



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА**

КАТЕДРА „ДЕРМАТОЛОГИЯ, ВЕНЕРОЛОГИЯ И АЛЕРГОЛОГИЯ“

Д-р Преслав Пламенов Василев

**Съвременни епидемиологични, хистологични и
имунохистохимични характеристики на спиноцелуларния
карцином на кожата**

**АВТОРЕФЕРАТ НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

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

Научни ръководители:

**Проф. Д-р Добромир Димитров, д.м.
Проф. Д-р Петранка Троянова, д.м.**

Плевен, 2025 г.

Дисертационният труд е представен на 120 стандартни машинописни страници. Съдържа 45 фигури, 57 таблици и 6 приложения. Библиографията включва 228 литературни източника, от които 3 на кирилица и 225 на латиница.

Изследванията по дисертацията са проведени в:

- ✓ Онкологичен Център на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – гр. Плевен ЕАД
- ✓ Клиника по Кожни и венерически заболявания, УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – гр. Плевен ЕАД
- ✓ Клиника по Онкологична хирургия, УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – гр. Плевен ЕАД
- ✓ Лаборатория към Катедра „Патологоанатомия“, Факултет Медицина, Медицински Университет – Плевен
- ✓ Лаборатория към Катедра „Обща и Клинична Патология“, Факултет Медицина, Медицински университет – София

Епидемиологичните проучвания и морфологичните изследвания /хистологични и имунохистохимични/ в този дисертационен труд са осъществени в рамките на научно-изследователски проект №7/2022г., финансиран от Медицински Университет – Плевен на тема: „Проучване степента на имунохистохимична експресия на PD-1, PD-L1 и CD8 при първичен спиноцелуларен карцином на кожата и тяхната роля в туморната генеза“ Провеждането на изследванията по проекта е одобрено с Решение №676/31.05.2022 г. на КЕНИД при Медицински Университет – Плевен.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на разширен катедрен съвет на катедра „Дерматология, венерология и алергология“ Факултет Медицина при Медицински Университет – Плевен, състоял се на 28.01.2025г.

Съдържание

Използвани съкращения	4
I. Въведение	5
II. Цел и Задачи.....	6
III. Материал и Методи.....	7
1. Материал.....	7
2. Методи.....	7
2.1. Проспективно епидемиологично проучване на пациенти със СЦК на кожата за периода м.Януари 2020г. – м. Декември 2023г.	7
2.2. Ретроспективно епидемиологично проучване на пациенти със СЦК на кожата, регистрирани в периода 2016г. – 2019г.	8
3. Лабораторни методи.....	8
3.1. Хистопатологично проучване.....	8
3.2. Имунохистохимично проучване.....	9
4. Статистически методи.....	11
5. Етични норми.....	11
IV. Резултати от собствени проучвания.....	12
1. Епидемиологично проучване на Спиноцелуларния карцином на кожата	12
1.1. Епидемиологично проучване на немеланоцитни карциноми на кожата при пациенти, регистрирани в Онкологичен Център към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен от 2000 до 2023 г.	12
1.2. Епидемиологично проучване на Спиноцелуларния карцином на кожата в област Плевен за периода 2016г. – 2023г.	15
2. Клинични проучвания.....	17
3. Хистологично проучване.....	26
4. Имунохистохимично проучване.....	32
V. Обсъждане.....	47
VI. Заключение.....	55
VII. Изводи.....	57
VIII Приноси.....	58

Използвани съкращения

НМКК.....	Немеланоцитни кожни карциноми
СЦК	Спиноцелуларен карцином на кожата
БЦК	Базоцелуларен карцином
ММ	Малигнен меланом
UV	Ултравиолетова светлина
UVA	Ултравиолетова А-светлина
UVB	Ултравиолетова В-светлина
EBH	Epidermolysis bullosa hereditaria
EBS	Epidermolysis bullosa simplex
EBJ	Epidermolysis bullosa junstionalis
EBD	Epidermolysis bullosa dystrophica
KS	Kindler syndrome
XP	Xeroderma pigmentosum
LECD	Lupus erythematosus chronicus discoides
HPV	Human papilloma virus
EV	Epidermodysplasia verruciformis
АК	Актинична кератоза
ПАК	Пигментна актинична кератоза
ЛАК	Лихеноидна актинична кератоза
EGFR	Epidermal growth factor receptor
PD-1	Programmed cell death protein - 1
PD-L1	Programmed cell death protein – ligand 1
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
АХ	Актиничен хейлит
БВ	Болест на Bowen
КА	Кератоакантом
ВК	Верукозен карцином
KIN.....	Keratinocyte intraepidermal neoplasia
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
ИХХ	Имунохистохимия
РКМ	Рефлектна конфокална микроскопия
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ММХ	Mohs-микрографска хирургия
КиЕ	Кюретаж и електрокоагулация
ФДТ	Фотодинамична терапия
РТ	Радиотерапия
ESMO	Европейска асоциация по медицинска онкология
ASCO	Американска асоциация по клинична онкология
ФТР.....	Фармако-терапевтично ръководство
5-FU	5-Fluorouracil
ORR	Overall response rate

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът на кожата е едно от най-често срещаните неопластични заболявания в човешкото тяло. Кожните тумори се разделят в две групи: меланоцитни и немеланоцитни. Основен представител на меланоцитните кожни тумори е малигненият меланом (ММ). В групата на немеланоцитните кожни карциноми, най-често срещан е базоцелуларният карцином (БЦК), последван от спиноцелуларният карцином (СЦК). Леталитетът от СЦК е нисък, но лечението му е предизвикателство. Малките по размер СЦК позволяват пълно излекуване чрез хирургична ексцизия, за разлика от по-големите, локално инвазираните и метастатичните СЦК, които представляват терапевтична трудност за дерматолози, дерматохирурзи, лъчетерапевти и медицински онколози.

Един от основните етиологични фактори за развитие на СЦК е хроничната експозиция на ултравиолетова слънчева светлина, особено ултравиолетовата В – светлина (UVB) и използване на солариуми. Други фактори са прием на определени групи медикаменти (имуносупресивни, фотосенсибилизатори), хронични възпалителни заболявания, т. нар. „преканцерози“ като *Lupus Erythematosus Chronicus Discoides* (LECD), вродени генетични заболявания като *Xeroderma pigmentosum* и *Epidermolysis bullosa hereditaria* (EBH).

Спиноцелуларният карцином на кожата е по-често срещан сред хората с по-светъл кожен фототип (I-III) и може да се развива както върху фотоекспонирана, така и върху фотонеекспонирана кожа.

Най-често СЦК се среща във възрастта след 65 години, но последните проучвания показват тенденция за „подмладяване“ на СЦК при пациенти под 40-годишна възраст.

Диагнозата СЦК на кожата се поставя чрез хистопатологично изследване на материал от патологично променената кожа, взет чрез кожна биопсия. Дерматоскопията е неинвазивен диагностичен метод, който подпомага предоперативната диагностика и способства за намаляване броя на кожните биопсии при съмнение за СЦК. Сред модерните методи за диагностика на СЦК е Спектралната конфокална микроскопия.

Съвременната клинична класификация на СЦК включва следните варианти: суперфициален, нодуларен, улцеро-инфилтративен. Според хистопатологичната характеристика СЦК биват: Неспецифичен (класически) тип, *Keratoacanthoma – like*, Верукозен, Светло-клетъчен, Акантолитичен, Аденосквамозен и Вретеновидоклетъчен типове.

Златният стандарт за лечение на СЦК е хирургичната ексцизия. При много малки СЦК, с нисък риск за рецидивирание, може да се приложи и електрокаутеризация, кюретаж, локален 5-fluorouracil или imiquimod крем. Щадящ околните тъкани и органи, модерен терапевтичен метод е т.нар. Mohs хирургия. При локално авансиралите и неоперабилните СЦК се прилага

лъчетерапия с добър резултат. Метастатичните СЦК се насочват за системно лечение. До скоро в медицинската онкология се използваха класически химиотерапевтици с недостатъчен до умерен ефект. Съвременните “checkpoint” инхибитори на рецептора на програмирана клетъчна смърт-1 (PD-1) и неговия лиганд-1 (PD-L1) са средства за лечение на метастатични и неоперабилни СЦК, които демонстрират значително по-добър терапевтичен ефект.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия труд е да се проучат съвременните аспекти на епидемиологията, морфологичните прояви (хистологични и имунохистохимични характеристики), хирургичното и медикаментозно лечение при пациенти, диагностицирани със СЦК.

За постигане на тази цел са разработени следните задачи:

Задача 1: Да се проучи заболяемостта от немеланоцитни карциноми на кожата при пациенти, регистрирани в Онкологичния регистър към Онкологичен Център към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен от 2000 г. до 2023 г.

Задача 2: Да се проучат разпространението и специфичните особености на СЦК на кожата при пациенти, водени на диспансерен учет в Онкологичния регистър към Онкологичен Център към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен от 2016 г. до 2023 г.

Задача 3: Да се проучи структурата на заболяемостта по пол, възраст, местоживееене при пациентите диагностицирани със СЦК на кожата, водени на диспансерен учет в Онкологичния регистър към Онкологичен Център към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен от 2016 г. до 2023 г.

Задача 4: Да се уточнят клиничните форми на заболяването при пациентите диагностицирани със СЦК на кожата, водени на диспансерен учет в Онкологичния регистър към Онкологичен Център към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен от 2016 г. до 2023 г.

Задача 5: Да се извърши подробно хистопатологично изследване на 100 инвазивни СЦК на кожата за определяне на прогностични за рецидивирание и метастазиране, хистопатологични критерии.

Задача 6: Да се извърши подробно имунохистохимично изследване на маркерите PD-1, PD-L1, CD8 при 100 инвазивни СЦК за определяне на прогностични имунохистохимични критерии, определящи поведението на заболяването и неговата прогноза.

Задача 7: Да се извърши подробно имунохистохимично изследване на маркерите Ki-67, CD4, и да се определи съотношението CD4:CD8 при 70 инвазивни СЦК за определяне на прогностични имунохистохимични критерии, определящи поведението на заболяването и неговата прогноза.

Задача 8: Да се анализират терапевтичните варианти и тяхната ефективност през различните стадии на заболяването.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Материал

За проучване на заболяемостта от немеланоцитни карциноми на кожата (НМКК) в Област Плевен, изследваната група се състои от 5748 пациента, регистрирани в Онкологичния регистър към Онкологичен Център на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ гр. Плевен ЕАД, с диагноза според МКБ-10 C44.0 – C44.9, през периода м. Януари 2000г. – м. Декември 2023г.

За проучване на разпространението и специфични особености на СЦК на кожата, изследваната група се състои от 355 пациента с хистологично верифициран СЦК, водени на диспансерен учет в Онкологичния регистър към Онкологичен Център към УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ гр. Плевен ЕАД, през периода м. Януари 2016г. – м. Декември 2023г. Пациентите са регистрирани след оперативно лечение, проведено в Клиника по Уши, нос и гърло, Отделение по Пластична и Реконструктивна Хирургия, Отделение по Гнойно-септична хирургия, Клиника по Офталмология, Клиника по Онкологична хирургия.

2. Методи

2.1. Проспективно епидемиологично проучване на пациенти със СЦК на кожата за периода м.Януари 2020г. – м. Декември 2023г.

2.1.1. Анализ на анамнестични данни и клинична картина

Индивидуално анкетиране (Анкетен метод) - снемане на анамнеза, данни за пол, възраст, давност на заболяването, придружаващи заболявания, съпътстваща терапия, фамилна обремененост и др. на всеки от откритите болни със СЦК.

Клиничната оценка (Клиничен преглед) на СЦК при всеки пациент, съгласно диагностичните критерии за класификация на заболяването – локализация, описание на макроскопски характеристики на лезията (размер, наличие на инфилтрация и повърхност).

- 2.1.2.** Параклинични и инструментални изследвания на пациентите със СЦК (Пълна кръвна картина, биохимични изследвания, Ro-графия на бял дроб, Тънкоиглена аспирационна биопсия)
- 2.1.3.** Хирургична ексцизия на СЦК при пациентите в рамките на КП № 199.1 „Лечение на тумори на кожа и лигавици – злокачествени новообразувания“ в Клиника по Онкологична Хирургия към УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ Плевен ЕАД.
- 2.1.4.** Хистологично изследване на материалите, получени от ексцизията на патологично променена кожа на всеки пациент със СЦК в Лаборатория към Катедра „Патологоанатомия“, Факултет Медицина, Медицински Университет – Плевен, Попълване на подробен хистологичен фиш, специфичен за СЦК.

Попълва се специално изработена Анкетна карта, която включва данни от индивидуалната анкета, клиничните признаци на заболяването, хистологичното и имунохистомичното изследване, лечението.

2.2. Ретроспективно епидемиологично проучване на пациенти със СЦК на кожата, регистрирани в периода 2016г. – 2019г.

Данните се получават от личните досиета на пациентите със СЦК, водени на диспансерен учет в Онкологичния регистър към Онкологичен Център към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД. Горепосочените пациенти задължително са попълнили унифициран за УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД документ „Декларация за информирано съгласие на пациента, относно реда на постъпване и провеждане на диагностични изследвания и лечебни процедури“, преди провеждане на хирургичното им лечение в рамките на КП № 199.1 (199). Бланката е приложена към Историята на заболяването.

3. Лабораторни методи

3.1. Хистопатологично проучване

Издирване на хистологичните материали от пациентите със СЦК, преминали оперативно лечение в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД за периода 2016-2023 г. в Отделение по обща и клинична патологоанатомия към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД

Хистологичното изследване се провежда по стандартна техника. След оперативно лечение, ексцизионните материали се фиксират във формалин (10% разтвор на формалдехид). Препаратите се включват в парафинов блок, нарязват се на микротом, фиксират се върху предметни стъкла и се оцветяват с Хематоксилин и Еозин. Резултатите се отчитат при наблюдение под светлинен микроскоп.

Избрахме 100 СЦК, които да изследваме подробно. Разделихме туморите в 2 групи:

- Група 1 – нискорискови за рецидивирание и метастазирание СЦК: диаметър до 2 см.; дълбочина на инвазия до 4 мм; подходящи за оперативно лечение – 50 карцинома;
- Група 2 – високорискови за рецидивирание и метастазирание карциноми: рецидивирали и/или метастазирали; диаметър над 2 см.; дълбочина на инвазия над 4 мм; локално авансирани карциноми; подходящи или неподходящи за оперативно лечение; СЦК развили се на фона на генетични заболявания като Xeroderma pigmentosum, Epidermolysis bullosa hereditaria – 50 карцинома

За целта на хистопатологичното проучване създадохме подробен хистологичен фиш, специфичен за СЦК.

3.2. Имунохистохимично проучване

При извършването на Имунохистохимичния анализ се прилага Методът на имунохистохимия (ИХХ), с който селективно се идентифицират антигените в клетките на избрания тъканен участък чрез използване на антитела, които се свързват специфично с антигените в тъканната проба.

От предварително селектираните пациентски тъканни проби, фиксирани във формалин и включени в парафин се приготвят срези с дебелина 3 микрона, които се монтират върху силанизирани предметни стъкла. Извършва се депарафиниране и рехидратиране на тъканните проби с ксилол и алкохол в низходяща редица 90%, 80% и 70% EtOH.

След топлинно медирано антигенно възстановяване в Dako EnVision FLEX TRS, Low pH за 20 min/ 95°C и блокиране на ендогенната пероксидаза с 3% H₂O₂, за оценка на PD-1 експресията приложихме **мише моноклонално [NAT105] анти-PD1 антитяло**, Abscam в работна концентрация 1/50 за 30 мин инкубационно време.

След топлинно медирано антигенно възстановяване с Dako EnVision FLEX, High pH буфер за оценка на PD-L1 експресията използвах **рекомбинантно заешко анти-PD-L1 антитяло [SP142] - C-terminal** за 30 мин. инкубационно време. За оценка експресията на CD8 приложихме **Dako FLEX Mono Mo a Hu CD8, cl C8/144B, RTU** за 30 мин. инкубационно време.

След топлинно медирано антигенно възстановяване в Dako EnVision FLEX TRS, Low pH за 20 min/ 95°C и блокиране на ендогенната пероксидаза с 3% H₂O₂, за оценка на Ki-67 експресията приложихме **мише моноклонално [Clone MIB-1] анти-Ki-67 антитяло** за 30 мин инкубационно време.

След топлинно медирано антигенно възстановяване в Dako EnVision FLEX TRS, Low pH за 20 min/ 95°C и блокиране на ендогенната пероксидаза с 3% H₂O₂, за оценка на CD4 експресията приложихме **мише моноклонално [Clone 4B12] анти-CD4 антитяло** за 30 мин инкубационно време.

За контрол и осигуряване на качеството включихме позитивни тъканни контроли от карцином на тонзила, успоредно с пациентските тъканни проби.

Визуализацията на комплексите бе извършена с Dako EnVision FLEX+ Mo (LINKER) детекционна система за 30 + 20 мин. инкубационно време. Контра-оцветяване на клетъчните ядра се извършва с Хематоксилин по Майер.

Експресията на PD-1 и PD-L1 бе оценена чрез **„резултат на туморната пропорция“ tumor proportion score (TPS) (DAKO)**, дефиниран като процента на всички туморни клетки показващи частично или пълно мембранно оцветяване (интензивност $\geq 1+$).

Експресията на Ki-67, CD4, CD8 и съотношението CD4:CD8 бе оценена чрез т.нар. **„eyeballing global score“**, а резултатите са в %. Не се избират горещи точки на експресия, а се гледа целия препарат.

Ki-67 експресията бе отчетена извън stratum basale на епидермиса (само туморни клетки извън stratum basale, тъй като базалният слой на епидермиса нормално показва повишена пролиферативна активност). Отчита се % на минимум 500 клетки.

CD4/CD8 експресията бе отчетена в пери-туморния инфилтрат (само в стромната реакция). CD4 се експресира не само от Т-лимфоцити, но и от макрофаги. Клетките, на които се виждат дендритните израстъци, се изваждат от % CD4.

Имунохистохимичното оцветяване за всяко антитяло, бе оценено като положително и негативно, а след това бе приложен **„резултат на туморна пропорция“** (Tumor proportion score -TPS).

PD-L1 експресията бе оценена както следва: без налична експресия ($TPS \leq 1\%$); с ниска експресия ($TPS 2-10\%$); с умерено висока експресия ($TPS 11-49\%$) и с висока експресия ($TPS > 50\%$).

PD-1 експресията бе оценена като: без налична експресия ($TPS \leq 1\%$); с ниска експресия ($TPS 2-10\%$); с умерено висока експресия ($TPS 11-20\%$) и с висока експресия ($TPS 21-30\%$) и с много висока експресия ($TPS > 30\%$).

Експресията на CD8 също бе оценена както следва: без налична експресия ($\leq 1\%$); с ниска експресия ($2-10\%$); с умерено висока експресия ($11-39\%$) и с висока експресия ($> 40\%$).

Ki-67 експресията бе оценена като: ниска ($< 10\%$); умерена ($10-25\%$) и висока ($> 25\%$).

Извършихме ИХХ изследване за PD-1, PD-L1 и CD8 на материали от 100 броя пациента и за Ki-67, CD4 и съотношението CD4:CD8 на материали от 70 броя пациента, диагностицирани с инвазивен СЦК, преминали оперативно лечение към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД за периода 2019 -2023 г. вкл.

Изследванията на PD-1, PD-L1 и CD8 бяха извършени в Лаборатория към Катедра „Патологоанатомия“, Факултет Медицина, Медицински Университет – Плевен, като бе използван AS480 Autostainer Link 48 (AS Link 48), производство на DAKO/Agilent- отворена автоматизирана система за имунохистохимично ИХХ оцветявания.

Изследванията и отчитанията на Ki-67, CD4 и съотношението CD4:CD8 бяха извършени в Катедра по Обща и Клинична Патология, Факултет Медицина, Медицински университет – София.

За целта на хистопатологичното проучване създадохме имунохистохимичен фиш за отчитане на експресията на PD-1, PD-L1, CD8 при пациенти със СЦК.

4. Статистически методи

За доказване достоверността на получените резултати, установяване на статистически закономерности и връзки между изследваните характеристики бяха използвани следните статистически методи:

А) Дескриптивна статистика

- Количествените променливи са представени чрез обобщаващите статистически характеристики - средна аритметична (Mean) и стандартно отклонение (SD);

- Категорийните променливи са обобщени чрез абсолютни (n) и относителни (%) честоти;

Б) **Хи-квадрат тест (Chi-square test)** – при изследване на зависимости между описателни (категорийни) данни с две или повече категории.

В) **Анализ на Каплан-Майер (Kaplan-Meier analysis)** – за оценка на кривата (функцията) на преживяемост до настъпване на изследваните събития.

Г) **Log Rank test** – за сравнение на кривите на преживяемост при две и повече независими групи.

Приетото прагово ниво на значимост е $\alpha=0,05$. Статистическа значимост се приема, когато р стойността е по-малка от α .

За обработка на данните от проучването е използван специализирания статистически пакет SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) версия 20.0

5. Етични норми

Реактивите, използвани за реализиране на научните цели и задачи, са получени по проект №7/2022г., одобрен от Комисия по Етика на Научно-изследователската дейност (КЕНИД) на Медицински Университет – Плевен. Всички пациенти от проспективното епидемиологично проучване са подписали формуляр „Информационен лист за пациента“ неразделна част от научно-изследователски проект №7/2022 г. Провеждането на изследванията по този проект е одобрено с официално Решение №676/31.05.2022 г. на КЕНИД при Медицински Университет – Плевен.

IV. РЕЗУЛТАТИ ОТ СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ

1. Епидемиологично проучване на Спиноцелуларния карцином на кожата

1.1. Епидемиологично проучване на немеланоцитни карциноми на кожата при пациенти, регистрирани в Онкологичен Център към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен от 2000 до 2023 година.

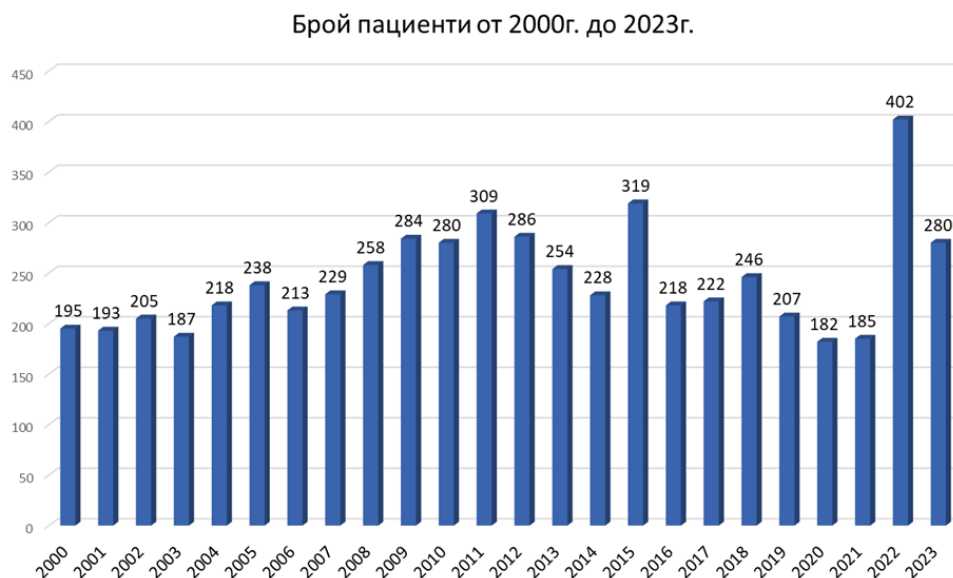
За обследвания период (м. Януари 2020г. – м. Декември 2023г.) регистрираните пациенти с НМКК в Онкологичен регистър към Онкологичен Център в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен са 5748. Пациентите от мъжки пол са 3055 (53%), а от женски пол – 2693 (47%), както е показано на Фигура 1.



Фигура 1. Разпределение на пациентите с НМКК по пол за периода 2000г. – 2023г.

Средната възраст на диагностициране на пациентите е 71 години. Мъжете са със средна възраст 70,6 години, а жените – 71,5 години.

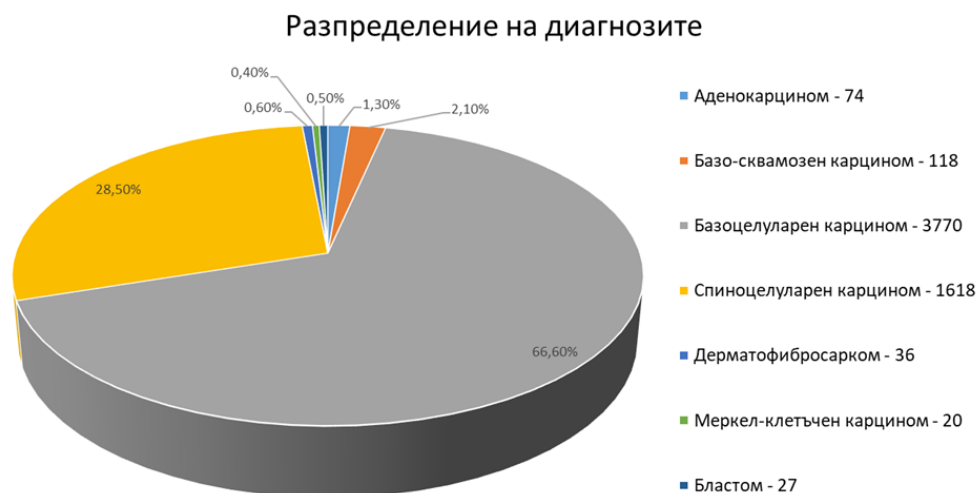
Броят на регистрираните пациенти през годините 2000г. – 2023г. е показан на Фигура 2.



Фигура 2. Регистрирани пациенти с НМКК в Онкологичен Център към УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен от 2000 до 2023 година

Анализът на данните показва, че в Онкологичен център област Плевен се регистрират средно 243,2 пациента със СЦК на кожата всяка година. Установява се спад в броя на регистрирани пациенти през 2020г. и 2021г. и последващо повишение на пациентите със СЦК на кожата през 2022г.

Данните от Онкологичния регистър дават информация относно хистопатологичната диагноза на пациентите с НМКК, представена на Фигура 3.



Фигура 3. Хистопатологична диагноза на пациентите с НМКК, регистрирани за периода 2000 до 2023 година

Най-висок е относителният дял на пациентите с БЦК – 66,6%, последван от тези с СЦК – 28,5%, Базо-сквамозен карцином – 2,1%, Първичен кожен Аденочарцином – 1,3%, Дерматофибросарком – 0,6%, Блостом – 0,5% и Меркел-клетъчен карцином – 0,4%.

Разпределението на карциномите според TNM – класификацията и стадиране е демонстрирано на Таблица 1, Таблица 2, Таблица 3 и Таблица 4.

Таблица 1. Разпределение на туморите според T- стадий (Макроскопски диаметър)

T - Категория	N	%
T1	3781	66,6
T2	1594	28,1
T3	223	3,9
T4	81	1,4
Общо	5679	100,0

Таблица 2. Разпределение на туморите според N – стадий (Метастази в лимфни възли)

N - Категория	N	%
N0	5578	98,9
N1	60	0,9
N2	2	0,04
N3	2	0,04
Общо	5640	100,0

Таблица 3. Разпределение на туморите според M – стадий (Метастази във вътрешни органи)

M - Категория	N	%
M0	5657	99,8
M1	7	0,1
M2	2	0,03
Общо	5666	100,0

Таблица 4. Разпределение на пациентите, диагностицирани със НМКК, според Клиничен Стадий на заболяването

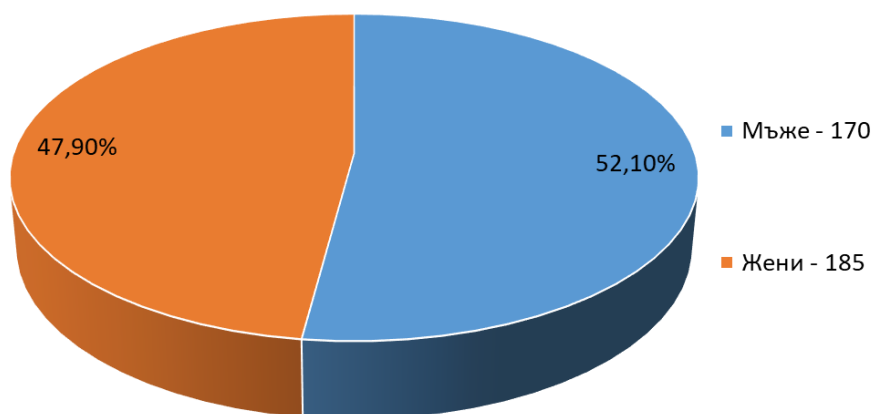
Стадий	N	%
Стадий I	3659	64,8
Стадий II	1737	30,8
Стадий III	222	3,9
Стадий IV	27	0,5
Общо	5645	100,0

Най-висок е относителният дял на туморите в T1 – макроскопски диаметър <20мм (66,6%), N0 – без засягане на лимфни възли (98,9%), M0 – без наличие на метастатични лезии във вътрешни органи (99,8%).

Според клиничният стадий на заболяването най-голям е относителният дял на пациентите в Стадий I – 64,8%. Най-нисък е делът на пациентите с метастатични лезии във вътрешни органи – Стадий IV (0,5%).

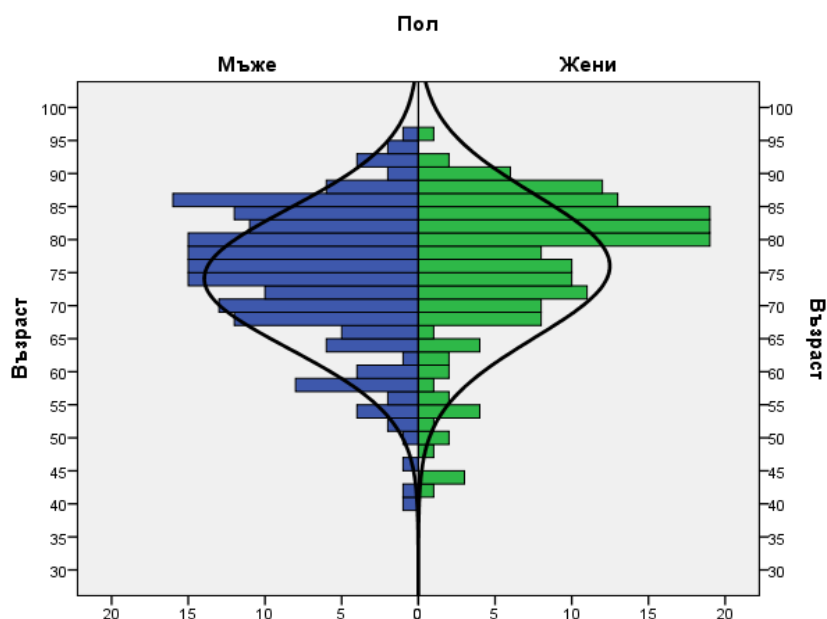
1.2. Епидемиологично проучване на Спиноцелуларния карцином на кожата в област Плевен за периода 2016г. – 2023г.

За обследвания от нас период (2016-2023 година) в Област Плевен установяваме 355 пациента, на възраст от 40 до 96 години, с диагноза СЦК на кожата. Пациентите от мъжки пол са 185 (52,1%), а от женски пол – 170 (47,9%), както е показано на Фигура 4.



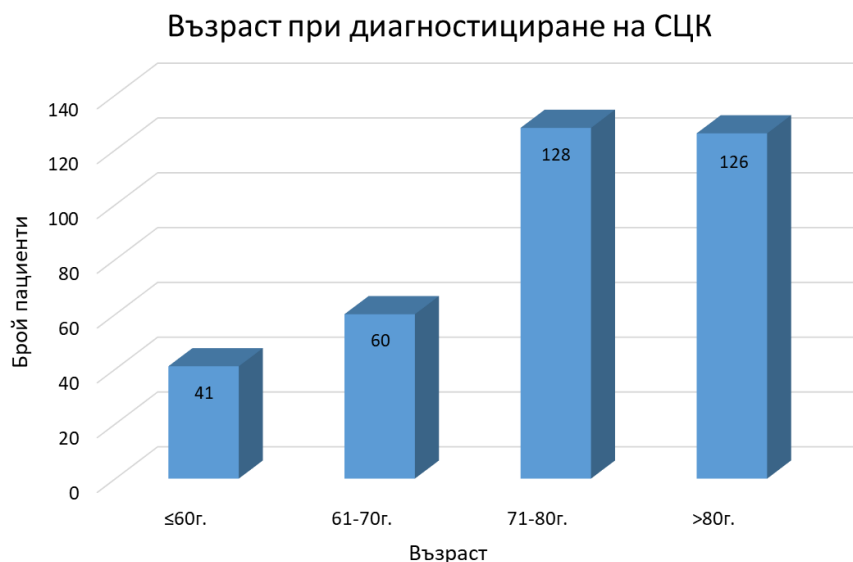
Фигура 4. Разпределение на пациентите със СЦК на кожата по пол.

Средната възраст на пациентите е 75,02 години със стандартно отклонение $\pm 10,74$ години. Мъжете са със средна възраст 74,11 години ($\pm 10,57$), а жените - 76,01 ($\pm 10,87$). Резултатите са демонстрирани на Фигура 5.



Фигура 5. Възрастово разпределение на пациентите със СЦК от мъжки и женски пол.

В обследваната група, 41 пациента (11,5%) са развили СЦК преди 60 годишна възраст, 60 пациента (16,9%) са в групата 61-70 години, 128 пациента (36,1%) са в групата 71-80 години, а 126 пациента (35,5%) са над 80 – годишна възраст, както е показано на Фигура 6.



Фигура 6. Възраст, на която пациентът е диагностициран със СЦК на кожата

Наблюдава се тенденция, заболяването да е по-често срещано при пациентите от мъжки пол със средна възраст 75 години.

Проучване върху професията на пациентите според Национална класификация на професиите и длъжностите в България от 2011 година. Резултатите са представени на таблица 5.

Таблица 5. Професионално направление на пациентите със СЦК на кожата

Професия	N	%
Ръководители	2	0,6
Техници и приложни професии	7	2,0
Помощен административен персонал	1	0,3
Персонал зает с услуги за населението, търговията и охраната	11	3,2
Квалифицирани работници в селското, горското, ловното и рибното стопанство	3	0,9
Квалифицирани работници и сродни на тях занаятчии	3	0,9
Машинни оператори и монтажници	1	0,3
Професии неизискващи специална квалификация	3	0,9
Пенсионер	312	91,0
Общо	343	100,0

Според местоживеенето на пациентите със СЦК на кожата, установяваме 194 пациента (54,6%) живущи в селски региони и 161 пациента (45,4%) – в градски.

2. Клинични проучвания

Извършен е клинико-морфологичен и хистопатологичен анализ в ретроспективен и проспективен план, който обхваща всички 355 болни със Спиноцелуларен карцином на кожата.

Изследвана е фотоекспозицията на пациентите в тяхното ежедневие. 238 пациенти (67%) работят в селското стопанство, растениевъдство и животновъдство. От анкетиранияте пациенти, 260 (73,2%) съобщават, че през живота си са преживяли тежки слънчеви изгаряния.

Двама пациента (1,13%) са приемали имуносупресираща терапия по повод на придружаващи онко-хематологични заболявания, преди появата на СЦК.

По отношение на преканцерозите, довели до развитие на СЦК, са открити 2 пациента развили СЦК на фона на Lupus erythematosus chronicus discoides (Фигура 7), 2 пациента – на фона на Epidermolysis bullosa hereditaria dystrophica (Фигура 8 и 9) и 2 пациента с Есенциална Тромбоцитемия (Фигура 10), дългогодишно лекувани с Хидроксисурия.



Фигура 7. СЦК на фона на Lupus erythematosus chronicus discoides



Фигура 8. СЦК на фона на Epidermolysis bullosa hereditaria dystrophica



Фигура 9. СЦК на фона на Epidermolysis bullosa hereditaria dystrophica



Фигура 10. СЦК на фона на Есенциална Тромбоцитемия

В настоящето проучване се изследва честотата на поява на множествени кожни карциноми. При 21 души (5,9%) са намерени повече от един СЦК, а при 15 (4,3%) – СЦК и БЦК. При 5 болни (1,4%) едновременно се развива немеланоцитен карцином (СЦК) и Малигнен Меланом (ММ). При останалите 314 души е диагностициран по 1 тумор, така че 1 болен се приема за 1 случай.

Топографската локализация е представена на Фигура 11.



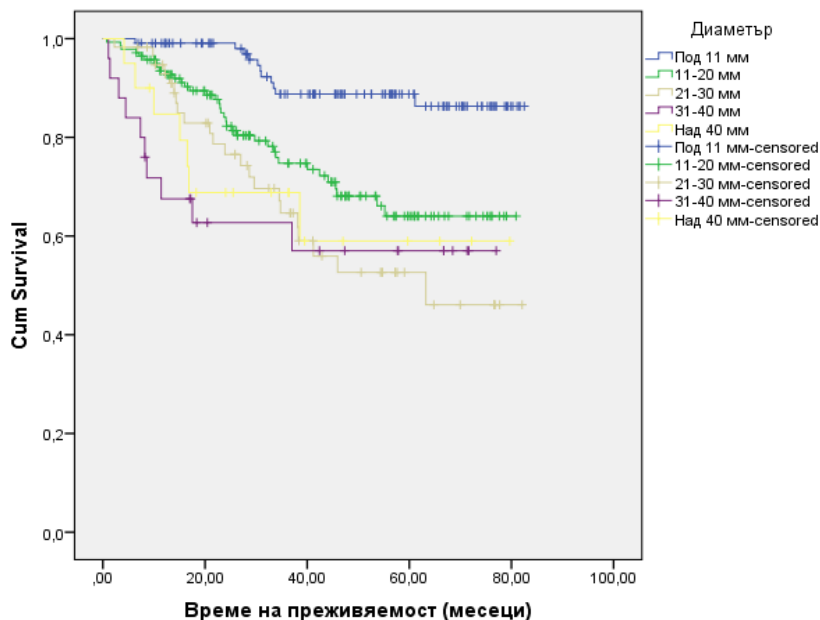
Фигура 11. Разпределение на СЦК според топографската локализация

Впечатление прави високият относителен дял на туморите, засягащи лицевата област (206 СЦК – 58,02%). Специфичната лицева локализация на СЦК е представена на Фигура 12.



Фигура 12. Специфична локализация на СЦК в лицевата област

Установен е среден макроскопски диаметър на туморите 19,86 мм ($\pm 14,34\text{mm}$). Минималният туморен диаметър е 4мм, а максималният – 100мм. Статистическият анализ на данните показва, че разликата между диаметъра на тумора в различните възрастови групи е значителна: $P < 0,05$ (Actual value 0,028). Статистически корелация е открита и между туморния диаметър и общата преживяемост в наблюдаваната група пациенти: $P < 0,05$ (Actual value $p < 0,001$). Резултатът е показан на Фигура 13.



Фигура 13. Връзка между туморен макроскопски диаметър и общата преживяемост на пациентите със СЦК на кожата

Стадирането на случаите е направено според TNM-класификацията на AJCC, 8-ма версия от 2017г. Разпределението на туморите според макроскопския им диаметър, категория Т, е представено в таблица 6.

Таблица 6. Разпределение на туморите спрямо T – категория

T – Категория	N	%
T1	214	60,3
T2	107	30,1
T3	25	7,0
T4	9	2,5
Общо	355	100,0

Най-голям е относителният дял на туморите в категория T1, с диаметър до 20мм – 60,3%. Два пъти по-рядко се срещат тумори в категория T2 с размер 20-40мм – 30,1%.

Разпределението на случаите според наличието на метастази в регионалните лимфни възли, категория N, е представено на таблица 7.

Таблица 7. Разпределение на туморите спрямо N – категория

N – Категория	N	%
N0	343	96,6
N1	8	2,3
N2	2	0,6
N3	2	0,6
Общо	355	100,0

Метастази в лимфните възли се откриват само в 3,4% от разгледаните случаи. Разпределението на случаите според наличието на висцерални метастази, Категория M, е дадено в таблица 8.

Таблица 8. Разпределение на туморите спрямо M – категория

M – Категория	N	%
M0	351	98,9
M1	2	0,6
M2	2	0,6
Общо	355	100,0

Далечни метастази са установени само при 1,2% от проучените пациенти.

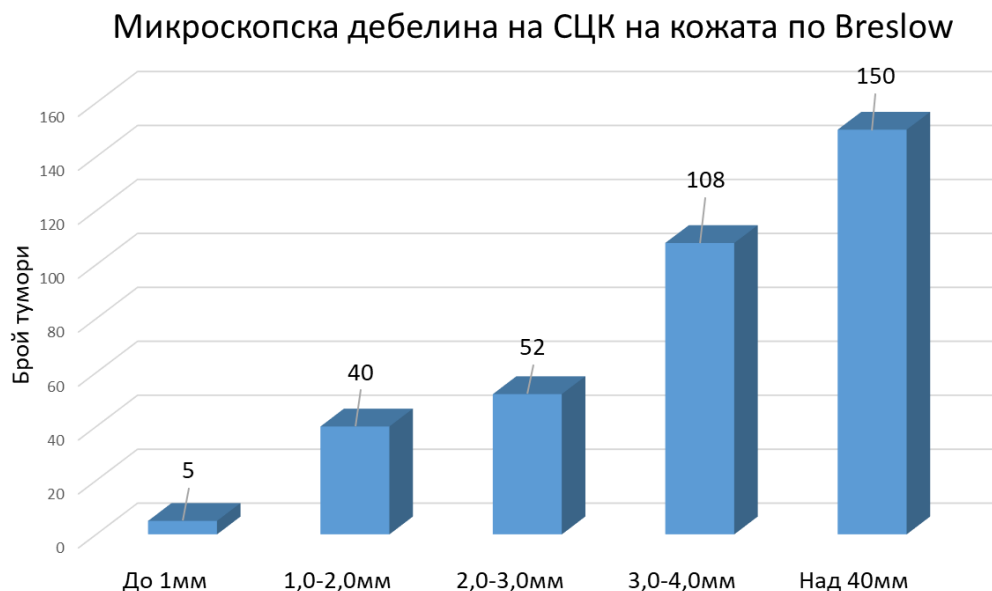
Разпределението на случаите със СЦК на кожата, в зависимост от клиничния стадий, дефиниран според TNM-класификацията, е показано в таблица 9.

Таблица 9. Стадиране на туморите

Стадий	N	%
Стадий I	214	60,3
Стадий II	125	35,2
Стадий III	10	2,8
Стадий IV	6	1,7
Общо	355	100,0

Най-висок е относителният дял на случаите в Стадий I (60,3%), а най-нисък – в Стадий IV (1,7%).

Анализирани са хистологичните особености на туморите. Изследвани са препарати, получени от туморите, оцветени стандартно с хематоксилин-еозин. Разпределението на първичните СЦК на кожата в зависимост от туморната дебелина по скалата на Breslow е показано на фигура 14.



Фигура 14. Микроскопска дебелина на СЦК на кожата

Най-голям е броят на туморите с дебелина по Breslow над 40мм, а най-нисък на туморите с дебелина <1мм. Анализът на данните показва статистически значима връзка между микроскопската дебелина на туморите и възрастта на пациентите: $P < 0,05$ (Actual value 0,001). По-дебели са туморите в групата на възрастните пациенти – 71-80 години.

При анализа на макроскопския диаметър на СЦК и микроскопската дебелина също се установява статистически значима връзка: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$). Колкото е по-голям туморният диаметър, толкова е по-голяма дебелината на тумора. Разпределението на туморите според диаметъра и туморната дебелина е представено на таблица 10.

Таблица 10. Връзка между макроскопския диаметър и микроскопската дебелина на СЦК (Chi-Square Tests)

Диаметър р	Микроскопската дебелина на карцинома						Общо	р
		До 1,0мм	1,0- 2,0мм	2,0- 3,0мм	3,0- 4,0мм	Над 4,0мм		
Под 11 мм	N	5	31	32	39	2	109	<0,001
	%	100,0 %	77,5%	61,5%	36,4%	1,3%	30,8%	
11-20 мм	N	0	8	16	60	57	141	
	%	0,0%	20,0%	30,8%	56,1%	38,0%	39,8%	
21-30 мм	N	0	0	4	8	46	58	
	%	0,0%	0,0%	7,7%	7,5%	30,7%	16,4%	
31-40 мм	N	0	1	0	0	25	26	
	%	0,0%	2,5%	0,0%	0,0%	16,7%	7,3%	
Над 40 мм	N	0	0	0	0	20	20	
	%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	13,3%	5,6%	
Общо	N	5	40	52	107	150	354	
	%	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	

При 302 (85,1%) от туморите се установява инвазивен карцином, а при 53 (14,9%) – “in situ” карцином. В групата на “in situ” карциномите са диагностицирани 1 пациент (2,0%) с актинична кератоза, 4 (7,8%) с Morbus Bowen и 46 (90,2%) с кератоакантом. В групата на инвазивните СЦК 11 пациента (3,8%) имат повърхностно-разпространяващ се карцином, 129 (44,0%) – улцеро-инфилтративен карцином и 153 пациенти (52,2%) са диагностицирани с нодуларен СЦК.

Разпределението на инвазивните СЦК на кожата според хистологичните подтипове по данни от „История на заболяването“ е представено на таблица 11. **Таблица 11. Разпределение на хистологичните типове на инвазивни СЦК по данни от „История на заболяването“.**

Хистологичен тип	N	%
Акантолитичен	8	2,3
Вретеновидноклетъчен	1	0,3
Аденосквамозен	1	0,3
Няма данни	345	97,2
Общо	355	100,0

Установява се много висок дял на СЦК, за които няма данни за хистологичен субтип (97,2%) от „история на заболяването.“

Разпределението на първичните СЦК в зависимост от туморната диференциация (грейдинг) е оценена при 159 случая и е представена на таблица 12.

Таблица 12. Хистологичен грейдинг на туморите

Хистологичен грейдинг	N	%
G1	83	52,2
G2	64	40,3
G3	11	6,9
G4	1	0,6
Общо	159	100,0

Кератинизацията е оценена при 349 карцинома – 309 (88,5%) от тях са кератинизиращи, а 40 (11,5%) – некератинизиращи. В проучената група преобладават кератинизиращите СЦК на кожата.

Оценката на 23 карцинома на пениса, като тумори с по-особено биологично протичане, показва, че най-честата локализация е върху glans penis - 82,6% от случаите, и по-рядко върху тялото на пениса – 17,4%. Според хистопатологичния субтип туморите се разделят на: 8 случая (34,8%) с Erythroplasia на Queyrat, 3 случая (13%) с Bowen-оидна папулоза, и 12 инвазивни карцинома.

Разпределението на случаите според проведеното лечение е следното: при 302 от пациентите (85,1%) е приложено хирургично лечение, а при 53 пациента (14,9%) – комбиниран подход (хирургична ексцизия + лъчетерапия).

В 303 от случаите (85,4%) хирургичната ексцизия е довела до пълно премахване на карцинома. При останалите 52 пациента (14,6%) след хирургичната ексцизия е приложена лъчетерапия поради туморна персистенция. При 41 пациента приложената доза е 50 Gy, при 10 - 60 Gy, а при 1 пациент е приложена 70 Gy лъчетерапевтична доза.

При 11 (3,09%) е приложена системна терапия за лечение на авансирал и метастатичен СЦК. При 7 пациента лечението е представено от класическа полихиомиотерапевтична схема, а 4 пациента са лекувани чрез имунотерапия с PD-1 инхибитор Cemiplimab. Двама от последните пациенти са развили иноперабилни тумори на фона на Epidermolysis bullosa hereditaria, а 1 – на фона на дългогодишно лечение на Есенциална Тромбоцитемия с Хидроксурея.

Приложеният Chi-Square Test за анализ на данните установява, че има статистически значима връзка между макроскопския диаметър на първичния карцином и честотата на използване на лъчетерапия: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$). Необходимостта от лъчетерапия е по-висока при карциноми с макроскопски диаметър над 20 мм.

Анализирани са появата на локален рецидив и метастази след лечение. В хода на проследяването на лекуваните болни със СЦК на кожата, се установява поява на **локален рецидив при 17 пациента (4,8%)**. Времето за рецидивирание е разделено в 3 групи – до 1 година (7 пациента – 41,2%), от 1 до 2 години (8 пациента – 47,1%) и повече от 3 години (2 пациента – 11,8%) след хирургично лечение. Статистическият анализ на данните показва статистически значима връзка между макроскопският диаметър на тумора и времето за поява на рецидив $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$), демонстрирано на таблица 13.

Таблица 13. Съотношение между времето за поява на локален рецидив и макроскопския диаметър на първичния СЦК (Log Rank test, p=0,001)

Диаметър	Средно време (месеци)	95% CI	
Под 11 мм	81,80	0,69	80,45
11-20 мм	83,22	1,65	79,99
21-30 мм	74,52	2,91	68,80
31-40 мм	68,62	4,55	59,70
Над 40 мм	61,67	7,54	46,90

Установена е статистически значима връзка между момента, в който пациента е потърсил медицинска помощ след появата на тумора, и времето за рецидивирание: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$).

Открита е статистически значима връзка между стадия на СЦК и времето за рецидивирание: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,007$). Колкото е по-висок стадия на първичния тумор, толкова е по-кратко времето за поява на локален рецидив.

При 44 пациента с хистологично верифициран първичен СЦК на кожата и уголемени регионални лимфни възли е извършена лимфна биопсия (ексцизионна/тънкоиглена аспирационна биопсия). При 18 от тях (5,1%) са открити локо-регионални метастази в лимфни възли, а при 8 пациента (2,25%) са регистрирани далечни метастатични лезии във вътрешни органи. Установена е статистически значима връзка между развитието на метастази и макроскопския диаметър на първичния СЦК: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$). Резултатът е демонстриран в Таблица 14.

Таблица 14. Статистически значима връзка между макроскопския диаметър на СЦК и развитието на метастатични лезии (Chi-Square Tests)

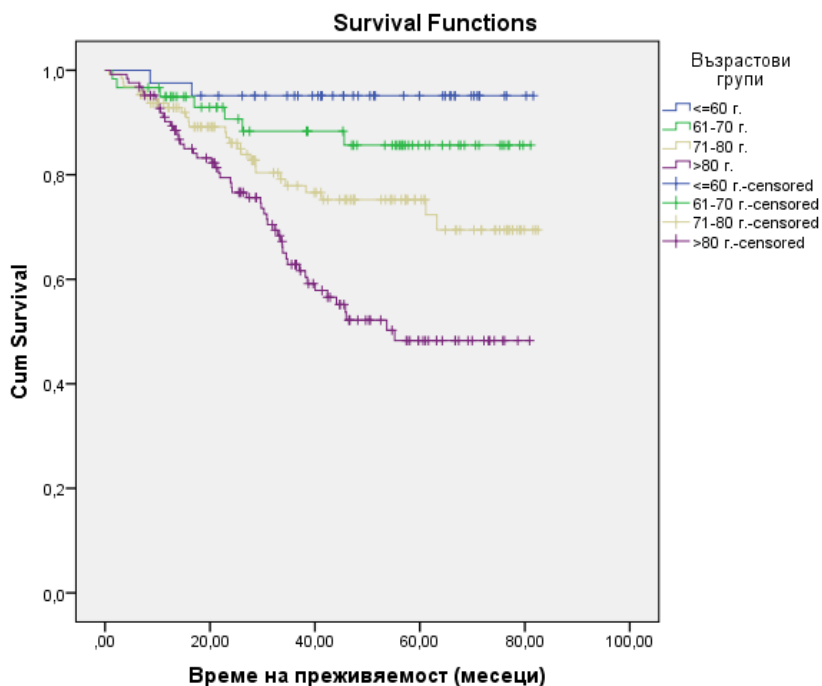
Диаметър	Пациентът развил ли е локо-регионални метастази в лимфни възли?			Общо	P
		Не е развил	Развил е		
Под 11 мм	N	108	1	109	<0,001
	%	32,1%	5,6%	30,8%	
11-20 мм	N	136	5	141	
	%	40,5%	27,8%	39,8%	
21-30 мм	N	56	2	58	
	%	16,7%	11,1%	16,4%	
31-40 мм	N	23	3	26	
	%	6,8%	16,7%	7,3%	
Над 40 мм	N	13	7	20	
	%	3,9%	38,9%	5,6%	
Общо	N	336	18	354	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Анализът на връзката между възрастта на пациентите и времето за поява на рецидив не показва статистически значима корелация между двата показателя: $P > 0.05$ (Actual value $P = 0,656$).

Оценена е онкологичната коморбидност при обследваната от нас група. Установени са 14 пациента (3,94%), които развиват друго малигнено заболяване преди развитието на СЦК на кожата. Един пациент (0,3%) е развил карцином на бял дроб, 1 пациент – мозъчен карцином, 2 пациента (0,6%) – карцином на гърда, 3 пациента – карцином на гастро-интестинален тракт и 7 пациента (2,0%) – карцином на простата.

Анализът на причините за смърт от заболяването в ретроспективен аспект показва, че общо 70 пациента (19,7%) са починали. Двама пациента (0,56%) са починали от тежка Covid-19 инфекция, 42 пациента (11,83%) – от остър съдов инцидент (сърдечен инфаркт/мозъчен инсулт), 13 пациента (3,66%) са починали поради хронични сърдечно-съдова заболявания, 6 пациента (1,69%) са загубили живота си следствие на други малигнени заболявания, а **7 пациента (1,97%) са починали поради авансирал или метастатичен СЦК**. Анализът на средната преживяемост спрямо пола на пациентите със СЦК на кожата не показва статистически значими разлики между мъжки и женски пол: $P > 0.05$ (Actual value $P = 0,216$).

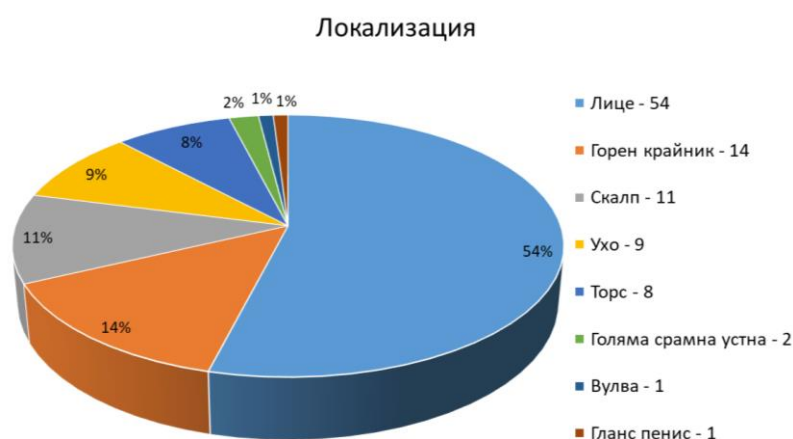
Установена е статистически значима връзка между възрастта на пациентите, диагностицирани със СЦК, в Стадий IV и времето до настъпване на смърт: $P > 0.05$ (Actual value $P = 0,001$). При пациентите ≤ 60 г. средната продължителност на живот до настъпване на смърт е 78,26 месеца, а при тези > 80 г. – 53,30 месеца. Резултатите са демонстрирани на фигура 15.



Фигура 15. Съотношение между възрастта на пациентите със СЦК в Стадий IV и времето до настъпване на смърт (Log Rank test, $p < 0,001$)

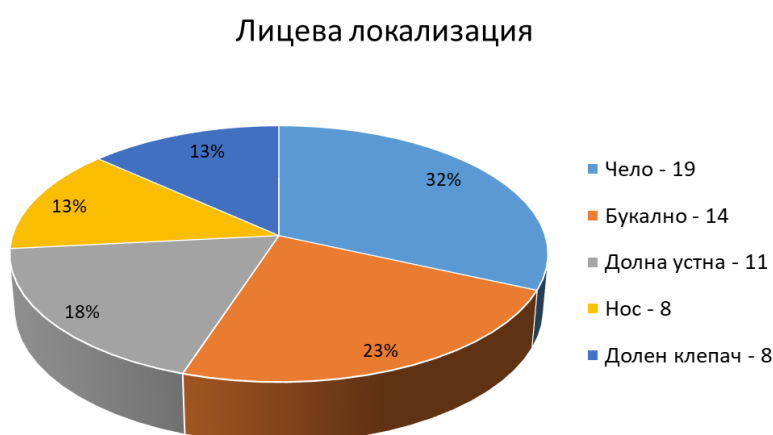
3. Хистологично проучване

Извършено е подробно хистопатологично изследване на 100 инвазивни СЦК. Туморите са разделени в две групи според техния макроскопски диаметър. Група 1 - с макроскопски диаметър <20мм и нисък риск за рецидивирание и метастазиране – 50 бр. и Група 2 – макроскопски диаметър >20мм и висок риск – 50бр. Проучени са локализацията, микроскопската дебелина на тумора, клетъчната диференциация на туморните клетки, периневралната и лимфоваскуларната инвазия, перитуморната лимфоцитната стромна реакция. Разпределението на туморите по локализация е показано на фигура 16.



Фигура 16. Локализация на обследваните 100 СЦК

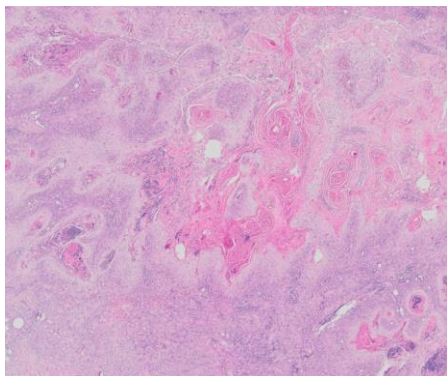
Отново прави впечатление по-големият относителен дял на туморите в областта на главата и шията. Обследваните тумори са разположени в различни области на лицето. На фигура 17 е показана специфичната локализация.



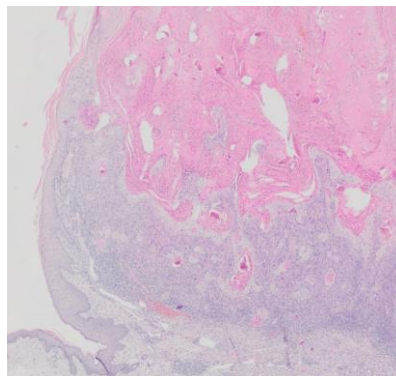
Фигура 17. Специфична лицева локализация на обследваните 100 СЦК

Разпределението на туморите според хистопатологичния субтип е следното: 76 са неспецифичен (класически) тип СЦК (**Фигура 18**), 15 –

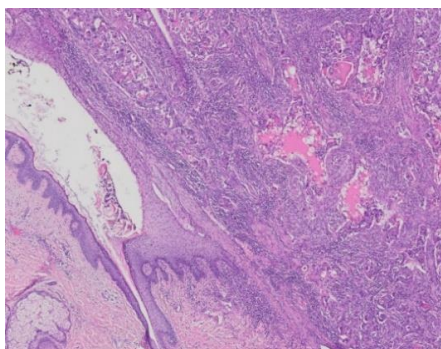
Кератоакантома- like инвазивен СЦК (Фигура 19), 4 – Акантолитичен (Фигура 20), 3 – Верукозен (Фигура 21), 1 е определен като Светло-клетъчен (clear-cell) карцином (Фигура 22) и 1 – Пигментен СЦК (Фигура 23).



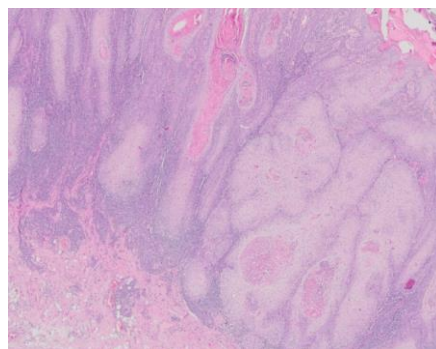
Фигура 18. Класически (неспецифичен) СЦК, Хематоксилин и Еозин (x20)



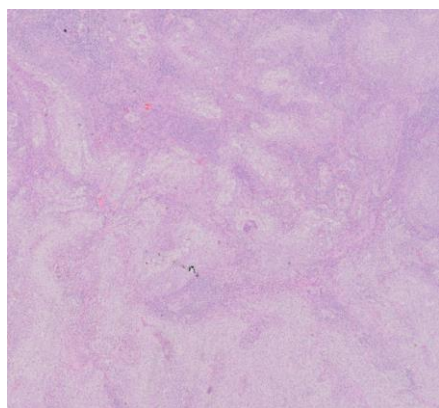
Фигура 19. Кератоакантома- like инвазивен СЦК, Хематоксилин и Еозин (x20)



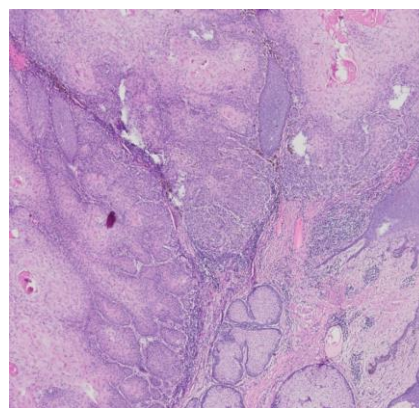
Фигура 20. Акантолитичен СЦК, Хематоксилин и Еозин (x50)



Фигура 21. Верукозен СЦК, Хематоксилин и Еозин (x20)



Фигура 22. Светло-клетъчен (clear-cell) карцином, Хематоксилин и Еозин (x20)



Фигура 23. Пигментен СЦК, Хематоксилин и Еозин (x20)

Морфологичната оценка на туморите установява доминиране на добре – до средно-диференцирани тумори: 71% са добре-диференцирани, 19% са умерено-диференцирани и 10 % са ниско-диференцирани. Анализът на данните не показва статистически значима връзка между хистопатологичния субтип на

СЦК и клетъчната диференциация на туморните клетки: $P < 0,05$ (Actual value 0,069).

Установената средна хистологична дебелина на наблюдаваните тумори според скалата Breslow е 5,92мм ($\pm 3,08$ мм), с минимална стойност 1мм и максимална – 18мм.

Анализът на данните показва статистически значима разлика между дебелината на туморите в Група 1 и Група 2: $P < 0,05$ (Actual value $< 0,001$) с по-дебели тумори в групата на СЦК с макроскопски диаметър > 20 мм. Средната дебелина в групата на ниско-рисковите карциноми е 4,93 ($\pm 2,34$), а в групата на високо-рисковите – 7,13 ($\pm 3,44$). (Таблица 15).

Таблица 15. Разлика между хистологичната дебелина на СЦК в Група 1 и Група 2 (Mann-Whitney Test)

Показател	Макроскопски диаметър	N	Mean	SD	Min	Max	p
хистологична дебелина по Breslow	До 20 мм	55	4,93	2,34	1,00	11,00	$< 0,001$
	Над 20 мм	45	7,13	3,44	1,00	18,00	

Анализът на данните също доказва статистически значима разлика между Breslow нивото на инвазия в групата на класическия (неспецифичен) СЦК и Кератоакантома-like инвазивния СЦК: $P < 0,05$ (Actual value $< 0,001$) с по-дебели класически СЦК (Таблица 16).

Таблица 16. Статистически значима разлика между хистопатологичната дебелина по Breslow при класически СЦК и при Кератоакантома-like инвазивния СЦК (Mann-Whitney Test)

Показател	Хистологичен тип	N	Mean	SD	Min	Max	p
хистологична дебелина по Breslow	Неспецифичен (класически) тип	76	6,47	3,20	2,00	18,00	$< 0,001$
	Кератоакантома-like	15	3,53	1,41	1,00	6,00	

Изследвано е нивото на инвазия на наблюдаваната група от 100 първични СЦК на кожата и са установени 56 тумора достигащи дермата, 36 – хиподермата и 8 тумора засягащи подлежащите тъкани под хиподерма (5 – мускули и 3 – перихондриум). Оценена е лимфоваскуларната и периневралната инвазия на наблюдаваните СЦК. При 7 от туморите е установена лимфоваскуларна инвазия, а при 5 – периневрална. Анализът на данните показва, че има статистически значима връзка между нивото на инвазия и лимфоваскуларната инвазия: $P < 0,05$ (Actual value 0,001). Колкото е по-голяма инвазията, толкова вероятността за лимфоваскуларна инвазия е по-висока. Не се установява значима връзка между макроскопския диаметър в Група 1 и Група 2 и лимфоваскуларната инвазия: $P < 0,05$ (Actual value 0,238) (Таблица 17).

Таблица 17. Зависимост макроскопски диаметър на СЦК (Група 1 и Група 2) и лимфоваскуларна инвазия (Fisher's Exact Test)

Лимфоваскуларна инвазия		Макроскопски диаметър		Общо	p
		До 20 мм	Над 20 мм		
Да	N	2	5	7	0,238
	%	3,6%	11,1%	7,0%	
Не	N	53	40	93	
	%	96,4%	88,9%	93,0%	
Общо	N	55	45	100	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Не се намира статистически значима разлика и между хистопатологичния субтип и лимфоваскуларната инвазия: $P < 0,05$ (Actual value 0,795) (Таблица 18).

Таблица 18. Хистопатологичен субтип на СЦК спрямо лимфоваскуларната инвазия (Fisher's Exact Test)

Хистологичен тип		Лимфоваскуларна инвазия		Общо	p
		Да	Не		
Неспецифичен (класически) тип	N	7	69	76	0,795
	%	100,0%	74,2%	76,0%	
Верукозен	N	0	3	3	
	%	0,0%	3,2%	3,0%	
Акантолитичен	N	0	4	4	
	%	0,0%	4,3%	4,0%	
Кератоакантома-like	N	0	15	15	
	%	0,0%	16,1%	15,0%	
Друг	N	0	2	2	
	%	0,0%	2,2%	2,0%	
Общо	N	7	93	100	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Не се установява статистически значима връзка между клетъчната диференциация на тумора и лимфоваскуларната инвазия: $P < 0,05$ (Actual value 0,320) и между макроскопския диаметър и лимфоваскуларната инвазия: $P < 0,05$ (Actual value 0,129) (Таблица 19).

Таблица 19. Връзка между клетъчната диференциация на СЦК и лимфоваскуларната инвазия (Fisher's Exact Test)

Туморен грейдинг		Лимфоваскуларна инвазия		Общо	p
		Да	Не		
Добре диференциран	N	4	67	71	0,320
	%	57,1%	76,1%	74,7%	
Умерено диференциран	N	3	16	19	
	%	42,9%	18,2%	20,0%	
Слабо диференциран	N	0	5	5	
	%	0,0%	5,7%	5,3%	
Общо	N	7	88	95	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Проучвайки перинеуралната инвазия, се установява статистически значима връзка с нивото на инвазия на туморните клетки: $P < 0,05$ (Actual value 0,006). (Таблица 20).

Таблица 20. Връзка между нивото на инвазия на СЦК и наличието на перинеурална инвазия (Fisher's Exact Test)

Ниво на инвазия		Перинеурална инвазия		Общо	p
		Да	Не		
Дерма	N	0	56	56	0,006
	%	0,0%	58,9%	56,0%	
Хиподерма	N	3	33	36	
	%	60,0%	34,7%	36,0%	
Под Хиподерма	N	2	6	8	
	%	40,0%	6,3%	8,0%	
Общо	N	5	95	100	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Не се открива статистически значима връзка между перинеуралната инвазия и макроскопския диаметър на СЦК: $P < 0,05$ (Actual value 0,086), както и между и хистологичния субтип на СЦК и перинеуралната инвазия: (Actual value 0,744).

Оценена е и перитуморната лимфоцитна стромна реакция. Тя е висока - при 68%, умерено-изразена - при 21%, ниско-изразена - при 10% и липсваща при 1% от наблюдаваните тумори. Не се открива статистически значима връзка между хистологичната дебелина на тумора и лимфоцитната реакция: $P < 0,05$ (Actual value 0,382), както и между двете групи тумори: $P < 0,05$ (Actual value 0,224). (Таблица 21).

Таблица 21. Съотношение между лимфоцитната стромна реакция и макроскопския диаметър в Група 1 и Група 2 (Fisher's Exact Test)

Лимфоцитна стромна реакция		Макроскопски диаметър		Общо	p
		До 20 мм	Над 20 мм		
Липсва	N	1	0	1	0,224
	%	1,8%	0,0%	1,0%	
Слабо изразена	N	5	5	10	
	%	9,1%	11,1%	10,0%	
Умерено изразена	N	15	6	21	
	%	27,3%	13,3%	21,0%	
Силно изразена	N	34	34	68	
	%	61,8%	75,6%	68,0%	
Общо	N	55	45	100	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Анализът на данните показва статистически значима връзка между хирургичния успех и хистологичната дебелина на СЦК по Breslow: $P < 0,05$ (Actual value $< 0,001$), както и макроскопския диаметър на тумора: $P < 0,05$ (Actual value 0,038). Анализът е представен на Таблица 22.

Таблица 22. Зависимост между успеха от хирургичното лечение, хистологичната дебелина на тумора по Breslow и макроскопския диаметър на СЦК (Mann-Whitney Test).

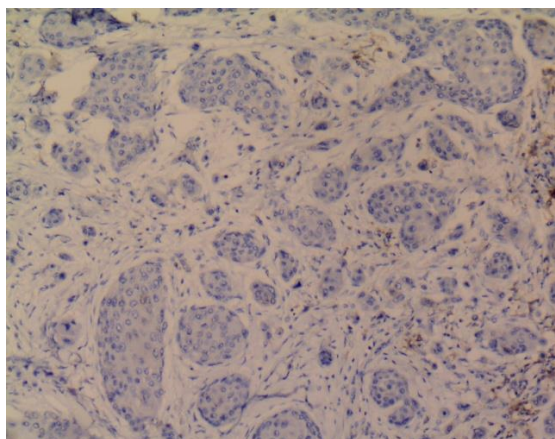
Показател	Ексцезиран ли е напълно	N	Mean	SD	Min	Max	p
Хистологична дебелина по Breslow	Да	85	5,44	2,76	1,00	18,00	$< 0,001$
	Не	15	8,67	3,42	2,00	16,00	
Макроскопски диаметър на тумора в мм	Да	85	22,87	13,20	8,00	100,00	0,038
	Не	15	38,67	26,98	10,00	100,00	

Колкото по-голям е макроскопският диаметър на един СЦК на кожата, и колкото по-дебел е туморът по Breslow, толкова е по-голяма вероятността той да не бъде отстранен хирургически напълно.

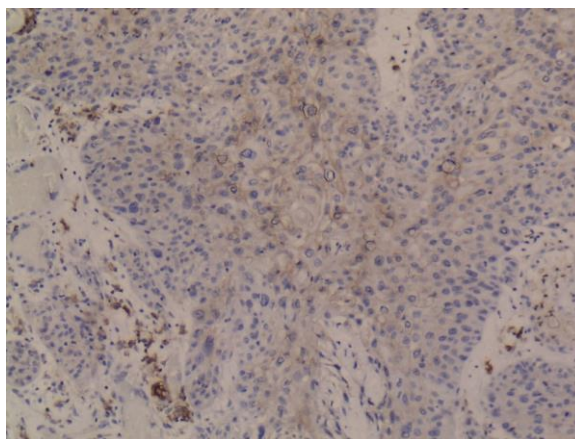
4. Имунохистохимично проучване

Извършено е имунохистохимично (ИХХ) изследване на експресията на PD-L1, PD-1 и CD8 върху хистологичните материали, използвани в хистопатологичното проучване. Отново СЦК са разделени в две групи според техния макроскопски диаметър. Група 1 - с размер <20мм и нисък риск за рецидивизиране и метастазиране и Група 2 – с размер >20мм и висок риск.

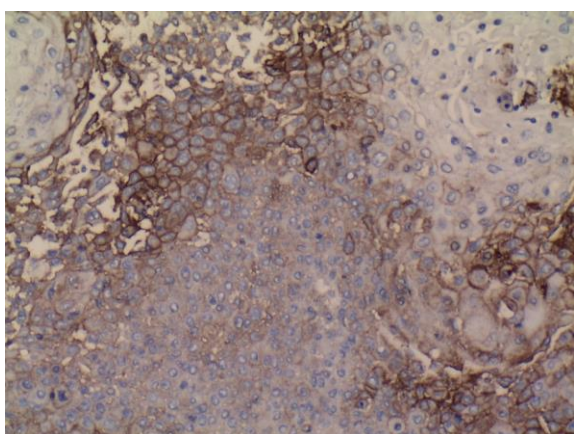
От обследваните тумори, са установени 45 СЦК без PD-L1 експресия ($\leq 1\%$), 35 тумора с ниска експресия (2-10%), 12 СЦК – с умерено висока експресия (11-49%) и 8 случая с висока експресия ($> 50\%$) Различната степен на ИХХ експресия на PD-L1 е показана на Фигури 24, 25, 26 и 27. Използваното анти тяло е Anti-PD-L1 antibody [SP142] - C-terminal, Abcam. Статистическият анализ на данните не установява статистически значима връзка между PD-L1 експресията и хистологичната дебелина по Breslow: $P < 0,05$ (Actual value $P = 0,134$) Резултатите от анализа са показани в Таблица 23.



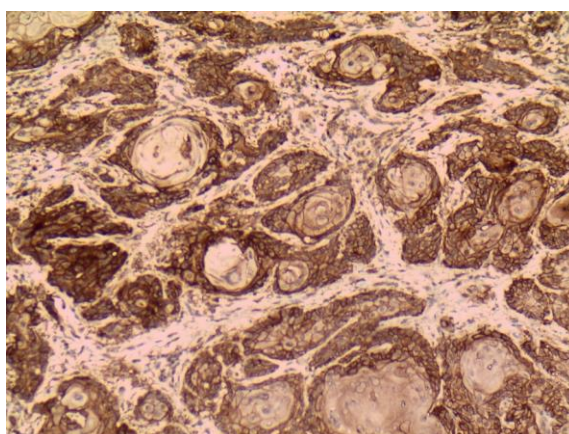
Фигура 24. Липса на PD-L1 експресия при първичен СЦК $\leq 1\%$



Фигура 25. Ниска експресия на PD-L1 2-10%



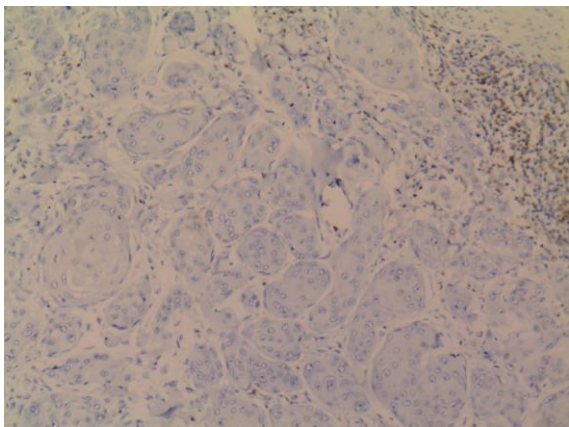
Фигура 26. Умерено висока експресия на PD-L1 11-49%



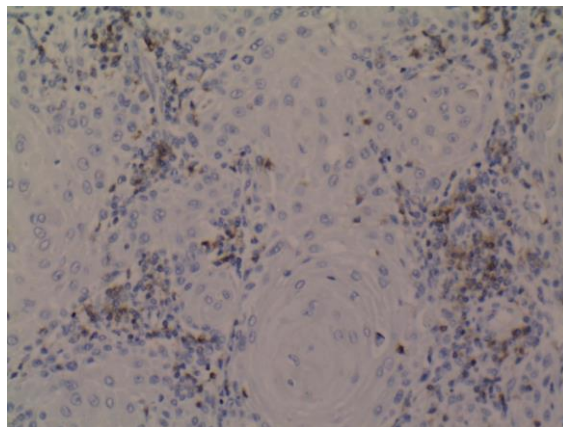
Фигура 27. Висока експресия на PD-L1 $> 50\%$

Относно ИХХ-експресията на PD-1: 10 тумора са без експресия ($\leq 1\%$), 33 са с ниска експресия (2-10%), 27 СЦК – с умерено висока експресия (11-20%), 22 случая – с висока експресия (21-30%) и 8 – с много висока ($> 30\%$).

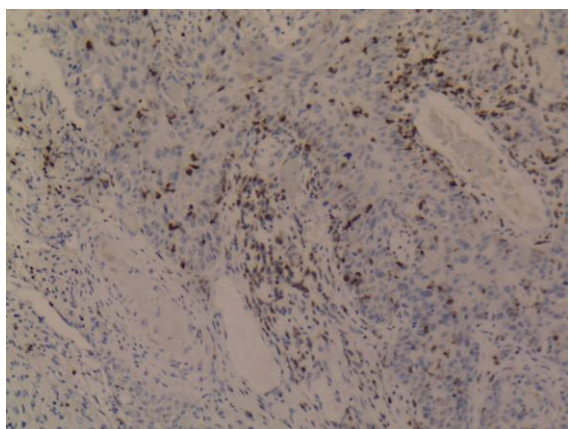
Примери за степента на експресия на PD-1 са представени на Фигури 28, 29, 30, 31 и 32. Използвано е антитяло Anti-PD1 antibody [NAT105], Abcam. Анализът на данните не открива статистически зависима връзка между PD-1 експресията и хистологичната дебелина по Breslow: $P < 0,05$ (Actual value $P = 0,453$) (Таблица 23).



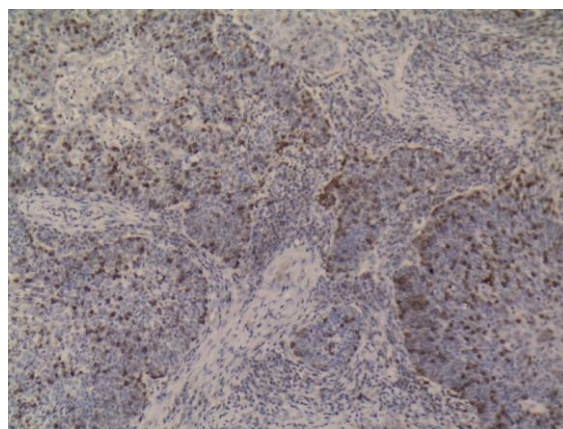
Фигура 28. Липса на PD-1 експресия при първичен СЦК $\leq 1\%$



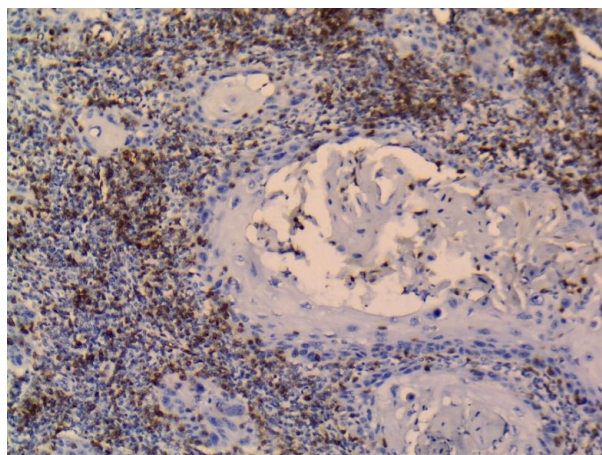
Фигура 29. Ниска PD-1 експресия 2-10%



Фигура 30. Умерено висока експресия на PD-1 11-20%

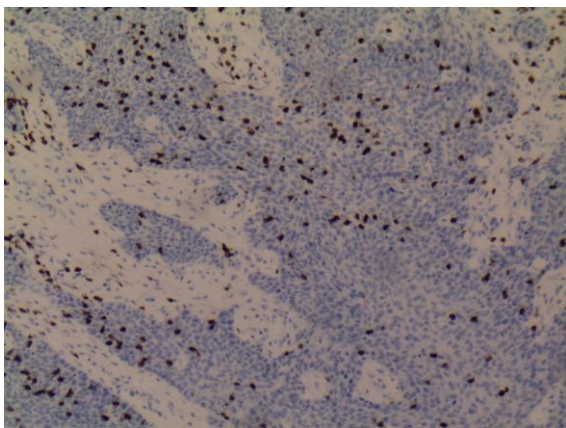


Фигура 31. Висока експресия на PD-1 21-30%

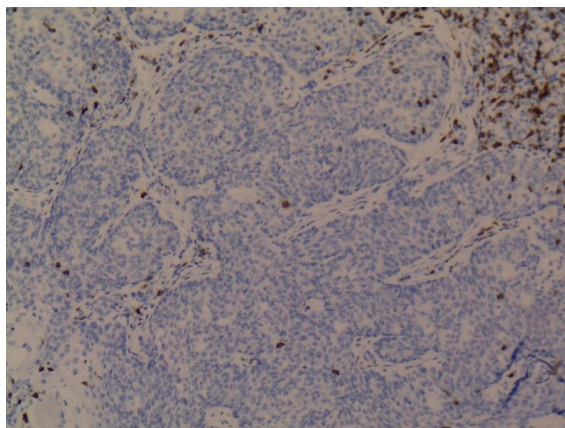


Фигура 32. Много висока експресия на PD-1 $>30\%$

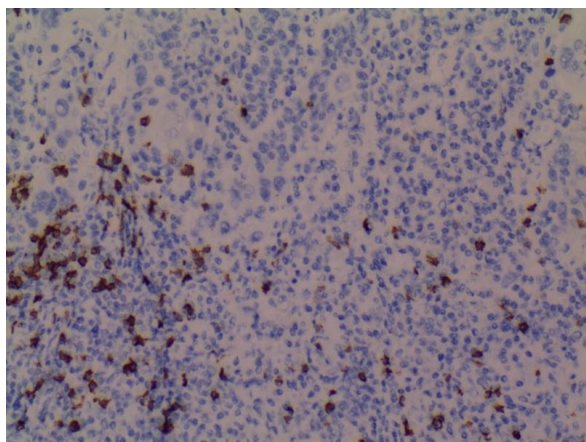
Изследвайки CD8 експресията, бяха установени 1 СЦК без експресия ($\leq 1\%$), 13 тумора с ниска експресия (2-10%), 48 случая с умерено висока експресия (11-39%) и 37 – с висока експресия ($>40\%$). Степента на ИХХ експресия на CD8 е показана на Фигури 33, 34, 35 и 36. Резултатите демонстрират, че липсва статистически значима зависимост между степента на CD8 експресия и хистопатологичната дебелина на първичния СЦК: $P < 0,05$ (Actual value $P = 0,146$) (Таблица 23).



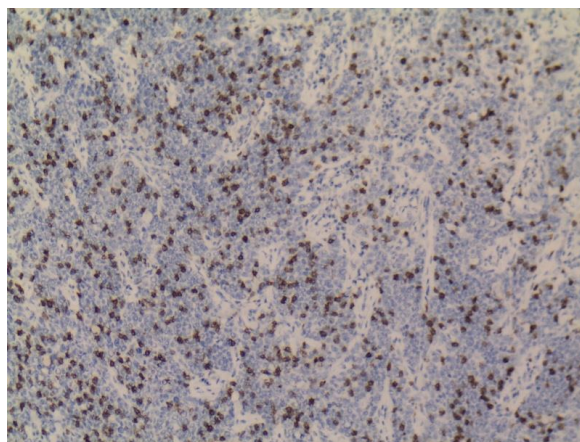
Фигура 33. CD8 експресия при първичен СЦК: Без експресия $\leq 1\%$



Фигура 34. CD8 експресия при първичен СЦК: Ниска експресия 2-10%



Фигура 35. CD8 експресия при първичен СЦК: Умерено висока експресия 11-39%



Фигура 36. CD8 експресия при първичен СЦК: Висока експресия $> 40\%$

Таблица 23. Съотношение между имунохистохимичната експресия на PD-1, PD-L1 и CD8 и хистологичната дебелина по Breslow на първичния СЦК

PD-L1	N	Breslow дълбочина на инвазия				
		Mean	SD	Min	Max	
Без експресия $\leq 1\%$	45	6,16	3,3	1	18	P=0,134
Ниска експресия 2-10%	35	5,37	2,24	2	10	
Умерено висока експресия 11-49%	12	6,83	3,41	2	11	
Висока експресия $> 50\%$	8	6,5	4,85	3	16	
PD-1						
Без експресия $\leq 1\%$	10	5,9	3,28	2	11	P=0,453
Ниска експресия 2-10%	33	6,12	2,58	3	13	
Умерено висока експресия 11-20%	27	5,37	2,44	1	11	
Висока експресия 21-30%	22	6,32	4,54	1	18	
Много висока експресия $> 30\%$	8	5,71	2,06	4	9	
CD8						
Без експресия $\leq 1\%$	2	10	0	10	10	P=0,146
Ниска експресия 2-10%	13	7,15	2,79	4	13	
Умерено висока експресия 11-39%	48	5,6	3,17	1	18	
Висока експресия $> 40\%$	37	5,78	3,03	2	16	

СЦК с по-голяма дълбочина на инвазия показват по-висока PD-L1 и PD-1 ИХХ-експресия, а по-тънките карциноми демонстрират по-висока CD8 експресия.

Сравнявайки Група 1 и Група 2 не установява статистически значима разлика между макроскопския диаметър на СЦК и експресията на PD-L1 (P=0,464), PD-1 (P=0,696) и CD8 (P=0,390). Резултатите са демонстрирани на Таблицы 24, 25 и 26.

Таблица 24. Съотношение между PD-L1 експресията на туморните клетки в Група 1 и Група 2

PD-L1 експресия на туморни клетки		Макроскопски диаметър		Общо	p
		До 20 мм	Над 20 мм		
Без експресия $\leq 1\%$	N	23	22	45	0,464
	%	43,4%	48,9%	45,9%	
С ниска експресия 2-10%	N	24	11	35	
	%	45,3%	24,4%	35,7%	
Умерено висока експресия 11-49%	N	3	9	12	
	%	5,7%	20,0%	12,2%	
Висока експресия $> 50\%$	N	3	3	6	
	%	5,7%	6,7%	6,1%	
Общо	N	55	45	100	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 25. Липса на статистически разлика между PD-1 експресията на цитотоксичните лимфоцити в Група 1 и Група 2

PD-1 експресия на цитотоксични лимфоцити		Макроскопски диаметър		Общо	p
		До 20 мм	Над 20 мм		
Без експресия $\leq 1\%$	N	6	4	10	0,696
	%	11,1%	8,9%	10,1%	
С ниска експресия 2-10%	N	18	15	33	
	%	33,3%	33,3%	33,3%	
Умерено висока експресия 11-20%	N	12	15	27	
	%	22,2%	33,3%	27,3%	
Висока експресия 21-30%	N	13	9	22	
	%	24,1%	20,0%	22,2%	
Много висока експресия $>30\%$	N	5	2	7	
	%	9,3%	4,4%	7,1%	
Общо	N	55	45	100	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 26. Разлика в CD8 експресията на СЦК спрямо макроскопския диаметър на тумора

CD8 експресия на цитотоксични лимфоцити		Макроскопски диаметър		Общо	p
		До 20 мм	Над 20 мм		
Без експресия $\leq 1\%$	N	1	0	1	0,390
	%	1,9%	0,0%	1,0%	
С ниска експресия 2-10%	N	5	8	13	
	%	9,3%	17,8%	13,1%	
Умерено висока експресия 11-39%	N	29	19	48	
	%	53,7%	42,2%	48,5%	
Висока експресия $> 40\%$	N	19	18	37	
	%	35,2%	40,0%	37,4%	
Общо	N	55	45	100	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Десет от наблюдаваните СЦК са ниско-диференцирани, 19 – умерено-диференцирани и 71 тумора - добре-диференцирани. Анализът на данните не открива статистически значима разлика между туморния грейдинг и експресията на PD-L1 ($P=0,277$), PD-1 ($P=0,552$) и CD8 ($P=0,889$). От добре-диференцираните СЦК само 49% показват PD-L1 експресия, докато 90% от

ниско-диференцираните са PD-L1 позитивни. Анализирайки лимфоваскуларната инвазия не се установяват статистически значими връзки с PD-L1 ($P=0,065$), PD-1 ($P=0,825$) и CD8 имунохистохимичната експресия ($P=0,548$). Резултатите са демонстрирани на Таблица 27, Таблица 28 и Таблица 29.

Таблица 27. Липса на статистическа зависимост между PD-L1 експресията на туморните клетки и лимфоваскуларната инвазия

PD-L1 експресия на туморни клетки		Лимфоваскуларна инвазия		Общо	p
		Да	Не		
Без експресия $\leq 1\%$	N	3	42	45	0,065
	%	42,9%	46,2%	45,9%	
С ниска експресия 2-10%	N	1	34	35	
	%	14,3%	37,4%	35,7%	
Умерено висока експресия 11-49%	N	3	9	12	
	%	42,9%	9,9%	12,2%	
Висока експресия $> 50\%$	N	0	6	6	
	%	0,0%	6,6%	6,1%	
Общо	N	7	91	98	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 28. Липса на статистическа зависимост между PD-1 експресията на цитотоксичните лимфоцити и лимфоваскуларната инвазия

PD-1 експресия на цитотоксични лимфоцити		Лимфоваскуларна инвазия		Общо	p
		Да	Не		
Без експресия $\leq 1\%$	N	0	10	10	0,825
	%	0,0%	10,9%	10,1%	
С ниска експресия 2-10%	N	2	31	33	
	%	28,6%	33,7%	33,3%	
Умерено висока експресия 11-20%	N	2	25	27	
	%	28,6%	27,2%	27,3%	
Висока експресия 21-30%	N	2	20	22	
	%	28,6%	21,7%	22,2%	
Много висока експресия $> 30\%$	N	1	6	7	
	%	14,3%	6,5%	7,1%	
Общо	N	7	92	99	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 29. Липса на статистическа зависимост между CD8 ИХХ-експресия и лимфоваскуларната инвазия.

CD8 експресия на тумора (лимфоцитите)		Лимфоваскуларна инвазия		Общо	p
		Да	Не		
Без експресия $\leq 1\%$	N	0	1	1	0,548
	%	0,0%	1,1%	1,0%	
С ниска експресия 2-10%	N	2	11	13	
	%	28,6%	12,0%	13,1%	
Умерено висока експресия 11-39%	N	2	46	48	
	%	28,6%	50,0%	48,5%	
Висока експресия $> 40\%$	N	3	34	37	
	%	42,9%	37,0%	37,4%	
Общо	N	7	92	99	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Проучвайки ИХХ- експресията на PD-L1 и периневралната инвазия не се установява статистически значима връзка ($P=0,284$). Резултатът е демонстриран на Таблица 30.

Таблица 30. ИХХ експресия на PD-L1 спрямо наличие на периневрална инвазия

PD-L1 експресия на туморни клетки?		Периневрална инвазия		Общо	p
		Да	Не		
Без експресия $\leq 1\%$	N	4	41	45	0,284
	%	80,0%	44,1%	45,9%	
С ниска експресия 2-10%	N	0	35	35	
	%	0,0%	37,6%	35,7%	
Умерено висока експресия 11-49%	N	1	11	12	
	%	20,0%	11,8%	12,2%	
Висока експресия $> 50\%$	N	0	6	6	
	%	0,0%	6,5%	6,1%	
Общо	N	5	93	98	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Не се открива връзка между периневралната инвазия и експресията на PD-1 от цитотоксичните лимфоцити: $P=0,710$ (Таблица 31).

Таблица 31. ИХХ експресия на PD-1 спрямо наличие на перинеурална инвазия

PD-1 експресия на цитотоксични лимфоцити	Перинеурална инвазия		Общо	p
		Да	Не	
Без експресия $\leq 1\%$	N	0	10	0,710
	%	0,0%	10,6%	
С ниска експресия 2-10%	N	3	30	
	%	60,0%	31,9%	
Умерено висока експресия 11-20%	N	1	26	
	%	20,0%	27,7%	
Висока експресия 21-30%	N	1	21	
	%	20,0%	22,3%	
Много висока експресия $>30\%$	N	0	7	
	%	0,0%	7,4%	
Общо	N	5	94	
	%	100,0%	100,0%	

Не се установява статистическа зависимост между перинеуралната инвазия и също CD8 експресията на перитуморните лимфоцити: $P=0,327$. Резултатите са показани на Таблица 32.

Таблица 32. ИХХ експресия на CD8 спрямо наличие на перинеурална инвазия

CD8 експресия на тумора (лимфоцитите)	Перинеурална инвазия		Общо	p
		Да	Не	
Без експресия $\leq 1\%$	N	0	1	0,327
	%	0,0%	1,1%	
С ниска експресия 2-10%	N	2	11	
	%	40,0%	11,7%	
Умерено висока експресия 11-39%	N	2	46	
	%	40,0%	48,9%	
Висока експресия $> 40\%$	N	1	36	
	%	20,0%	38,3%	
Общо	N	5	94	
	%	100,0%	100,0%	

Анализирайки възпалителната реакция около първичния СЦК, се установява че лимфоцитната стромна реакция при 2 СЦК липсва, при 9 е слаба, при 21 тумора – умерена и при 68 – висока. Анализът на данните не открива статистически значима връзка с PD-L1 ($P=0,637$) и PD-1 ($P=0,491$) ИХХ-експресия (Таблица 33 и Таблица 34).

Таблица 33. Връзка между PD-L1 експресията на туморните клетки и лимфоцитната стромна реакция

PD-L1 експресия на туморни клетки		Лимфоцитна стромна реакция				Общо	p
		Липсва	Слабо изразена	Умерено изразена	Силно изразена		
Без експресия ≤1%	N	2	5	13	27	47	0,637
	%	100,0%	55,6%	61,9%	38,8%	45,9%	
С ниска експресия 2-10%	N	0	2	6	27	35	
	%	0,0%	22,2%	28,6%	40,3%	35,7%	
Умерено висока експресия 11-49%	N	0	2	1	9	12	
	%	0,0%	22,2%	4,8%	13,4%	12,2%	
Висока експресия > 50%	N	0	0	1	5	6	
	%	0,0%	0,0%	4,8%	7,5%	6,1%	
Общо	N	2	9	21	68	100	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 34. Връзка между PD-1 експресията на цитотоксичните лимфоцити и лимфоцитната стромна реакция

PD-1 експресия на цитотоксични лимфоцити		Лимфоцитна стромна реакция				Общо	p
		Липсва	Слабо изразена	Умерено изразена	Силно изразена		
Без експресия ≤1%	N	0	1	3	6	10	0,491
	%	0,0%	10,0%	15,0%	8,8%	10,1%	
С ниска експресия 2-10%	N	1	6	9	17	33	
	%	100,0%	60,0%	45,0%	25,0%	33,3%	
Умерено висока експресия 11-20%	N	0	1	5	21	27	
	%	0,0%	10,0%	25,0%	30,9%	27,3%	
Висока експресия 21-30%	N	0	2	2	18	22	
	%	0,0%	20,0%	10,0%	26,5%	22,2%	
Много висока експресия >30%	N	0	0	1	6	7	
	%	0,0%	0,0%	5,0%	8,8%	7,1%	
Общо	N	1	10	20	68	99	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

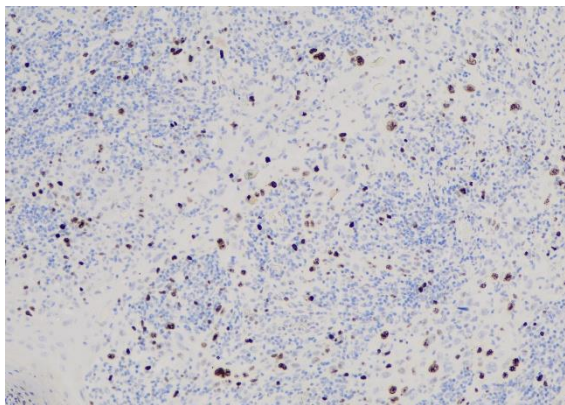
Анализът установява статистически значима връзка между CD8 ИХХ експресия и лимфоцитната стромна реакция: $P < 0,05$ (Actual value $P = 0,011$), което е показано на Таблица 35.

Таблица 35. Статистически зависима връзка между CD8 експресия на перитуморните лимфоцити и лимфоцитната стромна реакция

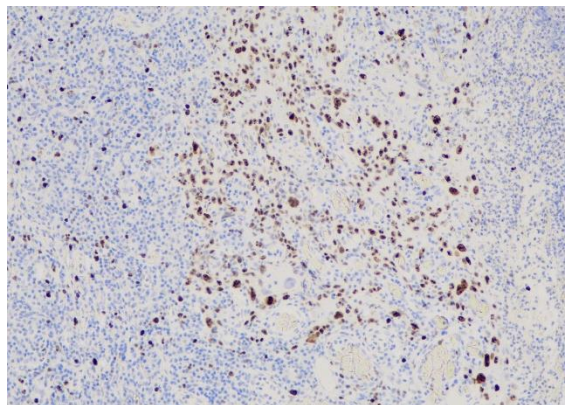
CD8 експресия на тумора (лимфоцитите)		Лимфоцитна стромна реакция				Общо	p
		Липсва	Слабо изразена	Умерено изразена	Силно изразена		
Без експресия $\leq 1\%$	N	0	0	1	0	1	0,011
	%	0,0%	0,0%	4,8%	0,0%	1,0%	
С ниска експресия 2-10%	N	1	3	4	5	13	
	%	100,0%	30,0%	19,0%	7,5%	13,1%	
Умерено висока експресия 11-39%	N	0	7	10	31	48	
	%	0,0%	70,0%	47,6%	46,3%	48,5%	
Висока експресия $> 40\%$	N	0	0	6	31	37	
	%	0,0%	0,0%	28,6%	46,3%	37,4%	
Общо	N	1	10	21	67	99	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Извършено е ИХХ изследване на експресията на Ki-67, CD4 и съотношението CD4:CD8 върху 70 от хистологичните материали, използвани в хистопатологичното проучване. Отново СЦК са разделени в Група 1 и Група 2. Проучването има за цел да установи дали има статистически зависима връзка между експресията на Ki-67, CD4 и съотношението CD4:CD8 при първичен СЦК и клинично-патологичните прогностични фактори за рецидивирание, метастазирание и смъртност.

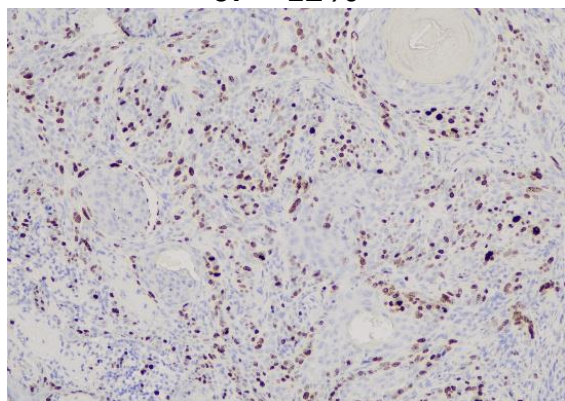
Изследвайки Ki-67 експресията, бе установено, че от ниско-рисковите карциноми 21 показват ниска експресия ($< 10\%$), 6-умерена експресия (10-25%) и 8 – висока експресия $> 25\%$. Нито един от високорисковите не показва ниска експресия, 11 са с умерена експресия и 25 – с много висок пролиферативен индекс $> 25\%$. Степента на ИХХ експресия на Ki-67 е демонстрирана на фигури 37, 38, 39, 40, 41, 42 и 43. Анализът на данните откри статистическа значима разлика между Ki-67 експресията в двете групи: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$). (Таблица 36). Интересен факт е, че установихме хетерогенни СЦК, които едновременно имат туморна ядра с много висок пролиферативен индекс и такива – с много нисък.



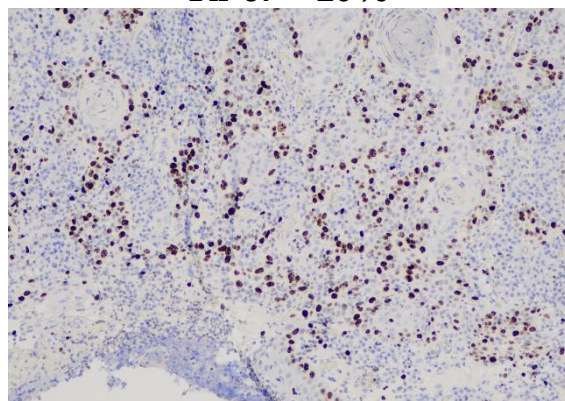
Фигура 37. Ниска експресия на Ki-67 – 12%



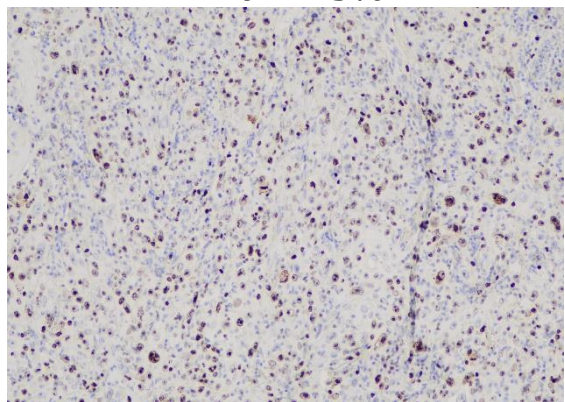
Фигура 38. Умерена експресия на Ki-67 – 20%



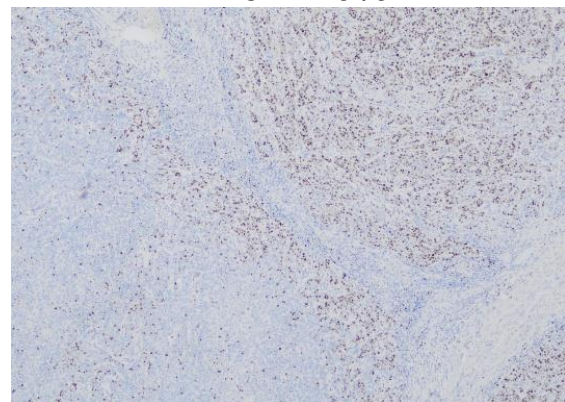
Фигура 39. Висока експресия на Ki-67 – 25%



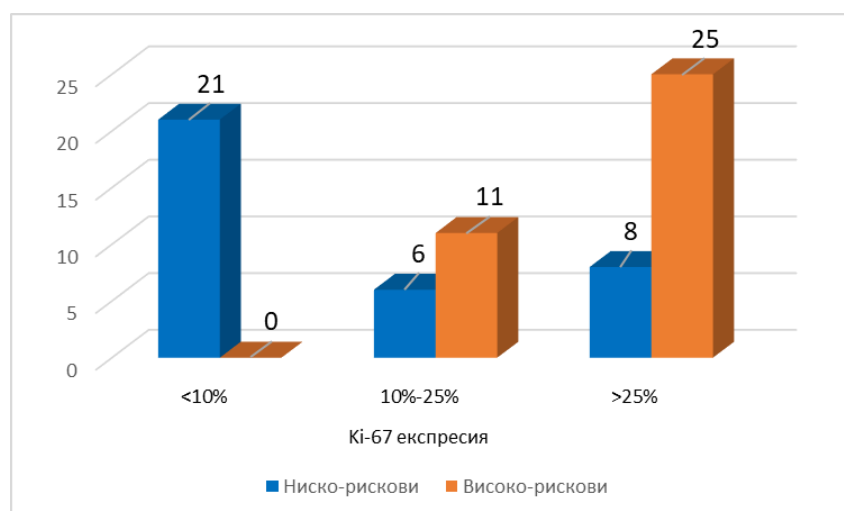
Фигура 40. Висока експресия на Ki-67 – 40%



Фигура 41. Много висока експресия на Ki-67 – 70%



Фигура 42. Хетерогенен тумор: Ядра с много висока и ядра с ниска експресия на Ki-67

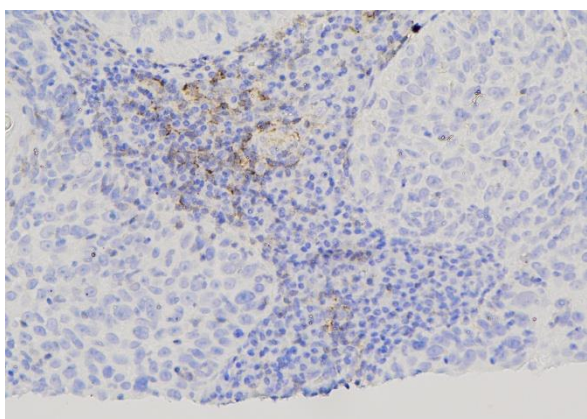


Фигура 43. Разпределение на ИХХ-експресията на Ki-67 от ниско-рисковите и високо-рисковите СЦК

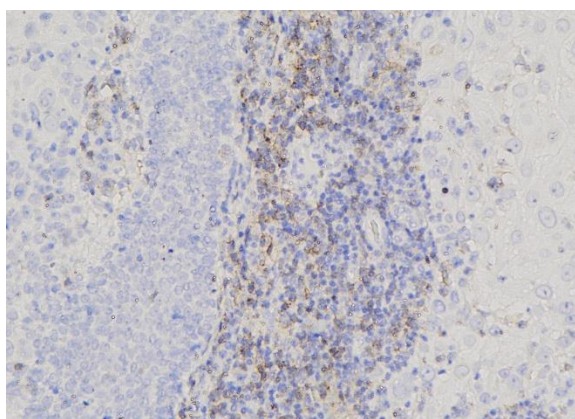
Таблица 36. Статистически значима разлика между Ki-67 експресията в двете групи

Показател	Какъв е туморът?	N	Mean	SD	Min	Max	p
Какъв е пролиферативният индекс спрямо Ki67 експресията в %?	Ниско-рисков	35	14,49	15,60	1,00	50,00	<0,001
	Високо-рисков	35	45,71	25,45	15,00	90,00	

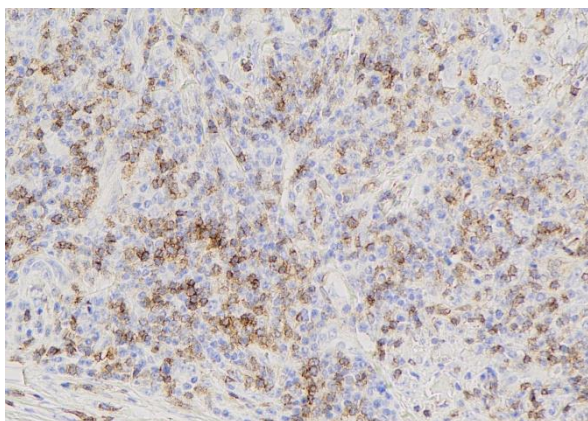
Относно CD4 експресията, установихме минимална стойност 10% и максимална – 60% при ниско-рисковите, и минимална стойност 5% и максимална – 60% от високо-рисковите СЦК. Различната степен на ИХХ експресия на PD-L1 е показана на Фигури 44, 45, 46 и 47. Статистическият анализ на данните не установява статистически значима връзка между CD4 експресията в двете групи: $P < 0,05$ (Actual value $P = 0,355$). Резултатите от анализа са показани в Таблица 37.



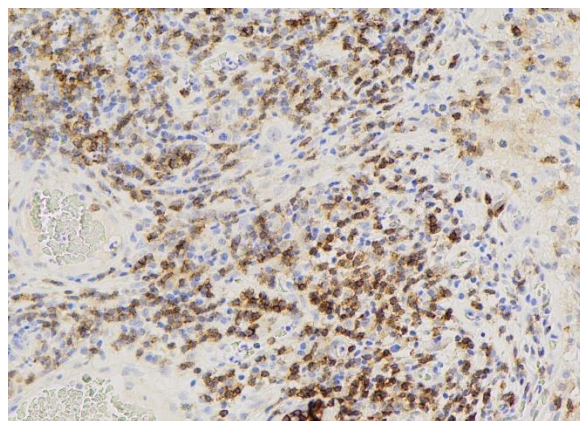
Фигура 44. Ниска експресия на CD4 – 10%



Фигура 45. Умерена експресия на CD4 – 20%



Фигура 46. Висока експресия на CD4 – 40%



Фигура 47. Много висока експресия на CD4 – 60%

Таблица 37. Липса на статистически значима разлика в CD4 експресията между двете групи

Показател	Какъв е туморът?	N	Mean	SD	Min	Max	p
Каква е експресията на CD4 от лимфоцитния инфилтрат около тумора в %?	Ниско-рисков	35	32,29	18,60	10,00	60,00	0,355
	Високо-рисков	35	28,43	15,89	5,00	60,00	

Изследвайки съотношението CD4:CD8 на избраните СЦК, се установи средна стойност от 1,54 при ниско-рисковите тумори и 1,12 при високо-рисковите. Анализът на данните установява статистически значима разлика между двете групи тумори: $P < 0,05$ (Actual value $P = 0,022$). Резултатите от анализа са показани в Таблица 38.

Таблица 38. Статистически значима разлика в съотношението CD4:CD8 при ниско-рискови и високо-рискови СЦК

Показател	Какъв е туморът?	N	Mean	SD	Min	Max	p
Какво е съотношението CD4/CD8 от лимфоцитите около тумора?	Ниско-рисков	35	1,54	0,85	0,30	3,00	0,022
	Високо-рисков	35	1,12	0,86	0,30	4,00	

Изследвайки ИХХ експресията на Ki-67, CD4 и съотношението CD4:CD8 и туморната диференциация, не се установява статистически значима разлика между добре диференцираните, умерено диференцираните и ниско-диференцираните СЦК. Резултатът е представен на Таблица 39.

Таблица 39. Липса на статистически значима разлика между експресията на Ki-67, CD4 и съотношението CD4:CD8 и туморната диференциация.

Показател	Туморът с какъв грейдинг е?	N	Mean	SD	Min	Max	p
Какъв е пролиферативният индекс спрямо Ki67 експресията в %?	Добре диференциран	55	28,15	24,08	1,00	75,00	0,088
	Умерено диференциран	8	33,00	33,54	5,00	85,00	
	Ниско диференциран	4	62,50	31,75	35,00	90,00	
Каква е експресията на CD4 от лимфоцитния инфилтрат около тумора в %?	Добре диференциран	55	31,09	15,86	10,00	60,00	0,852
	Умерено диференциран	8	31,25	20,13	10,00	50,00	
	Ниско диференциран	4	37,50	25,98	15,00	60,00	
Какво е съотношението CD4/CD8 от лимфоцитите около тумора?	Добре диференциран	55	1,39	0,93	0,30	4,00	0,514
	Умерено диференциран	8	1,20	0,58	0,30	1,70	
	Ниско диференциран	4	1,60	0,12	1,50	1,70	

Сравнявайки Ki-67, CD4 и съотношението CD4:CD8 с хистологичната дебелина по Breslow установихме статистически значима връзка с експресията на Ki-67: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$). Подобна корелация не установихме с експресията на CD4 (Actual value $P = 0,624$) и съотношението CD4:CD8 (Actual value $P = 0,097$). Резултатът е представен на таблица 40.

Таблица 40. Статистически значима връзка между хистологичната дебелина по Breslow и експресията на Ki-67

Каква е точната хистологична дебелина по Breslow на тумора?	Какъв е пролиферативният индекс спрямо Ki67 експресията в %?	Каква е експресията на CD4 от лимфоцитния инфилтрат около тумора в %?	Какво е съотношението CD4/CD8 от лимфоцитите около тумора?
R	0,735	-0,060	0,200
p	<0,001	0,624	0,097
N	70	70	70

Анализирайки лимфоцитната стромна реакция около СЦК, се установява статистически значима връзка с експресията на CD4: $P < 0,05$ (Actual value $P = 0,020$) и съотношението CD4:CD8: (Actual value $P = 0,010$), но липса на корелация с експресията на Ki-67: (Actual value $P = 0,577$). Резултатът е представен на Таблица 41.

Таблица 41. Статистическа корелация между експресията на CD4 и съотношението CD4:CD8 с лимфоцитната стромна реакция около СЦК

Показател	Оценка на лимфоцитна стромна реакция	N	Mean	SD	Min	Max	p
Какъв е пролиферативният индекс спрямо Ki67 експресията в %?	Слабо изразена	5	30,60	40,53	1,00	75,00	0,577
	Умерено изразена	6	38,33	37,24	5,00	85,00	
	Силно изразена	59	29,22	24,00	2,00	90,00	
Каква е експресията на CD4 от лимфоцитния инфилтрат около тумора в %?	Слабо изразена	5	17,00	2,74	15,00	20,00	0,020
	Умерено изразена	6	46,67	13,66	30,00	60,00	
	Силно изразена	59	29,83	17,19	5,00	60,00	
Какво е съотношението CD4/CD8 от лимфоцитите около тумора?	Слабо изразена	5	1,30	0,27	1,00	1,50	0,010
	Умерено изразена	6	2,23	0,61	1,70	3,00	
	Силно изразена	59	1,24	0,88	0,30	4,00	

Статистическа обработка на данните показва прагово ниво на съотношението CD4:CD8 (cutoff level) от 1,3 в наблюдаваната група тумори с най-голяма статистически значима разлика между двете групи: $P < 0,05$ (Actual value $P = 0,002$). Резултатът е представен на Таблица 42.

Таблица 42. Прагово ниво на съотношението CD4:CD8 при СЦК

CD4/CD8		Какъв е туморът?		Общо	p
		Ниско-рисков	Високо-рисков		
≤ 1.3	N	11	24	35	0,002
	%	31,4%	68,6%	50,0%	
> 1.3	N	24	11	35	
	%	68,6%	31,4%	50,0%	
Общо	N	35	35	70	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

V. ОБСЪЖДАНЕ

Епидемиологично и клинично проучване

Спиноцелуларният карцином на кожата е представител от групата на немеланоцитните кожни карциноми и заема около 30% от туморите в нея. Това е и второто по честота неопластично заболяване в САЩ, с над 1 милион случая годишно. Повечето епидемиологични проучвания показват, че мъжкият пол е по-засегнат. През последните 40 години се установява тенденция за увеличаване на честотата на СЦК. Мъжете развиват по-често СЦК в областта на главата и шията. В Австралия е установена честота на СЦК 499/100 000 мъже и 291/100 000 жени. Данни от Европейският Съюз демонстрират, че честотата на СЦК варира от 9 до 96 на 100 000 при мъжкия пол и от 5 до 68 на 100 000 при женския пол. Спиноцелуларният карцином на кожата е заболяване характерно за популацията със светъл фототип по Fitzpatrick (I-III). Поради това честотата е по-висока сред бялата раса и в области със силно слънцегреене.

Нашите резултати върху регистрираните пациенти с НМКК в Онкологичен регистър към Онкологичен Център в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен за периода 2000 – 2023 г. представят 5748 пациенти. Подобно на данните на Hussain и сътр. (2010), в проучената кохорта превалява мъжкият пол – 3055 мъже и 2693 жени. За изследвания 24-годишен период средно годишно са диагностицирани 243,2 пациента с НМКК. Прави впечатление рязък спад в броя на новорегистрираните пациенти през 2020г. и 2021г. и последващо рязко повишение през 2022г. Тези резултати корелират с резултатите на Jennyfa K. Ali и John C. Riches (2020), които описват влиянието на Ковид-19 пандемията върху диагностицирането и проследяването на онкологично-болни пациенти. Техните резултати показват спад с 42% на новодиагностицирани пациенти през 2021г., което съответства напълно на нашите резултати. При регистрираните 5748 болни, прави впечатление най-високият относителен дял на БЦК – 66,6%, последван от СЦК – 28,5%, което съответства на резултатите на Chorchadosobos и сътр. от САЩ (2020). Те описват повишение до почти 30% на СЦК и почти 70% на БЦК от групата на НМКК.

Според TNM класификацията, прави впечатление най-високият относителният дял на туморите в T1 – 66,6%, N0 – 98,9% и M0 – 99,8%, а според клиничния стадий на заболяването - Стадий I – 64,8%. Най-нисък е дялът на пациентите с метастатични лезии във вътрешни органи – Стадий IV (0,5%). Тези резултати напълно отговарят на резултатите на Ciuciulete и сътр. (2022).

Според адресната регистрация на пациентите, прави впечатление, че в област Плевен са диагностицирани, хирургично и медикаментозно лекувани пациенти, населяващи почти всяка област в Република България, както и един пациент с гръцки произход. Това е пример за централизация на онко-дерматологичната специализирана помощ в големите областни градове, подобно на описаната в проучването на Kodumudi и сътр. (2021).

Нашите резултати от подробното епидемиологично и клинично проучване за периода 2016г. – 2023 г. представят 355 пациента, на възраст от 40 до 96 години, които са развили СЦК за периода 2016 – 2023 г. Подобно на данните на Karagas и сътр. (1999), в проучената от нас кохорта превалява мъжкият пол – 185 пациента от мъжки пол и 170 пациента от женски пол. Въпреки, че повечето засегнати пациенти са от мъжки пол, не се открива статистически значима разлика между заболялите от СЦК от двата пола: $P > 0.05$ ($P = 0,057$). Установява се най-висока честотата на СЦК на 75-годишна възраст (± 10.74 SD), което съответства на данните на Music и сътр. (2017) – най-висока честота на заболяването между 64 и 84 години. Всички пациенти със СЦК обследвани от нас, са от бялата раса, с кожен Фототип I-III, подобно на данните на Marks и сътр. (1993) и Karia и сътр. (2013). Според произхода им са установени 194 пациента (54,6%) живущи в селски региони и 161 пациента (45,4%) – в градски, съответстващо на данните на Corchado-Cobos и сътр. (2020).

Относно рисковите фактори за развитие на СЦК, е изследвана фотоекспозицията на пациентите. От тях 238 пациента (67%) практикуват растение- и животновъдство като хоби или професия и 1 пациент практикува спорт. От всички проучени пациенти, 260 пациента (73,2%) признават, че през живота си са преживявали тежки слънчеви изгаряния. Резултатите относно фотоекспозицията и слънчеви изгаряния съответстват на резултатите на Zanetti и сътр. (2006). Нашите резултати потвърждават връзката на кожни неопластични заболявания със слънчевата експозиция, тъй като са установени пациенти развили както СЦК, така и ММ (1,4%) и БЦК (4,3%). Открити са и двама пациента, приемали имunosупресираща терапия по повод на придружаващи онко-хематологични заболявания, преди появата на СЦК, което потвърждава имunosупресията като причина за развитие на СЦК, подобно на описаната от Euvrard и сътр. (2003) и Silverberg и сътр. (2013). От преканцерозите, довели до развитие на СЦК, са открити 2-ма пациента развили заболяването на фона на Lupus erythematosus chronicus discoides disseminatus, 2-ма пациента – на фона на Epidermolysis bullosa hereditaria dystrophica и 2-ма пациента с Есенциална Тромбоцитемия, дългогодишно лекувани с Hydroxyurea, които наши резултатите напълно съответстват на данните от Condorelli и сътр. (2019), Bhat и сътр. (2012) и Tao и сътр. (2012).

Проучено е времето, което е необходимо на пациента да потърси медицинска помощ по повод на образуването на кожата. Анализът на данните показва статистически значима връзка между времето до диагностициране и макроскопския диаметър на СЦК: $P < 0,05$ (Actual value $P = 0,001$). Колкото е по-дълго времето до диагностициране, толкова е по-голям туморът.

Спрямо локализацията на СЦК получените от нас резултати корелират с тези на Brantsch и сътр. (2008). Установена е най-висока честота на тумори в областта на главата и шията, последвани от карциноми на торса, горния крайник и пениса. От специфичната лицева локализация, най-чести са СЦК в областта на бузите, последвани от тумори на долната устна, челото и носа.

Средният макроскопски диаметър на обследваните от нас тумори е 19,86 мм ($\pm 14,34\text{mm}$). Минималният туморен диаметър е 4мм, а максималният – 100мм. Статистическият анализ на данните показва, че разликата между диаметра на тумора в различните възрастови групи е значима: $P<0,05$ (Actual value 0,028), т.е. по-големи тумори се откриват при по-възрастните пациенти. Откритата в нашето проучване статистически значима връзка между туморния диаметър и общата преживяемост: $P<0,05$ (Actual value $p<0,001$), кореспондира на данните на Thompson и сътр. (2016). Колко е по-голям туморния диаметър, толкова е по-ниска преживяемостта на пациентите.

Според хистопатологичното изследване на всички 355 тумори, се установява най-малък брой тумори с хистологична дебелина до 1мм и най-голям брой с дебелина над 4мм, което е характеристика на високо-рисковите СЦК, описана от Schmuls и сътр. (2013). Статистическият анализ показва статистически значима връзка между микроскопската дебелина на туморите и възрастта на пациентите: $P<0,05$ (Actual value 0,001) с по-дебели тумори в групата 71-80 години. При сравнение на макроскопския диаметър на СЦК и микроскопската дебелина също е установена връзка: $P<0,05$ (Actual value $P<0,001$). Колкото е по-голям туморният диаметър, толкова е по-голяма дебелината на тумора, което корелира с резултатите на Schmuls и сътр. [113].

От изследваните тумори, 302 (85,1%) са инвазивен СЦК на кожата, а 53 (14,9%) – “in situ” карцином. Това съотношение съответства на представеното от Katalinic и сътр. (2003).

Подобно на Brantsch и сътр. (2008), са проучени локализацията и клиничния вид на СЦК пениса и са установени 23 тумора с тази локализация. От тях 82,6% ангажират glans penis, а 17,4% - кожата на тялото на пениса. Според вида на тумора 8 от тях са Erythroplasia на Queyrat, 3 са Bowen-оидна папулоза, а останалите 12 – инвазивен СЦК. Тези резултати напълно съответстват на данните, публикувани от горепосочените автори.

Проучвайки методите на лечение на СЦК, при 85,1% от пациентите е приложено самостоятелно хирургичното лечение, а при 14,9% - комбиниран подход (хирургична ексцизия + лъчетерапия). Стандартната хирургична ексцизия е успешна (пълно премахване на карцинома) в 85,4% от случаите. Резултатите за успех от хирургичното лечение напълно съответстват на резултатите на Lansbury и сътр. (2013). При останалите 14,6% от пациентите след хирургичната ексцизия е приложена лъчетерапия, поради персистенция на заболяването. При 11 пациента (3,09%) е приложена системна терапия. При 7 пациента е използвана класическа полихиомиотерапевтична схема, а 4 пациента са лекувани чрез имунотерапия с PD-1 инхибитор Cemiplimab. Двама от последните пациенти са развили иноперабилни тумори на фона на Вродена Булозна Епидермолиза, а 1 – на фона на дългогодишно лечение на Есенциална Тромбоцитемия с Хидроксурея. И при тримата пациенти лечението със Cemiplimab е прекратено – при пациентите с Вродена Булозна Епидермолиза поради прогресия на заболяването с нарастване на СЦК или поява на нови СЦК на кожата, а пациентът с Есенциална Тромбоцитемия е екзитиран.

Установена е статистически значима връзка между макроскопския диаметър на първичния карцином и честотата на използване на лъчетерапия: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$). Необходимостта от лъчетерапия е по-висока при карциноми с макроскопски диаметър над 20 мм, подобно на резултатите на Stewart и сътр. (2022).

Проследявайки склонността за рецидивирание на туморите, е установена поява на локален рецидив при 17 пациента (4,8%). Статистическият анализ на данните показва статистически значима връзка между макроскопският диаметър на тумора и времето за поява на рецидив $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$), както и че при тумори с диаметър над 40 мм този период е значително по-кратък. Открита и статистически значима връзка между стадия на СЦК и времето за рецидивирание: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,007$). Колкото е по-висок стадия на първичния тумор, толкова е по-кратко времето за поява на локален рецидив. Тези наши резултати са подобни на представените от Pickering и сътр. (2014).

При 18 пациента (5,1%) след извършване на биопсия от лимфен възел (ексцизионна или тънкоиглена аспирационна биопсия) са открити локо-регионални метастази в лимфни възли. При 8 от тези пациенти (2,25%) са регистрирани и далечни метастатични лезии във вътрешни органи. Установена е статистически значима връзка между развитието на метастази и диаметъра на първичния СЦК: $P < 0,05$ (Actual value $P < 0,001$), подобно на резултатите на Leibovitch и сътр. Колкото е по-голям диаметърът, толкова по-голяма възможността за развитие на метастази (2005).

Нашите резултати за рецидивирание и смъртност се доближават до тези на Karia и сътр. (2013), които докладват поява на локален рецидив в 5,4% от случаите и смъртност от 1,5-2% в САЩ, достигаща до 4% в някои държави.

Анализът на смъртността от заболяването в направеното от нас ретроспективно проучване показва, че 7 пациенти (1,97%) са починали поради авансирал или метастатичен СЦК. Средната преживяемост не показва статистически значими разлики между мъжки и женски пол: $P > 0,05$ (Actual value $P = 0,216$). Установена е статистически значима връзка между възрастта на пациентите в Стадий IV и времето до настъпване на смърт: $P > 0,05$ (Actual value $P = 0,001$). При по-възрастните пациенти средната продължителност на живота е значително по-кратка.

Това води до заключението, че е необходимо пациентите с инвазивен СЦК на кожата да се проследяват поне 4 години след хирургичната ексцизия на тумора, както препоръчва и Европейската асоциация по медицински онкология (ESMO).

Хистопатологично проучване

Множество проучвания са проведени с цел установяване на връзката между определени хистопатологични характеристики на СЦК и по-високия риск за рецидивирание, метастазиране и смъртност.

Ramirez и сътр. (2005) описват, че туморен диаметър над 20мм носи по-висок риск от прогресия на заболяването. Clayman и сътр. (2005) пък описват 40мм туморен диаметър с по-лоша прогноза, но съобщават, че СЦК с локализация в областта на устните и ушната мида може да метастазира и при диаметър <20мм. Същите автори описват и туморната дебелина в мм, както и нивото на инвазия като прогностични фактори. Техните резултати демонстрират, че СЦК с дебелина >4мм имат 45,7% по-висок риск за рецидивирание и метастазиране. За разлика от тези тумори, СЦК с дебелина <2мм носи минимален риск за прогресия. Те описват също, че СЦК на кожата, инвазиращ тъкани под нивото на подкожната мастна тъкан (фасции, мускули, хрущяли, кост), се асоциира с по-висока смъртност.

Резултатите от проведеното от нас хистопатологично проучване показват, че СЦК с макроскопски диаметър >20мм имат статистически значима по-дълбока инвазия в сравнение с тумори с по-малък диаметър $P<0,05$ (Actual value <0,001), подобно на резултатите на Mullen и сътр.(2006). Средната дебелина в групата на ниско-рисковите карциноми е 4,93 ($\pm 2,34$), за разлика от дебелината на високо-рисковите – 7,13 ($\pm 3,44$).

Установена е значително по-голяма хистопатологична дебелина за класическият (неспецифичен) СЦК в сравнения с Kerathocanthoma-like инвазивния СЦК: $P<0,05$ (Actual value <0,001). Средната дебелина на класическият СЦК е 6,47мм, а на Kerathocanthoma-like инвазивния СЦК е 3,53мм, подобно на резултатите, представени от Kwiek и сътр. [86].

Подобно на Mullen и сътр. (2006), нашето проучване установява, че степента на диференциация на СЦК има значителен ефект върху риска от прогресия. Горепосочените автори описват пълно излекуване при 37% от ниско-диференцираните СЦК, 59% - при умерено-диференцираните и 88% - при добре-диференцираните карциноми след двугодишно проследяване.

Подобно на резултатите на Fernandez-Figueras и сътр. (2015), нашите резултати не показват статистически значима връзка между хистопатологичния субтип на СЦК и клетъчната диференциация на туморните клетки: $P<0,05$ (Actual value 0,069): 71% бяха добре-диференцирани, 19% бяха умерено-диференцирани и 10 % бяха ниско-диференцирани.

Подобно на Mendenhall и сътр. (2007), които докладват перинеурална и лимфоваскуларна инвазия в 7% от случаите и описват асоциацията с висок риск за рецидивирание, метастазиране и смъртност, ние установяваме лимфоваскуларна инвазия в 7% от случаите и перинеурална инвазия в 5% от обследваните СЦК. Открита е статистически значима връзка между нивото на инвазия и лимфоваскуларната инвазия: $P<0,05$ (Actual value 0,001). Подобно на горепосочените автори ние установяваме, че колкото е по-голяма инвазията, толкова вероятността за лимфоваскуларна инвазия е по-висока. За разлика от тях, ние не регистрираме връзка между макроскопския диаметър (<20мм или >20мм) и лимфоваскуларната инвазия: $P<0,05$ (Actual value 0,238).

Нашите резултати показват връзка между нивото на инвазия и наличието на перинеурална инвазия: $P<0,05$ (Actual value 0,006). Колкото по-дълбоки

структури засяга СЦК, толкова е по-голям рискът от наличие на перинеурално засягане. За разлика от Mendenhall и сътр. (2007), ние не описваме връзка между перинеуралната инвазия и макроскопския диаметър на СЦК: $P<0,05$ (Actual value 0,086) и хистологичния субтип: $P<0,05$ (Actual value 0,744).

Според Maimela и сътр. (2018) наличието на голямо количество тумор-инфилтриращи лимфоцити около тумора е добър прогностичен фактор, който се асоциира с по-нисък риск от рецидивирание и метастазиране. При обследваните от нас СЦК перитуморната лимфоцитна стромна реакция е висока при 68%, умерено-изразена при 21%, ниско-изразена при 10% и липсваща при 1%. Не е установена статистически значима връзка между микроскопската дебелина на тумора и лимфоцитната реакция: $P<0,05$ (Actual value 0,382). Не установихме и статистическа връзка с диаметъра на карцинома ($<20\text{mm}$ и $>20\text{mm}$): $P<0,05$ (Actual value 0,224).

Подобно на проучването на Carter и сътр. (2013), нашите резултати демонстрират значимостта на детайлния хистопатологичен репорт, съдържащ данни за диференциация на СЦК, агресивни субтипове (акантолитичен, аденосквамозен), туморна дълбочина и дебелина, наличие или не на перинеурална и лимфоваскуларна инвазия, инвазия на фасция, мускул, хрущял или кост, наличие или отсъствие на възпалителна реакция и статус на ексцизионните (ангажирани или не от туморни клетки).

Анализирайки успеха на хирургичното лечение, 85% от туморите са напълно отстранени след първичната хирургична ексцизия, а при 15% от туморите се открива персистенция – засягане на периферна или дълбока ексцизионна граница. Установена е връзка между хирургичния успех и Breslow хистологичната дебелина на СЦК: $P<0,05$ (Actual value $<0,001$), както и макроскопския диаметър на тумора: $P<0,05$ (Actual value 0,038), както описват Thompson и сътр. (2016). При по-големите на ширина и дълбочина тумори шансът за непълно отстраняване със самостоятелна хирургична ексцизия е значително по-висок.

Хистопатологичните характеристики на СЦК на кожата са изключително важни за бъдещето на пациента. Могат да променят периодите на проследяване на пациента, както и последващата терапия след хирургично лечение (допълнително хирургично лечение, лъчелечение или системна терапия).

Според Zhang и сътр. (2021) постоперативно лъчелечение се провежда при персистенция на тумора – непълно отстраняване с ангажиране на дъното или страничните резекционни линии от туморни клетки или при негативни прогностични белези – ниско-диференциран СЦК, наличие на лимфоваскуларна и перинеурална инвазия, дебелина по Breslow над 6мм. Лъчелечението може да се експлотира и като самостоятелна терапия, без хирургична ексцизия. След хистологично доказване на тумора, при по-възрастни пациенти, с повече придружаващи заболявания, които не биха понесли хирургичната ексцизия.

Според Lee и сътр. (2020) пациенти с често рецидивирани СЦК, с големи иноперабилни тумори или такива, при които оперативното лечение би ги обезобразило със значително понижаване на качеството на живот, или би

довело до премахване на определена част на тялото, или вече са развили метастази в лимфни възли или вътрешни органи, са подходящи за системна химиотерапевтична терапия или имунотерапия. Представените от нас пациенти, провели терапия със Cemiplimab, спадат към групата с големи иноперабилни тумори или такива, при които оперативното лечение би ги обезобразило със значително понижаване на качеството на живот, или би довело до премахване на определена част на тялото.

Имунохистохимично проучване

PD-L1, наречен още B7 хомоложен протеин (B7-H1) или клъстер на диференциация 274 (CD274) е описан за първи път през 1999 година. Това е много важна ко-стимулаторна молекула на имунния отговор, която индуцира имунна толерантност в туморната микросреда. PD-L1 рядко се експресира от нормални непатогенни тъкани. Открива се при тумори като малигнен меланом, карцином на бял дроб, карцином на млечна жлеза, на панкреас, на бъбрек, пикочен мехур, тумори на езофага, колона и ректума. Свързването между PD-L1 и PD-1 индуцира апоптоза на Т-лимфоцитите и води до по-лоша прогноза за пациентите. Моноклоналните антитела, насочени към PD-L1 и/или PD-1 блокират свързването между двата рецептора, което освен че блокира апоптозата, води и до по-дълга преживяемост на Т-лимфоцитите и увеличена противотупорна активност. Вследствие на тези действия се супресира диференциацията и пролиферацията на туморни клетки. Имунохистохимичната експресия на PD-L1, PD-1 и CD8 при първичен инвазивен СЦК показва, че те могат да бъдат използвани като биомаркери, предиктори на отговора към имунотерапия с PD-L1/PD-1 инхибитори. Тумори, които отговарят на имунотерапията, обикновено имат висока експресия. Те също биха могли да определят риск от рецидивирание и метастазиране. От друга страна високата експресия на CD8 при СЦК може да е позитивен прогностичен маркер. Прогностичната стойност на PD-L1/PD-1 е спорна. Редица проучвания показват, че високата експресия на PD-L1 корелира с лоша прогноза при карцином на стомах, хепатоцелуларен и бъбречен карцином, но при Меркел-клетъчен карцином и рак на гърдата е маркер за по-добра прогноза.

В литературата няма много проучвания върху ИХХ експресията на PD-L1, PD-1 и CD8 при немеланоцитни кожни карциноми. Slater и Googe (2016) в свое проучване представят PD-L1 позитивна експресия при 20% от ниско-рисковите и при 70% от високо-рисковите СЦК. Те анализират 40 първични СЦК и откриват статистически значима връзка между PD-L1 експресията и хистопатологичните характеристики за високо-рисков СЦК: туморна дебелина >6mm, макроскопски диаметър >20mm и ниска туморна диференциация. За разлика от публикуваните от тях данни, нашите резултати не демонстрират връзка между PD-L1/PD-1 експресията и гореспоменатите параметри, но откриват тенденция СЦК с по-голяма хистопатологична дебелина и по-дълбоко ниво на инвазия да показват по-висока PD-L1 и PD-1 експресия, а тумори с по-малка хистопатологична дебелина да показват по-висока CD8 експресия.

Подобно на резултатите, представени от Oh и сътр. (2019), нашите резултати представят статистически значима връзка между PD-L1 и PD-1 експресията и туморната диференциация.

Roper и сътр. (2017) установяват, че високата PD-L1 експресия е прогностичен фактор за по-дълга преживяемост без заболяване при високо-рискови СЦК на кожата на главата и шията. Техните резултати, използвайки sp263 клонът на антитялото, доказват връзката при експресия на PD-L1 >5%. От друга страна, Garcia-Diez и сътр. (2018) показват че по-високата PD-L1 експресия е свързана с повишен метастатичен риск. Те използват същият клон на антитялото, както и ние в нашето проучване - SP142. Проучване на Varki и сътр. (2018), използвайки SP142 клона на anti-PD-L1, демонстрира позитивна експресия (>5%) при 26% от 66 първични СЦК. За разлика от тези резултати, нашето проучване демонстрира, че 64% от PD-L1 позитивните случаи са с експресия 2 – 10% и 36% показваха експресия >10% PD-L1, т.е. в нашето проучване имунохистохимичната експресия на PD-L1 е значително по-висока от представената.

Scharer и сътр. (2017) откриват статистически значима връзка между възпалителната реакция около СЦК и PD-L1 експресията. За разлика от тези автори, нашите резултати показват, че 98 от туморите имат разнообразна възпалителна реакция, но не се установява статистически значима връзка с PD-L1 експресията. Подобно на Scharer и сътр., нашето проучване не установява статистически значима връзка между PD-L1 експресията, туморния диаметър и клетъчната диференциация.

Проучвайки разликата в PD-L1 експресията между първичен СЦК и лимфни метастази при СЦК, Amoils и сътр. (2017) демонстрират значително по-висока експресия при метастични тъкани. Техните резултати не показват статистически значима връзка между експресията на PD-L1 и клиникопатологичните характеристики на първичния СЦК. Нашите резултати напълно корелират с резултатите на горепосочените автори.

Alferraly и сътр. (2019), в свое проучване върху СЦК, не установяват статистически значима връзка между Ki-67 експресията и туморният грейдинг. Нашите резултати също не откриват подобна корелация. Нашите резултати върху експресията на Ki-67 показват, че високо-рисковите СЦК имат значително по-висока експресия и корелират с тези на много проучвания в областта на оралния спиноцелуларен карцином.

Резултатите на Ehidiamhen и сътр. (2024) доказват, че агресивните субтипове на БЦК и СЦК имат значително по-висок пролиферативен индекс Ki-67. Те показват, че всички субтипове на СЦК показват по-висока Ki-67 експресия, в сравнение с БЦК, тъй като СЦК е тумор с по-агресивно поведение. Нашите резултати корелират с техните.

Bauer и сътр. (2018) проучват експресията на CD4 и CD8 при актинична кератоза, кератоакантом и инвазивен СЦК. Те установяват статистически значими разлики с най-висока експресия на CD4 при кератоакантомите и най-висока CD8 експресия при инвазивните СЦК. Подобно на тях, ние установихме

по-висока експресия на CD4 при ниско-рисковите СЦК и по-висока CD8 експресия при високо-рисковите СЦК, както и съотношение CD4:CD8 по-ниско при високо-рисковите СЦК.

Проучвайки съотношение CD4:CD8 при карцином на стомаха, Skubleny и сътр. (2023) установяват, че карциномите с по-високо съотношение са с по-добра прогноза относно преживяемост и отговор към терапията, както и описват корелации с хистопатологичните характеристики на тумора. Подобно на тях, ние установяваме значително по-високо съотношение CD4:CD8 при ниско-рисковите СЦК. Праговото ниво, до което достигнахме е 1,3, със статистическа зависимост между по-ниските нива на съотношение CD4:CD8 и високо-рисковите СЦК.

Изследвайки съотношението CD4:CD8 при карцином на гърдата, Wang и сътр. (2017) установяват много по-висока експресия на CD4 и CD8 в периферията на тумора, от колкото в туморната строма. Те доказват статистически значима връзка между по-ниското ниво на съотношението CD4:CD8 и по-агресивните субтипове на карциномът на гърдата. Подобно на тези автори, ние достигаме до същите резултати за СЦК на кожата – по-ниско ниво (под 1,3) при високо-рисковите СЦК и по-високо (над 1,3) при ниско-рисковите СЦК.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Немеланоцитните кожни карциноми, и в частност БЦК и СЦК, са най-често срещаните тумори в човешкия организъм. В световен мащаб броят им надхвърля всички други неоплатични заболявания, взети заедно. Забавянето в поставянето на диагнозата, както и „подмладяването“ на популацията, развиваща СЦК на кожата, води до значителни предизвикателства в последващото лечение и икономически загуби.

Сред предразполагащите фактори за развитие на СЦК са мъжки пол, светъл фототип, слънцеизлагане без фотопротекция, употребата на солариуми, тютюнопушене. Допълнителни рискови фактори са прием на фотосенсибилизатори, токсични вещества, имunosупресори, както и боледуване от Psoriasis vulgaris, Epidermolysis bullosa hereditaria, Xeroderma pigmentosum, Lupus erythematosus discoides, Human papilloma virus, факултативни и облигатни преканцерози.

СЦК притежава най-богата палитра от генни мутации в сравнение с всички останали тумори, което е и основа за постоянно изучаване и разработване на различни нови терапевтични модели за лечение на локално-авансиралите и метастатичните форми на заболяването.

Проведеното епидемиологично проучване поставя НМКК и СЦК сред най-честите тумори в българската популация. Стратифицирането на рисковите фактори дава насоки за бъдещи изследвания върху причините за развитие на СЦК. Данните за честота на поява на рецидив, метастази, както и летален изход, съответстват на данните от световната литература, което показва

високото качество на българската, и в частност плевенската, медицинска услуга.

Клиничните проучвания изясняват възрастта на най-засегнатата популация, предилекционните места за развитие на СЦК, специфичната локализация, TNM-класификацията, стадирането и лечението на тумора, както и фактори влошаващи успеха от самостоятелното оперативно лечение.

Хистологичното проучване изяснява хистологичните типове СЦК и доказва колко е важен подробният хистопатологичен анализ на СЦК на кожата и какви са характеристиките на високо-рисковите за рецидивирание и метастазирание тумори. Той може да промени поведението на дерматолога, дерматохирурга, лъчетерапевта и онколога в избора на най-правилната терапия за пациента.

Имунохистохимичното проучване на PD-1, PD-L1 и CD8 на СЦК на кожата е едно от малкото извършени в света. Липсата на статистически значими връзки с определени високо-рискови хистологични характеристики на СЦК показва, че ИХХ-изследването е важно, но при определени случаи. Най-полезно е за пациенти с често-рецидивирани, иноперабилни и метастатични СЦК на кожата. ИХХ – изследване на PD-1, PD-L1 и CD8 може да бъде прогностичен фактор. От една страна определя вероятността за развитие на метастази от СЦК на кожата в лимфни възли и вътрешни органи, а от друга – вероятността на пълен, частичен или никакъв отговор на терапия със съвременните PD-1 инхинитори. ИХХ- изследването е най-информативно, когато се изследват метастатични тъкани.

Проучвания върху ИХХ-експресията на Ki-67, CD4 и съотношението CD4:CD8 при СЦК на кожата също са рядкост. Статистически зависимата разлика в Ki-67 експресията е доказана при много видове тумори, което се потвърждава и от нашите резултати. Изследвания на експресията на CD4 и съотношението CD4:CD8 в момента са много модерни и се извършват върху много видове тумори, но при НМКК те са все още рядкост. Нашите резултати показват, че CD4 и съотношението CD4:CD8 могат да се използват като прогностични имунохистохимични критерии, определящи поведението на заболяването и неговата прогноза.

Надяваме се, че всички тези данни ще допринесат за по-доброто разбиране на СЦК сред българската популация, за търсене и своевременно поставяне на диагнозата, за по-доброто хирургично лечение, лъчелечение и приложение на системна терапия.

VII. ИЗВОДИ

1. НМКК са най-често срещаните тумори сред българската популация. В Онкологичен регистър към Онкологичен Център в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ Плевен ЕАД в обл. Плевен за период от 24 години са регистрирани 5748 пациенти, заболели от НМКК.
2. Налице е еквивалентно разпределение според пола на пациентите със СЦК на кожата. Установява се малко по-висока честота за развитие на СЦК при пациентите от мъжки пол – 53%, докато при женски пол честотата е 47%.
3. Най-висок е относителният дял на пациентите развили СЦК на кожата във възрастовата група между 71 – 80 години. При мъжете средната възраст е 70,6 години, а при жените – 71,5 години.
4. СЦК на кожата е вторият по честотата карцином от групата на НМКК с 28,5%. На първо място в групата е БЦК с 66,6%, а на трето – смесеният Базо-сквамозен карцином с 2,1%.
5. По-висок е относителният дял на пациентите, живущи в селски региони и практикуващи растение- и животновъдство, т.е. имат по-висока фотоекспозиция. Установена е връзката между хроничната фотоекспозиция и слънчевите изгаряния на кожата и повишената честота на развитие на СЦК на кожата
6. Колкото е по-дълго времето до поставяне на правилната диагноза и насочване за лечение, толкова по-големи, трудни за оперативно лечение и рецидивиращи/метастазиращи СЦК на кожата се развиват.
7. Най-често засегнатата от СЦК топографска област е лицето, последвана от скалпа, ухо, торс, горен крайник, гланс пенис и долен крайник. Най-висок е относителният дял на туморите в букална област, последвани от тези на долна устна, чело, нос, долен клепач, горна устна и горен клепач.
8. Установява се статистически значима връзка между туморния диаметър на първичния СЦК на кожата и честотата на поява на рецидиви и метастази в лимфни възли и вътрешни органи.
9. Установява се статистически значима връзка между макроскопския диаметър, локализацията, хистологичната дебелина по Breslow, туморната диференциация, наличието на перинеурална и лимфоваскуларна инвазия и честотата на туморна персистенция, рецидивизиране и метастазиране.

10. Не се установява статистически значима връзка между PD-1, PD-L1 и CD8 – ИХХ експресията и високо-рисковите хистопатологични характеристики при СЦК на кожата. Въз основа на нашите резултати и данните от литературата, става ясно, че изследването на PD-1, PD-L1 и CD8 е по-информативно и дава информация относно преживяемост на пациента и отговор към имунотерапия с „checkpoint“ инхибитори, когато се извършва върху метастатични тъкани.
11. Установена е статистически значима връзка между Ki-67, CD4 и съотношението между CD4:CD8 Т-лимфоцитите и високо-рисковите хистопатологични характеристики на СЦК на кожата. Маркерите CD4 и съотношението CD4:CD8 могат да се използват като прогностични имунохистохимични критерии, определящи поведението на заболяването и неговата прогноза.

VIII. ПРИНОСИ

Приоритетни приноси с оригинален характер

1. Проведено е мащабно епидемиологично проучване, обхващащо 24-годишен период при голяма група пациенти със СЦК на кожата в България.
2. Анализирани са клинико-морфологични данни на голям брой пациенти със СЦК на кожата.
3. Проведено е систематизирано хистопатологично проучване при проспективна серия от пациенти със СЦК на кожата.
4. За първи път в България се проучва имунохистохимичната експресия на PD-1, PD-L1 и CD8 при първичен СЦК на кожата и се определя тяхната прогностична стойност за рецидивирание, метастазиране и отговор към терапия с „checkpoint“ инхибитори.
5. За първи път в България се проучва имунохистохимичната експресия на Ki-67, CD4 и съотношението между CD4:CD8 Т-лимфоцитите при първичен СЦК на кожата и се доказва статистически значима разлика между ниско-рисковите и високо-рисковите тумори.
6. Проучени са епидемиологията, методите за диагностика, лечението, честотата на рецидивирание и метастазиране на СЦК на кожата за обл. Плевен.
7. Описан е случай на локално авансирал СЦК на кожата при пациент, страдащ от Epidermolysis bullosa hereditaria dystrophica, успешно лекуван с имунотерапия – Cemiplimab.
8. Описан е случай на локално авансирал СЦК на кожата, индуциран от дълго-годишен прием на Hydroxyurea при пациент, страдащ от Есенциална Тромбоцитемия, лекуван с имунотерапия – Cemiplimab.

Приноси с потвърдителен и теоретичен характер

1. Проучен е спектърът на асоциираните със СЦК на кожата заболявания сред българската популация – „in situ“ карциноми, факултативни и облигатни преканцерози, придружаващи заболявания и придружаваща терапия.
2. Проучена е връзката между хроничната слънчева експозиция и слънчеви изгаряния, и развитието на СЦК на кожата.
3. Проучена е връзката между високо-рисковите хистопатологични характеристики на СЦК на кожата и честотата на рецидивирание, метастазиране и смъртност.
4. Проучена е връзката между високо-рисковите хистопатологични характеристики на СЦК на кожата и тяхното влияние върху намаляването на честотата на радикалните самостоятелни хирургични ексцизии.
5. Проучена е връзката на ИХХ-експресията на PD-1, PD-L1 и CD8 при първичен СЦК на кожата и е установена липсата на влияние върху честотата на рецидивирание, метастазиране и смъртност.

Приноси с научно-приложен характер

1. Въведен е специфичен хистопатологичен фиш при СЦК на кожата.
2. Създаден е алгоритъм за промяна на терапевтичния подход при пациенти със СЦК на кожата при определени хистопатологични характеристики.
3. Въведени са определени отстояния от видимия периферен ръб на тумора, според неговия диаметър, при извършване на хирургична ексцизия.
4. Въведен е cutoff от 1,3 за съотношението CD4:CD8. Туморите с по-високо ниво са с по-благоприятно протичане, докато по-агресивните се характеризират с ниво на CD4:CD8 под 1,3

Списък с научната продукция по темата на дисертационния труд

I. Научни публикации:

1. **Vasilev P.**, Karaivanov M., Karamanliev M., Dimitrov D., Troyanova P., Yordanova I. Squamous cell carcinoma of the skin: epidemiology, diagnosis, management, recurrence and mortality rates for the Bulgarian population. Journal of Biomedical and Clinical Research, 2023, 16, 2: 180-185, DOI:10.2478/jbcr-2023-0024, ISSN: 1313-9053, Web of Science
2. **Vasilev P.**, Popovska S., Karaivanov M., Dimitrov D., Yordanova I., Squamous cell carcinoma of the skin: a study of clinicohistopathological correlations predictive for recurrence, metastasis and mortality. Journal of IMAB–Annual Proceeding Scientific Papers, 2023, 29(4), pp.5139-5144, DOI: 10.5272/jimab.2023294.5139, ISSN: 1312-773X, Q4, Web of Science, IF 0,1
3. **Василев П.**, Калев Д., Микински А., Стефанова Н., Караиванов М., Киров В., Йорданова И. Лечение на Carcinoma spinocellulare при тежка рецесивна Epidermolysis bullosa dystrophica – представяне на клиничен случай и обзор на литературата. Дерматология и Венерология, 2021, 3: 3-10, ISSN 0417-0792
4. **Василев П.**, Караманлиев М., Караиванов М., Димитров Д., Йорданова И. Модифицирана Tenzel пластика - оперативно лечение и реконструкция при пациент с инвазивен спиноцелуларен карцином в лява зигоматична област и ляв долен клепач, Окулопластична и реконструктивна хирургия, 2024, стр. 18-22, ISBN 978-954-756-340-7

II. Участие в научни форуми в България:

1. **Василев П.**, Киров В., Караиванов М., Микински А., Стефанова Н., Калев Д., Йорданова И. Лечение със Cemiplimab на спиноцелуларен карцином на кожата при пациент с генерализирана автозомно-рецесивна дистрофична булозна епидермолиза. Симпозиум Дерматолози „Диагностика и възможности за лечение на пациенти с кожни неоплазми“, Българска асоциация по Дермато-онкология Правец, 25-27 Юни 2021 /орална презентация/
2. **Василев П.**, М. Караманлиев, М. Караиванов, Д. Димитров. Инвазивен спиноцелуларен карцином на лицето – хирургично лечение и тъканна реконструкция, XXIX Софийски Дерматологични Дни „Проф. Асен Дурмишев“ София, 4 – 7 Ноември 2021 /орална презентация/
3. **Василев П.**, М. Караманлиев, М. Караиванов, Д. Димитров, И. Йорданова, Д. Господинов, П. Троянова. Авансирал спиноцелуларен карцином на кожата при пациентка с Polycythemia vera и дълготрайно приложение на Hydroxyurea, XXX-ти Софийски Дерматологични дни „Проф. Асен Дурмишев“, София, 03–06 Ноември 2022 /орална презентация/
4. **Василев П.**, Д. Калев, М. Караиванов, М. Караманлиев, Д. Димитров, И. Йорданова, Д. Господинов, П. Троянова. Имунотерапия със Cemiplimab – клиничен опит. Втори Национален Конгрес по Дермато-онкология, София, 11 – 13 Ноември 2022 /орална презентация/

5. Петракиева М., **Василев П.**, Господинова К. Гинчева В. Йорданова И., Господинов Д. Кожен лупус и спиноцелуларен карцином на кожата, X-ти Национален конгрес на българските дерматовенеролози, София, 02 – 05 Ноември 2023 /орална презентация/
6. **Василев П.**, М. Караиванов, Д. Димитров, П. Троянова, И. Йорданова. Хистологични варианти и особености на спиноцелуларния карцином на кожата. Варненски Дерматологични дни, Варна, 21-22 Април 2023 /орална презентация/
7. **Василев П.**, Караманлиев М., Караиванов М., Димитров Д., Йорданова И. Модифицирана tenzel пластика - оперативно лечение и реконструкция при пациент с инвазивен спиноцелуларен карцином в лява зигоматична област и ляв долен клепач. Окулопластична и реконструктивна хирургия, Плевен, 19-20 Април 2024 /орална презентация/
8. **Василев П.** Лечение със Cemiplimab на плоскоклетъчен карцином на кожата при пациенти с булозна епидермолиза. XIV Научна конференция по Онкология, Боровец 14-16 Юни 2024 /орална презентация/

III. Участие в научни форуми в чужбина:

9. Yordanova I., **Vasilev P.**, Trashlieva M., Gospodinov D. Squamous cell carcinoma of the skin in patients with congenital bullous epidermolysis. XIII ASKED Kongres, Belgrade, 3 – 4 December 2021 /орална презентация/
10. **Vasilev P.**, Karaivanov M., Kalev D., Dimitrov D., Gospodinov D., Troyanova P., Yordanova I. Advanced cutaneous squamous cell carcinoma induced by long-term Hydroxyurea treatment – a case report, 25th World Congress of Dermatology, Singapore, 03-08 July 2023 /постер/
11. **Vasilev P.**, Kalev D., Karamanliev M., Dimitrov D., Karaivanov M., Troyanova P., Yordanova I. Cutaneous squamous cell carcinoma in a patient with dystrophic epidermolysis bullosa –a case report, 25th World Congress of Dermatology, Singapore, 03-08 July 2023 /постер/
12. **Vasilev P.**, Popovska S., Kraevska E., Karaivanov M., Yordanova I. PD-L1, PD-1 and CD8 expression in 100 primary invasive cutaneous squamous cell carcinomas. EADV Spring Symposium. Malta 16-18 May 2024 /постер/