1%	50, 0%	32, 0%	22,2 %	27,0%
		% of Total	3,0 %	3,0 %	11, 0%	8,0 %	2,0%	27,0%
	Count	31	13	22	25	9	100	
	% within Хистологичен тип	31, 0%	13, 0%	22, 0%	25, 0%	9,0%	100,0%	
	% within HER-2 статус	100, 0%	100, 0%	100, 0%	100, 0%	100, 0%	100,0%	
	% of Total	31, 0%	13, 0%	22, 0%	25, 0%	9,0%	100,0%	

🔔 В обобщение, HER2-свърхекспресията се среща най-често в папиларните и свързани с луминалния молекулярен път (включително микропапиларния). Плоскоклетъчните и саркоматоидните УК практически не показват HER2 3+. Тези резултати имат важно терапевтично значение: те подсказват, че пациенти с луминални тумори (които са по-склонни да експресират HER2) биха могли да бъдат кандидати за анти-HER2 таргетна терапия. Обратно, при базалните тумори таргетирането на HER2 вероятно няма да е ефективно, тъй като те не експресират целевия протеин; за тях по-подходящи са други подходи (например, имунотерапия, базирана на платина ХТ).

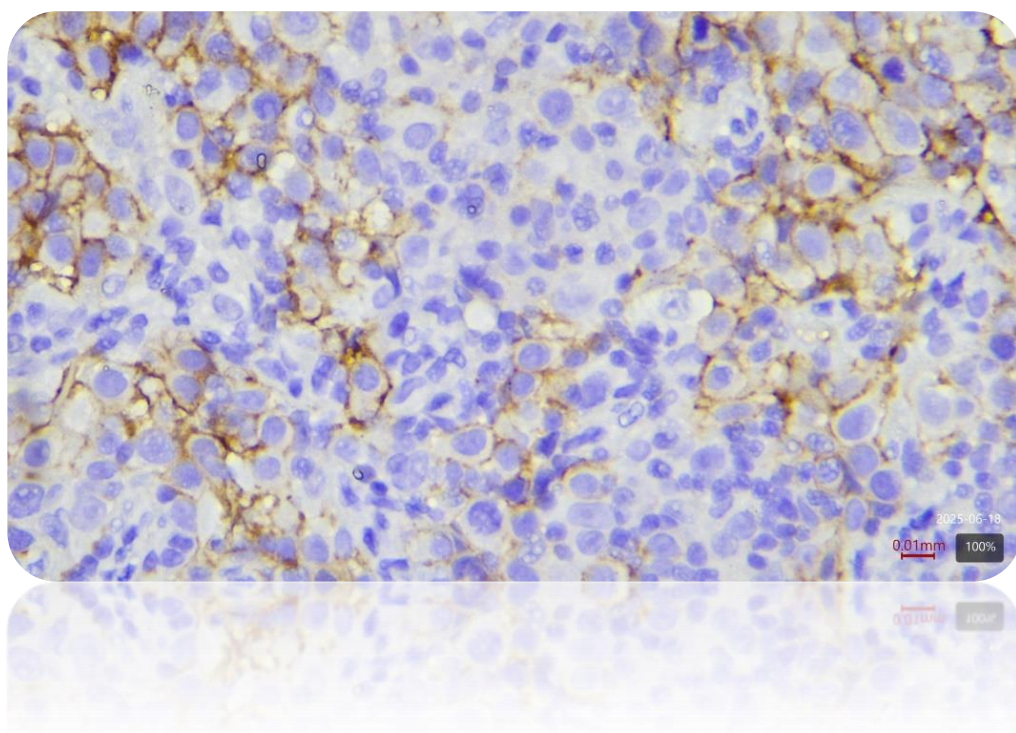
Микрофотография 8: Уротелен папиларен карцином, луминален папиларен молекулярен вариант със силна пълна мембранна експресия в над 10% от туморните клетки / HER2 3+.



Микрофотография 9: HER2 3+ експресия (пълно и силно мембранно оцветяване в >10% от туморните клетки в микропапиларни структури), увеличение x100.

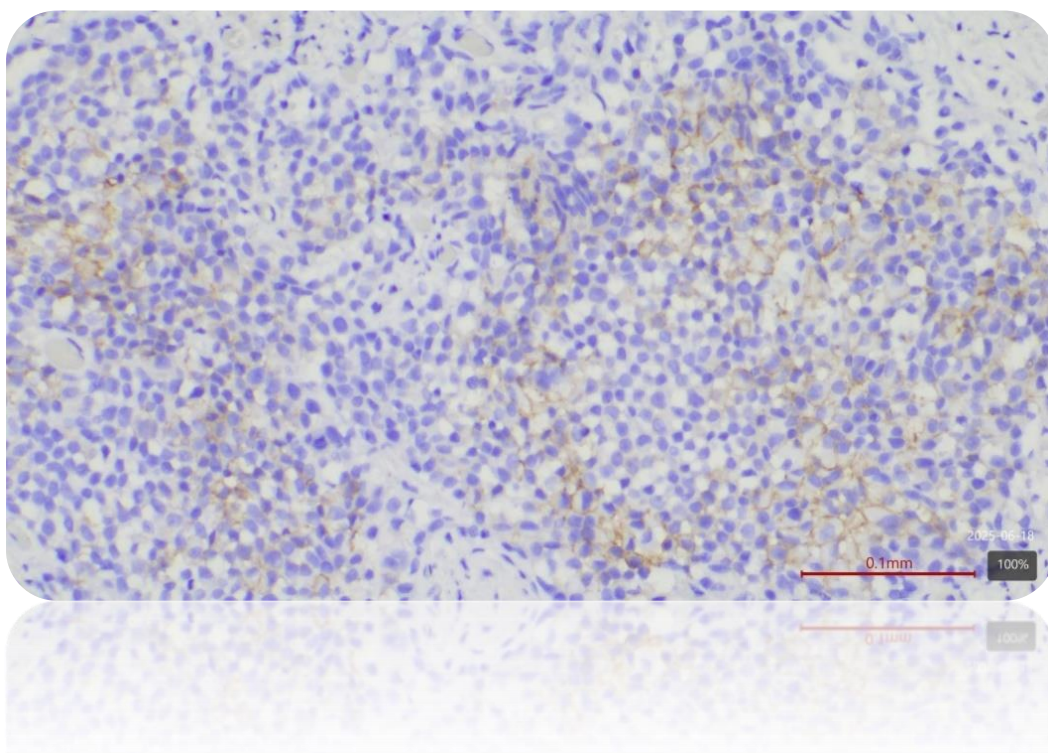


Микрофотография 10: Лимфоцитоподобен карцином с HER2 2+ експресия, увеличение x400.

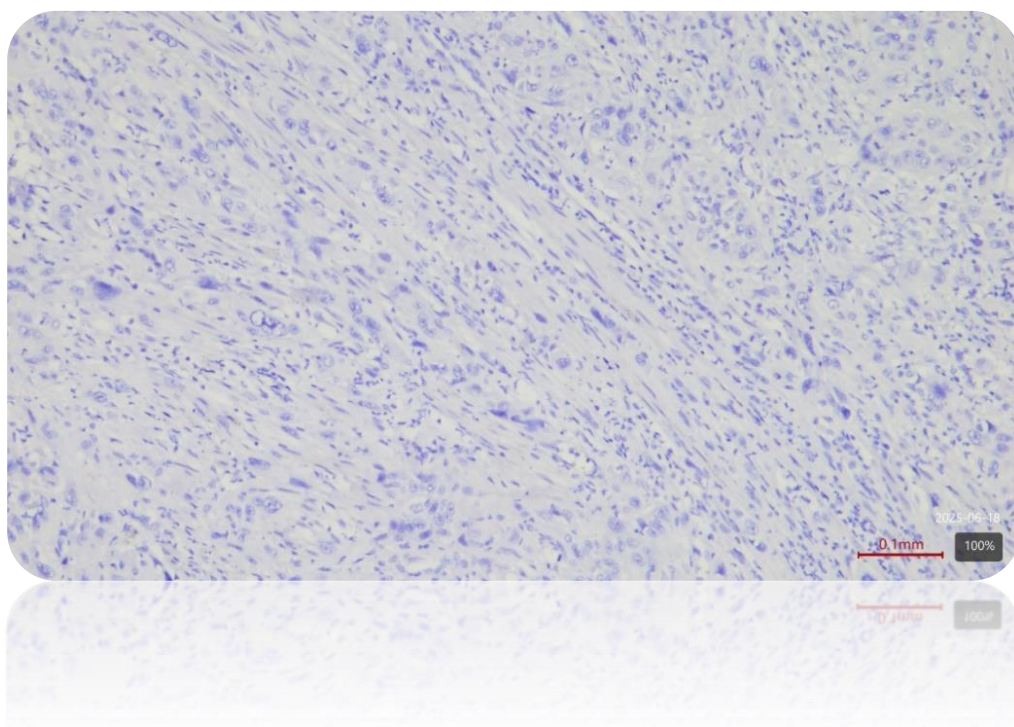


Микрофотография 11: Непълно и слабо оцветяване в над 10% от туморните

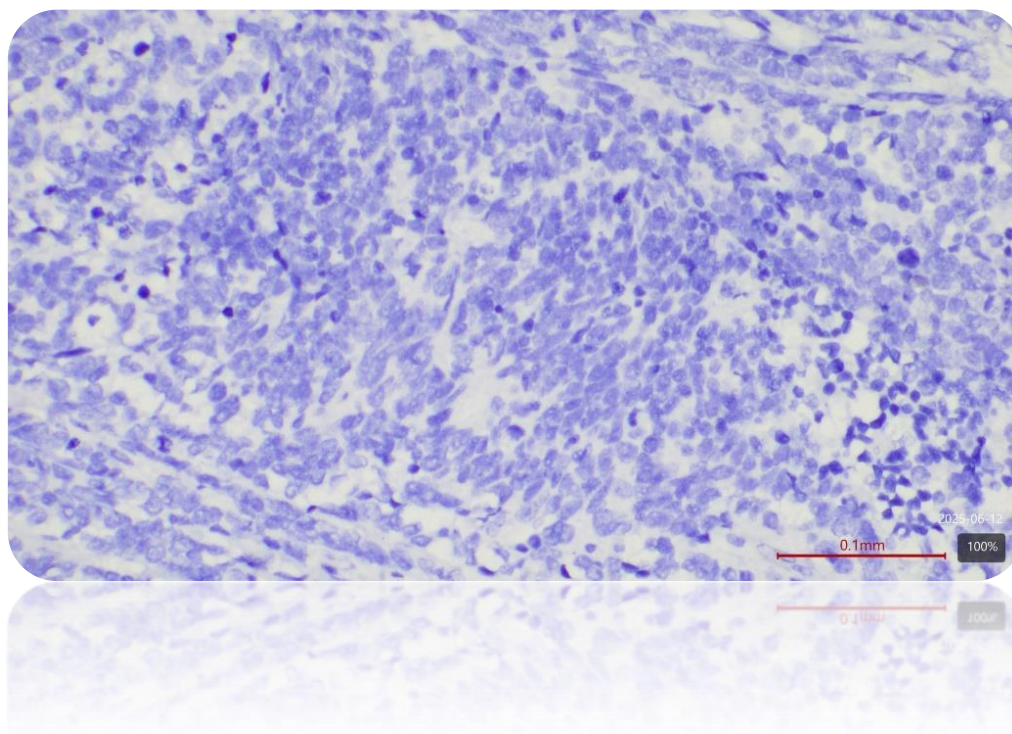
клетки/HER2 1+ експресия в плазмоцитоиден субтип, увеличение x200.



Микрофотография 12: Саркоматоиден субтип УК, базален молекулярен вариант HER2 (0) пълна липса на мембранно оцветяване увеличение x100.



Микрофотография 13: Дребноклетъчен карцином с пълна липса на мембранно оцветяване/HER2 (0), увеличение x200.



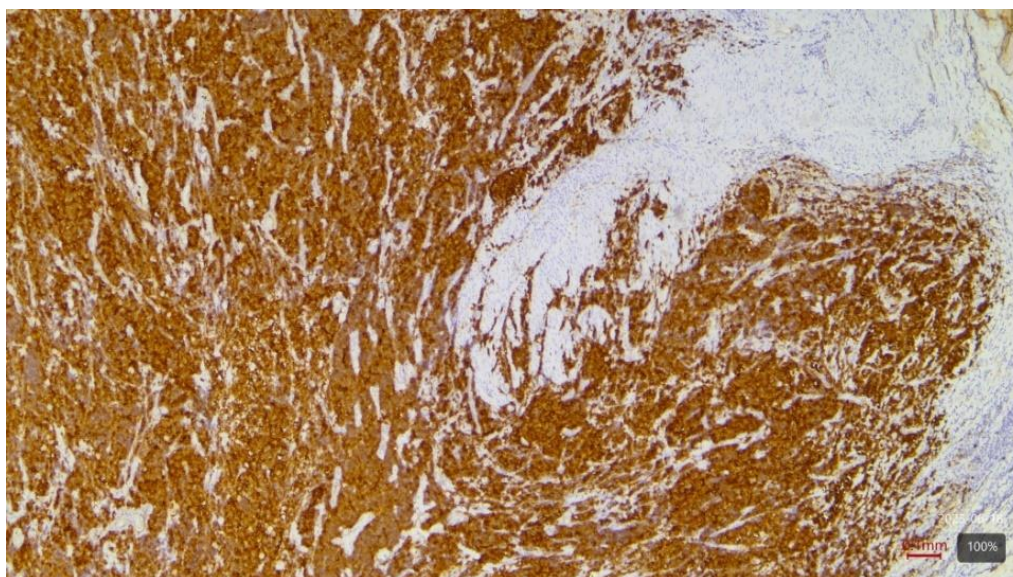
АНАЛИЗ НА P16 ЕКСПРЕСИЯТА

Протеинът p16INK4A (CDKN2A) е туморен супресор, чиято експресия служи като маркер за (не)функционалност на RB-пътя. Има *два основни механизма* за инактивиране на контрола на клетъчния цикъл при уротелния карцином: (1) загуба или изключване на CDKN2A, водещо до липса на p16; или (2) мутация/загуба на RB1, водеща до нефункционален pRb и компенсаторна свръхекспресия на p16. Различните молекулярни варианти предпочитат единия или другия механизъм. Използвахме p16 като допълнителен имунохистохимичен класификатор на луминалната категория, както и в двойно негативните и двойно позитивни случаи. Всички луминални нестабилни (LumU) тумори (16/16, 100%) бяха p16-позитивни, което е очаквано предвид честите RB1 мутации при този вариант. По този начин високите нива на p16 при LumU са индикатор за загуба на Rb функция (неработещ pRb) – феномен, известен още като “paradoxical p16 overexpression”. За разлика от тях, луминалните папиларни (LumP) тумори са p16-негативни – в нашата серия всички луминални тумори, негативни за p16, бяха причислени към тази категория. Това съответства на индиректната инактивация на Rb-пътя при LumP чрез загуба на CDKN2A (делеция 9p21), водеща до липса на p16

протеин. Луминалният неуточнен (LumNS) вариант показва смесени резултати – от 10 случая 2 бяха p16-негативни, а 8 – позитивни, което подсказва известна хетерогенност в механизмите на тези неопределени луминални тумори (вероятно някои са подобни на LumP, а други – на LumU по отношение на RB-пътя). Базолуминалните тумори (9 случая) показаха само 22% p16-позитивност (2/9), т.е., при тях преобладава p16-негативен профил. Това потвърждава, че нашата базолуминална група клони по-скоро към луминалната (загуба на CDKN2A), отколкото към базалната ос.

Характерната молекулярна черта на NE-подобен вариант е едновременната инактивация на TP53 и RB1. Докладвано е, че при повечето NE-like тумори присъстват мутации и в двата гена едновременно, картина, сходна с тази при дребноклетъчния белодробен карцином. Тази двойна загуба води до пълно освобождаване на клетъчния цикъл от тумор-супресорен контрол. От гледна точка на p16, това означава, че CDKN2A рядко се губи чрез делеция, тъй като няма селективна необходимост от това допълнително изменение – Rb пътят вече е компрометиран на ниво RB1. Напротив, поради загубата на функционален Rb протеин, p16INK4A обикновено се натрупва в NE-like туморни клетки (негативната обратна връзка е нарушена). Следователно, NE-подобните карциноми имат силно p16-позитивно имунооцветяване в преобладаващия брой случаи. Нашите данни също отразяват това: от 6 тумора с NE-подобна морфология в нашата кохорта, 5 са p16-позитивни (приблизително 83%), а само 1 е p16-отрицателен. Единичният отрицателен случай би могъл да се обясни с допълнителна загуба или промоторна метилация на CDKN2A в този тумор, но като цяло нашите данни потвърждават, че NE-подобният вариант е преобладаващо p16 позитивен.

Микрофотография 14: Силна ядрена и цитоплазмена експресия на p16 в дребноклетъчен карцином, увеличение x40.



Двата тумора класифицирани като „stroma-rich“ в нашата серия, са p16-позитивни (100%). Този малък брой не позволява да се правят изводи, но показва, че е възможно и богатите на строма тумори да експресират p16 при определени обстоятелства – вероятно, когато е налице загуба на RB1 в туморните клетки.

Микрофотография 15: Строма-обогастен молекулярен вариант със силна ядрена експресия на p16, увеличение x400.

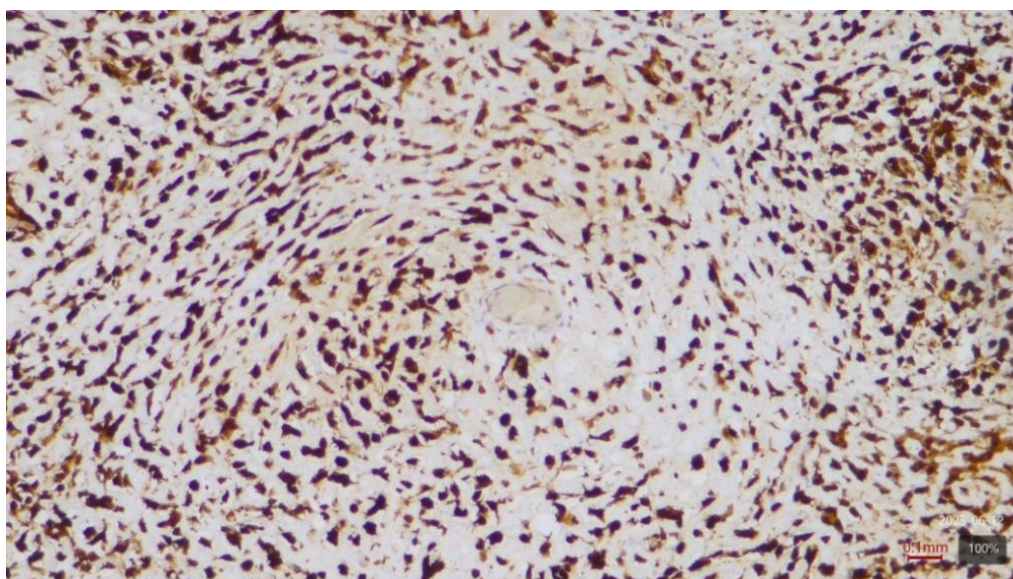


Таблица 7. Кръстосана таблица, демонстрираща експресията на p16 при различни молекулярни варианти.

			p16		Total
			p16 позитивен	p16 негативен	
Молекулярен вариант	Луминален папиларен	Count	0	24	24
		% within Молекулярен вариант	0,0%	100,0%	100,0%
		% within p16	0,0%	70,6%	35,8%
		% of Total	0,0%	35,8%	35,8%
	Луминален нестабилен	Count	16	0	16
		% within Молекулярен вариант	100,0%	0,0%	100,0%
		% within p16	48,5%	0,0%	23,9%
		% of Total	23,9%	0,0%	23,9%
	Базолуминален	Count	2	7	9
		% within Молекулярен вариант	22,2%	77,8%	100,0%
		% within p16	6,1%	20,6%	13,4%
		% of Total	3,0%	10,4%	13,4%
	NE-like	Count	5	1	6
		% within Молекулярен вариант	83,3%	16,7%	100,0%
		% within p16	15,2%	2,9%	9,0%
		% of Total	7,5%	1,5%	9,0%
	Stroma rich	Count	2	0	2
		% within Молекулярен вариант	100,0%	0,0%	100,0%
		% within p16	6,1%	0,0%	3,0%
		% of Total	3,0%	0,0%	3,0%
	Луминален неуточнен	Count	8	2	10
		% within Молекулярен вариант	80,0%	20,0%	100,0%
		% within p16	24,2%	5,9%	14,9%
		% of Total	11,9%	3,0%	14,9%
Total		Count	33	34	67
		% within Молекулярен вариант	49,3%	50,7%	100,0%
		% within p16	100,0%	100,0%	100,0%
		% of Total	49,3%	50,7%	100,0%

p16 и морфологични субтипове:

Като цяло, p16-статусът корелира повече с молекулярния профил, отколкото директно с морфологията. Например, дребноклетъчните (NE-like) карциноми показваха дифузно p16 в 5 случая ($\approx 83\%$ позитивни), което е очаквано при NE-like вариант с двойна TP53/RB1 мутация.

 Обобщено, луминалните папиларни тумори нямат p16, докато луминалните нестабилни и NE-like тумори почти винаги експресират p16. Междинните варианти (LumNS, базолуминален) показват смесено поведение. Резултатите ни потвърждават ролята на p16 като отличителен белег между различните биологични пътища: p16 е ниско експресиран при тумори с делеция на CDKN2A (най-често LumP) и високо експресиран при тумори с мутация на RB1 (LumU, NE-like).

От диагностична гледна точка, p16 може да се използва като допълнителен имунохистохимичен маркер за характеризиране на МИКПМ. Силно p16 (+) оцветяване в голям процент от клетките насочва към неблагоприятен молекулярен профил (Luminal Unstable или NE-like), който е свързан с агресивност, но потенциално и с чувствителност към химиотерапия (например, NE-like туморите реагират на платина-базирана ХТ). От друга страна, p16 (-) резултат при МИКПМ предполага луминален папиларен вариант, който, макар и с по-добра прогноза, може да не отговори на определени терапии (LumP са по-резистентни на неoadювантна химиотерапия според някои данни).

Като цяло, нашите данни потвърждават, че профилът на p16 експресия е ценен молекулярен маркер за всяка категория. Той отразява фундаментални различия в туморогенезата: луминалните тумори най-често избягват пътя на клетъчния цикъл чрез загуба на p16, докато нелуминалните – чрез загуба на RB1 и съответно имат високи нива на p16. Това допълва останалите имунохистохимични маркери и подпомага точното определяне на молекулярния вариант.

Настоящото изследване предоставя поглед върху морфологичните субтипове и молекулярните характеристики на мускулно-инвазивния уротелен карцином на пикочния мехур, като по този начин запълва някои празнини в познанията и дава ценна локална перспектива. Резултатите потвърждават високата хетерогенност на МИКПМ както на тъканно (морфологично), така и на молекулярно ниво. Обсъждането по-долу се фокусира върху ключовите открития, техния контекст в светлината на публикуваните данни и значението им за клиниката.

1. Хистологични субтипове и тяхната честота: Установихме, че 66% от МИКПМ притежава хистологичен компонент, различен от конвенционалния. Това е по-високо от класически цитираните честоти на хистологичните субтипове (около 25%) при карцином на пикочния мехур. Една причина може да е старателното търсене и докладване дори на минимални огнища с различна морфология. Известно е, че при рутинна практика до 50% от хистологичните субтипове могат първоначално да останат неразпознати, особено ако са малки огнища. В нашата серия целенасоченият преглед на всички резекции вероятно е довел до по-пълно идентифициране на тези компоненти. Друг фактор е подборът: всички случаи са мускулно-инвазивни (pT2+), докато статистиките от литературата често включват и повърхностни тумори, а инвазивните тумори имат по-висока склонност към дивергентна диференциация. Нашите данни също така могат да отразяват факта, че към университетските клиники се насочват по-сложни, „атипични” случаи, обогатявайки процента на редките субтипове.

Конкретните честоти на хистологичните субтипове в нашето проучване до голяма степен попадат в рамките на известните диапазони. Плоскоклетъчната диференциация (17%) съвпада с очакваното и е най-честата дивергентна форма при уротелния карцином с докладвана честота 10–25%. Някои автори дори отбелязват, че ако целенасочено се търсят и минимални плоскоклетъчни огнища, делът може да достигне 60%, което подчертава колко разпространено, но често недооценено явление е плоскоклетъчната метаплазия в уротелните тумори. Жлезистата диференциация (3% при нас) е малко под типичните 5–10%; част от смесените случаи с малки жлезисти участъци категоризирахме просто като „смесен субтип”, без отделно отчитане на жлезистия компонент. Микропапиларният субтип (4%) попада в границите на обичайно

цитираните 2–6%. Плазмоцитоидният субтип (3%) съвпада с литературния диапазон от 1–3%. Той е рядък, но много агресивен и често се диагностицира в напреднал стадий (pT3/T4). Гнездният субтип (2%) е над очакваното (~0.3-1%), което вероятно отразява повишената бдителност към този иначе трудно разпознаваем субтип, често бъркан с доброкачествени лезии. Саркоматоидният субтип (5%) и дребноклетъчният карцином (5%) са значително над литературните данни (<1% всеки), но тези отклонения вероятно са артефакт на малката извадка и „късмет“ – 5 случая от 100. Все пак, наличието на толкова много саркоматоидни и дребноклетъчни карциноми подчертава агресивността на разглежданата популация. Тези два варианта са сред най-лошите прогностични форми на рак на пикочния мехур, асоциирани с ранни метастази и лоша прогноза.

В заключение на морфологичната част, нашата серия подкрепя тезата, че туморите с вариации в хистологията не са изключение, а по-скоро правило при мускулно-инвазивния карцином на пикочния мехур – две трети от случаите имат някаква друга отклоняваща се особеност (плоскоклетъчна, жлезиста, саркоматоидна и т.н.). Това има директно отражение върху клиниката. Препоръчително е патологът активно да търси такива вариации, тъй като идентифицирането им може да промени грейдинга. Например, наличието на саркоматоиден компонент автоматично прави тумора висок грейд/степен 3, което се свързва с по-агресивно поведение. Това подобрява терапевтичното планиране: например, микропапиларните тумори, дори при ограничена инвазия, изискват ранна цистектомия поради склонност към дисеминация.

2. Молекулярна класификация – сравнение с консенсус. Нашето имунохистохимично профилиране успешно стратифицира почти всички (91%) от случаите към съответния молекулярен вариант съгласно консенсусната класификация. Постигнатото разпределение (33% базални, 50% луминални, 9% базолуминални, 8% двойно-негативни) съвпада с големи референтни проучвания. Това демонстрира, ИХХ методът възпроизвежда транскриптомната класификация посредством подбран панел от маркери. Разликата в дела на строма-обогатените (2% спрямо 15%) е най-същественото отклонение. Едно възможно обяснение е методологично: консенсусното определяне на строма-обогатен вариант се базира основно на гени, свързани с микросредата, като например експресия на фибробластни и имунни маркери (колагени, PD-L1 и др.). Чисто количествено, ние няма как директно да измерим „количеството строма“ или „нивото на имунен инфилтрат“; тези характеристики оценяваме морфологично. Напълно е възможно част от туморите, които транскриптомно биха попаднали в строма-

обогащения клас, ние да сме класирали спрямо техния епителен профил – например, тумор с изобилна строма, но също с изразени базални маркери, вероятно сме определили като базален, вместо да го водим отделно. Това би намалило броя на отделно обособените „строма-богати” случаи.

На второ място, отчитането на базолуминален вариант в нашата класификация е интересна особеност. В консенсуса тези тумори не се отделят, а се „разпределят” по доминиращ признак (т.е., ако един тумор експресира и базални и луминални маркери, алгоритъмът обикновено го слага или в базален, или в луминален според това кое превалява). Въпреки това, наличието на двойно-позитивни (ДП) тумори е добре документирано в част от проучванията. При нас това са около 9% от случаите. От клинична перспектива, тези ДП тумори също заслужават внимание, те може би представляват истински хибриден вариант, съчетаващ характеристики (и потенциално унаследяващ терапевтична резистентност) на двата основни класа. Друга хипотеза е, че тези ДП профили всъщност отразяват интратуморна хетерогенност, тоест, туморът съдържа смес от отделни клонове, едни с базален, други с луминален почерк. За изясняване на това са нужни допълнителни проучвания, например РНК-анализ на отделни клетки от ДП тумори, за да се види дали геномно представляват смес или хибриден клон. В практичен план, базолуминалните тумори в нашето изследване се държаха междинно и по отношение на биомаркерите: тяхната HER2 експресия беше между тази на чисто луминалните и чисто базалните, а p16 профилът им клони към луминалния (само 22% са p16 позитивни).

В крайна сметка, молекулярното профилиране, което приложихме, почти напълно припокрива честотата на консенсусните класове дори в ограничена извадка. Това означава, че консенсусната класификация до голяма степен е възпроизводима и може да се внедри в диагностичната практика с помощта на ИХХ панел. Това би позволило на патологичните отделения, които не разполагат с възможности за високотехнологично секвениране, да класифицират случаите си по биологично значим начин. За клиницистите познаването на варианта е от полза. Например, вече има клинични изпитвания, демонстриращи различни терапевтични подходи при различни молекулярни варианти – например неoadювантна химиотерапия работи по-добре при базалните тумори, докато при луминалните се обмисля таргетна терапия, имунотерапия при релапс и т.н. Нашите данни дават увереност, че имунохистохимичната типизация би била достатъчно надеждна, за да информира такива решения.

3. Корелация морфология – молекулярен вариант: Получената корелация между класическата хистологична диагноза и молекулярния профил е до голяма степен очаквана, но въпреки това ценна за потвърждение. Тя показва, че морфологичният фенотип отразява подлежащия генотип/транскриптом. Например, наблюдението, че плоскоклетъчната диференциация почти винаги сочи базален вариант, съответства на предходни проучвания. Това е логично – базалните тумори имат генна експресия, сходна с базалните клетки на уротела, а последните имат афинитет към плоскоклетъчна метаплазия, следователно туморите наследяват този морфологичен белег. Папиларната архитектура пък е почти сигурен индикатор за луминалност. Всички папиларни тумори в нашата серия бяха или LumP, или LumU. Въпреки това, не съществува абсолютно 1:1 съответствие; понякога един тумор обединява характеристики на повече от един вариант. Например, смесен уротелен карцином с жлезиста диференциация и дребноклетъчен компонент (такъв случай имаме в нашата кохорта) има молекулярен профил, който съдържа елементи и на Luminal, и на NE-like. Точно такива случаи беше трудно да класифицираме еднозначно. Както споменахме, техният профил често отразява пропорциите на компонентите им, а някои се появяват като ДП (базолуминални).

Корелацията морфология–молекула има директен *диагностичен ефект*. Ако патологоанатомът види определен рядък субтип, той може да предвиди някои молекулярни особености: например, микропапиларният субтип вероятно ще бъде луминален нестабилен (с висок Ki-67, възможни *ERBB2* изменения); плазмощитоидният – луминален (с нарушена *E-cadherin* адхезия); дребноклетъчният – NE-like (с мутации в *TP53+RB1*, висока експресия на p16, ще отговори на химиотерапия). Обратно, ако чрез имунохистохимия се установи базален профил, а морфологията е например „чист уротелен карцином“, може да се потърсят в резервния материал за пропусната малка плоскоклетъчна зона, която да оправдае профила – т.е. молекулярната информация може да помогне да се открие скрит хистологичен компонент.

4. HER2 като прогностичен/предиктивен биомаркер: Едно от значимите открития в нашето проучване е високата честота на HER2 свръхекспресия при мускулно-инвазивния рак на покочния мехур, особено в определени групи. Общо 25% от всички случаи са 3+ по IHC, което ги прави потенциални кандидати за анти-HER2 терапия, а други 22% са 2+ (гранични; част от тях вероятно биха показали генна амплификация

при допълнителен тест). С други думи, приблизително една четвърт до една трета от МИКПМ носят HER2 като терапевтична мишена. В литературата се наблюдава широк диапазон на честота на HER2-експресия. Тези разлики произтичат от липсата на единни критерии и хетерогенността на кохортите. Нашето изследване използва най-новите ASCO/CAP указания (2025), които са по-стриктни и по-добре адаптирани. Например, ние отчетохме и категорията „ultra low” категорията, която не фигурира в предходни публикации. При нас 9% от туморите бяха „ultra low“, и ако не се отдели в самостоятелна група, би отишло в 0-категорията и би повишило привидно броя на „отрицателните“ до 40%. Смятаме, че отчитането на „ultra low“-категорията е важно, тъй като дори тези минимално HER2-експресиращи тумори могат да отговорят на някои нови ADC терапии.

Най-важният извод по отношение на HER2 е силната му връзка с луминално диференцирания път. Данните ни недвусмислено показват, че луминалните тумори (LumP, LumU, LumNS) често експресират HER2, докато базалните тумори почти не го експресират. Това потвърждава наблюденията на Damrauer и др. (2014), които подразделят мехурните карциноми на “Luminal (плюс вариантите им)” – HER2 (+), и “Basal” – HER2 (–). В нашата серия повече от половината LumU са 3+, повечето LumP са $\geq 2+$, докато нито един базален не е 3+. Тази взаимовръзка има и терапевтична и прогностична стойност. Базално-сквамозните тумори по принцип по-добре отговарят на химиотерапия и нямат HER2, така че за тях стандартът остава химиотерапия и имунотерапия при прогресия. Луминалните нестабилни тумори, са неблагоприятни по природа (висока степен, чести метастази), но интересното е, че наличието на HER2 като мишена при тях открива нова възможност-таргетна терапия. Вече са в ход клинични проучвания (например THOR – Trial of Herceptin in Bladder Cancer), които оценяват ефекта от добавянето на анти-HER2 лекарства при HER2-позитивен МИКПМ. Нашите резултати предполагат, че ако даден пациент е със силно HER2(+), то туморът му вероятно е луминален – а има данни, че луминалните са по-слабо чувствителни на конвенционална химиотерапия. Следователно, за такъв пациент, таргетен подход би бил по-разумен път. Обратно, ако туморът е HER2(–) и знаем, че е базален, бихме предпочели класическа химиотерапия, защото те имат полза от неoadювантна химиотерапия (показано е, че базалните случаи печелят преживяемост с 10% повече при добавяне на неoadювантно лечение, докато луминалните не показват статистическа полза). Разбира се, тези стратегии изискват допълнително клинично валидиране, но очертават персонализиран подход: молекулярният профил и HER2-статусът могат да насочат към оптимална терапия.

Освен това, HER2 се явява и прогностичен маркер. В нашето проучване HER2(+) туморите като цяло корелират с луминални варианти, които имат различна прогноза от базалните. Някои изследвания свързват свръхекспресията на HER2 с по-агресивно поведение (по-кратка преживяемост без прогресия), но това не е единодушно и може би зависи от съпътстващата терапия. Има хипотеза, че HER2(+) туморите са по-агресивни, ако не се третират, но ако се третират с таргетни агенти, резултатите се подобряват драстично – аналогия с рака на гърдата. Към момента HER2 не е рутинно тестван при рак на мехура в клиничната практика, но въз основа на нашите данни, ние препоръчваме въвеждането на HER2 тестване поне при пациентите с мускулно-инвазивен карцином, особено ако туморът демонстрира луминални характеристики (папиларен растеж, микропапиларен компонент и пр.). Това може да отвори врати за прилагане на лекарства, одобрени за други показания, особено при метастатични или платина-рефрактерни случаи, при които възможностите за лечение са ограничени.

5. Роля на p16 и RB пътя: Нашите резултати относно p16 допълват молекулярния профил на вариантите с функционална информация за състоянието на клетъчния цикъл. LumU вариантът се характеризира с инактивация на RB1 – нашата група от LumU тумори е p16(+), което е пряк белег за загуба на пътя (поради мутация на RB, p16 се освобождава натрупан). Интересно е, че консенсусната класификация на GU (Genomic Subtype) дефинира LumU именно като p16(+) и RB1(-) ИХХ профил, съчетан с липсата на FGFR3 и висок Ki-67. От друга страна, LumP туморите бяха p16 (-). Известно е, че около 50–60% от повърхностните папиларни карциноми имат делеция на 9p21 (където е *CDKN2A*), което води до липса на p16 протеин. Нашите данни предполагат, че това се запазва и при инвазивните папиларни тумори. Тук можем да направим връзка и с клинично наблюдение: папиларните (LumP) тумори често са множествени, рецидивиращи повърхностни лезии, асоциирани с т. нар. полеви ефект (цялата лигавица е податлива към папиларни образувания). Делецията 9p21 е ранно събитие, което може да обясни тази дифузна предразположеност. Загубата на p16 дава клонално предимство на уротелни клетки в цялата повърхност, водещо до мултифокални папиларни разраствания. Отсъствието на p16 обаче ги прави по-слабо чувствителни към цитотоксична химиотерапия (тъй като имат цялостен G1-arrest), което може да допринесе за факта, че вариантът LumP – макар и по-индолентен – не се влияе добре от неoadювантна химиотерапия. Това наблюдение се дискутира в литературата: базалните тумори (обикновено p16-позитивни) се повлияват от неoadювантно лечение, докато луминалните тумори не се повлияват, или поне не в същата степен. Едно възможно биологично обяснение е, че p16-негативните клетки имат алтернативен контрол на

клетъчния цикъл и може да са по-малко чувствителни към агенти, увреждащи ДНК, за разлика от p16-позитивните клетки, които имат разстроен Rb и хиперактивен цикъл, правейки ги уязвими към химиотерапевтици.

NE-like вариантът, от друга страна, почти винаги комбинира *TP53+RB1* мутации и съответно, почти винаги е p16-позитивен (83% при нас). Това е консистентно с описаното при дребноклетъчния рак на белия дроб: там почти всички случаи имат загуба на RB1 и са p16-позитивни.

Като цяло, може да се каже, че експресията на p16 служи като функционален маркер, отразяващ статуса на два ключови туморни супресора – RB и p53. Когато RB и p53 са изгубени (както при NE-like), p16 е силно позитивен, но това не спира нищо – клетките са в безконтролен цикъл, което прави тези тумори много агресивни. Когато RB е загубен, но p53 е запазен (както често се случва при LumU), p16 е висок, но без RB това само маркира проблема, не го решава; тези тумори имат висока пролиферация. И когато RB е запазен, а p16 е загубен (LumP), клетките навлизат бавно в цикъл, но с функциониращ RB донякъде контролират темпото, затова тези тумори често са по-индолентни. Тези нюанси са важни и подсказват, че например комбинирана терапия, насочена към RB-пътя, може да има различен ефект според варианта. В момента няма конкретни терапии за възстановяване на RB функцията или за повишаване на p16, но идеята е, че знаейки кой път е нарушен, бихме могли в бъдеще да адаптираме подхода си. Например, CDK4/6 инхибитори биха работили само ако RB е интактен, тоест при LumP, но не и при LumU.

Проучването има преки импликации за бъдещата диагностика и лечение на карцинома на пикочния мехур. Първо, показахме, че имунохистохимичната класификация е възможна, т.е., всеки патологичен център с базов набор от антитела може да категоризира МИКПМ туморите на молекулярни варианти в голям процент от случаите (91% при нас). Това може да залегне в стандартните протоколи, подобно на рака на гърдата, където всеки случай задължително се определя като Luminal A/B, HER2-обогатен или Basal-like въз основа на ИХХ (ER, PR, HER2, Ki-67). Нашите данни показват, че с антитела срещу CK5/6, CK20 и p16 може да се постигне класификация, даваща прогностична информация. Второ, идентифицирахме групата на HER2-позитивни МИКПМ като потенциална мишена за персонализирано лечение. В ерата на прецизната медицина, наличието на таргетируема мутация или свръхекспресия е ценна възможност. Доскоро при КПМ липсваха одобрени таргетни терапии, но сега вече има FGFR3 инхибитори за FGFR3-мутирали тумори, PD-1/PD-L1 инхибитори при подходящ

CPS и ADC срещу Nectin-4. Възможно е скоро анти-HER2 средства да бъдат прибавени към арсенала за лечение. Нашето проучване е първото в България, което систематично изследва HER2 при уротелен карцином и демонстрира неговата значимост.

Освен това, комбинирайки HER2 и молекулярните данни, предлагаме схема за риск-стратификация: NE-like вариант (висок риск, чувствителен на химиотерапия), Basal-вариант (висок риск, но чувствителен на химио- и имунни терапии), LumU (висок риск, потенциално таргетируем с HER2-инхибитори), LumP (по-нисък риск, нечувствителен на химиотерапия, но евентуално таргетируем с FGFR3-инхибитори, при наличие на FGFR3 мутации), Базолуминален (среден риск, нуждаещ се от допълнително изследване, например с RNA-seq) и Stroma-rich (неясен риск, отговарящ на имунотерапия). Разбира се, това са хипотетични разсъждения, които изискват клинично валидиране. Представянето на данните по този начин е един от приносите на дисертацията.

⌚ Ограничения на проучването:

Трябва да отбележим, че изследването обхваща 100 пациенти от един център, което е относително малък размер на извадката и може да не отразява напълно популационната картина. Някои редки субтипове (липидно-обогатен, лимфоепителиомотоиден и др.) бяха срещани в смесени карциноми и пренебрежимо малко количество, за да се правят изводи. Също така, липсва продължително проследяване на пациентите, нашият фокус беше върху патологичните корелации, а не върху преживяемостта или терапевтичния отговор. В момента продължава мониторингът на тази кохорта и в бъдеще бихме могли да анализираме прогностичната стойност на вариантите, например дали базалните имат по-лоша обща преживяемост от луминалните и т.н. Друг потенциален недостатък е, че имунохистохимичната преценка има субективен елемент, например, определянето на луминален нестабилен спрямо луминалния неспецифичен донякъде зависи от преценката. Стремяхме се да спазим точно критериите, но все пак са възможни малки неточности. Използването на цифрови скорове (image analysis) би намалило субективността и е препоръчително при бъдещи изследвания. Съществен недостатък е и липсата на допълнително уточняване на пациентите с HER2 2+. Нашето проучване на тази група ще продължи, като същите ще бъдат допълнително уточнени с in situ хибридизационни методи (SISH). Друга таргетна група и поле за бъдещи наши изследвания ще бъде групата на смесените тумори. Към момента смесените тумори представляват сериозно диагностично и терапевтично предизвикателство.

↔ Съпоставка с други изследвания:

Нашите резултати са в съзвучие с глобалните тенденции. Например, проектът TCGA (2017) и консенсусната класификация на Kamoun et al. (2020) до голяма степен се припокриват с нашите резултати. Тези съвпадения дават увереност в коректността на нашия подход.

👉 Нови хипотези и предложения:

Въз основа на натрупаните данни, предлагаме следното:

- ➡ Да се включи рутинно имунохистохимично профилиране и HER2-тестване при всички случаи на МИКПМ, особено при по-млади пациенти или при планиране на системна терапия, тъй като това може да повлияе на избора на лечение.
- ➡ Да се изследва допълнително базолуминалният вариант – например чрез РНК-секвениране, за да се определи дали той представлява отделен клас с уникална транскрипционна сигнатура или е просто смесица.
- ➡ Да се проведат проспективни клинични проучвания, които да валидират прогностичната значимост на установените варианти и биомаркери в българската популация – например дали базалните пациенти наистина имат полза от неoadювантна химиотерапия в нашите условия, дали HER2(+)/LumU пациенти печелят от включване на анти-HER2 терапия и пр.
- ➡ Да се внедри мултидисциплинарен подход при лечението на рак на пикочния мехур – например, предварително молекулярно типизиране, което да се обсъжда на туморен борд заедно с всички данни, подобно на практиката при рака на гърда. Вече представихме резултатите в нашия център и получихме обратната връзка – при агресивни фенотипове (базални, NE-like) се обмисля по-ранно адювантно лечение, а при HER2(+) метастатични случаи – насочване към подходящи клинични изпитвания.

Изводи:

1. Честота на хистологичните варианти:

Мускулно-инвазивният карцином на пикочния мехур демонстрира значителна морфологична хетерогенност. Този дял на вариации в морфологията в нашето проучване е по-висок (66%) от традиционно докладвания поради фокусираното търсене и напредналия стадий на включените тумори.

2. Молекулярна класификация:

Прилагането на имунохистохимичен панел позволи стратифицирането на 91% от нашата кохорта към някой от консенсусните молекулярни варианти. Разпределението на вариантите в изследваната кохорта съвпада до голяма степен с публикуваните данни от мащабни проучвания. Основните разлики спрямо консенсуса са по-ниският относителен дял на строма-обогатените тумори и отделянето на базолуминална категория в нашето проучване.

3. Корелация морфология – молекулярен вариант:

Налице е корелация между хистологичния субтип на тумора и неговия молекулярен вариант (χ^2 , $p < 0,001$). Тези зависимости потвърждават, че морфологичният фенотип отразява подлежащите молекулярни механизми в тумора. Това знание може да се използва за по-добра диагностика и прогнозиране.

4. HER2 експресия:

Установена е HER2 свръхекспресия (ИХХ 3+) в значителна част от МИКПМ – 25% от случаите. Общо, повече от половината тумори (69%) показват някаква HER2 позитивност (включително ниска и свръх ниска експресия). HER2 статусът корелира с

молекулярния и хистологичния профил. Тези данни идентифицират HER2 като потенциален прогностичен и предиктивен биомаркер.

5. p16 статус:

Експресията на p16 показва двуфазно разпределение сред МИКПМ, отразяващо различните механизми на нарушаване на Rb-пътя. P16 служи като сурогатен маркер за допълнително подтипизиране на луминалната категория. Също така, p16 има прогностична и предиктивна стойност, например, p16-позитивни туморите имат по-висока пролиферативна активност и по-вероятно да отговорят на терапии, таргетиращи клетъчния цикъл.

6. Клинично значение:

Комбинирайки на морфологичните и имунохистохимичните данни, се постига по-добра прогностична стратификация на пациентите с МИКПМ. Предлаганият имунохистохимичен алгоритъм за типизиране на МИКПМ е приложим в рутинната диагностична практика и предоставя информация, която може да оптимизира терапевтичното поведение за всеки пациент чрез персонализиран подход.

Дисертационният труд обогатява познанията за МИКПМ, като за пръв път в нашата страна: (а) предоставя детайлно количествено описание на честотата на различните хистологични субтипове при МИКПМ на локално ниво; (б) демонстрира практически подход за молекулярна класификация на МИКПМ чрез подбран имунохистохимичен панел и потвърждава възпроизводимостта на тази класификация; (в) разкрива съществуването на хибридна базолуминална категория тумори с особен имунофенотип; (г) установява честотата на HER2 свръхекспресия при МИКПМ и нейната връзка с луминалния диференциативен път, което има директно клинично значение; (д) анализира експресията на p16 като маркер за статуса на RB1 и показва неговата стойност при разграничаване на вариантите; (е) интегрира морфологичните и молекулярни данни в ясни алгоритми и препоръки за подобряване на диагностиката и лечението на пациенти с рак на пикочния мехур.

Приноси на научния труд

Дисертационният труд съдържа следните оригинални научни и научно-приложни приноси:

1. Изясняване на морфологичния спектър на МИКПМ в българска кохорта. За първи път систематично е документирана честотата на различните хистологични субтипове на мускулно-инвазивния уротелен карцином на пикочния мехур у нас. Установено е по-високо от очакваното разпространение на вариантна морфология (66% от случаите), включително редки и агресивни субтипове (саркоматоиден, микропапиларен, плазмоцитоиден и др.), което подчертава необходимостта от повишено внимание при хистопатологичната диагностика на тези тумори.
2. Въвеждане на имунохистохимично-базирана класификация на МИКПМ: Разработен и приложен е имунохистохимичен алгоритъм за молекулярна стратификация на МИКПМ съгласно консенсусната класификация (Basal/Sq, Luminal Pap, Luminal Unst, Luminal NS, NE-like, Stroma-rich). Демонстрирана е възпроизводимостта на този подход; полученото разпределение на вариантите съвпада с международните данни. Това е научно-приложен принос, показващ, че сложната молекулярна класификация може да бъде имплементирана в рутинна практика чрез относително достъпен ИХХ панел.
3. Идентификация на базолуминален (двойно-позитивен) вариант: Обособена е група от 9% от случаите с хибриден имунофенотип (едновременна експресия на базални и луминални маркери). Предложено е тези тумори да се третират като отделен „базолуминален” вариант, тъй като те демонстрират междинни характеристики (например умерена HER2 експресия, предимно p16-негативност) и могат да имат специфично биологично поведение. Това наблюдение допринася

за разбирането на хетерогенността на уротелните карциноми и повдига нови въпроси за геномния произход на тези неоплазми.

4. Проучване на HER2-статуса при МИКПМ: За първи път в българска серия систематично е изследван експресионният статус на HER2 при карцином на пикочния мехур. Установено е, че значителна част от МИКПМ (25%) демонстрира HER2 свръхекспресия (3+), като позитивността силно корелира с луминалните молекулярни варианти и с определени морфологични субтипове (микропапиларен). Този принос има пряко клинично значение: определя подгрупата пациенти с МИКПМ, които потенциално биха имали полза от анти-HER2 таргетна терапия, и дава аргументи за въвеждане на HER2 тестване при напреднал рак на мехура.
5. Анализ на p16 като маркер за RB1-статус: Показано е, че експресията на p16 има дихотомно разпределение, отразяващо механизма на инактивиране на клетъчния цикъл – луминалните папиларни тумори (с делеция на CDKN2A) са p16(-), докато луминалните нестабилни и NE-like тумори (с мутация на RB1) са p16(+). Това е принос, който потвърждава практическата полза от включването на p16 в имунохистохимичния панел за класификация.
6. Корелация морфология–молекула и интеграция на данните: Направена е цялостна корелация между хистологичните и молекулярните характеристики на всеки тумор. Това води до формулиране на конкретни зависимости (например, плоскоклетъчен компонент → базален вариант; папиларен растеж → луминален вариант; HER2(+)/p16(+) профил → луминален нестабилен вариант и др.), които представляват научно-приложни насоки за диагностичната практика. Въз основа на тези зависимости са изведени препоръки за оптимално лечение (например, индикации за таргетна терапия при HER2-позитивни луминални тумори, агресивно поведение при NE-like вариант, резистентност на LumP към химиотерапия и др.), което е съществен принос с оглед въвеждане на персонализирани терапевтични подходи.

7. Локална популационна база данни: Събраната информация от 100 последователни случая формира първата по рода си локална база данни за МИКПМ в България, включваща детайлни морфологични и имунохистохимични параметри. Тази база данни може да послужи за бъдещи проучвания – например, проследяване на преживяемост и отговор на лечение според субтипа или варианта, сравнение с други популации, както и за обучителни цели (създаден е набор от характерни микрофотографии за всеки субтип и вариант).

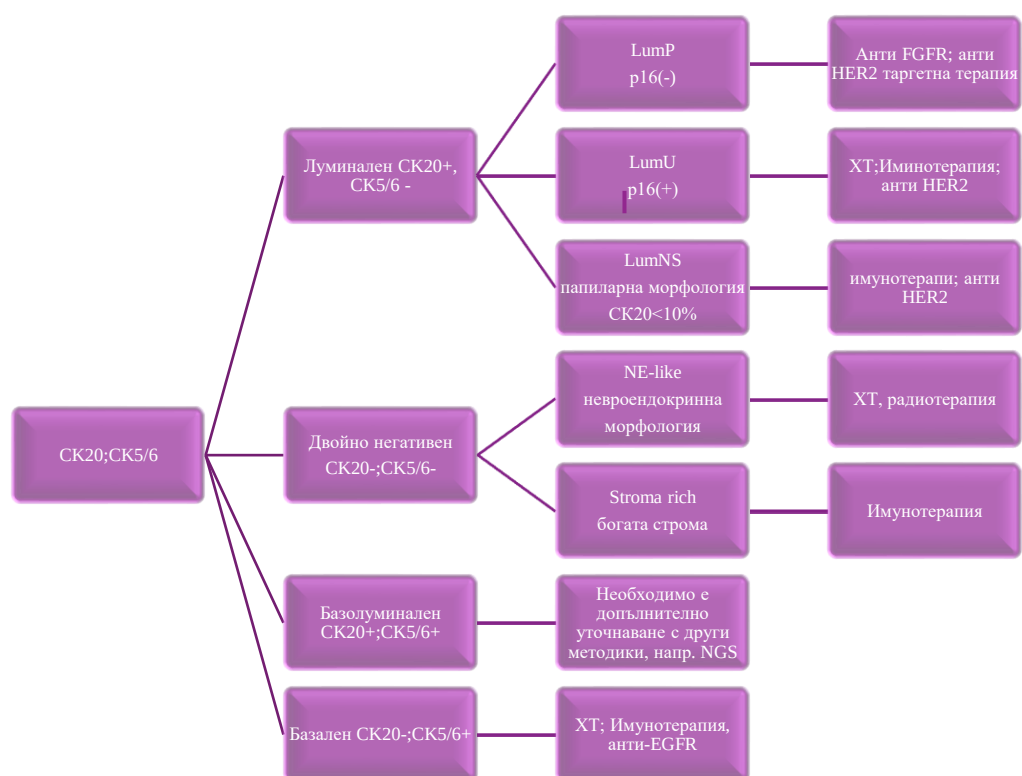
 В заключение, нашето проучване демонстрира тясната взаимовръзка между морфологията, молекулярния профил и експресия на ключови биомаркери (HER2, p16) при мускулно-инвазивния карцином на пикочния мехур.

Тези резултати подпомагат разбирането на патогенезата на заболяването и предоставят основа за персонализирани диагностични и терапевтични стратегии.

Докато класическата патология остава гръбнакът на диагнозата, добавянето на целенасочени имунохистохимични маркери позволява по-фина стратификация, която е от съществено значение в ерата на прецизната медицина.

Приложения

Приложение 1:



****Забележка:**

Терапевтичните модели са хипотетични разсъждения, които изискват клинично валидиране.

ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, КУРСОВЕ И ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

ПУБЛИКАЦИИ НА НАУЧНИ РЕЗУЛТАТИ В ПЪЛНОТЕКСТОВИ СТАТИИ:

1. **Kraevska, E.**, Popovska, S. *Immunohistochemistry-Based Molecular Profiling of Muscle-Invasive Bladder Cancer: Analysis of 100 Consecutive Cases with Morphological Correlation*. *Medical Sciences*, 2025, 13(3): Article number 202; e-ISSN: 2076-3271; Web of Science, Scopus
2. **Kraevska, E.**, Popovska, S. *Analysis of HER2 Expression in Different Histological Subtypes and IHC-Based Molecular Variants of Muscle-Invasive Bladder Carcinoma*. *Medicina*, 2025, 61(10): Article number 1759; ISSN: 1010-660X; Web of Science, Scopus
3. Vasilev, P., Popovska, S., **Kraevska, E.**, Karamanliev, M., Dimitrov, D., Yordanova, I. *Relationship Between PD-L1, PD-1, CD8 and Clinicopathological Factors in Primary SCCs*. *Dermatology Practical and Conceptual*, 2024, 14(3): Article number e2024176; ISSN: 2160-9381; Web of Science, Scopus

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. 1-3.06.2023г. Национална конференция по патология, к.к. Златни пясъци

„Хистологични и имунохистохимични промени, възникващи по време на клинична прогресия при мускулно-инвазивен карцином на пикочния мехур-демонстрация на случай от практиката“

Е. Краевска, С. Поповска

2. 24-27.04.2025г. XIV Национален конгрес по патология „Патологията - компас за прецизна диагноза и лечение“ гр. Сандански

„Комбиниран дребноклетъчен карцином на пикочния мехур: морфологична, имунохистохимична, образна и клинична характеристика – клиничен случай “

Е. Краевска, С. Поповска, А. Ванов, Р. Трифонов

3. 29-31.08.25г. Регионална научна среща „ Хипократова школа - Предай нататък “

гр. Пловдив „Хистологични субтипове на рак на пикочния мехур и тяхното

диагностично и терапевтично значение“ **д-р Елица Петрова Краевска**

УЧАСТИЕ В СПЕЦИАЛИЗИРАНИ КУРОВЕ В ОБЛАСТТА НА ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

- 1st Course on Urothelial Cancers 2023: Tumor heterogeneity and therapeutic resistance, Institut Curie, Paris, Франция, December 7- 9, 2023.
- Vincent Academy of Pathology - Diagnostic Pathology of the Urinary System and Male Genital Organs October 16 – 18, 2024, Linz, Австрия
- Advanced bladder Pathology course 20-21.01.2025, BAUP, UK, London
- Neuroendocrine GU tumors 05.03.2025, BAUP, UK, London
- Staging of bladder cancer 07.05.2025, BAUP, UK, London
- Mimics of bladder cancer 05.06.2025, BAUP, UK, London
- Grading of urothelial carcinoma 02.04.2025, BAUP, UK, London
- Предизвикателства и нови възможности в лечението на бъбречноклетъчен и уротелен карцином 30.11.- 01.12.24г. Боровец, България
- Еволюция В *HER2* диагностиката – нови концепции и практически насоки”
30-31.05.2025 г., гр. София, България
- Национална Академия по Патология: “HER2 експресия при карцином на гърда – спектърът се разгръща“, Гост-лектор: Prof. Giuseppe Viale, University of Milan, Italy, 20.04.2024г., гр. София
- Breast HER2 IHC (4B5) Proficiency Test 407 (with focus on 0 & 1+ scores) 04.2023
- Breast HER2 Dual ISH Proficiency Test 509, June 2023
- HER2 Testing Summit: Re-evaluating approaches to HER2 scoring in breast cancer
- Breast HER2 (4B5) Proficiency Test 418, August/September 2024
- Breast HER2 IHC Feedback_18 September 2024, 18th September 2024
- HER2 Diagnostics Summit - EU.-12.oct.2024

- Breast HER2 (4B5) Proficiency Test 414, April 2024
- Breast HER2 IHC Feedback_18 April 2024
- HER2 (4B5) Proficiency Test 418, August/September 2024
- HER2 IHC Feedback_18 September 2024, 18th September 2024
- Breast HER2 (4B5) Proficiency Test 414, April 2024
- Breast HER2 IHC & HER2 Dual ISH Case Review Session 422/522, 12th February 2025
- Breast HER2 Dual ISH Proficiency Test 522, January/February 2025
- Breast HER2 Dual ISH Education session 522, 29th January 2025
- Breast HER2 (4B5) Proficiency Test 422, January/February 2025

УЧАСТИЕ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ:

1. Проект №D7/2024, финансиран от Медицински университет-Плевен „Мускул - инвазивен карцином на пикочен мехур - морфологични и имунохистохимични характеристики с фокус върху някои предиктивни биомаркери “
2. “Център за компетентност по персонализирана медицина, 3Д и телемедицина, роботизирана и минимално инвазивна хирургия“, с рег. № BG05M2OP001-1.002-0010, финансиран от „Оперативна програма наука и образование за интелигентен растеж “
3. „Център за компетентност по персонализирана медицина, 3Д и телемедицина, роботизирана и минимално инвазивна хирургия“, финансиран от Оперативна програма „Научни изследвания, иновации и дигитализация за интелигентна трансформация“, съфинансирано от Европейския съюз, проект № BG16RFPR002-1.014-0002
4. Проект № BG-RRP-2.004-0003, финансиран от Европейския съюз - NextGenerationEU, чрез Националния план за възстановяване и устойчивост на Република България