



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ”- ВАРНА**

---

**ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА  
КАТЕДРА ПО ОБЩА И КЛИНИЧНА ПАТОЛОГИЯ,  
СЪДЕБНА МЕДИЦИНА И ДЕОНТОЛОГИЯ**

---

**д-р Лиляна Николова Петкова**

**ЕКСПРЕСИЯ НА Cyclin D1, BCL2, p53 И ДРУГИ  
МЕЛАНОЦИТНИ МАРКЕРИ В МАЛИГНЕНИ  
МЕЛАНОМИ НА КОЖАТА И МЕЛАНОЦИТНИ НЕВУСИ -  
СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА  
ИМУНОХИСТОХИМИЧНАТА ЕКСПРЕСИЯ,  
МОРФОЛОГИЧНИЯ ПРОФИЛ И ЗНАЧИМОСТТА ИМ ЗА  
ДИАГНОСТИКАТА И ТУМОРНАТА ПРОГРЕСИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“**

**шифър: 03.01.03**

**Научен ръководител: Проф. д-р Богомила Г. Маневска, дмн**

**ВАРНА, 2021**

---

Дисертационният труд съдържа 154 стандартни машинописни страници и е онагледен с 41 фигури и 30 таблици.

Литературната справка включва общо 126 литературни източника, от които 10 на кирилица и 116 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за официална защита на катедрен съвет на Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Медицински университет – Варна.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на .....от .....Ч. в.....  
(или онлайн заседание) пред научно жури в състав:

Вътрешни членове:

Проф. д-р Петър Генов, дм

Доц. д-р Илко Бакърджиев, дм

Външни членове:

Доц. д-р Маргарита Каменова, дм

Доц. д-р Юлиан Ананиев, дм

Доц. д-р Елена Порязова, дм

Резервни членове:

Доц. д-р Силвия Генова, дм

## СЪДЪРЖАНИЕ

### Използвани съкращения

#### Цел и задачи

Цел	8
Задачи	8

#### Материали и методи

Материал	9
Методи	9

Макроскопски анализ на изследвания биопсичен материал	9
---	---

Секция на изследвания материал	9
--------------------------------	---

Хистологична обработка на материалите	9
---------------------------------------	---

Хистологични методи	10
---------------------	----

Имунохистохимично изследване	13
------------------------------	----

Отчитане на резултатите от имунохистохимичното изследване	14
---	----

Статистически методи за анализ на резултатите	16
---	----

#### Резултати

Демографски показатели на изследвания материал	19
--	----

Топографско разпределение (локализация) на бенигнените невуси, атипични невуси и меланоми	23
---	----

Основни морфологични характеристики на изследвания материал	26
---	----

Морфологична характеристика на атипичните невуси в изследвания материал	29
---	----

Морфологична характеристика на малигнените меланоми в изследвания материал	31
<b>Резултати от имунохистохимично изследваната експресия на Cyclin D1, BCL2 и p53</b>	44
Резултати от изследването на Cyclin D1	45
Резултати от изследването на p53	53
Резултати от експресия на BCL2	60
<b>Резултати от експресия на S100 protein:</b>	66
<b>Резултати от експресията на Melanosome clone HMB45</b>	70
<b>Резултати от изследването на Ki 67:</b>	78
<b>Статистически анализ за предиктивна стойност на Cyclin D1, p53 и Melanosome clone HMB45</b>	80
<b>Обсъждане</b>	
<b>Заклучение</b>	
<b>Изводи</b>	
<b>Приноси</b>	
Оригинални научно-приложни приноси	109
Потвърдителни приноси	109
<b>Публикации и участия свързани с дисертационния труд</b>	

## **Използвани съкращения**

**BCL2 protein** - B-Cell Lymphoma apoptotic regulator

**P53 protein** – tumor protein p53/ туморен протеин p53

**Cyclin D1** -B cell Lymphoma 1 protein

**ММ** - малигнен меланом

**WHO (СЗО)** – World Health Organisation/ Световна Здравна Организация

**AJCC** – American Joint Committee on Cancer

**HE/ХЕ** – Hematoxilin Eosin stain

**Melan A (MART)** - Melanoma Antigen Recognized By T-Cells

**S100 protein** - S100 Calcium Binding Protein

**HMB45** – Human Melanoma Black 45 (Melanosome clone HMB45)

**Ki 67 (MIB1)** – Ki 67 antigen clone MIB1

**TNM** - T category describes the primary tumour site and size, N category describes the regional lymph node involvement, M category describes the presence or otherwise of distant metastatic spread

**TILs (ТИЛ)** – Tumor Infiltrating Lymphocytes in the stroma

## Въведение

Меланомът е злокачествен тумор с меланоцитен произход, неблагоприятна прогноза и нарастваща честота в световен мащаб. Най – значим, с най – голяма честота е кожният малигнен меланом. Епидемиологичната характеристика на кожния меланом в България, се представя с ниска заболеваемост, умерен темп на нарастване, сравнително ниска смъртност при мъжете и средно висока при жените, но сравнително бърз темп на увеличение и при двата пола. България е с най – ниска преживяемост на пациентите сред държавите от Източна Европа (Димитрова Н, 2015).

Морфологичната диагностика на меланома е труден и сложен процес. Многообразието на пигментните неоплазии, включително и многото дискретните морфологични разлики между малигнените пигментни тумори и атипичните меланоцитни лезии, имитиращи малигнен меланом, в много случаи я правят изключително трудна. Изисква се познаване и оценка на голям брой хистологични параметри и често имунохистохимичен анализ доказващ, както произхода на тумора, така и диференцирането му от другите, особено от атипичните пигментни лезии. Ето защо изграждането на диагнозата само по морфологични критерии в тези случаи е изключително предизвикателство. А правилната и ранна диагноза са от особена важност и са в пряка корелативна връзка с успеха от лечението и преживяемостта на пациентите.

Освен хистологичните критерии за туморна дебелина, митотична активност, наличието или липсата на улцерация, които се приемат като основни прогностични фактори при малигнения меланом, днес, в съвременната диагностика на туморите навлиза употребата на маркери, които значително повишават възможността за по-сигурно потвърждаване на малигнения потенциал на лезията и са значително по-точни предиктори на туморната прогресия. Те биха намерили естествено място и в диагностиката на пигментните неоплазии, поради което търсенето и изучаването им е оправдана необходимост. Всяко изследване и сравнителен анализ на имунореактивността на такива маркери в бенигнените невуси,

атипичните пигментни лезии и малигнения меланом днес, ще обогати диагностичните възможности, а детайлното познаване на имунореактивността им ще предпазва от възможността за диагностични грешки, предпоставки абсолютно необходими при изучаването и познаването на пигментните неоплазии, включително и на биологичното им поведение. Настоящото изследване цели, чрез сравнителен анализ на експресията на маркери като BCL2, p53 protein, Cyclin D1 и на други, определящи пигментната природа на кожните меланоми, бенигнените и атипични невуси, на фона на морфологичните особености за всеки тип лезия, да се установи тяхната значимост за морфологичната диагноза, за ранната диагностика и профилактика, за стадийно ориентирана терапия и предикция на кожния малигнен меланом.

## **Цел и задачи**

### **Цел**

Върху подбрана, морфологично диагностицирана и анализирана кохорта от пигментни (доброкачествени и злокачествени) тумори на кожата, да се направи имунохистохимичен анализ на експресията на определени меланоцитни (S100 protein, Melanosome clone HMB45) и немеланоцитни (Cyclin D1, BCL2, p53 protein) биомаркери, с цел да се потърсят сигнификантни разлики, които да позволят изработването на критерии в помощ на морфологичната диагноза, особено за диференциране на граничните лезии и ММ, и за възможна предикция на биологичното поведение при тези тумори.

### **Задачи**

Постигането на тази цел включва изпълнение на следните задачи:

1. На базата на общоприетите хистоморфологични характеристики, да се подберат, оформят и анализират съответните групи от пигментни кожни лезии (с бенигнени пигментни невуси, с гранични/атипични лезии и с ММ).
2. В така обособените групи от пигментни лезии да се проведе синхронно имунохистохимично изследване на експресията на меланоцитните маркери S100 protein и HMB45 и на немеланоцитните BCL2, p53 protein и Cyclin D1, както и на пролиферативната активност (Ki 67).
3. Да се определи има или не особености и сигнификантни разлики в експресията на съответните маркери в и между различите групи.
4. При установяване на сигнификантни разлики в експресията, да се определи значимостта им за изработване на диагностичен алгоритъм, подпомагащ и осигуряващ морфологичната диагноза при разграничаване на трудните, имитиращи ММ случаи, от истинските малигнени меланоми.
5. На базата на получените резултати и техния анализ, да се потърсят възможни прогностични белези за поведението на граничните лезии и малигнения меланом.



## **Материали и методи**

### **Материал**

Събиране и подбор на материали за настоящото изследване беше извършено от диагностицираните в ДКЦ2 ЕООД Добрич, за периода 2014 до 2019 година пигментни неоплазии, с анализ на клинично-анамнестични данни от придружаващия материалите биопсичен фиш. Бяха определени и подбрани като подходящи за целите на настоящото изследване общо 91 пигментни неоплазии, включващи 57 (петдесет и седем) доброкачествени меланоцитни невуси, 10 (десет) атипични невуса и 24 (двадесет и четири) малигнени меланома. От придружаващия материала биопсичен фиш (в някои случаи и включително от самия пациент или негови близки) се получиха данни за възраст и пол на пациента, локализация, първичност или вторичност на лезията, времето на появата ѝ, темп/бързина на развитие, включително степен на нарастване и промяна във вида на лезията, както и предполагаеми провокиращи фактори.

### **Методи**

#### **Макроскопски анализ на изследвания биопсичен материал**

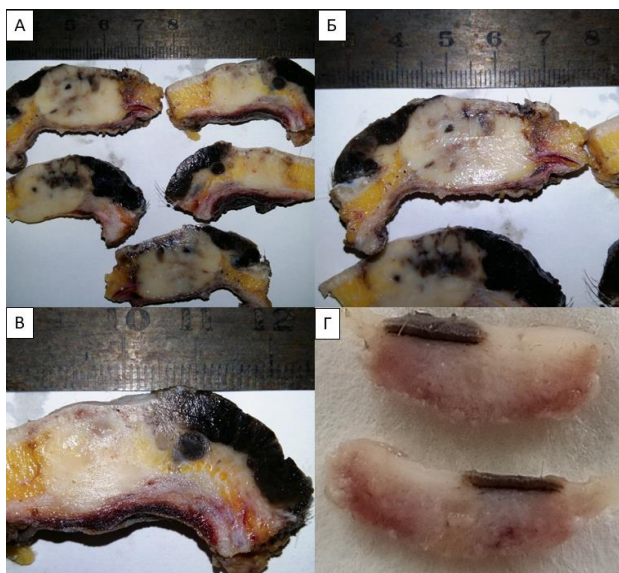
Макроскопската преценка включваще описание на лезията по отношение на големина, очертания (контури) на границите ѝ, наличие на симетрия, цвят и размери, наличие на улцерации, крусти, сателитоза, резекционни граници.

#### **Секция на изследвания материал**

От целия биопсичен материал се изготвиха трансверзални последователни топографски срези с дебелина 2 до 3 мм, включващи лезията с нейните ръбове - периферни и дълбоки (Фиг.4.1), за последваща хистологична обработка.

#### **Хистологична обработка на материалите**

Всеки материал се фиксираше в 10% неутрален формалин, буфериран с 4% метанол, с продължителност на фиксацията от 8 до 48 часа. Обработваше се в хистокинет, с последващо изготвяне на парафиново блокче от всеки срез, включени в парафин с ниска точка на топене 52 до 54 градуса. От всяко парафиново блокче, на парафинов микротом, се приготвяха хистологични срези с последващи рутинни хистологични оцветителни и имунохистохимични методики.



Фигура. 1: А - Секция на голям нодуларен меланом в окосмена кожа на главата; Б – същата лезия от фигура 1А в по-близък план; В – същата лезия от фигура 1А и 1Б в по-близък план с видима сателитна лезия; Г – секция на граничен меланоцитен некус.

### Хистологични методи

Срезите от парафиновите блокчета се депарафинираха в ксилол и последваща дехидратация с възходяща редица от етанол, оцветяваха се с хематоксилин-еозин и се включваха в еокит с

покривни стъкла. Микроскопското изследване се провеждаше със светлинен микроскоп „Olympus” CX31. Микроскопската оценка на всяка една лезия следваше изискуемите за морфологична диагноза на пигментните лезии параметри (Elder D, 2018), изследвани морфологично, морфометрично и с полуколичествени методи а именно:

- Оценка на базирането (позиционираност) на меланоцитната пролиферация;
- Оценка на микроскопската симетричност на профила на лезията;
- Вида клетъчност, клетъчен атипизъм с определяне степента на изразеност,

локализация и разпределение в тумора;

- Дебелина на лезията (дебелина на туморната маса) определена по четиристе-

пенната скала на Breslow, измерена с окулярмикрометър в мм, от нивото на грануларния епидермален слой или от ръба на дефекта при разязвени тумори, до най – дълбоката инфилтрираща група меланоцити в дермата или в хиподермата. Дълбоката вертикална пропация на единични или малки групи от туморни клетки, перпендикулярно на базата, не се отчиташе (не се вземаше предвид). Измерването се извършваше, само върху перпендикулярни на епидермалната повърхност хистологични срезове. Измерена по този начин дебелината се квалифицираше, както следва : Breslow I – дебелина до 0,75 мм, Breslow II – от 0,76 до 1,50 мм, Breslow III – от 1,51 до 4,00 мм, Breslow IV – дебелина над 4мм;

- Оценка на митотичната активност с отчитане на митозите по метода “hot spot”

(миточните фигури на квадратен милиметър, изчислени като сбор от митозите в полето с най – голям брой митози /гореща точка/ и четири съседни полета, при увеличение 400x, според изискванията на протокола от 1982 г, на International Pathology Workshop, включена в седмата ревизия на TNM класификацията (Amin M, 2017). Митотичната активност се определяше като: умерена митотична активност (1 до 5 митози), висока митотична

активност (6 до 10 митози), много висока митотична активност (над 11 митози);

- Микроинвазия по Clark, оценена в пет степени на микроинвазия до отделните анатомични слоеве на кожата: Clark 1 – малигнена пролиферация в епидермиса, Clark 2 - инвазия на малигнената пролиферация в папиларната дерма, Clark 3 – преминаване на границата с ретикуларната дерма, Clark 4 – ангажира на ретикуларната дерма, Clark 5 – ангажиране на хи подермата (Clark W, 1967);

- Оценка на улцерация в меланомите с преценка вида на улцерацията като:

инфилтративна улцерация - инвазия и ерозия на епитела, най – честа при нодуларни меланом без епидермална инвазия, които изтъняват и вторично разкъсват епидермиса и травматична улцерация, която няма прогностичен смисъл. Определяше се и размера на улцерацията (под или над 70% от общата туморна дължина и до 5 мм диаметър или над 5 мм диаметър), който има прогностично значение (Eggermont A, 2012-2; Naydu L, 2012; Vønnelykke-Behrndtz M, 2014;

- Наличие на тумор инфилтриращи лимфоцити (ТИЛ) като проява на имуноен отговор спрямо меланомните клетки. Инфилтрацията се категоризираше в три групи - изразена, умерена и минимална, до отсъстваща (Plaza J, 2017). Отчиташе се като високо интензивна ТИЛ при непрекъснат лимфоиден инфилтрат в туморната периферия и между туморните клетъчни агрегати; умерена ТИЛ при наличие на огнищни, но със сравнително плътна клетъчност лимфоидни инфилтрати в туморната периферия и фокална между туморните клетки; слаба до липсваща ТИЛ в случаите, когато са налице отделни, с ниска плътност лимфоидни инфилтрати в туморната периферия и /или в туморната строма;

- Отчитане на регресия в меланомите, изразяваща се в заместване на меланомните клетки от фиброза, меланофаги, лимфоцитен инфилтрат и телеангиоектатични съдове, със или без резидуален

интрадермален компонент и определена като фокална или екстензивна;

- Наличие на сателитоза при меланомите, микроскопски представляващи кожни

или субкутанны туморни клетъчни групи, с диаметър по – голям или равен на 0,05 мм, разположени около първичния меланом, но отделени от него с нормален колаген или мастна тъкан (Day C, 1981; Barnhill R, 2004).

## **Имунохистохимично изследване**

Депарафинирани и дехидратирани срези от същите парафинови блокчета се обработваха с универсална система на DAKO (En vision flex TRS high pH /Link/), включваща буфери за антигенно възстановяване, депарафиниране, рехидратация, промиване и последващо оцветяване с визуализираща система HRP Magenta Substrate Chromogen на DAKO Omnis GV925, при която таргетираните антигенни обекти и антитела се оцветяват в червено. Антителното въздействие се извършваше по стандартизиран протокол за работа с антитела. Изработването на препаратите беше осъществявано едноетапно на автоматизирана (роботизирана) затворена система на DAKO autisteiner Link 48.Използваха се следните антитела:

**Анти S100 protein** на DAKO IR504, поликлонално заешко антитяло, готово за употреба, антигенно възстановяващ буфер с рН 9, за доказване меланоцитен характер на лезията. Клетките маркирани с антитялото позитивират ядрена и цитоплазмена експресия.

**Анти Melanosome, clone HMB 45 (Human Melanoma Black)**, моноклонално мише антитяло на DAKO IR052, готово за употреба, антигенно възстановяващ буфер с рН 9, също за доказване меланоцитния характер на лезията. Клетките маркирани с антитялото позитивират цитоплазмена експресия.

**Ki 67 antigen clone MIB - 1**, моноклонално мише антитяло на DAKO IR626, готово за употреба, за проследяване на пролиферативната активност на меланоцитните клетки. Маркирани с антитялото, те позитивират ядрена експресия.

Експресията за целите на изследването се прецизираше в пет групи: Кі 67 (+) клетки - 0 до 2% , 3 до 5% , 6 до 10%, 11 до 20%, над 20%. Определянето на експресията се извършваше в най – пролиферативната зона, без сериозен възпалителен инфилтрат, при ниско увеличение. В тази „гореща точка“ процентът на ядрено оцветените клетки се изчисляваше в около 200 туморни клетки, което позволява интерпретирането при тънки и дебели лезии (Uguen A, 2015).

**Антитяло p53 protein**, моноклонално мише, clone D07, DAKO IR616, готово за употреба. Клетките маркирани от антитялото показват ядрено оцветяване, но в някои случаи може да се регистрира и цитоплазмено.

**Антитяло BCL2 онкопротеин**, моноклонално мише, clone 124, DAKO IR614, готово за употреба. Клетките маркирани с антитялото, показват цитоплазмено оцветяване.

**Антитяло Cyclin D1**, моноклонално заешко, clone EP12, готово за употреба, DAKO IR083. Клетките маркирани от антитялото показват предимно ядрено оцветяване.

### **Отчитане на резултатите от имунохистохимичото изследване**

Оценката на експресията на различните използвани антитела се извършваше светлинномикроскопски, на базата на полуколичествен анализ. От всеки отделен случай се изследваха по 10 зрителни полета, при увеличение 400x. Отчиташе се: 1. интензитет на експресията в четиристепенна скала, от 0 (негативна) до 4 степен (високо позитивна); 2. характера на разпространение на експресията като фокална/петниста или дифузна/непрекъсната; 3. топографска характеристика на експресията: суперфициално в дермоепидермалната граница (горна порция), в дълбоко разположените части на лезията или дифузно в цялата и дебелина; 4. наличие или липса на различия в степента на интензитет на експресията в една и съща лезия. За позитивна експресия приемахме оцветяване на клетките в червено с три степени на интензитет: светло червено оцветяване (+),

съответстващо на ниско/слабо интензивна експресия; червено оцветяване (++)), съответстващо на умерено интензивна експресия и тъмно червено оцветяване (+++), отговарящо на високо интензивна експресия. Въз основа на тези основни изисквания за оценка на имунохистохимичните реакции и въз основа на натрупания опит, разработихме детайлизирано отчитане на експресията по интензитет и разпространение в единадесет групи (модела), както следва:

1. Липса на експресия – пълна липса на експресия или експресия в единични клетки

2. Нискоинтензивна експресия в горната порция на лезията

3. Нискоинтензивна петниста експресия, т.е. фокална експресия с нисък интензитет в отделни участъци от цялата дебелина на лезията

4. Ниско интензивна дифузна – експресия с нисък интензитет в цялата дебелина на лезията

5. Умерено интензивна в горната порция на лезията

6. Умерено интензивна петниста експресия - фокална експресия с умерен интензитет, в отделни участъци от цялата дебелина на лезията

7. Умерено интензивна дифузна експресия – експресия с умерен интензитет в цялата дебелина на лезията

8. Високо интензивна експресия в горната порция на лезията

9. Високоинтензивна петниста експресия - фокална експресия с висок интензитет в отделни участъци от цялата дебелина на лезията

10. Високо интензивна дифузна експресия – експресия с висок интензитет в цялата дебелина на лезията

11. Хетерогенна експресия – експресия в цялата дебелина на лезията, но варираща по интензитет

Наблюдаваните морфологични и имунохистохимични характеристики при отделните случаи документирахме с дигитални снимки със сканиращ апарат Leica Aperio Scan Scope AT2 device (Aperio Technologies, Vista, CA) Image Scope V12.1.0.5029 (Aperio).

## **Статистически методи за анализ на резултатите**

Използвахме програма за статистически анализ - IBM, SPSS v. 23. Резултатите са представени таблично чрез програма Microsoft Excel v.2010.

Видовете използвани статистически методи са както следва:

### **Дескриптивни методи**

За изчисляване на средната аритметична величина и стандартно отклонение на количествени признаци.

### **Непараметричен анализ**

За установяване на категорийни признаци чрез кростабулация и критерий  $\chi^2$  (хи-квадрат) на Pearson. Кростабулацията формира двупосочни и многопосочни таблици. Структурата на таблицата е подредена по категории, които спомагат за определяне вида на използвания статистически тест. Получените резултати са оценени като статистически значими, когато р-стойността (p-value) е  $< 0,05$ .

### **Корелационен анализ**

За измерване степента на асоциация между две или повече променливи. Корелационният коефициент приема стойности между -1 и 1, като знакът е в зависимост от посоката на асоциация, а стойности над 0,5 се приемат за силна корелация. Получените резултати са оценени като статистически значими когато р-стойността (p-value) е  $< 0.05$ .

### **T-test анализ**

За изчисляване на разликите между стойностите на променливите за всеки отделен случай/пациент и тестване дали средните стойности се различават от 0, т. е. дали има разлика



при сравнението или не, и дали тази разлика е статистически значима.

### **Вариационен анализ**

ANOVA тест за параметрични данни и Kruskal-Wallis test за непараметрично разпределени данни, използван за сравняване на разликите по различните изследвани показатели между доброкачествени невуси, атипичните невуси и меланомите. Графичната визуализация на сравнените стойности на показателите са представени с Error Bar Graphs. Разликите между стойностите са приемани за достоверни при стойност  $p < 0.05$ , която е приетата статистически достоверна разлика за биологични експерименти. Post-Hoc test по метода на Tukey и Dunn е използван да покаже между кои групи конкретно се откриват тези статистически значими разлики.

### **Корелационен анализ на Spearman ( $\rho$ )**

Използван за определяне на зависимости между променливите. Степента на асоциативна зависимост е: значителна при  $0.5 < \rho = 0.7$ ; голяма при  $0.7 < \rho = 0.9$ ; изключително голяма при  $\rho > 0.9$ . Статистическа значимост се приема при  $p \leq 0.05$ .

### **Резултати**

От диагностицираните пигментни тумори, за периода 2014 – 2019 г. в лабораторията в ДКЦ2 ЕООД Добрич, бяха определени и подбрани като подходящи за целите на настоящото изследване, базирано в по – голямата си част на имунохистохимичен анализ – общо 91 пигментни неоплазии, включващи 57 (петдесет и седем) доброкачествени меланоцитни невуси, 10 (десет) атипични невуса и 24 (двадесет и четири) малигнени меланома (Табл 5.1 - Табл.5.3). От бенигнените пигментни лезии 30 (тридесет) са съставни, 22 (двадесет и две)

интрадермални, 1 (един) граничен, 1 (един) комбиниран (Spitz с конвенционален съставен), 1 (един) пигментен Reed невус, 2 (два) малки конгенитални от съставен тип. Атипичните невуси са 1 (един) съставен с нискостепенен атипизъм в дермалната компонента, 4 (четири) съставни с нискостепенна дисплазия в граничната компонента, 5 (пет) от граничен тип с нискостепенен атипизъм в четири от тях и един с тежкостепенен атипизъм. Меланомите са 18 (осемнадесет) нодуларни (2 първичен нодуларен и 16 вертикална растежна фаза на суперфициално напредващ меланом), 3 (три) суперфициално напредващи, 1 (един) малигнен син невус, 1 (един) Spitz меланом и 1 (един) детски първичен дермален, нодуларен меланом.

*Таблица 5.1. Разпределение на изследваните доброкачествени невуси по хистологичен вид*

	съставни	интрадермални	гранични	Пигментен невус на Reed	комбинирани	конгенитални	общо
Брой (n=)	30	22	1	1	1	2	57

*Таблица 5.2. Разпределение на изследваните атипични невуси според хистологичния им вид*

	атипизъм в граничната компонента		атипизъм в дермална компонента	общо
	нискостепенен	високостепенен		
Брой (n=)	8	1	1	10

Таблица 5.3. Разпределение на изследваните меланоми според хистологичния им вид

	нодуларни		суперфициално напредващ	Spitz меланом	малигнен син невос	детски меланом	общо
	първични дермални	вертикална растежна фаза					
Брой (n=)	2	16	3	1	1	1	24

В изследвания за целите на настоящото проучване материал, селектираните лезии, строго отговарящи на клинично-морфологичните критерии за съответната група, са представени сравнително на Табл.5.4. Бенигнените меланоцитни лезии съставляват 62.63% (57 сл.), атипичните невоси са 11% (10 сл.), а случаите с малигнен меланом - 26.37% (24 сл.)

Таблица 5.4. Разпределение на изследваните пигментни неоплазии в трите таргетиранни групи

	Бенигнени неви	Атипични неви	меланоми	общо
Брой (n=)	57	10	24	91
%	62,63%	11%	26,37%	100%

### Демографски показатели на изследвания материал

Те включват данни за половото разпределение на лезиите, възрастова характеристика и локализация на образуванията:

**Половото разпределение** по групи е както следва:

При случаите с **бенигнени невоси** женският пол превалява – 42 случая, мъжете са – 15 случая, съответно:

- 46,15% жени и 16, 48% мъже

При **атипичните невуси** жените са 5 случая, мъжете са също 5, респективно:

- 5,50 % мъже и 5,50 % жени

При случаите с **малигнен меланом** разпределението показва равнопоставеност на двата пола – 12 случая при мъже и 12 при жени, съответно:

- 13,2 мъже и 13,2% жени.

Сравнително представен относителният дял на разпределение на лезиите по пол в отделните групи пигментни лезии е както следва: (Табл. 5.5) В целия, изследван от нас материал доминира женският пол, почти 2:1 превес на жените с пигментни тумори спрямо мъжете.

*Таблица 5.5. Сравнително процентно разпределение на изследваните лезии според пола на пациентите*

пол	Бенигнени невуси % (n=)	Атипични невуси % (n=)	Меланоми % (n=)	Общо % (n=)
Мъже	16,48 % (n=15)	5,50 % (n=5)	13.20 % (n=12)	35,17 % (n=32)
Жени	46.15 % (n=42)	5,50 % (n=5)	13.20 % (n=12)	64,83 % (n=32)
Общо	62,63 % (n=57)	11 % (n=10)	26.37 % (n=24)	100 % (n=91)

### **Разпределението по възраст е следното:**

Разпределението по възраст на бенигнените лезии в изследваната кохорта (представени в абсолютни стойности и като относителен дял от общия брой изследвани пигментни лезии) е както следва:

- 0 -10 години - 0 случая (0%),
- 11 - 20 години – 11 случая (12,09%),
- 21 – 30 години – 10 случая (10,99%),

- 31 – 40 години – 15 случая (16,49%),
- 41 – 50 години – 15 случая (16,49%),
- 51 – 60 години – 3 случая ( 3,29%),
- 61 – 70 години – 2 случая ( 2,19%),
- 71 – 80 години – 1 случай (1,09%),
- 81 – 90 години – 0 случая (0%).

**Разпределение по възраст на атипичните лезии в кохортата е:**

- 0 – 10 години – 0 случая ( 0%),
- 11 – 20 години – 2 случая (2,20%),
- 21 – 30 години – 5 случая (5,5%),
- 31 – 40 години – 1 случай ( 1,1%),
- 41 – 50 години – 1 слуай (1,1%),
- 51 – 60 години – 0 случая (0%),
- 61 – 70 години – 1 случай (1,1%),
- 71 – 80 години – 0 случая (0%),
- 81 – 90 години – 0 случая (0%).

**Разпределение по възраст на малигнените меланоми е:**

- 0 – 10 години – 1 случай ( 1,09%),
- 11 – 20 години – 0 случая (0%),
- 21 – 30 години – 1 случай (1,09%),
- 31 – 40 години – 2 случая (2,19%),
- 41 – 50 години – 4 случая (4,30%),
- 51 – 60 години – 3 случая (3,30%),
- 61 – 70 години – 6 случая (6,59%),
- 71 – 80 години – 5 случая (5,5%),
- 81 – 90 години – 2 случая (2,19%).

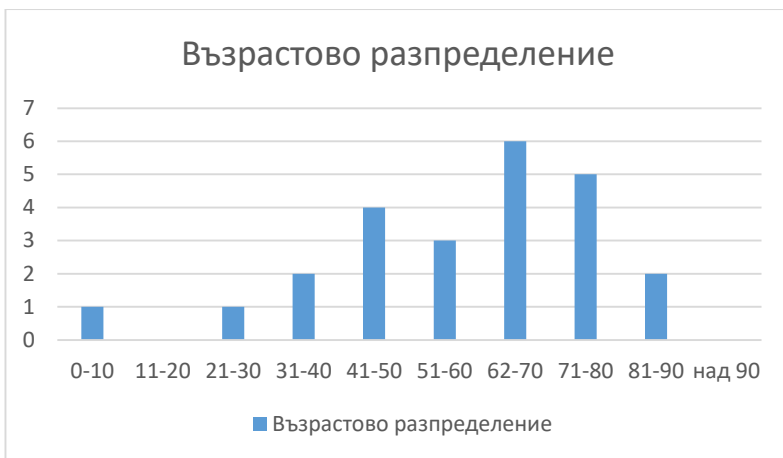
Сравнителното съотношение на възрастовите групи при различните пигментни лезии е представено на Табл. 5.6.

*Таблица 5.6 Процентно разпределение на изследваните меланоцитни лезии според възрастта на пациентите*

диагностична група
--------------------

<b>възрастова група</b>	<b>бенигнени неви % (n=)</b>	<b>атипични неви % (n=)</b>	<b>меланоми % (n=)</b>	<b>общо % (n=)</b>
0-10	0% (n=0)	0% (n=0)	1.09 % (n=1)	1.09 % (n=1)
11-20	12.09 % (n=11)	2.2 % (n=2)	0 % (n=0)	14.29 % (n=13)
21-30	10.99 % (n=10)	5.5 % (n=5)	1.09 % (n=1)	17.58 % (n=16)
31-40	16.49 % (n=15)	1.1 % (n=1)	2.19 % (n=2)	19.78 % (n=18)
41-50	16.49 % (n=15)	1.1% (n=1)	4.30% (n=4)	21.89 % (n=20)
51-60	3.29 % (n=3)	0% (n=0)	3.30 % (n=3)	6.59 % (n=6)
61-70	2.19 % (n=2)	1.1 % (n=1)	6.59 % (n=6)	9.88 % (n=9)
71-80	1.09 % (n=1)	0% (n=0)	5.5 % (n=5)	6.59 % (n=6)
81-90	0 % (n=0)	0 % (n=0)	2.19 % (n=2)	2.19 % (n=2)
Общо	62.63 % (n=57)	11 % (n=10)	26.37 % (n=24)	100 % (n=91)

Средната възраст на пациентите с меланом в изследвания материал е 59,82 години (диапазон 8 – 89 години). Във всички възрастови групи, с изключение на групата 11 до 20 години се установиха случаи на меланом, с най – висока честота във възрастовата група 61 до 70 години, следвани от 71 до 80 и 51 до 60 ( Фиг. 5.1).



Фигура 5.1: Разпределение на случаите с малигнен меланом по възрастови групи

От тези данни следва, че процентно, по-голямата част от случаите с меланом са диагностицирани при пациенти над 40 години, като разликата спрямо останалите възрастови групи е статистически значима ( $X^2 = 38.13$ ,  $p=0.001$ ). С увеличаване на възрастта броят на възможно откритите меланоми се увеличава, т.е. съществува положителна корелационна зависимост ( $\rho=0.463$ ,  $p=0.001$ ).

#### **Топографско разпределение (локализация) на бенигнените невуси, атипични невуси и меланоми**

Топографското разпределение на доброкачествените пигментни лезии в изследвания материал показва следното:

- глава и шия – 24 случая (26,38%),
- гръб – 11 случая (12,09%),
- гърди – 10 случая (11,49%),
- корем – 9 случая (10,35%),
- горен крайник 2 случая (2,19%),
- долен крайник – 1 случай (1,09%).

Топографското разпределение на **атипичните невуси е:**

- глава и шия – 2 случая (2,19%),
- гръб – 3 случая (3,29%),
- гърди – 1 случай (1,09%),
- корем – 3 случая (3,29%),
- горен крайник – 1 случай (1,09%),
- долен крайник – 0 случая (0%).

Топографското разпределение на **малигнените меланоми е:**

- глава и шия – 3 случая ( 3,29%),
- гръб – 5 случая (5,49%),
- гърди – 5 случая (5,49%),
- корем – 2 случая (2,19%),
- горен крайник – 3 случая ( 3,29%),
- долен крайник – 6 случая (6,59%).

Сравнителните данни за локализацията на лезиите между отделните групи представени като % от общия брой изследвани пигментни лезии е следното (Табл. 5.7):

*Таблица 5.7. Сравнително топографско разпределение на пигментните лезии по области – глава и шия, гръб, гърди, корем, горен крайник, долен крайник в различните групи*

Локализация	Бенигнени невуси % (n=)	Атипични невуси % (n=)	Меланоми % (n=)	Общо % (n=)
Глава и шия	26,38% (n=24)	2,19% (n=2)	3,29% (n=3)	31,87% (n=29)
Гръб	12,09% (n=11)	3,29% (n=3)	5,49% (n=5)	20,87% (n=19)
Гърди	10,99% (n=10)	1,09% (n=1)	5,49% (n=5)	17,57% (n=16)
Корем	9,90% (n=9)	3,29% (n=3)	2,19% (n=2)	15,38% (n=14)
Горен крайник	2,19% (n=2)	1,09% (n=1)	3,29% (n=3)	6,57% (n=6)
Долен	1,09% (n=1)	0% (n=0)	6,59% (n=6)	7,68%

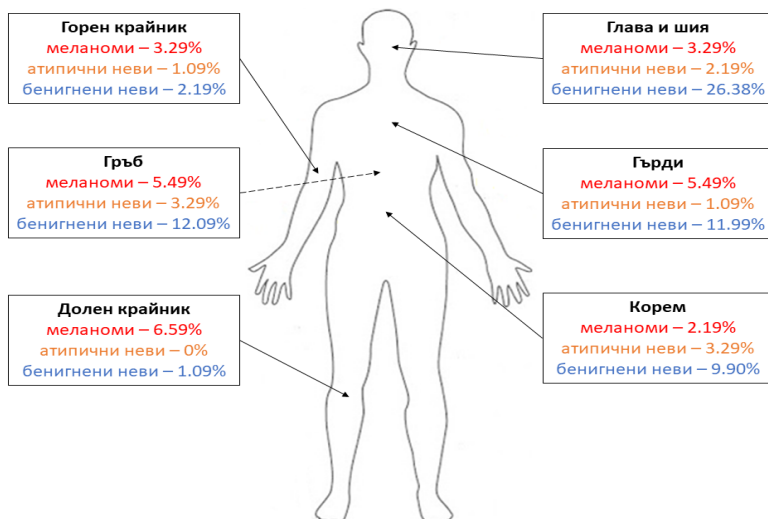


крайник				(n=7)
Общо	65,52% (n=57)	6,9% (n=10)	27,59% (n=24)	100% (n=91)

Данните показват, че най – голяма част от бенигнените невуси е в областта на главата и шията, следвани от тези в областта на гърба, гърдите и корема, по – рядко на горните и най – малко на долните крайници.

Атипичните невуси са с честа локализация по кожата на гърба и корема, следвани от тези в областта на главата и шията (атипичен е и единственият невус, установен в областта на лицето).

Превалират случаите с малигнен меланом диагностицирани в областта на кожата на долните крайници, следвани от тези на гърба и гърдите (последните две локализации са с равнопоставеност на стойностите). (Фиг. 5.2)



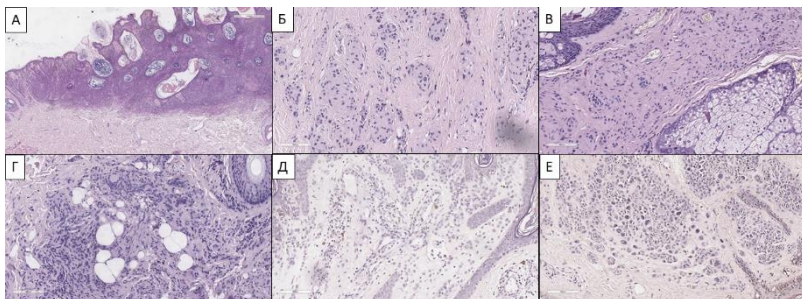
Фигура 5.2: Топографско разпределение (локализация) на пигментни лезии от изследвания материал.

## **Основни морфологични характеристики на изследвания материал**

Морфологична характеристика на бенигнените пигментни лезии (57 случая) в изследвания материал:

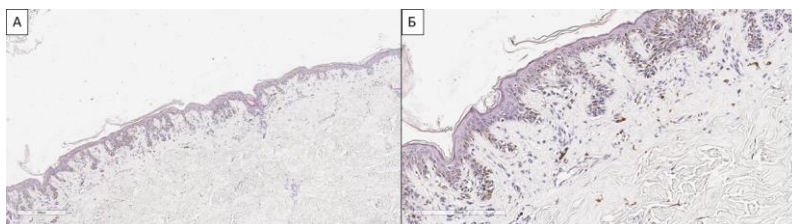
**Съставните невуси** (30 случая) са с размери от 5 до 15 мм, добре отграничени и симетрични, елевирани, от папули до куполовидни или веруциформени (папиломатозни), с еднаква пигментация, от розова до светлокафява или тъмнокафява. Микроскопски са съставени от гранична и интрадермална компоненти, без екстензия на граничната порция извън пределите на дермално разположените меланоцити, с матурация на клетките в дълбочина; клетки са тип А (епителоидоподобни меланоцити) и тип В (лимфоцитоподобни), рядко с единични митози в дълбоката порция; два от невусите са съчетани с кератинови кисти.

**Интрадермалните невуси** (22 случая) са с размери от 5 до 20 мм, също добре отграничени и симетрични, елевирани, куполовидни (невус на Unna), мамелонирани или веруциформени (невус на Miescher), с еднотипна пигментация, от светло кафяви, сиво – белезникави до белезникави и жълто белезникави в лезиите със склероза и липоматоза. Микроскопски са изградени от тип В и тип С (neural like) клетки, без митози, с гнездна структура, отделени от дермо-епидермалната границата чрез тънка или по дебела лентовидна фиброзна зона, с намаляваща пигментация в дълбочина и прояви на матурация (невротизация - Шванизация), наличие на мултинуклеирани гигантски клетки, псевдоваскуларни пространства; откриват се и прояви на стареене (фиброза, липоматоза, липосклероза), както и съпътстващи трихофоликуларни кератинови кисти.(Фиг. 5.3).



*Фигура 5.3 Меланоцитни невуси: А – веруциформен невус с кератинови кисти, оцветяване ХЕ, оригинално увеличение 40х, Б и В – Шванизация в меланоцитен невус, оцветяване ХЕ, оригинално увеличение 200х, Г – липоматоза в меланоцитен невус, оцветяване ХЕ, оригинално увеличение 200х, Д – невус с телеангиектатични съдове, оцветяване ХЕ, оригинално увеличение 200х, Е – мултинуклеарни клетки в интрадермален меланоцитен невус, оцветяване ХЕ, оригинално увеличение 200Х.*

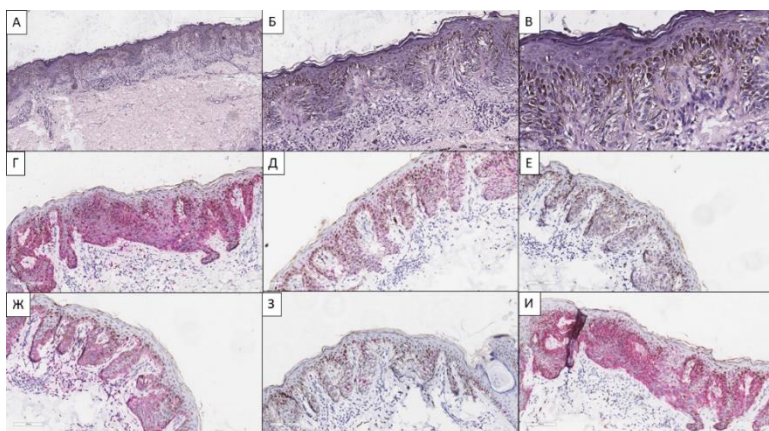
Единият **граничен невус** е с макуларен вид, диаметър 6 мм, добре отграничен, с добре дефинирани граници, еднаква тъмнокафява пигментация. Микроскопски е изграден от епителоидни меланоцити, с гнездна структура във върховете на епидермалните гребени, малки еднакви ядра с незабележими нуклеоли, еднотипна цитоплазмена пигментация и меланофаги в папиларната дерма (Фиг. 5.4).



*Фигура 5.4 – Граничен невус: А оригинално увеличение 70Х, оцветяване ХЕ; Б оригинално увеличение 200Х, оцветяване ХЕ*

**Комбинираният невус** е разположен на кожата на гърба, елевиран, ангажира повърхност от 10 мм и височина 3 мм и микроскопски е представен от епителоиден тип апигментни клетки в Spitz компонентата и с обичайния вид на съставен меланоцитен невус в граничната и интрадермална компоненти.

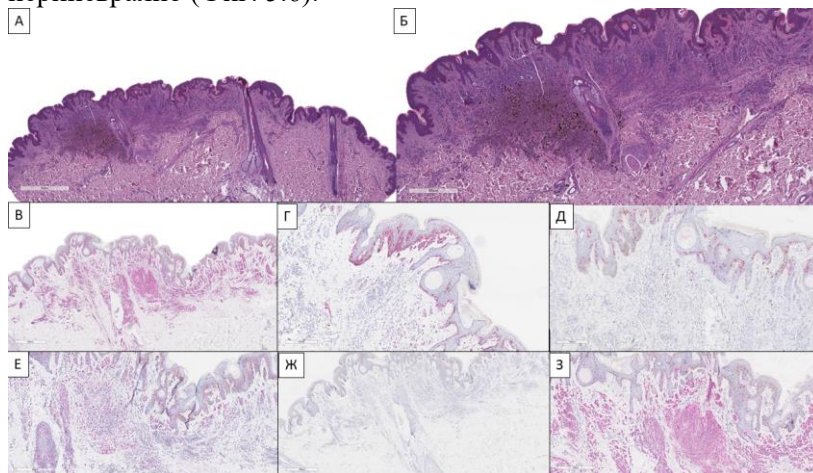
**Пигментният невус на Reed** е на кожата на подбедрицата, слабо елевиран, с диаметър 10 мм, отграничен, тъмно кафяво пигментиран. Микроскопски е с характеристика на граничен тип невус от източени фасцикулирани, еднакви, пигментирани меланоцити, образуващи гнезда; налице е инконтиненция на пигмент и меланофаги в дермата с минимална фокална лимфоцитна инфилтрация (Фиг. 5.5).



*Фигура 5.5: Пигментен невус на Reed: А – оригинално увеличение 80x, оцветяване ХЕ; Б – оригинално увеличение 200x, оцветяване ХЕ; В – оригинално увеличение 400x, оцветяване ХЕ; Г – IXX реакция S100 protein, оригинално увеличение 200x; Д – IXX реакция Cyclin D1, оригинално увеличение 200x; Е – IXX реакция p53 protein, оригинално увеличение 200x; Ж – IXX реакция BCL2, оригинално увеличение 200x; З – IXX реакция Ki67, оригинално увеличение 200x; И – IXX реакция HMB45, оригинално увеличение 200x.*

Двата малки **конгенитални невуси** са с размери 10 и 15 мм, височина 8 и 10мм, мамелонирани, окосмени, отграничени и

симетрични, тъмнокафяви, с еднаква пигментация. Микроскопски са съставни от тип А и В меланоцити, с епидермална акантоза и хиперкератоза, дифузен растеж с ангажиране на фоликуларния епител, периваскуларно и периневрално (Фиг. 5.6).

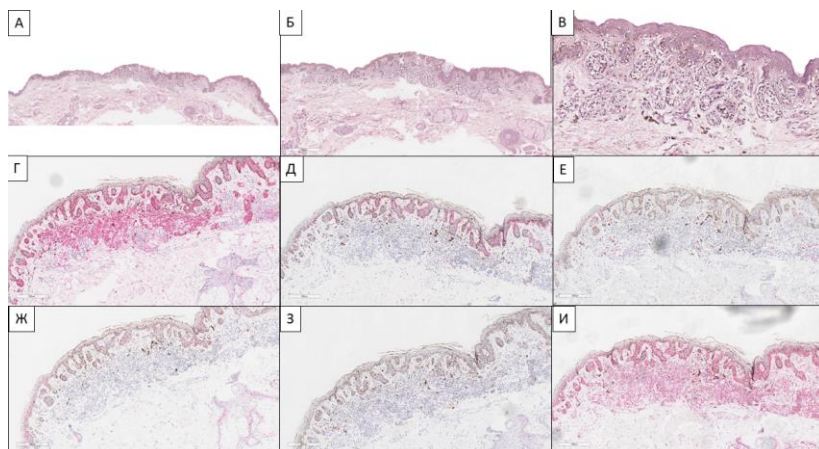


*Фигура 5.6: Конгенитален невус: А – оцветяване ХЕ оригинално увеличение 20x; Б – оцветяване ХЕ оригинално увеличение 80x; В – ИХХ експресия S100 protein оригинално увеличение 100x; Г – ИХХ експресия HMB45 оригинално увеличние 100x; Д – ИХХ експресия Ki 67 оригинално увеличение 100x; Е – ИХХ експресия Cyclin D1 оригинално увеличение 100x; Ж – ИХХ експресия p53 оригинално увеличение 100x; И – ИХХ експресия BCL2 оригинално увеличение 100x*

### **Морфологична характеристика на атипичните невуси в изследвания материал**

Извадката съдържа десет атипични невуса: 1 (един) съставен с нискостепенен атипизъм в дермалната компонента, 4 съставни с нискостепенна дисплазия в граничната компонента и 5 (пет) от граничен тип с нискостепенен атипизъм в четири от тях и един с тежкостепенна дисплазия.

Лезиите са с размери от 5 до 16 мм, с неравни граници и хетерогенна кафява пигментация, макуларни или със слабо неравна повърхност. Микроскопски клетките са неравномерно натоварени с пигмент, налице е екстензия на граничната клетъчна компонента извън границите на дермалния пул при първия съставен невус (феномен на рамото) и архитектурна асиметрия с образуване на арки от хоризонтално ориентирани меланоцитни гнезда и клетъчно гнездно сливане във всички останали, придружено от огнищен клетъчен атипизъм, с лекостепенно ядрено уголемяване (спрямо кератиноцитните ядра) и видими нуклеолии (Фиг. 5.7).



Фигура 5.7: Диспластичен меланоцитен невус с нискостепенен атипизъм: А – обзорна снимка оцветяване ХЕ; Б – оцветяване ХЕ увеличение 40x; В – оцветяване ХЕ увеличение 200x; Г – ИХХ експресия S100 protein увеличение 100x; Д – ИХХ експресия HMB45 увеличение 100x; Е – ИХХ експресия Ki 67 увеличение 100x; Ж – ИХХ експресия Cyclin D1 увеличение 100x; З – ИХХ експресия p53 увеличение 100x; И – ИХХ експресия BCL2 увеличение 100x

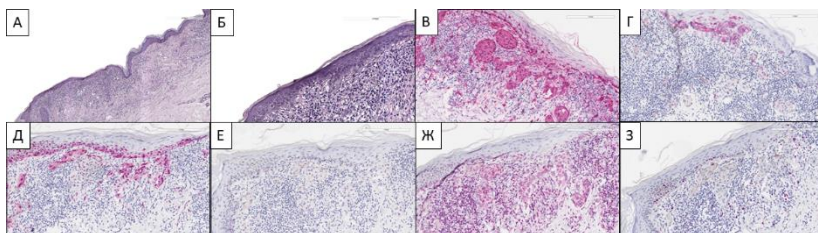
## **Морфологична характеристика на малигнените меланоми в изследвания материал**

Случаите с меланом (24 случая) са със следната морфологична характеристика:

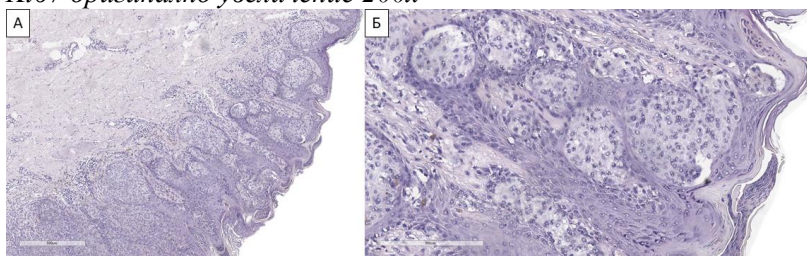
**Нодуларните меланоми** (18 случая) в изследвания материал са екзофитни, възловидни лезии с диаметър от 10 до 35 мм и височина от 6 до 25 мм, с неравни граници и повърхност, разязвяване, хетерогенна пигментация, включително апигментни регресионни участъци, в периферията с асиметрични макуларни фокуси от предшестващи невуси. Микроскопски изследваните нодуларни меланоми са изградени от полиморфни, дискохезивни клетки от епителоиден тип, с гнездна структура, жлезоподобно подреждане (псевдожлезни структури) или източени клетки във фасцикули, като в един и същ тумор се установяват различни видове клетъчност и подреждане; пигментацията е хетерогенна, включително бедни на пигмент туморни клетки, или с наличие на пигмент само в групи от стромни макрофаги, наличие на много митози, различно представена лимфоцитна стромна реакция, васкуларни емболи в периферни на тумора дермални съдове в два от меланомите.

Три от меланомите са **суперфициално напредващи** и трите при жени на кожа от крайниците - два на горен и един на долен крайник. Двата са тънки, 0,5 и 1мм, третият е с дебелина 2 мм., единият е макуларен, другите два плаковидни, салабо релефни, с неравни, лошо дефинирани граници, хетерогенна кафява пигментация, асиметричен секционен профил. Микроскопски са с неравномерна епидермална акантоза, удължени епидермални гребени с лентигинозна и гнездна пролиферация във върховете им, представена от епителоидоподобни клетки, с везикуларни ядра, добре видими нуклеоли и явен полиморфизъм, пейджетоидно напредване в епидермиса и асиметрична периферна екстензия на патологичния пролиферат (Фиг. 5.8-5.9)





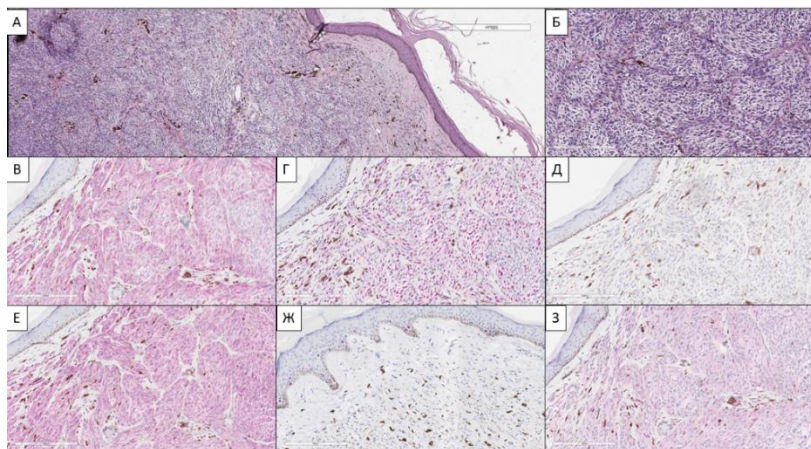
Фигура 5.8: Суперфициално напредващ меланом, хоризонтална фаза на растеж, оригинално увеличение А-40х, Б-200х, оцветяване HE; В – IXX реакция S100 protein оригинално увеличение 200х; Г IXX реакция HMB45 оригинално увеличение 200х; Д – IXX реакция Cyclin D1 оригинално увеличение 200х; Е – IXX реакция p53 оригинално увеличение 200х; Ж – IXX реакция BCL2 оригинално увеличение 200х; З - IXX реакция Ki67 оригинално увеличение 200х



Фигура 5.9: Суперфициално напредващ меланом, вертикална фаза на растеж, оригинално увеличение А-40х, Б-200х, оцветяване HE

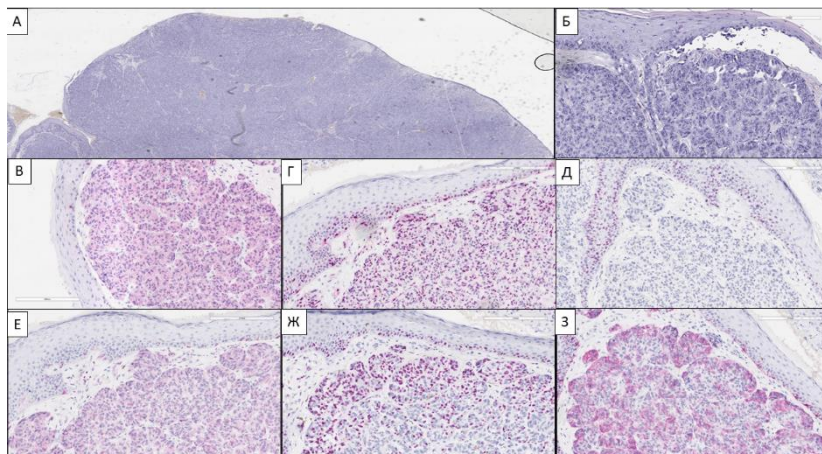
**Малигниеният син невус** (melanoma arising blue nevus or blue nevus like melanoma) в изследвания материал е на мъж, на кожата по дорзална повърхност на стъпалото, с вид на елевирана лезия с диаметър 30 мм и дебелина 7 мм, черен цвят, солиден асиметричен секционен профил и остатъци от дермо – хиподермален син невус в периферията. Микроскопски, меланомните клетки са вретеновидни, с фасцикулирано подреждане, бедни на пигмент, хиперхромни ядра с добре видими нуклеоли и чести митози; наличие на пигмент в стромни меланофаги, както и на микросателит в периферната дерма (Фиг. 5.10).





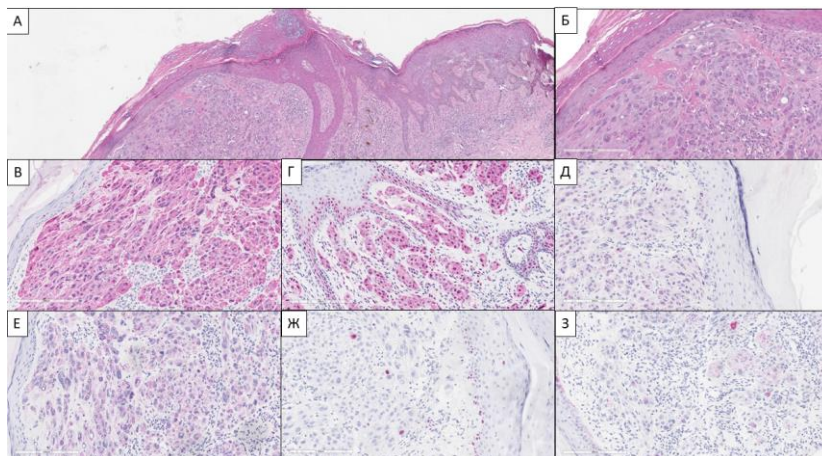
*Фигура 5.10: Малигнен син невос – меланом възникващ на базата на син невос: А – обзорно увеличение, Б – оцветяване ХЕ, оригинално увеличение 200x; В – IXX реакция S100 protein, оригинално увеличение 200x; Г – IXX реакция Cyclin D1, оригинално увеличение 200x; Д – IXX реакция p53 protein, оригинално увеличение 200x; Е – IXX реакция BCL2 оригинално увеличение 200x; Ж – IXX реакция Ki 67, оригинално увеличение 200x; З – IXX реакция HMB45, оригинално увеличение 200x.*

Единят случай с **шпициден (Spitz – like) меланом** е на жена, на кожата от трупа (гръден кош), с диаметър 30 мм и височина 15 мм, централно повърхностно разязвяване, асиметричен секционен профил, с розово – белезникав до светлокафяв цвят. Микроскопски е представен от епителоподобни клетки с везикуларни полиморфни ядра, проминентни нуклеоли, много митози, сравнително бедна пигментация, предимно от праховиден пигмент и малко (единични) клетки с по – обилно пигментно съдържание; клетките са структурирани гнездно, стромата е оскъдна с неголям брой меланофаги и хиподермална лимфоидна инфилтрация (Фиг. 5.11).



*Фигура 5.11: Spitz melanoma: А – оцветяване ХЕ, обзорно увеличение, Б – оцветяване ХЕ, оригинално оригинално увеличение 200x, В – ИХХ реакция S100 protein, оригинално увеличение 200x; Г – ИХХ реакция Cyclin D1, оригинално увеличение 200x; Д – ИХХ реакция p53 protein, оригинално увеличение 200x; Е – ИХХ реакция BCL2, оригинално увеличение 200x; Ж - ИХХ реакция KI 67, оригинално увеличение 200x; З – ИХХ реакция HMB45, оригинално увеличение 200x.*

Случаят с **детски меланом** е на осем годишно момиче, локализиран на бедрената кожа, с диаметър 7 мм и височина 4 мм, петнист, светло – кафяв до белзникав на цвят и асиметричен секционен профил. Микроскопски е представен от дермално базирана, подчертано полиморфна, атипична меланоцитна пролиферация от предимно епителоподобни клетки в големи гнезда с оскъдна интервенираща строма, както и от огнишна с фасцикули от фузиформени и многоядрени клетки; клетките са предимно без пигмент, само отделни клетъчни групи съдържат цитоплазмени пигментни гранули, а инфилтративният им растеж достига границата папиларна /ретикуларна дерма; лимфоцитната стромна реакция е умерено изразена и меланофагите са неголям брой (Фиг. 5.12).



*Фигура 5.12: Педиатричен меланом (нодуларен): А – оцветяване ХЕ обзорно увеличение; Б – оцветяване ХЕ, оригинално увеличение 200x, В - IXX реакция S100 protein, оригинално увеличение 200x, Г – IXX Cyclin D1, оригинално увеличение 200x; Д – IXX оцветяване p53, оригинално увеличение 200x; Е – IXX реакция BCL2, оригинално увеличение 200x; Ж – IXX реакция Ki 67, оригинално увеличение 200x; З - IXX реакция HMB45, оригинално увеличение 200x*

### **Туморната дебелина на меланомите в изследвания натериал (Табл. 5.8):**

*Таблица 5.8. Разпределение на изследваните малигнени меланоми според дебелина по Breslow*

Случай	<b>Breslow</b>	Туморна дебелина
1. улцериран	Breslow 3	3,7 мм
2. неулцериран/ детски	Breslow 3	4,0 мм
3. неулцериран/ssm	Breslow 1	0,5 мм
4. улцериран	Breslow 4	10,0 мм
5. улцериран	Breslow 4	4,5 мм
6. улцериран	Breslow 4	10,0 мм
7. улцериран	Breslow 4	18,0 мм

8. улцерирани	Breslow 4	15,0 мм
9. улцерирани	Breslow 4	11,0 мм
10. улцерирани	Breslow 4	14,0 мм
11. неулцерирани/ssm	Breslow 2	1,0 мм
12. неулцерирани/ ssm	Breslow 3	2,0 мм
13. улцерирани	Breslow 4	5,0 мм
14. улцерирани	Breslow 3	25,0 мм
15. улцерирани	Breslow 3	25,0 мм
16. улцерирани	Breslow 4	6,0 мм
17. неулцерирани/BNM	Breslow 4	7,0 мм
18. улцерирани	Breslow 4	7,0 мм
19. неулцерирани	Breslow 3	25,0 мм
20. улцерирани	Breslow 3	1,8 мм
21. улцерирани	Breslow 4	9,0 мм
22. неулцерирани	Breslow 4	12,0 мм
23. улцерирани	Breslow 4	20,0 мм
24. улцерирани	Breslow 3	4,0 мм

Съответният относителен дял на случаите с ММ според дебелината на лезията е както следва: един (4,17%) - Breslow 1, един (4,17%) - Breslow 2, осем (33,33%) - Breslow 3, четиринадесет (58,33%) - Breslow 4 (Фиг. 5.13). Видно е, че преобладават случаите с Breslow 4, следвани от тези с Breslow 3.



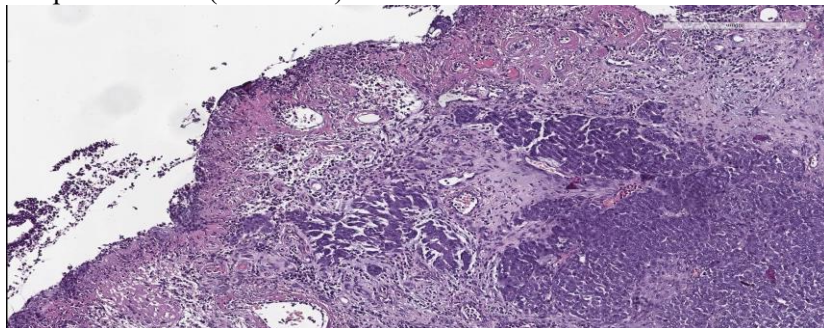
Фигура 5.13: Разпределение на меланомите според дебелината им, с хоризонтала показваща дебелината по Breslow и



*вертикала показваща броя на меланомите със съответната дебелина*

#### **Улцерации в меланомите:**

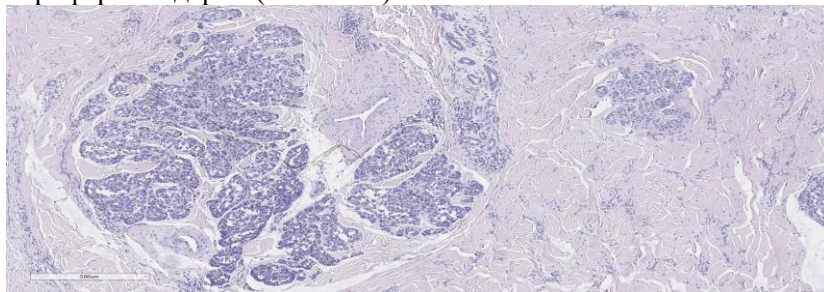
В изследвания материал, седемнадесет от меланомите са с улцерация, всички те са нодуларни, десет с размери на улцерацията под 5мм и седем с размери на улцерацията от 5 до 12 мм. Останалите меланоми, включващи един нодуларен – първичен дермален, трите суперфициално напредващи, Шпицоидния меланом, педиатричния и малигнения син невус са без разязвяване (Фиг. 5.14).



*Фигура 5.14: Туморогенна улцерация в нодуларен меланом - оцветяване ХЕ увеличение 200х.*

#### **Сателитоза при меланомите:**

Три от меланомите в изследвания материал (малигнен син невус и два нодуларни) са с микросателити в хиподермата и периферната дерма (Фиг. 5.15):



*Фигура 5.15: Микросателит в периферна дерма оцветяване HE увеличение 100х.*

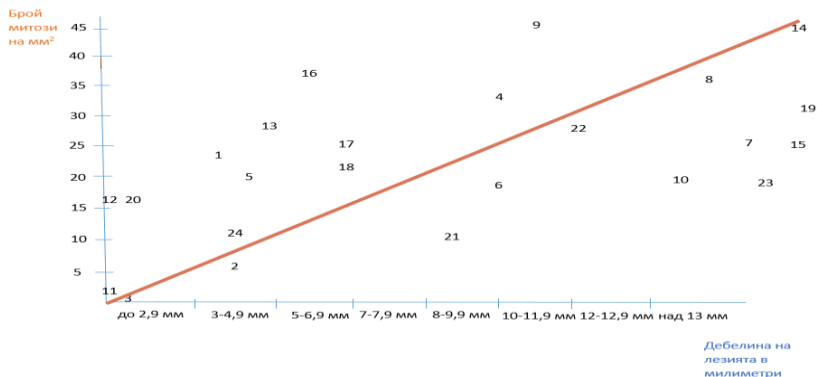
**Митотична активност на меланомите** (количествено измерване на меланоцитната пролиферация) – т.е. определянето на митозите в 1 кв.мм площ в изследваните случаи показва следното разпределение: (Табл.5.9).

*Таблица 5.9. Разпределение на изследваните малигнени меланоми спрямо митотична активност и туморна дебелина. SSM – суперфициално напредващ меланом*

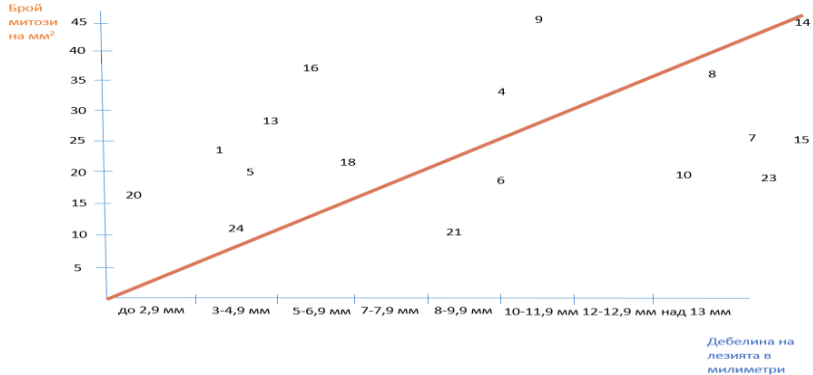
случай	Диаметър на улцерацията	Брой митози/1 кв.мм	Туморна дебелина
1. улцериран	4 мм	23 митози	3,7 мм
2. неулцериран		6 митози	4,0 мм
3. неулцериран	ssm	Под 1 митоза/кв.мм.	0,5 мм
4. улцериран	5 мм	33	10 мм
5. улцериран	4 мм	20	4,5 мм
6. улцериран	4 мм	18	10 мм
7. улцериран	4 мм	26	18 мм
8. улцериран	9 мм	36	15 мм
9. улцериран	10 мм	44	11 мм
10. улцериран	4 мм	19	14 мм
11. неулцериран	ssm	2	1 мм
12. неулцериран	ssm	17	2 мм
13. улцериран	3 мм	28	5 мм
14. улцериран	12 мм	43	25 мм
15. улцериран	5 мм	25	25 мм
16. улцериран	8 мм	37	6 мм
17. неулцериран		25	7 мм
18. улцериран	5 мм	21	7 мм
19. неулцериран		30	25 мм
20. улцериран	3 мм	16	1,8 мм
21. улцериран	4 мм	11	9 мм
22. неулцериран		28	12 мм
23. улцериран	4 мм	17	20 мм
24. улцериран	4 мм	11	4 мм

В изследвания материал доминират случаите с улцерирани меланоми. Средната митотична активност на нодуларните

меланоми с улцерация в материалът е 24,62 митози /1 кв.мм, при средна дебелина от 11,29 мм (Фиг. 5.16 и Фиг. 5.17).



Фигура 5.16: *Хоризонталата показва дебелината на лезиите, верикалата - броя митози на 1 кв.мм. Всички меланоми са отбелязани с цифра, съответстваща на номера им в таблицата, презентираща изследвания материал. Оста около която гравитира броя на митозите в отделните лезии, показва възходящ брой митози, нарастващ сравнително право пропорционално на дебелината на лезията.*



Фигура 5.17: *Графично изображение на зависимостта на нарастване броя на митозите с дебелината на туморната лезия само за улцеративните меланоми, като на хоризонталата е отбелязана туморната дебелина, а на вертикалата – броя на митозите на квадратен мм*

Резултатите от изследването на митотичната активност показват, че:

- Митотичната активност в тънките меланоми (дебелина до 1 мм) е ниска. Те са два в изследвания материал, единият с дебелина 500 микрометра и 1 митоза на 10 зрит. полета /400 х , т.е. – под 1 митоза/кв.мм.; във втория, с дебелина 1 мм, се установяват 2 митози/ кв.мм.
- В два от суперфициално напредващите меланоми, които са тънки, митотичната активност е ниска, в третия с дебелина 2 мм, митотичната активност е висока (17 митози/1 кв. мм).
- В нодуларните меланоми митотичната активност е висока, средно 22,90 митози/1кв.мм при средна дебелина на меланомите от 14,42 мм.
- Средната митотична активност на неулцерирани нодуларни меланоми е 17 митози/ 1 кв.мм, при средна дебелина на лезиите от 8 мм.
- Средната митотична активност на улцерирани меланоми в селектирания материал е 24,62 митози /1 кв.мм, при средна дебелина на лезиите 11,29 мм, т.е. средната митотична активност на улцерирани меланоми е по – висока, спрямо тази на неулцерирани със 7,62/1 кв.мм митози при по – голяма дебелина, средно 3,29 мм, т.е. 2,32 митози/ 1кв.мм повече за всеки мм дебелина в повече.

**Clark нивото на инвазия при меланомите в изследвания материал:**

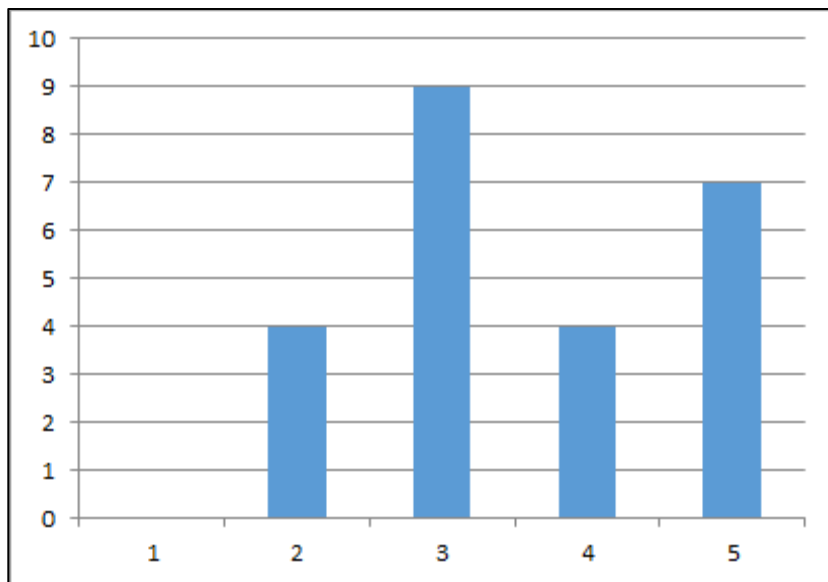
Микроинвазията определена по Clark е както следва (Табл.5.10):  
*Таблица 5.10 Разпределение на изследваните меланоми според нивото на инвазия по Clark.*

Случай с меланом	Clark ниво на инвазия
1	Clark 3
2	Clark 3
3	Clark 2



4	Clark 3
5	Clark 3
6	Clark 5
7	Clark 4
8	Clark 4
9	Clark 4
10	Clark 5
11	Clark 2
12	Clark 2
13	Clark 3
14	Clark 3
15	Clark 5
16	Clark 3
17	Clark 5
18	Clark 2
19	Clark 5
20	Clark 3
21	Clark 4
22	Clark 5
23	Clark 5
24	Clark 3

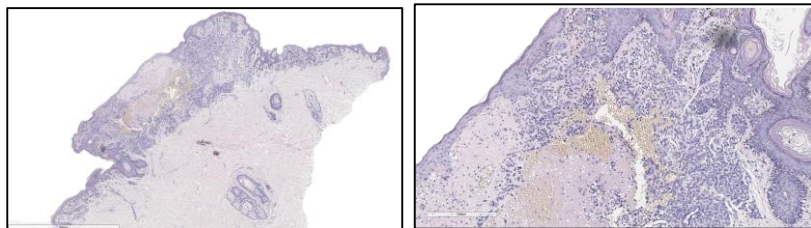
Най – голям брой са меланомите с микроинвазия по Clark 3 – девет случая (37,50%), следвани от Clark 5 – седем случая (29,16%), и равен брой меланоми с микроинвазия по Clark 4 – четири (16,67%) и Clark 2 – четири (16,67%) (Фиг. 5.18).



*Фигура 5.18 Графично изображение на разпределението по Clark микроинвазия в изследвания материал*

#### **Регресия на меланомите:**

В изследвания материал не се открият белези за регресия в тънките меланоми. Установена е такава само в един от нодуларните меланоми, където регресията е парциална (фокална), в централната част на лезията с фиброза и меланофаги, без меланомни клетки в дермалния регресионен участък ( Виж Фиг. 5.19 и Фиг. 5.20).



Фигура 5.19: Регресия в меланом: обзорна снимка оригинално увеличение 20x оцветяване ХЕ.

Фигура 5.20: Регресия в меланом: оригинално увеличение 100x оцветяване ХЕ.

**Тумор инфилтриращи лимфоцити при меланомите (ТИЛ):**

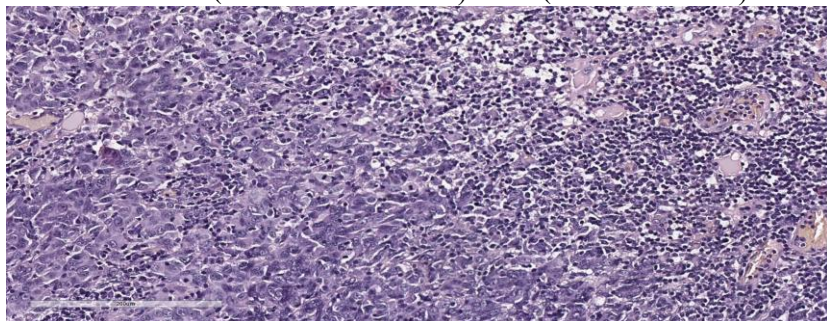
В изследвания материал ТИЛ показват следната характеристика: в три от меланомите се установява интензивна, представена от плътни инфилтрати в стромата, между клетъчните туморни агрегати и непрекъсната (комплетна) в периферията лимфоцитна инфилтрация; в четири случая инфилтрацията е умерена по интензитет, представена от необилни лимфоцитни групи огнищно, в туморната строма и огнищна такава в границата на инвазия; най – голяма е групата на меланомите с минимална и предимно липсваща стромна лимфоцитна инфилтрация – седемнадесет (Табл. 5.11).

Таблица 5.11. Разпределение на изследваните меланоми според митотична активност, туморна дебелина и интензивност на ТИЛ.

Случай	Брой митози/1 кв.мм	Туморна дебелина	Интензивност на ТИЛ
1. улцериран	23	3,7 мм	Интензивна
2. неулцериран	6	4,0 мм	Умерена
3. неулцериран	0,5	0,5 мм	Интензивна
4. улцериран	33	10 мм	Минимална
5. улцериран	20	4,5 мм	Минимална
6. улцериран	18	10 мм	Минимална
7. улцериран	26	18 мм	Минимална

8. улцериран	36	15 мм	Минимална
9. улцериран	44	11 мм	Минимална
10. улцериран	19	14 мм	Минимална
11. неулцериран	2	1 мм	Минимална
12. неулцериран	17	2 мм	Минимална
13. улцериран	28	5 мм	Минимална
14. улцериран	43	25 мм	Умерена
15. улцериран	25	25 мм	Минимална
16. улцериран	37	6 мм	Минимална
17. неулцериран	25	7 мм	Минимална
18. улцериран	21	7 мм	Минимална
19. неулцериран	30	25 мм	Минимална
20. улцериран	16	1,8 мм	Умерена
21. улцериран	11	9 мм	Минимална
22. неулцериран	28	12 мм	Умерена
23. улцериран	17	20 мм	Минимална
24. улцериран	11	4мм	Интензивна

В нашия материал само в три от меланомите е установена високостепенна (високо интензивна) ТИЛ (Виж. Фиг. 5.21):



*Фигура 5.21: Интензивна (високостепенна) ТИЛ в меланом, оцветяване ХЕ оригинално увеличение 10х.*

### **Резултати от имунохистохимично изследваната експресия на Cyclin D1, BCL2 и p53**

Базирано на опита ни в диагностиката на пигментните тумори, показващи подчертано многообразие в имунохистохимичната експресия на едно и също анти тяло в една и съща диагностична група, с цел да представим това многообразие в систематизиран

вид, полезен за практиката, извършихме отчитането на експресията в единадесет групи. Тези групи или модели я прецизират детайлно, както по интензитет, така и по топографско разпределение (виж глава: Методи – Отчитане на резултатите от имунохистохимичното изследване):

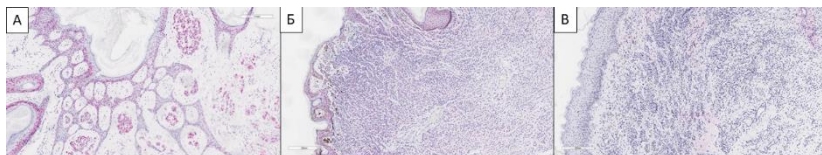
## **Резултати от изследването на Cyclin D1**

### **Експресия на Cyclin D1 в доброкачествените пигментни лезии (невусите)**

(Фиг. 5.22):

Проведеното изследване показва следната експресия на Cyclin D1 в доброкачествените лезии – 57 случая, отразена като абсолютна стойност и относителен дял:

- ❖ липсваща реакция или такава в единични клетки – 1 случай (1,75%),
- ❖ ниско интензивна експресия в горната порция - 6 случая (10,53%),
- ❖ ниско интензивна петниста експресия - 9 случая (15,79%),
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 1 случай (1,75%),
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция – 6 случая (10,53%),
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 30 случая (52,63%),
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%),
- ❖ високо интензивна експресия в горна порция – 1 случай (1,75%),
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 3 случая ( 5,26%),
- ❖ високоинтензивна дифузна експресия – 0 случая (0%),
- ❖ хетерогенна експресия – 0 случая (0%)



Фигура 5.22: IXX реакция *Cyclin D1* в невуси: А – високо интензивна експресия в горна порция на лезията, оригинално увеличение 100x; Б – ниско интензивна петниста експресия, оригинално увеличение 100x; В – липса на експресия в изследваната лезия

Обобщено резултатите показват следното:

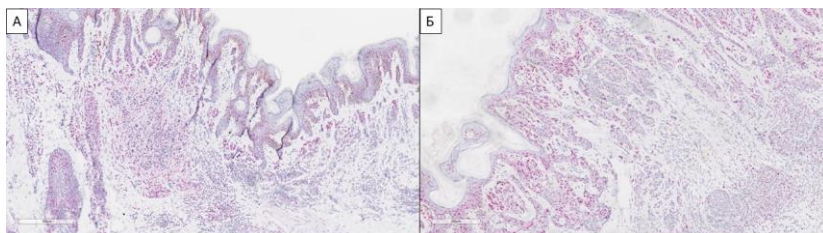
- В доброкачествените пигментни лезии, в много малък процент от случаите – един (1,75%), липсва експресия на антитялото;
- По – често се установява петниста експресия – в четиридесет и два (73,68%) от общия брой доброкачествени лезии в материала, с варираща интензивност, най – много с умерена интензивност – тридесет (71,43%) случая, следвани от тези с ниска интензивност – девет (21,43%) и най – малък брой случаи, с висока интензивност – три (7,14%);
- Следващата по честота е експресията в горната порция на лезията – тринадесет (22,80%) от общия брой доброкачествени лезии, също варираща по интензитет, от ниско интензивна в шест (46,15%), умерено интензивна в шест (46,15%) и високо интензивна в един (7,69%) случай;
- Дифузна експресия, в цялата дебелина на лезията се установява в един (1,75%) от невусите и то с нисък интензитет;
- Няма невуси с експресия в цялата дебелина на лезията, която да е умерено интензивна, високо интензивна или хетерогенна.

### **Експресия на *Cyclin D1* в атипичните невуси (Фиг. 5.23):**

Експресията на *Cyclin D1* в атипичните невуси (6 случая), представени като абсолютна стойност и относителен дял, показва:

(Случаите са редуцирани, поради недостатъчен репрезентативен за ИХХ изследване материал, след направените срези за хистологичното изследване при 4 от лезиите, които бяха със съвсем малки размери)

- ❖ липса на експресия – 0 случая (0%),
- ❖ нискоинтензивна експресия в горната порция – 0 случая (0%),
- ❖ нискоинтензивна петниста експресия – 1 случай (16,67%),
- ❖ нискоинтензивна дифузна експресия – 0 случая (0%),
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 1 случай (16,67%),
- ❖ умерено интензивна петниста – 1 случай (16,67%),
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%),
- ❖ високо интензивна в горната порция – 1 случай (16,67%),
- ❖ високо интензивна петниста – 1 случай (16,67%),
- ❖ високо интензивна дифузна - 1 случай (16,67%),
- ❖ хетерогенна експресия – 0 случая (0%).



*Фиг. 5.23: ИХХ реакция Cyclin D1 в диспластични невуси А – умерено интензивна петниста експресия оригинално увеличение 100x; Б – високо интензивна експресия в горната порция оригинално увеличение 80x*

Обобщените резултати от експресията на Cyclin D1 при атипичните лезии показват следните особености:

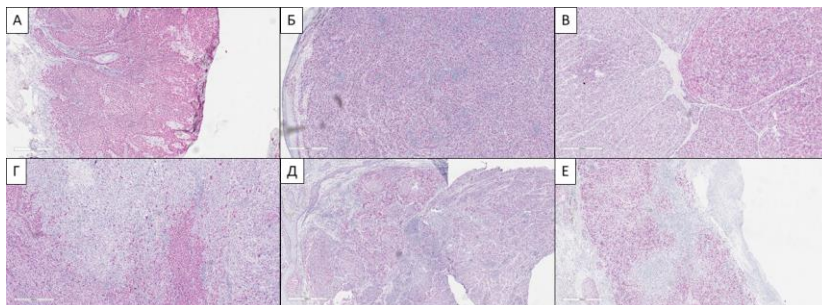
- Всички атипични лезии експресират Cyclin D1;

- Няма случаи, които проявяват ниско интензивна дифузна експресия, умерено интензивна дифузна или хетерогенна по интензитет в цялата дебелина на лезията експресия;
- В равна процентна пропорция, лезиите показват ниско интензивна в горната порция и петниста ниско интензивна експресия (респ. по 16,67%), умерено интензивна в горната порция или умерено интензивна петниста (респ. по 16,67%), високо интензивна в горната порция, високо интензивна петниста и високо интензивна дифузна (респ. по 16,67%);
- Няма хетерогенна по интензитет в цялата дебелина на лезията Cyclin D1 експресия.

#### **Експресия на Cyclin D1 в меланомите (Фиг. 5.24):**

- ❖ липсваща експресия – 0 случаи (0%),
- ❖ нискоинтензивна експресия в горната порция – 0 случая (0%),
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%),
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%),
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%),
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 1 случай (4,17%),
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия - 1 случай (4,17%),
- ❖ високо интензивна експресия в горната порция – 0 случая (0%),
- ❖ високо интензивна петниста експресия - девет (37,50%),
- ❖ високо интензивна дифузна експресия - дванадесет (50,00%),
- ❖ хетерогенна експресия - един (4,17%)





*Фигура 5.24: Cyclin D1 експресия в меланоми: А – високо интензивна дифузна експресия; Б умереноинтензивна дифузна експресия; В – хетерогенна (различна по интензитет в цялата дебелина на лезията); Г – хетерогенна (различна по интензитет в цялата дебелина на лезията); Д – високо интензивна петниста експресия; Е – високо интензивна петниста експресия; оригинално увеличение 50x, оцветяване с ХЕ*

Резултатите от експресията на Cyclin D1 в малигнените меланоми показват:

- Всички меланоми експресират Cyclin D1;
- Няма меланоми с експресия само в горната порция на лезията, експресията е разпределена в цялата дебелина на лезията – петнисто или дифузно;
- По интензитет експресията е умерено, високо, ниско интензивна или хетерогенна.

**Сравнителният анализ на експресията на антицяло Cyclin D1 в бенигнени невуси, атипични невуси и меланомите представен процентно спрямо общия брой лезии е както следва (Табл. 5.12):**

Таблица 5.12. Сравнителна експресия на антияло Cyclin D1 в бенигнени невуси, атипични невуси и меланоми

Cyclin D1	диагностична група			Общо % (n=)
	бенигнени неви % (n=)	атипични неви % (n=)	меланоми % (n=)	
липсва експресия до единични клетки със слаба експресия	1,15% (n=1)	0% (n=0)	0% (n=0)	1,15% (n=1)
нискоинтензивна експресия в горна порция на лезията	6,9% (n=6)	0% (n=0)	0% (n=0)	6,9% (n=6)
нискоинтензивна петниста експресия	10,34% (n=9)	1,15% (n=1)	0% (n=0)	11,49% (n=10)
нискоинтензивна дифузна експресия	1,15% (n=1)	0% (n=0)	0% (n=0)	1,15% (n=1)
умереноинтензивна експресия в горна порция на лезията	6,9% (n=6)	1,15% (n=1)	0% (n=0)	8,05% (n=7)
умереноинтензивна петниста експресия	34,48% (n=30)	1,15% (n=1)	1,15% (n=1)	36,78% (n=32)
умереноинтензивна дифузна експресия	0% (n=0)	0% (n=0)	1,15% (n=1)	1,15% (n=1)
високоинтензивна експресия в горна порция на лезията	1,15% (n=1)	1,15% (n=1)	0% (n=0)	2,3% (n=2)
високоинтензивна петниста експресия	3,45% (n=3)	1,15% (n=1)	10,34% (n=9)	14,94% (n=13)
високоинтензивна дифузна експресия	0% (n=0)	1,15% (n=1)	13,74% (n=12)	14,94% (n=13)
хетерогенна експресия	0% (n=0)	0% (n=0)	1,15% (n=1)	1,15% (n=1)
Общо	65,52% (n=57)	6,9% (n=6)	27,59% (n=24)	100% (n=87)

Процентните разлики в експресията на Cyclin D1 между групите е статистически значима ( $X^2=73.7$ ,  $p=0.001$ )

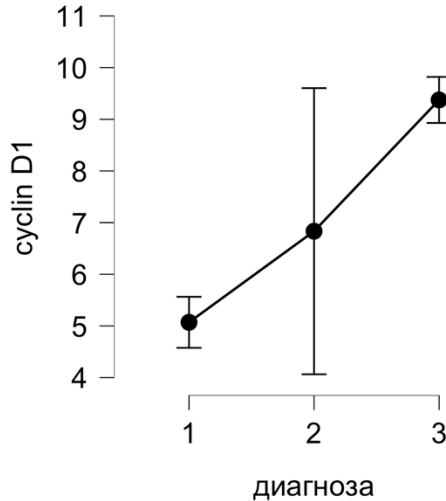
За да се установи има или не значима разлика в експресията на *Cyclin D1* в изследваните групи е проведен допълнително вариационен анализ, ANOVA ранг тест и Kruskal-Wallis тест за непараметрично разпределени данни с графична визуализация на сравнените стойности на показателите представени с Error Bar Graphs. Разликите между стойностите при този анализ са достоверни, при приетата за биологични експерименти стойност  $p < 0.05$ . Чрез тези допълнителни анализи е оценена връзката между експресията на *Cyclin D1* и вида на меланоцитната лезия.

В таблицата (Табл.5.13) са означени средните стойности на *Cyclin D1* експресията при различните диагностични групи. Очевидно е, че те са най-високи при меланомите ( $9.375 \pm 1.056$ ), най – ниски при доброкачествените невуси ( $5,070 \pm 1,860$ ) и междинни при атипичните невуси ( $6,833 \pm 2,639$ ).

*Таблица 5.13. Средни стойности на експресия на Cyclin D1 в изследваните таргетни групи*

диагностична група	средо аритметично	стандартно отклонение	брой
бенигнени невуси	5.070	1.860	57
атипични невуси	6.833	2.639	6
меланоми	9.375	1.056	24

Графичната визуализация на сравнените стойности на показателите е представена с Error Bar Graphs (Фиг.5.25). Вижда се, че диапазонът от стойности е най-широк при атипичните невуси, маргинално висок при меланомите и маргинално нисък при бенигнените невуси, т.е. най- голяма и значима е разликата в експресията между доброкачествените и злокачествените лезии.



Фигура 5.25: Графичен диапазон на Cyclin D1 експресия в изследваните таргетни групи : 1 - доброкачествени невуси, 2 - атипични невуси; 3 - меланоми

Анализът на резултатите за това дали има съществени статистически различия между трите диагностични групи (доброкачествени невуси, атипични невуси и меланоми) спрямо стойностите на Cyclin D1, извършен с ANOVA тест, показва съществуваща статистическа значима разлика ( $F=51.935$ ,  $p<0.001$ ) (Табл. 5.14):

Таблица 5.14. ANOVA тест за експресията на Cyclin D1

Случаи	Сума	df	Квадрат	F	p
Диагноза	314.305	2	157.153	51.935	< 0.001
Остатък	254.178	84	3.026		

Конкретни статистически различия се откриват и при Post-Нос анализа по метода на Tukey и Dunn (Табл.5.15) и то между доброкачествените невуси и меланомите, където различията спрямо стойностите на показателя са най-големи,  $t=10.170$ ,  $p<0.001$ . Статистическа разлика има и между групите на атипичните невуси и меланомите ( $t=3.201$ ,  $p=0.005$ ).

*Таблица 5.15. Post Нос тест по метода Tukey и на Dunn за установяване разликите на Cyclin D1 експресията в трите таргетни групи (табл. 5.15)*

	Средна разлика	Горна	Долна	95% CI	SE	t	P
Бенигени - атипични	-1.763	-3.545	0.018	0.747	-2.362	0.053	
Бенигнени невуси - меланомни	- 4.305	-5.315	-3.295	0.423	-10.170	< .001	***
Атипични невуси - меланомни	- 2.542	-4.436	-0.647	0.794	-3.201	0.005	**

Следователно, високата статистически значима разлика в експресията на Cyclin D1 между доброкачествените и злокачествените лезии в изследвания материал отразява възможност Cyclin D1 експресията да се използва за предикция на малигнен потенциал при пигментните тумори.

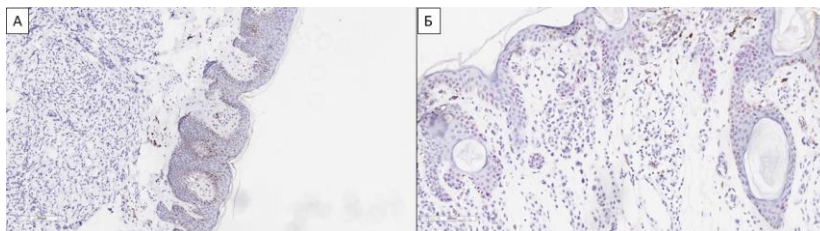
### Резултати от изследването на p53

Изследвани са същия брой лезии - 57 доброкачествени, 6 атипични и 24 меланома, представени в резултатите като абсолютна стойност и относителен дял.

**Експресия на p53 в доброкачествени невуси (Фиг. 5.26):**

- ❖ липсваща експресия – 56 случая (98,25%)
- ❖ ниско интензивна експресия в горна порция – 1 случай(1,75%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)

- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ хетерогенна експресия – 0 случая (0%)



*Фигура 5.26: експресия на p53 в доброкачествени невуси: А – без експресия оригинално увеличение 100x; Б – ниско интензивна експресия в горната порция на лезията оригинално увеличение 200x*

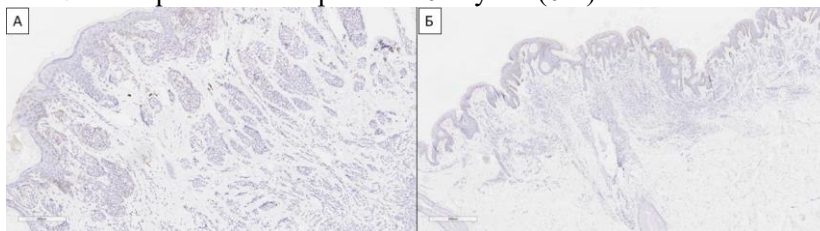
В петдесет и шест (98,25%) от доброкачествените невуси липсва p53 експресия, с изключение на един (1,75%) от тях, който проявява ниско интензивна експресия в горната порция на лезията.

### **Експресия на p53 в атипичните невуси (Фиг. 5.27):**

В атипичните лезии е отчетена следната експресия:

- ❖ липса на експресия – 5 случая (83,33%)
- ❖ ниско интензивна експресия в горната порция – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)

- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 1 случай (16,67%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ хетерогенна експресия – 0 случая (0%)



*Фигура 5.27: 32 ИХХ р53 експресия в атипични невуси: А – умерено интензивна петниста експресия оригинално увеличение 100x; Б – липса на експресия оригинално увеличение 80x.*

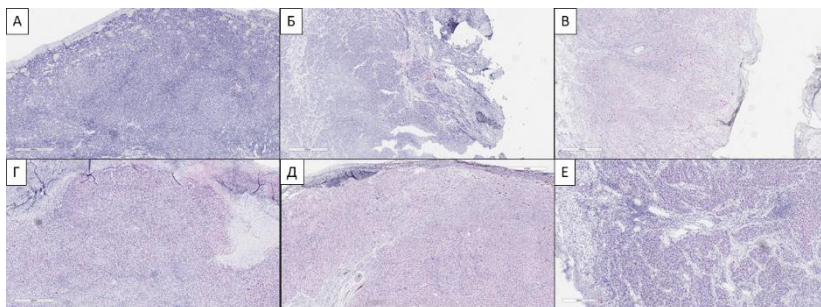
В изследвания материал - един (16,67%) от атипичните невуси проявява умерено интензивна петниста експресия, в останалите липсва такава т.е. по – голямата част (83,33%) от атипичните невуси не проявяват р53 експресия.

#### **Експресия на р53 в малигнените меланоми (Фиг 5.28):**

В изследваните случаи с малигнен меланом експресията е следната:

- ❖ липса на експресия – 5 случая (20,83%)
- ❖ ниско интензивна експресия в горната порция на лезията – 1 случай (4,17%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 4 случая (16,67%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)

- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 8 случая (33,33%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 2 случая (2,30%)
- ❖ високо интензивна експресия в горната порция а лезията – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 3 случая (12,50%)
- ❖ високо интензивна дифузна – 0 случая (0%)
- ❖ хетерогенна експресия - 1 случай (4,17%)



*Фигура 5.28: имунохистохимична p53 protein експресия в меланоми: А –негативна; Б слабо интензивна дифузна; В – слабо интензивна дифузна; Г – умерено интензивна дифузна; Д – умерено интензивна дифузна; Е – хетерогенна експресия ; оригинално увеличение 50x, оцветяване с ХЕ.*

Експресията на p53 в изследваните 24 меланома обобщено показва следните резултати:

- Деветнадесет (79,17%) от малигнените меланоми експресират p53, като най – голям процент 8 (33,33%) от тях показват умерено интензивна петниста експресия, следвана от ниско интензивна петниста експресия в 4 (16,67%), и от високо интензивна петниста в 3 (12,50%), умерено интензивна дифузна експресия има в 2 (8,33%), а равнопоставена, ниско интензивна експресия в горна порция и хетерогенна варираща по интензитет експресия



в цялата дебелина на лезията са отчетени в по 1 (респ. по 4,17%) от меланомите.

- Пет (20,73%) от изследваните меланоми не проявяват експресия.

**Сравнителният анализ на експресията на антитяло p53 в бенигнени невуси, атипични невуси и меланоми е представен процентно спрямо общия брой лезии в следващата таблица (Табл. 5.16) :**

*Таблица 5.16. със сравнителен анализ на p53 експресията в трите таргетирани групи*

p53	диагностична група			Общо % (n=)
	Бенигнени невуси % (n=)	Атипични невуси % (n=)	Меланоми % (n=)	
липсва експресия до единични клетки със слаба експресия	64.37 % (n=56)	5.75% (n=5)	5.75 % (n=5)	75.86 % (n=66)
нискоинтензивна експресия в горна порция на лезията	1.15 % (n=1)	0 % (n=0)	1.15 % (n=1)	2.30 % (n=2)
нискоинтензивна петниста експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	4.60 % (n=4)	4.60 % (n=4)
умереноинтензивна петниста експресия	0 % (n=0)	1.15 % (n=1)	9.20% (n=8)	10.35 % (n=9)
умереноинтензивна дифузна експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	2.30 % (n=2)	2.30% (n=2)
високоинтензивна петниста експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	3.45 % (n=3)	3.45 % (n=3)
хетерогенна експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	1.15 % (n=1)	1.15 %
Общо	65.52 % (n=57)	6.90 % (n=6)	27.59 % (n=24)	100 % (n=87)

Процентните разлики в експресията на p53 между групите е статистически значима ( $X^2=58.6$ ,  $p=0.001$ ).

За изтъкване на разликите в експресията между изследваните групи допълнително е проведен ANOVA тест.

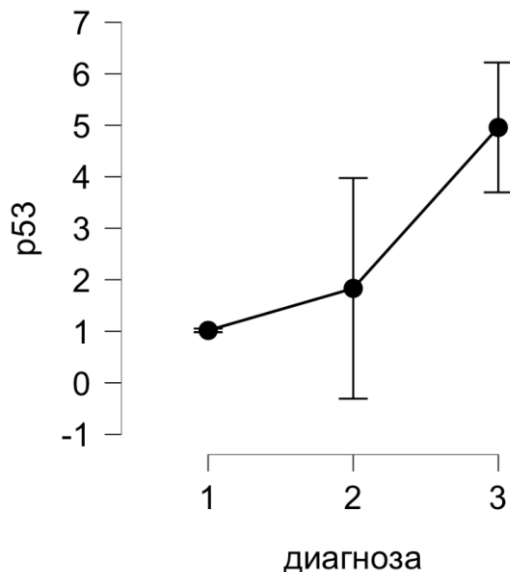
**Резултат от допълнителния вариационен анализ, ANOVA тест за параметрични данни и Kruskal-Wallis test за непараметрично разпределени данни, за сравняване разликите на p53 protein експресията между доброкачествени невуси, атипични невуси и малигнени меланомни показват следното:** (Табл. 5.17)

*Таблица 5.17. Вариационен анализ за експресия на p53 при меланоцитните лезии*

Диагностична група	Средно аритметично	Стандартно отклонение	Общо
Бенигнени невуси	1.018	0.132	57
Атипични невуси	1.833	2.041	6
Меланомни	4.958	2.985	24

Разликите между стойностите при този анализ са достоверни, при приетата за биологични експерименти стойност  $p<0.05$ . При показателя p53, средните стойности и стандартните отклонения потвърждават, очаквано, най-висока средна стойност в групата на меланомите ( $M=4.958 \pm 2.985$ ), а най-малка средна стойност – при доброкачествените невуси ( $M=1.018 \pm 0.132$ ); при атипичните невуси стойностите заемат междинна позиция ( $M=1,833 \pm 2,041$ ).

Графичната визуализация на сравнените стойности на p53 е представена с Error Bar Graphs, където е видна широтата в диапазона на показателя в отделните групи (Фиг. 5.29).



Фигура 5.29: Графичен диапазон за експресия на p53 при меланоцитните лезии: 1- доброкачествени неви, 2-атипични неви; 3-меланоми

Анализът на резултатите за това дали има съществени статистически различия между трите диагностични групи (бенигнени невуси, атипични неви и меланомите) спрямо стойностите на p53, извършен с **Kruskal-Wallis** тест, показва съществуваща статистически значима разлика ( $H=55.381$ ,  $p<0.001$ ) (Табл. 5.18).

Таблица 5.18. *Kruskal-Wallis Test*

Фактор	Сума	df	p
диагноза	55.381	2	< .001

Конкретно, статистически значими различия при Post-Hoc анализа по метода на Dunn се откриват между

доброкачествените невуси и меланомите /където различията спрямо стойностите на показателя са най-големи, ( $z=7.429$ ,  $p<0.001$ )/, следвани от тези при атипични невуси и меланомите ( $z=3.191$ ,  $p=0.001$ ) (Табл. 5.19).

Таблица 5.19.: Доверителен интервал на p53 експресията при изследваните групи меланоцитни лезии *Dunn's Post Hoc Comparisons* – диагноза

Сравнителен анализ	z	W <sub>i</sub>	W <sub>j</sub>	p	p <sub>bonf</sub>	p <sub>holm</sub>
Бенигнени невуси атипични невуси	- 0.819	34.096	40.750	0.207	0.620	0.207
Бенигнени невуси меланомни	- 7.429	34.096	68.333	<.001	<.001	<.001
Атипични невуси меланомни	- 3.191	40.750	68.333	<.001	0.002	0.001

Следователно, високата статистически значима разлика в експресията на p53 между доброкачествените и злокачествените лезии в изследвания материал отразява възможност p53 експресията да се използва за предикция на малигнен потенциал при пигментните тумори.

## Резултати от експресия на BCL2

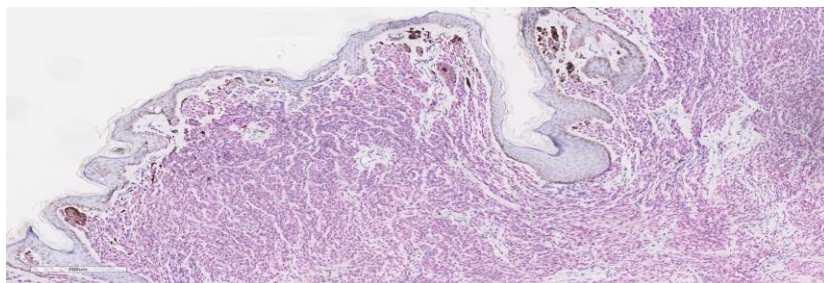
### Резултати от експресията на BCL2 при изследваните доброкачествени невуси

(Фиг. 5.30):

В доброкачествените пигментни неоплазии резултатите от експресията на BCL2 показват следното:

- ❖ слаба и липсваща експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна експресия в горна порция – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)

- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия - 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 57 случая (100%)
- ❖ хетерогенна експресия – 0 случая (0%)



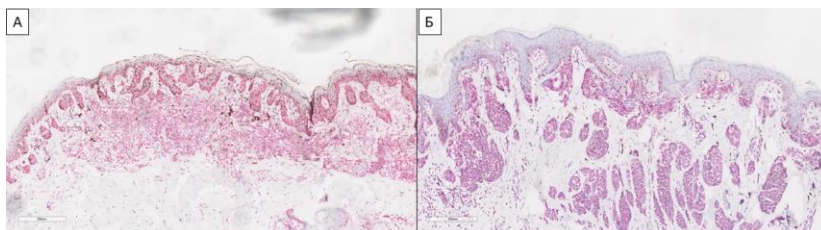
*Фигура 5.30: ИХХ експресия BCL2 в меланоцитен невус – високо интензивна дифузна, оригинално увеличение 100х.*

Всички доброкачествени невуси в изследвания материал – 57 случая, т.е. в 100% експресират еднотипно, високо интензивно и дифузно BCL2.

### **Резултати от експресията на BCL2 при атипичните невуси (Фиг. 5.31):**

- ❖ слаба и липсваща експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна в горната порция на лезията – 0 случая (0%)

- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 1 случай (16,67%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 1 случай (16,67%)
- ❖ високо интензивна в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 4 случая (66,66%)
- ❖ хетерогенна експресия – 0 случая (0%)



*Фигура 5.31: BCL2 експресия в атипични невуси: А – умерено интензивна дифузна оригинално увеличение 100x; Б – високо интензивна дифузна оригинално увеличение 100x*

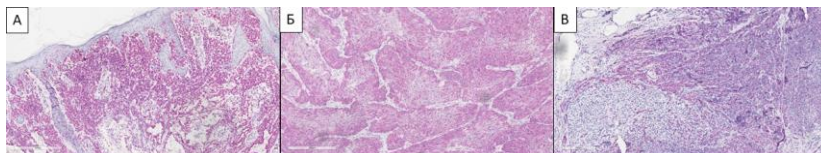
Атипичните невуси показват умерено интензивна петниста експресия в 1 (16,67%) от случаите, умерено интензивна дифузна в 1 (16,67%) от случаите, високо интензивна дифузна експресия в 4 (66,66%) от случаите, т.е. най – голям брой лезии – 4 (66,66%), показват високо интензивна дифузна експресия, идентична с тази на доброкачествените лезии.

**Резултати от експресията на BCL2 в изследваните малигнени меланоми (Фиг. 5.32):**

Експресията на BCL2 в случаите с малигнени меланоми в изследвания материал е както следва:

- ❖ слаба до липсваща експресия – 0 случая (0%)

- ❖ ниско интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 1 случай (4,17%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 6 случая (25,00%)
- ❖ високо интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 2 случая (8,33%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 10 случая (41,67%)
- ❖ хетерогенна експресия – 5 случая (20,83%)



*Фигура 5.32: ИХХ реакция BCL2 в меланоми: А – високо интензивна дифузна експресия, оригинално увеличение 100x; Б – хетерогенна експресия, оригинално увеличение 100x; В – високо интензивна петниста експресия, оригинално увеличение 100*

Всички меланоми експресират BCL2, като високо интензивна дифузна експресия (подобна на тази в доброкачествените лезии) има в 10 (41,67%) от меланомите, следвана от умерено интензивна дифузна в 6 (25%) случая, варираща по интензитет – хетерогенна в 5 (20,83%), следвана от високо интензивна петниста в 2 (8,33%) от тях и умерено интензивна петниста експресия в 1 (4,17%) от меланомите. Т.е. високо интензивната BCL2 експресията при малигнените меланоми намалява под 50% от изследваните и се разпределя между експресии с намаляващ интензитет, петниста експресия и хетерогенна

експресия, сумарно в 58,33% от меланомите в изследвания материал.

**Сравнителният анализ на експресията на антитяло BCL2 в бенигнени неви, атипични неви и меланоми, представен в табличен вид (Табл. 5.20) е както следва:**

*Таблица 5.20: Експресия на BCL2 в трите таргетиранни групи, представени като % от общия брой изследвани пигментни неоплазии):*

BCL 2	Диагностична група			общо % (n=)
	Бенигнени неви % (n=)	Атипични неви % (n=)	Меланоми % (n=)	
Умереноинтензивна петниста експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	1.15 % (n=1)	1.15 % (n=1)
Умереноинтензивна дифузна експресия	0 % (n=0)	1.15 % (n=1)	6.90 % (n=6)	8.05% (n=7)
Високоинтензивна петниста експресия	0 % (n=0)	1.15 % (n=0)	2.30% (n=2)	3.45 % (n=3)
Високоинтензивна дифузна експресия	65.52 % (n=57)	4.60 % (n=4)	11.49 % (n=10)	81.61 % (n=71)
Хетерогенна експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	5.75 % (n=5)	5.75 % (n=5)
Общо	65.52 % (n=57)	6.90 % (n=6)	27.59 % (n=24)	100 % (n=87)

Експресията на BCL2 е разпределена в посочените в таблицата пет типа експресия. Обобщените резултати показват, че 71 от общо 87 изследвани лезии представят високо интензивната дифузна експресията - 57 от 57 доброкачествени лезии, 4 от 6 атипични и 10 от 24 меланома. Това наложи допълнителен анализ, тъй като Апова тестът не може да се използва за показателя BCL2, защото данните са струпани около един вид



експресия – високо интензивна дифузна (модел/група 10 на експресия) (71 от общо 87 пигментни лезии), което прави вариационния анализ невъзможен. Затова използвахме Х-квадрат тест ( $X^2$ ) анализ (Табл. 5.21).

Таблица 5.21: Резултати от хи – квадрат анализ на BCL2 експресията в трите таргетирани групи меланоцитни лезии. В таблицата с цифрите 6, 7, 9, 10 и 11, са отбелязани съответно моделите на BCL2 експресия, проявени в таргетираните групи: 6 – умерено интензивна петниста 7 – умерено интензивна дифузна, 9 – високо интензивна петниста, 10 – високо интензивна дифузна, 11 – хереогенна експресия (според предложенията от нас и използван при изследването модел за оценка степента и локализацията на експресия на антителата).

Диагностична група	6 група	7 група	9 група	10 група	11 група	общо % (n=)
Бенигни неви	0 % (n=0)	0 % (n=0)	0 % (n=0)	65.52 % (n=57)	0 % (n=0)	65.52 % (n=57)
Атипични неви	0 % (n=0)	1.15 % (n=1)	1.15 % (n=1)	4.60 % (n=4)	0 % (n=0)	6.90 % (n=6)
Меланоми	1.15 % (n=1)	6.90 % (n=6)	2.30 % (n=2)	11.49 % (n=10)	5.75 % (n=5)	27.59 % (n=24)
Общо	1.15 % (n=1)	8.05 % (n=7)	3.45 % (n=3)	81.61 % (n=71)	5.75 % (n=5)	100 % (n=87)

Резултатите от Х-квадрат теста показват съществуваща разлика между стойностите на BCL2 експресията в отделните диагностични групи ( $X^2=43.349$ ,  $p<0.001$ ). (Табл. 5.22).

Таблица (5.22: Chi-Squared Tests показваща статистическата значимост при непараметричен тест, при  $p \leq 0.05$

Сума	df	p
------	----	---

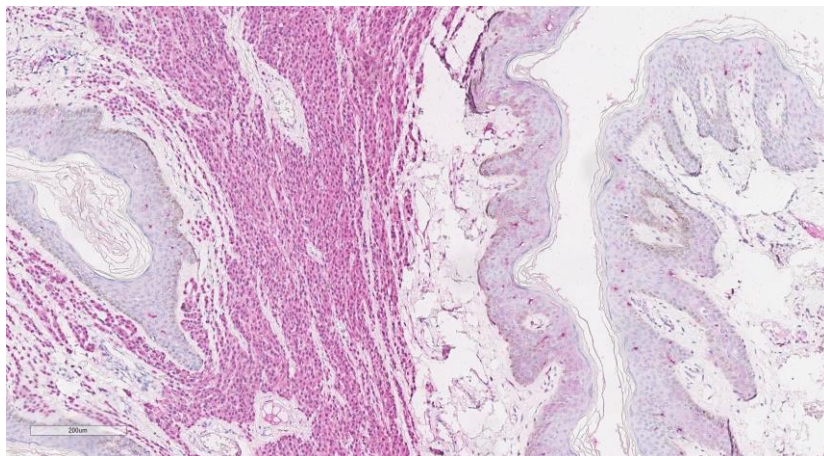
X <sup>2</sup>	43.349	8	< 0.001
N	87		

Въпреки статистически доказаната съществуващата разлика между стойностите на BCL2 експресията в трите таргетирани групи, широката зона на припокриване, гравитираща около десета група (модел) на експресия – високо интензивна дифузна, установена в 100% от бенигнените, 66,66% от атипичните и 41,67% от малигнените лезии, показва че това анти тяло не може да се използва като предиктор на малгнен потенциал.

### **Резултати от експресия на S100 protein:**

Изследването на S100 protein експресията в доброкачествените пигментни лезии показва следното разпределение (Фиг 5.33):

- ❖ липса на експресия - 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна експресия в горната порция на лезията - 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 57 случая (100%)
- ❖ хетерогенна експресия – 0 случая (0%)

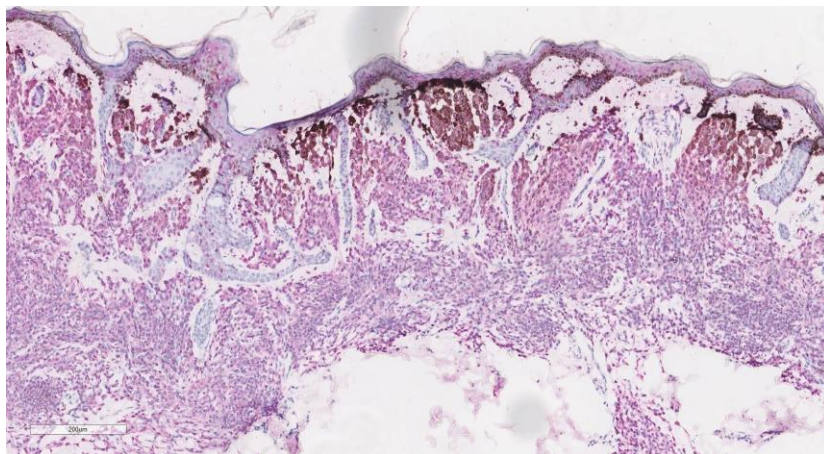


*Фигура 5.33: S100 protein експресия в бенигнен меланоцитен невус, високо интензивна дифузна, оригинално увеличение 100x.*

Всички доброкачествени невуси показват дифузна и високо интензивна S100 protein експресия.

**Резултати от експресия на S100 protein в изследваните атипични невуси (Фиг. 5.34):**

- ❖ липса на експресия - 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 1 случай (16,67%)
- ❖ високо интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 5 случая (83,33%)
- ❖ хетерогенна експресия – 0 случая (0%)



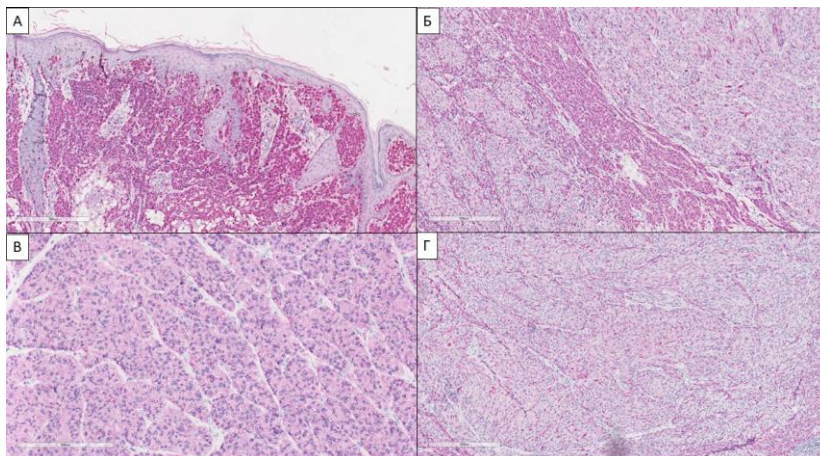
*Фигура 5.34: ИХХ експресия S100 protein в атипичен меланоцитен невус: умерено интензивна дифузна експресия оригинално увеличение 100х.*

Всички атипични невуси в изследвания материал експресират S100 protein, дифузно, предимно високо интензивно – 83,33% от тях, като само 16,67% експресират антитялото с умерен интензитет.

**Резултати от експресията на S100 protein в изследваните малигнени меланоми (Фиг. 5.35):**

- ❖ липса на експресия - 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 1 случай (4,17%)
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 9 случая (37,50%)
- ❖ високо интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)

- ❖ високо интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 7 случая (29,17%)
- ❖ хетерогенна експресия – 7 случая (29,17%)



*Фигура 5.35: ИХХ реакция S100 protein в меланоми: А – високо интензивна дифузна експресия оригинално увеличение 100x; Б – хетерогенна експресия (в цялата дебелина на лезията с различен интензитет) оригинално увеличение 100x; В - умерено интензивна дифузна експресия оригинално увеличение 100x; Г – ниско интензивна експресия оригинално увеличение 100x*

Всички меланоми в изследвания материал експресират S100 protein, като най – голямата част – девет (37,50%) от тях експресират антиялото дифузно с умерен интензитет, следвани, в равни пропорции – по седем (респ. по 29,17%) с високо интензивна дифузна експресия и хетерогенна с вариращ интензитет в цялата дебелина на лезията; най – малка част – един (4,17%) от меланомите проявява ниско интензивна дифузна експресия.

**Сравнителният анализ на експресията на антияло S100 protein в бенигнени невуси, атипични невуси и меланомите показва, че:** (Табл.5.23)

Таблица 5.23: S100 protein експресията в трите таргетирувани групи с представянето им като % от общия брой изследвани пигментни неоплазии:

S100	диагностична група			Общо % (n=)
	бенигнени неви % (n=)	атипични неви % (n=)	меланоми % (n=)	
нискоинтензивна дифузна експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	1.15 % (n=1)	1.15 % (n=1)
умереноинтензивна дифузна експресия	0 % (n=0)	1.15 % (n=1)	10.35 % (n=9)	11.50 % (n=10)
високоинтензивна дифузна експресия	65.52 % (n=57)	5.75 % (n=5)	8.05 % (n=7)	79.31 % (n=69)
хетерогенна експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	8.05 % (n=7)	8.05 % (n=7)
Общо	65.52 % (n=57)	6.90 % (n=6)	27.59 % (n=24)	100 % (n=87)

Всички изследвани пигментни неоплазии, 57 (65,52%) доброкачествени, 6 (6,90%) атипични и 24 (27,59%) меланоми експресират S100 protein. Експресията на S100 protein във всички изследвани лезии е потвърждение на това, че антиятлото може да се използва за доказване на меланоцитен произход.

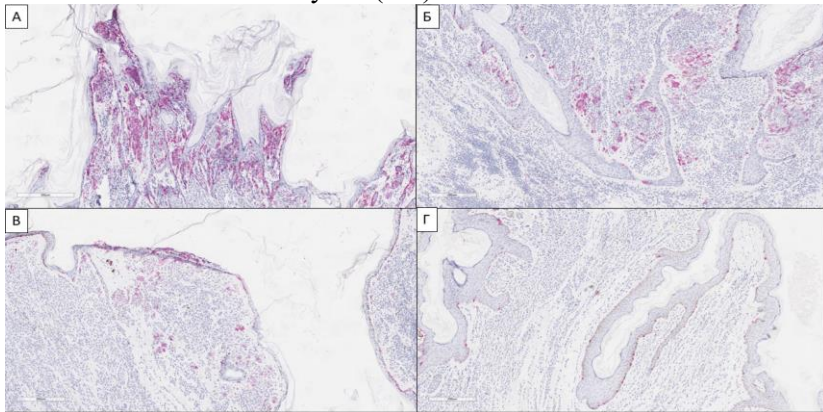
## Резултати от експресията на Melanosome clone HMB45

### Експресия на HMB45 в доброкачествени невуси (Фиг.5.36):

- ❖ липса на експресия – 4 случая (7,02%)
- ❖ ниско интензивна експресия в горната порция на лезията – 10 случая (17,54%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)



- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 20 случая (35,09%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 3 случая (5,26%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна в горната порция на лезията – 20 случая (35,09%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ хетерогенна варираща по интензитет в цялата дебелина на лезията – 0 случая (0%)



*Фигура 5.36: ИНС експресия на НМВ45 в доброкачествени невуси: А – високо интензивна експресия в горната порция на лезията увеличение 100x; Б – умерено интензивна в горната порция на лезията, оригинално увеличение 100x; В – ниско интензивна експресия в горна порция на лезията ,оригинално увеличение 100x; Г – липса на НМВ 45 експресия в лезията, оригинално увеличение 100x*

По – голямата част – 53 (92,98%) случая от общия брой изследвани невуси експресират НМВ45 и само 4 (7,02%) от тях остават без експресия.

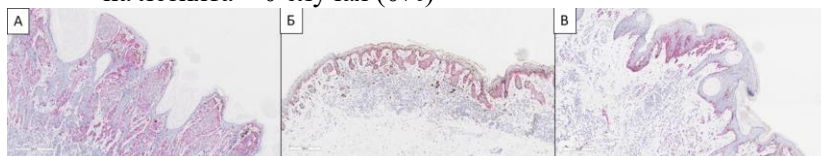
Експресията е в горната порция – 94,34% от експресиращите лезии и само 5,26% от тях проявяват умерено интензивна петниста експресия.

Експресията в горната порция варира по интензитет от ниска до висока; при повечето от случаите експресията е с умерен и висок интензитет в равни пропорции – респ. по 40% и два пъти по – малко или една пета от общия брой за тази група са с ниско интензивна експресия – 20,00%.

Следва, че невусите експресират HMB45 предимно в горната порция на лезията с различна интензивност, от ниска до висока, т.е. при доброкачествените лезии е налице градиент в експресията на анти тялото.

#### **Експресия на HMB45 в атипичните невуси (Фиг. 5.37):**

- ❖ липса на експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 2 случая (33,33%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 1 случай (16,67%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна в горната порция на лезията – 2 случая (33,33%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 1 случай (16,67%)
- ❖ хетерогенна варираща по интензитет в цялата дебелина на лезията – 0 случая (0%)



*Фигура 5.37: HMB45 експресия в атипични невуси: А – високо интензивна дифузна оригинално увеличение 80x; Б – умерено интензивна в горна порция оригинално увеличение 100x; В – високо интензивна в горна порция оригинално увеличение 100x.*



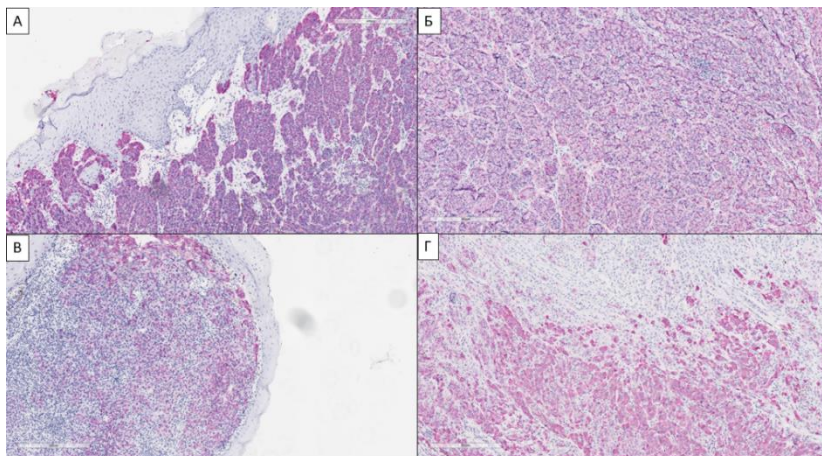
Всички атипичните невуси в изследвания материал експресират Melanosome clone НМВ45. По – голямата част от атипичните невуси – 4 (66,66%), показват експресия в горната порция на лезията, т.е. показват градиент в експресията, като 50% от тези с градиент, проявяват експресионен градиент с умерена интензивност на експресията и 50% с висока интензивност на експресията

Една трета (33,33%) от атипичните невуси не проявяват градиент на НМВ45 експресията, като 1 (16,67%) от атипичните невуси проявява умерено интензивна петниста експресия и 1 (16,67%), високо интензивна дифузна експресия.

Ниско интензивна експресия при атипичните невуси не се регистрира.

**Експресията на Melanosome clone НМВ 45 в изследваните малигнени меланоми показва следната характеристика:(Фиг.5.38)**

- ❖ липса на експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ ниско интензивна дифузна експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна експресия в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна петниста експресия – 0 случая (0%)
- ❖ умерено интензивна дифузна експресия – 1 случай (4,17%)
- ❖ високо интензивна в горната порция на лезията – 0 случая (0%)
- ❖ високо интензивна петниста експресия – 12 случая (50,00%)
- ❖ високо интензивна дифузна експресия – 6 случая (25,00%)
- ❖ хетерогенна експресия – 5 случая (20,83%)



*Фигура 5.38: ИХХ реакция НМВ45 в меланоми: А – високо интензивна дифузна експресия оригинално увеличение 100x; Б – умерено интензивна дифузна експресия оригинално увеличение 100x; В – високо интензивна петниста експресия оригинално увеличение 100x; Г – хетерогенна експресия оригинално увеличение 100x*

Всички меланоми в изследвания материал експресират Melanosome clone НМВ45, без градиент в експресията, т.е. проявяват експресия в цялата дебелина на лезията.

При меланомите не се отчита ниско интензивна експресия.

Най – голямата част от меланомите - 18 (75%), показват високо интензивна експресия: 12 (50%) от тях показват високо интензивна петниста експресия и 6 (25%) проявяват високо интензивна дифузна експресия.

Следващата, най – често наблюдавана експресия в меланомите след високо интензивната, дифузна или петниста по разпределение, е хетерогенната (вариращата по интензитет експресия в цялата дебелина на лезията), установяваща се в 5 (20,83%) от случаите.

Най – малка част от меланомите - 1 (4,17%) показва умерено интензивна дифузна експресия.

**Сравнителният анализ на експресията на Melanosome clone HMB45 в бенигнените невуси, атипичните лезии и малигнените меланоми е както следва: (Таб.5.24)**

*Таблица 5.24: Сравнителна експресията на HMB45 в трите таргетиращи групи представени като % от общия брой изследвани пигментни неоплазии:*

<b>HMB 45</b>	<b>диагностична група</b>			<b>Общо % (n=)</b>
	<b>Бенигнени неви % (n=)</b>	<b>Атипични неви % (n=)</b>	<b>Меланоми % (n=)</b>	
липсва експресия до единични клетки със слаба експресия	4.60 % (n=4)	0 % (n=0)	0 % (n=0)	4.60 % (n=4)
нискоинтензивна експресия в горна порция на лезията	11.49 % (n=10)	0 % (n=0)	0 % (n=0)	11.49 % (n=10)
умереноинтензивна експресия в горна порция на лезията	22.99 % (n=20)	2.30 % (n=2)	0 % (n=0)	25.29 % (n=22)
умереноинтензивна петниста експресия	3.45 % (n=3)	1.15 % (n=1)	0 % (n=0)	4.60 % (n=4)
умереноинтензивна дифузна експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	1.15 % (n=1)	1.15 % (n=1)

високоинтензивна експресия в горна порция на лезията	22.99 % (n=20)	2.30 % (n=2)	0 % (n=0)	25.29 % (n=22)
високоинтензивна петниста експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	13.79 % (n=12)	13.79 % (n=22)
високоинтензивна дифузна експресия	0 % (n=0)	1,15% (n=1)	6.90 % (n=6)	8.05 % (n=7)
хетерогенна експресия	0 % (n=0)	0 % (n=0)	5.75 % (n=5)	5.75 % (n=7)
Общо	65.52 % (n=57)	6.90 % (n=6)	27.59 % (n=24)	100 % (n=87)

Почти всички изследвани пигментни лезии 83 (95,40%) експресират НМВ45 и само в 4 (4,60%) от тях липсва експресия. Проведеният сравнителен анализ (кростабулационен и хи – квадрат тест) установява, че процентните разлики в експресията на НМВ45 между групите е статистически значима ( $X^2 = 88.16$ ,  $p=0.001$ ). Установява се разлика в типа на експресията между групите. При доброкачествените невуси тя е локализирана типично в горната порция на невуса в 50 (57,47%), т.е. налице е градиентна експресия, варираща по интензитет от ниска до висока, предимно високо интензивна. Само 3 (3,45%) от доброкачествените лезии проявяват умерено интензивна петниста експресия, т.е. липсва градиент. Всички атипични невуси в изследвания материал експресират НМВ45, две трети от тях показват градиентна експресия с висок или умерен интензитет в равно съотношение. В групата с ММ в нито един случай не се открива градиент на експресия на НМВ45. Следва, че липсата на градиент при злокачествените тумори (ММ), както и в част от атипичните невуси се явява характерен белег.

**Сравнителен анализ в експресията на HMB45 спрямо наличието или липсата на градиент (наличие или липса на експресия в горната порция на лезията):** Проведеният сравнителен анализ (кростабулационен и хи – квадрат тест) показва, че процентните разлики (Табл. 5.25) между отделните категории са статистически значими ( $X^2=58.179$ ,  $p=0.001$ ) (Табл.5.26)

*Таблица 5.25: Сравнителен анализ на градиента в експресията на HMB45 в трите таргетирувани групи:*

		диагностична група			Общо % (n=)
		Бенигни неви % (n=)	Атипични неви % (n=)	Меланом и % (n=)	
Наличие градиент в експресията	на	51	4	0	55
		58.62 % (n=51)	4.60% (n=4)	0% (n=0)	63.21 % (n=55)
Липса градиент експресията	на	6	2	24	32
	в	6.90 % (n=6)	2.30 % (n=2)	27.59 % (n=24)	36.79 % (n=32)
Общо		57	6	24	87
		65.52 % (n=57)	6.90 % (n=6)	27.59 % (n=24)	100 % (n=87)

*Таблица 5.26: Chi-Squared Tests*

	Сума	df	p
$X^2$	58.179	2	< .001

N	87
---	----

Според отчетените резултати е очевидно, че градиентът в експресията на HMB45 е установен в 51 от 57 доброкачествени невуса и липсва в 24 от 24 меланома. Тази съществена разлика е допълнително тествана с корелационен анализ по метода на Spearman, с оглед установяване на статистическа значимост, която да покаже, дали може да се използва градиента в експресията за предсказване на малигнен потенциал при пигментните тумори. (Табл. 5.27):

*Таблица 5.27: Корелационен анализ по Spearman за HMB45 градиента в трите таргетирувани групи:*

Фактор		HMB 45	диагноза
HMB 45	Spearman's rho	—	
	p-value	—	
диагноза	Spearman's rho	0.794	—
	p-value	< .001	—

Таблицата показва, че при този метод се отчита високо ниво на асоциация между градиента в експресията на HMB45 и доброкачествените невуси, тенденция за намаляване на градиента в експресията при атипичните невуси и липса на градиент при меланомите ( $\rho=0.794$ ,  $p=0.001$ )

### **Резултати от изследването на Ki 67:**

**Експресия на Ki 67 в доброкачествените невуси от изследвания материал:**

- 0 до 2% - 53 случая (92,98%)

- 3 до 5% - 3 случая (5,26%)
- 6 до 10% - 1 случай (1,75%)
- 11 до 20% - 0 случая (0%)
- над 20% - 0 случая (0%)

Най – голямата част от доброкачествените невуси са с ниска пролиферативна активност от 0 до 2% - 53 (92,98%) случая, 3 (5,26%) от невусите проявяват експресия от 3 до 5%, и само 1 (1,15%) случай е в групата от 6 до 10% пролиферативна активност. Няма невуси с пролиферативна активност от 11 до 20% и над 20%. **Средната пролиферативна активност за доброкачествените пигментни тумори (невуси) е Ki 67 = 0,90%.**

#### **Експресия на Ki 67 в изследваните атипични невуси:**

- 0 до 2% - 3 случая (50%)
- 3 до 5% - 1 случай (16,67%)
- 6 до 10% - 2 случая (33,33%)
- 11 до 20% - 0 случая (0%)
- над 20% - 0 случая (0%)

В атипичните невуси отчетената пролиферативна активност е близка до тази на бенигнените лезии: най – голяма част от тях проявяват пролиферативна активност от 0 до 2% - в 3 (50%) от диспластичните невуси, следвани от 2 (33,33%) случая с пролиферативен индекс от 6 до 10% и 1 (16,67%) от атипичните лезии е с пролиферативен индекс от 3 до 5%. **Средната пролиферативна активност за изследваните атипични невуси е Ki 67 = 2,75%**

#### **Експресия на Ki 67 в изследваните малигнени меланоми:**

- 0 до 2% - 4 случая (16,67%)
- 3 до 5% - 3 случая (12,50%)
- 6 до 10% - 2 случая (8,33%)
- 11 до 20% - 7 случая (29,17%)
- над 20% - 8 случая (33,33%)

Най- голяма част от меланомите в таргетираната група, 15 (62,50%) проявяват висока пролиферативна активност, като 8 (33,33%) от тях показват пролиферативен индекс над 20% и седем (29,17%) са с пролиферативен индекс от 11 до 20%.

Умерена пролиферативна активност, т.е. с индекс 6 до 10% проявяват 2 (8,33) от меланомите. Ниска пролиферативна активност се отчита в 7 (29,17%) от меланомите, като 4 (16,67%) са с индекс от 0 до 2% и 3 (12,50%) с индекс 3 до 5% **Средната пролиферативна активност в изследваните меланоми е Кі 67 = 14,96%.**

**Сравнителният анализ на пролиферативната активност в трите таргетни групи показва следното: (Табл. 5.28)**

*Таблица 5.28: Сравнителен анализ на Кі67 имунохистохимичната експресия в трите таргетиранни групи*

Кі 67	диагностична група			Общо % (n=)
	Бенигнени неви % (n=)	Атипични неви % (n=)	Меланоми % (n=)	
0-2%	60.92 % (n=53)	3.45 % (n=3)	4.60 % (n=4)	68.97 % (n=60)
2-5%	3.45% (n=3)	1.15 % (n=1)	3.45 % (n=3)	8.05 % (n=7)
6-10%	1.15 % (n=1)	2.30 % (n=2)	2.30 % (n=2)	5.75 % (n=5)
11-20%	0 % (n=0)	0 % (n=0)	8.05 % (n=7)	8.05 % (n=7)
Над 20%	0 % (n=0)	0 % (n=0)	9.20 % (n=8)	9.20 % (n=8)
общо	65.52 % (n=57)	6.90 % (n=6)	27.59% (n=8)	100 % (n=87)

Установената средна пролиферативната активност е най – висока при меланомите, най – ниска при доброкачествените невуси и междинна при атипичните лезии. Процентните разлики в експресията на Кі 67 между групите е статистически значима ( $X^2 = 65.4$ ,  $p=0.001$ ). Въпреки значимата разлика на средната пролиферативната ативност между таргетираните групи, наличието на меланоми с ниска пролиферативна активност не позволява използването на този критерий самостоятелно, като предиктор на малигнен потенциал.

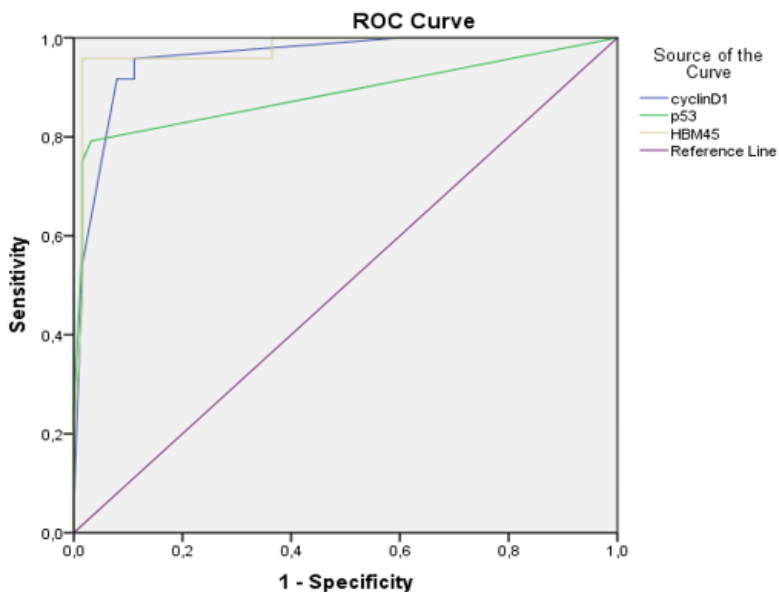
**Статистически анализ за предиктивна стойност на Cyclin D1, p53 и Melanosome clone HMB45**



Проведеното изследване върху имунореактивността на всички маркери в трите групи пигментни тумори, показва най – значими разлики в експресията между групите при *Cyclin D1*, *p53 protein* и *Melanosome clone HMB45*, с маргинални резултати в експресията между доброкачествените и злокачествените пигментни тумори. Поради това тези маркери бяха допълнително изследвани за статистическа значимост като предиктори на малигнен потенциал в два дизайна: **Първият дизайн** на изследване беше базиран на комбинация от експресията на *Cyclin D1*, *p53 protein* и *HMB45* установена по единадесетмоделната схема, въведена от нас за отчитане на имунореактивността; **Вторият дизайн** ползва имунореактивността на *Cyclin D1* и *p53 protein* установени по единадесетмоделната схема за отчитане на експресията в комбинация с градиентна в експресията на *HMB45*. Трите маркера са допълнително тествани с  $\chi^2$  – квадрат тест и корелационен анализ по Spearman, визуализирани графично с ROC крива анализ:

**Резултати от изследване на трите маркера *Cyclin D1*, *p53*, *Melanosome clone HMB45*, като предиктори на малигнен потенциал, според първия дизайн (базиран на експресията им, оценена по единадесетмоделната схема за антителна експресия):**

Комбинираният анализ с  $\chi^2$  – квадрат тест и корелационен анализ по Spearman показват високата предиктивна стойност на всеки един от трите критерия, както и в комбинация. Най – добре се визуализира тази висока предиктивна стойност чрез Рок крива анализ. Графично Рок крива с площ на кривата близо до 1,0 означава висока предиктивност (почти 100%). В случая, трите показателя имат висока предиктивност, като най висока е на *HMB45* (площ = 0,975), най-ниска на *p53* (площ = 0.886) (Фиг. 5.39).



Фигура 5.39: Графично изобразяване на ROC крива анализа, с представяне на трите криви в различен цвят както следва: Cyclin D1 в син цвят ( $AUC=0.959$ , 95% CI: 0.917-1.000,  $p<0.0001$ ). P53 в зелен цвят ( $AUC=0.886$ , 95% CI: 0.786-0.986,  $p<0.0001$ ). Melanosome clone HMB45 в жълт цвят ( $AUC=0.975$ , 95% CI: 0.939-1.000,  $p<0.0001$ )

Посочените стойности на параметрите в графиката (AUC) са отразени в следващата таблица : (Табл. 5.29)

Таблица 5.29: Параметрите на ROC крива анализа (AUC) за трите изследвани критерия (показателя)

Площ	Стандартна грешка	Ниво на значимост	95% интервал на доверие
------	-------------------	-------------------	-------------------------

				Долен интервал	Горен интервал
cyclinD1	0,959	0,021	0,0001	0,917	1,000
p53	0,886	0,051	0,0001	0,786	0,986
HMB45	0,975	0,018	0,0001	0,939	1,000

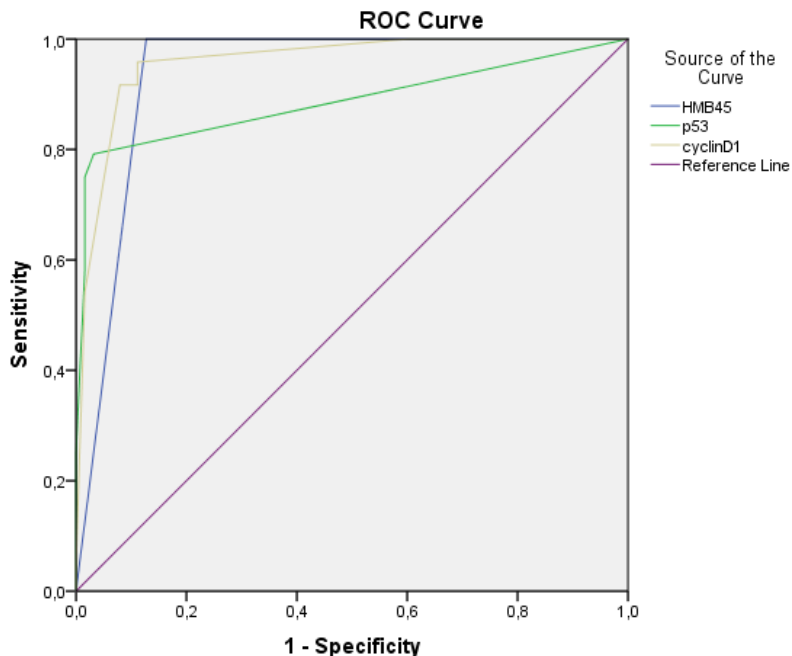
При показателя Cyclin D1, умерено интензивната експресия – петниста или дифузна се явява cut-off point, има най-добра чувствителност (95.8%) и специфичност като прогностичен показател за това, че пигментната лезия е малигнена (AUC=0.959, 95% CI: 0.917-1.000, p<0.0001).

При показателя p53 protein, дори ниско интензивната експресия в горна порция на лезията, може да служи като cut-off point или индикатор за възможен малигнен потенциал т.е. като предиктор на меланом (AUC=0.886, 95% CI: 0.786-0.986, p<0.0001).

Показателят HMB45 е с най-висока чувствителност, при високо интензивна дифузна или хетерогенна експресия. При такъв тип експресия, вероятността да се предвиди малигнен потенциал на пигментната лезия или тя да е меланом е 97,5% (AUC = 0.975, 95% CI: 0.939-1.000, p<0.0001).

**Резултати от изследване на трите маркера Cyclin D1, p53, Melanosome clone HMB45, като предиктори на малигнитет, по втория дизайн (базиран на експресията оценена по единнадесетмоделната схема за Cyclin D1 и p53 и двустепенната схема за градиен в експресията на HMB45):**

Отново е приложен ROK крива анализ за графично преставяне на предиктивната прецизност на трите показателя. Отново трите изследвани показателя имат висока стойност като предиктори на малигнен потенциал (Фиг. 5.40).



Diagonal segments are produced by ties.

Фигура 5.40: Графично изображение на ROC крива анализа с представяне на трите криви за отделните показатели в различен цвят както следва: Cyclin D1 крива в жълт цвят ( $AUC=0.959$ , 95% CI: 0.917-1.000,  $p<0.0001$ ). P53 крива в зелен цвят ( $AUC=0.886$ , 95% CI: 0.786-0.986,  $p<0.0001$ ). Melanosome clone HMB45 крива в син цвят ( $AUC = 0.937$ , 95% CI: 0.886 – 0.988,  $p < 0.0001$ ) (табл. 5.32-33)

Посочените стойности на параметрите в графиката (AUC) са отразени в следващата таблица (Табл. 5.30)

Таблица 5.30: Параметри на ROC крива анализа (AUC) за трите изследвани критерия (показателя)

	Площ	Стандартна грешка	Ниво на значимост	95% интервал на доверие	
				Долен интервал	Горен интервал
cyclinD1	0,959	0,021	0,0001	0,917	1,000
p53	0,886	0,051	0,0001	0,786	0,986
HBM45	0,937	0,026	0,0001	0,886	0,988

Тук показателят HBM45 има най-висока чувствителност. При липса на градиент, чувствителността като предиктор на малигнен потенциал е 100%.

## Обсъждане

Резултатите от проведеното сравнително морфологично и имунохистохимично изследване на 91 случая с пигментни тумори на кожата, разпределени в групи, според критериите, определени от WHO (Elder D, 2018) и на базата на собствения ни опит, а именно - 57 доброкачествени меланоцитни невуси, 10 атипични невуса и 24 малигнени меланоми показват, че демографските и чисто морфологични характеристики на пигментните неоплазии не са достатъчни за категорична оценка на малигнения им потенциал и биологичното им поведение. Половото разпределение, например, което в нашия материал включва два пъти по-голям брой бенигнени невуси при жените и равно разпределение в двата пола на атипичните невуси и меланомите, не е белег с особена стойност за диагнозата и прогностичните насоки. Въпреки, че според отделни клинични проучвания (Чернев Г, 2015) женският пол се асоциира с по – добра прогноза в сравнение с мъжкия, дори при пациенти с метастатични лимфни възли, а 10 - годишната преживяемост при жените с меланом е 86% без наличие на метастази, спрямо 68% при мъжете. Следва, че полът може да се разглежда само като клиничен прогностичен белег при малигнения меланом.

Що се отнася до възрастовото разпределение на случаите в нашия материал, особени различия в групите с бенигнени невуси и атипичните лезии не се откриват. Възрастовият диапазон при тях е между 11 и 80 години, респ. 11 - 70 години, с най-висока честота в младата възраст (31 - 40 г., рсп. 21 - 30 г.). Малигненият меланом се открива във всички възрастови групи (с изключение на групата 11- 20 г.) като разликата в процентното съотношение на диагностицираните в нашия материал случаи над 40 години, спрямо останалите възрастови групи е статистически значима ( $X^2 = 38.13$ ,  $p=0.001$ ), т.е. с увеличаване на възрастта, броят на възможно откритите меланоми се увеличава ( $\rho=0.463$ ,  $p=0.001$ ). От това следва, че възрастта при пациентите с меланом може да се разглежда като независим прогностичен фактор. Последното се потвърждава и от литературните данни, че с увеличаването на възрастта към

момента на диагностицирането, 5 - и 10 - годишната прогноза за преживяемост се влошава (Чернев Г, 2015). При диагностицирани случаи с малигнен меланом преди 30 годишна възраст, 5 - годишната преживяемост е 87%, в сравнение с 78%, 71% и 60%, съответно при 60, 70 и 80 годишните пациенти (Чернев Г, 2015).

Според топографското разпределение на лезите в таргетните групи, най-голяма част от бенигнените невуси са в областта на главата и шията, най-много атипични невуси са диагностицирани в кожа от корема, следвани от тези на главата и шията. Случаите с малигнен меланом са установени, най-вече в кожата на долните крайници, гърба и гърдите. В литературата се приема, че локализацията на ММ в крайниците е свързана с по – добра прогноза в сравнение с тази на трупа, главата и шията. При липса на далечни метастази, независимо от туморната дебелина, 10 - годишната преживяемост за пациентите с последните локализации е 70%, , в сравнение с 90% преживяемост при меланомите, локализиращи по кожата на крайниците (Чернев Г, 2015). Следователно, локализацията на първичния тумор при меланомите трябва да се приема като клиничен прогностичен фактор, докато локализацията на бенигнените и атипични лезии е без особена значимост.

В морфологичната характеристика на пигментните тумори обаче, има редица параметри с висока стойност за дигнозата, за отчитане на малигнения потенциал и за прогнозни заключения. Според изискванията за диагностика на пигментните лезии (Elder D, 2018) това са определящи диагностични и прогнозни белези, отнасящи се главно за малигнения меланом на кожата и включват: дебелина на туморната лезия, степента на микроинвазия, митотичната активност, улцерациите, тумор - инфилтриращи лимфоцити, проявите на регресия и сателитоза. Изследването на **дебелината на тумора** по Breslow в нашия материал показва, че най - голям относителен дял имат туморите с дебелина - Breslow 4 (58,33%), следвани от Breslow 3 (33.33%) (Виж. Табл.5.8 и Фиг. 5.13). През 1970 г. А. Breslow сравнява прогностичното значение на диаметъра на тумора, микроинвазията по Clark и туморната дебелина, измерена с

микроокулар в мм, определяйки пет точки на прогностично пречупване (cut-off): на 0,75мм, 1,5 мм, 2,25 мм, 3,00 мм и над 3,00 мм (Breslow, 1970). В последствие стадирането по Breslow е променено на четиристепенно, като заедно с нивата по Clark, определя Т категорията в TNM класификацията до шестата й версия от 2002 г. (Киров К, 2017). Приема се, че туморната дебелина е специфичен независим прогностичен фактор с висока значимост, основен критерий за pT- стадирането на кожния меланом според 8 –то издание на AJCC (Amin M, 2017). В осмата редакция на TNM класификацията, 2017 г., Т-категорията се определя, имено от дебелината по Breslow и липсата или наличието на улцерации (Amin M, 2017). Микроскопското измерване на туморния обем в посока към подлежащите структури (т.нар. вертикален растеж) остава основен критерий за pT – стадирането на кожния меланом (Amin M, 2017). Освен това, в ретроспективни клиничко – морфологични проучвания е доказана пряка зависимост между преживяемостта и оценката по Breslow (Marghoob A, 2000; Balch C, 2001).

Определената **микроинвазия по Clark** в изследвания от нас материал, показва най – голям брой меланоми като Clark 3 (37,50%), следвани от Clark 5 (29,16%), и почти двойно по-малък брой случаи с микроинвазия Clark 4 и Clark 2 (респ. в 16,67%) (Виж Табл.5.10 и Фиг. 5.18). Според Scolier микроинвазията по Clark има прогностично значение само за 5-годишната преживяемост и то за туморите до 1мм дебелина (T1) (Elder D, 2018).

**Митотичната активност** е много важен компонент на диагнозата. Митотичната активност в тънките (дебелина до 1 мм) меланоми в нашия материал е ниска, под 1 до 2 митози/1 кв.мм. При нодуларните ММ митотичната активност е висока, средно 22,90 митози/1кв.мм, при средна дебелина на тумора 14,42 мм, като при неулцерирани лезии е 17 митози/1 кв.мм (средна дебелина 8 мм), а при улцерирани - 24,62 митози /1кв.мм (средна дебелина 11,29 мм), т.е. средната митотична активност на улцерирани меланоми е по – висока спрямо тази на неулцерирани форми с 7,62 митози/1 кв.мм и нараства с



2,32 митози/1 кв.мм. за всеки мм по-голяма дебелина. Зависимостта между двата параметъра (брой митози/дебелина на лезията) много добре личи при графичното представяне на съотношенията между двете величини (виж Фиг. 5.16 и Фиг. 5.17). Това се потвърждава и от изследвания на други автори. Според данни на К. Киров, средният брой митози нараства с туморната дебелина от 1 до 9.6 митози/1 кв.мм при увеличаване на дебелината на лезията от 1 мм или по малко от 1 мм до над 8мм (Киров К, 2017). Авторът посочва, че митотичната активност се увеличава и при улцерация на тумора, а именно повече от 5 митози/1 кв.мм в 59% от случаите с улцерирани меланом, спрямо 16% без разязвяване. Според Azzola, броят на митозите на площ от 1 кв. мм. има самостоятелно прогностично значение, тъй като при митотичен сбор над 6 митози/ кв.мм, 8 - годишната преживяемост е до 38%, срещу 95% при липса на митози (Azzola M, 2003). Attis също определят митотичната активност като много значим прогностичен фактор (Attis M, 2007). В седмата ревизия на TNM класификацията (2010) броят на митозите определя разделянето на T1 стадия - T1a при по – малко от 1 митоза на кв.мм и T1b при 1 и повече от 1 митоза на кв.мм при тънките меланомии (Amin M, 2017). От всичко това следва, че митотичната активност е изключително важен фактор за туморната прогресия и общата преживяемост на пациентите с ММ.

От горните резултати е ясно, че митотичната активност е в пряка зависимост с наличието на улцерация на тумора. **Разязвяването** на ММ е друг белег със значителна стойност за диагнозата. Той се приема като специфичен независим прогностичен фактор с висока статистическа значимост (Киров К, 2017) и определя уточняването на T-категорията в TNM класификацията като T1a – T4a без улцерация и T1b – T4b с улцерация. В нашия материал улцерираниите форми на ММ са над 50% от случаите (17 пациента). Литературни данни сочат, че големината на улцерацията корелира с преживяемостта при пациентите. При минимална или умерена големина (под 70% от общата туморната дължина или диаметър под 5 мм), преживяемостта е по – добра, спрямо пациенти със значима

улцерация (повече от 70% или повече от 5 мм) т.е. увеличаването на улцерацията е прогностичен белег за по – лоша преживяемост на болните (Haydu L, 2012; Vønnelykke-Behrndtz M, 2014; Vønnelykke-Behrndtz M, 2017). От това следва, че в нашия материал трябва да се очаква значително по-неблагоприятна прогнозна преживяемост в 29.17% (7 случая) от улцерирани случаи, тъй като разязвяването е 5 мм и над 5 мм (от 5мм до 12 мм). Анализи върху проучвания на EORTC 18952 и 18991 установяват, че улцерацията на първичния меланом е статистически значим ( $p < 0,001$ ) и единствен предиктивен фактор и за ефекта от терапията. Това са пациенти, чиято преживяемост се подобрява значително при прилагане на адювантна имунотерапия с интерферон – алфа (Eggermont A, 2005; Eggermont A, 2012-2). Ефектът от адювантната терапия с интерферон – алфа, най – вероятно се дължи на възстановяване на функцията на JAK – STAT (Jewell R, 2015). Според изследванията на Rakosy и Jewell, пациентите с улцериран ММ имат различен генотип от тези без улцерация (Rakosy Z, 2013; Jewell R, 2015). Гените FGFR2, FGFR3, HLF, DSP, EGFR, CEBRA, PTGS1, KCNK6 са свързани с улцерацията (Rakosy Z, 2013; Jewell R 2015). Тези особености в биологичното поведение на улцеративните меланоми и техния различен генетичен профил, дават основания на автори като Eggermont, да поставят въпроса за обособяването им в отделна нозологична подгрупа (Eggermont A, 2012-1). Следователно, точната оценка и отразяване на разязвяването е много важна компонента в морфологичната диагноза на ММ, особено с оглед предикция за преживяемост и терапевтичен отговор.

Оценката на **тумор инфилтриращите лимфоцити** е друг важен момент в диагностиката на пигментните неоплазии. Много автори приемат лимфоидната инфилтрация, като защитен механизъм на имунната система спрямо туморите и причина за регресията им (Dudley M, 2002; Besser M, 2009; Goff S, 2010; Joseph R, 2011; Robbins P, 2011). Това мотивира прилагането на имунотерапия, широко застъпена днес в онкологичната практика. В изследвания от нас материал установихме, че е налице корелативна връзка между дебелината на меланомите и

ТИЛ. В дебелите меланоми стромната лимфоцитна инфилтрация е от минимална до липсваща (Виж Табл. 5.12). Според резултатите на Plaza между изразения инфламаторен инфилтрат (brisk TILs) и по – добрата преживяемост съществува явна корелация (Plaza J, 2017). Слабата стромна лимфоцитна реакция или липсата на такава, корелира с влошаване на прогнозата. Пет - годишната преживяемост намалява от 55% до 27% с намаляване степента на изразеност на ТИЛ по данни на Barnhill, а според Mihm, 5- и 10- годишната преживяемост редуцира от 77%, респ. 55%, до 37%, респ.27%. Ясно е, че отчитането на ТИЛ е задължителна част в диагнозата и има определяща роля като прогностичен фактор (Mihm M, 1996; Barnhill R, 2004).

По отношение на **регресията на ММ**, такава в изследвания от нас материал наблюдавахме само в един от случаите – нодуларен тип ММ и то с парциална (фокална) регресия. В някои изследвания (Morris K, 2008) появата на регресия се отчита като лош прогностичен белег за тънките меланоми (с дебелина под 0,76 мм). Според други (Plaza J, 2017), корелацията на регресионния феномен с прогнозата е противоречива. Смята се, че една от причините за това е липсата на консенсус по отношение точното дефиниране на процеса и на неговото измерване.

В литературата наличието на **микросателити при ММ** се описват в 4.6% от тумори с дебелина 1.5 мм и в 65% при такива с дебелина над 4 мм; наличието им се асоциира с висок риск от регионални лимфонодуларни метастази при дебелина над 1.5.мм (Plaza J, 2017). В нашия материал сателити се откриха в три от меланомите - при малигнен син невус и при два нодуларни меланом, със съответна дебелина 7 мм, 14 мм и 25 мм. Но тъй като не ни е известен лимфонодуларния статус на пациентите към момента на поставяне на първичната диагноза, не бихме могли да имаме отношение към този морфологичен критерий.

От анализа на тези наши резултати, съпоставими с литературните данни е ясно, че в характеристиката на пигментните тумори основните демографски критерии като пол, възраст, локализация нямат съществена роля и място в процеса на морфологичната диагностика. Те могат да се вземат в

съображение само и основно като клинични прогностични белези за преживяемостта на пациентите при злокачествените пигментни лезии. В оценките за биологичното поведение и прогнозите за преживяемост при малигнения меланом обаче, значително висока е стойността на характеристиките за дебелината на малигнената лезия, дълбочината на инвазия, митотичната активност и лимфоцитната инфилтрация. Те илюстрират степента на малигнен потенциал и предикция за преживяемост на пациентите, в частност, за очакван терапевтичен отговор. Поради това точната им преценка и отразяване в морфологичната диагноза са задължителни компоненти при изграждането ѝ. По начало, видно и от резултатите от проведеното от нас проучване, изследването и диагностиката на пигментните тумори не е лек процес. Сложността и трудностите в морфологичната диагностика и предикцията за тяхното поведение произтичат от редица фактори, определящи се от многообразието им, от трудно установимите, понякога, белези за малигненост, в много случаи поради размиване границите на хистологичните параметри за доброкачествени и злокачествени лезии, и по-специално между бенигнените и атипични невуси от една страна, и атипичните невуси и ММ от друга, от трудностите за доказване на меланоцитната им природа при диференцирането им от други тумори. За решаването на тези диагностични проблеми, търсенето на други, освен хистологичните, методи в помощ на диагнозата е оправдано. Имунохистохимичното изследване на пигментните лезии в нашия материал с меланоцитни и немеланоцитни маркери цели именно това, откриване на маргинални (радикално противоположни) белези, показващи максимално значими статистически разлики между различните типове, в резултат на което да се дефинират като предиктори на малигнен потенциал. Клинико-морфологичният смисъл е те да бъдат използвани именно в диагностиката на трудните от морфологична гледна точка пигментни лезии, каквито, най – често са атипичните невуси, особено тези с тежка дисплазия.

**Сравнителният имунохистохимичен анализ** проведехме на базата на оценка на експресията на съответните биомаркери при 57 случая с доброкачествени, 6 случая с атипични и 24 случая с малигнени пигментни тумори, т.е. стандартен асиметричен профил на дизайн на изследването (2:1 доброкачествени:злокачествени тумори), с превес на бенигнените лезии като по - често срещани в човешката популация. За оценка на имунореактивността, базирайки се на собствения опит, изработихме единадесет моделна схема на разпределение на експресията. Тази схема за отчитане се наложи поради факта, че при изследването наблюдавахме голямо разнообразие, както в интензитета на експресия, така и в топографското разпределение на маркера в рамките на отделните туморни лезии. А познаването на нюансите в имунореактивността при пигментните тумори са важни за избягване на грешни интерпретации, особено по посока на оценка на малигнен потенциал. Детайлното изследване на имунореактивността по тази схема, при всички тествани маркери в нашия материал, показва гравитиране около един най – чест, специфичен за съответния маркер модел на експресия в съответната група (доброкачествени, атипични и малигнени тумори), която можем да наречем характерна или типична. Заедно с това установихме и широка гама от други модели на експресия, определени като нетипични, с по – тясно или по – широко припокриване на проявената експресия в доброкачествените и злокачествените туморни групи. Освен това, пъстротата на експресията подсказва и, че преценката в някои случаи не може, и не трябва да се базира само на експресията на едно анти тяло, а на комбинация от няколко. При използването на двата меланоцитни маркера (S100 protein и Melanosome clone HMB45), които по същество потвърждават принадлежността на изследваните тумори към пигментната тъкан, установихме известни особености в експресията, които имат значение за диагностиката. Всички пигментни неоплазии в изследваните групи експресират **S100 protein**, като експресията при доброкачествените невуси е дифузна и високо интензивна в 100%, и със същия интензитет, но в 83,33% от случаите с

атипични лезии. При случаите с ММ антиятлото се експресира предимно дифузно с умерен интензитет в 37,50%, високо интензивна дифузна експресия и хетерогенна с вариращ интензитет в цялата дебелина на лезията се открива в равни пропорции – в 29,17% (респ. по 7 случая) и само в 1 сл. (4.17%) е ниско интензивна дифузна. Следователно, изразената имунореактивност във всички изследвани пигментни неоплазии, в трите таргетирани групи, потвърждава високата чувствителност на S100 protein за доказване на меланоцитната им природа и го прави подходящ за диференциация на пигментната лезия от други, непигментни тумори. Тази характеристика на антиятлото намира широка подкрепа и в литературата (Gaynor R, 1981; Cochran A, 1982; Gatter K, 1985; McNutt N, 1998). Но намерените разлики в интензитета на експресия между таргетните групи в нашия материал, а именно, че той е постоянно висок при бенигнените невуси и с умерен интензитет предимно при ММ и в част от атипичните невуси е характеристика, познаването на която може да е в помощ на диагностичния процес.

В експресията на **НМВ45** се откриват редица особености. Доброкачествените лезии в 92.98% експресират антиятлото и само в 4 случая (7.02%) такава липсва. Експресията обаче, е локализирана типично, в горната порция на невуса (в 87.72%), т.е. налице е градиент на експресия и само малка част, 5.66% (3 случая) от тях проявяват умерено интензивна петниста експресия, т.е. липсва такъв. Градиентната експресия варира по интензитет от ниска до висока, като в повечето невуси тя е високо интензивна (в 40%) и два пъти по-малко (в една пета от общия брой за тази група) е с нисък интензитет. Всички атипичните невуси в изследвания материал експресират НМВ45, като по – голямата част (66,66%) показват градиент с висок или умерен интензитет в равни съотношения. В останалите случаи липсва градиент на експресия; при тях експресията е високо интензивна дифузна или умерено интензивна петниста. В групата с ММ в нито един случай не се открива градиент на експресия на НМВ45. Имунореактивността е високо интензивна петниста (в 50 %) или дифузна (в 25%), и хетерогенна

(вариращата по интензитет в цялата дебелина на лезията) (в 20,83%). Следва, че липсата на градиент при злокачествените тумори (ММ), както и в част от атипичните невуси се явява характерен белег. Това се потвърждава и от направения Х – квадрат тест и корелационен анализ по Spearman, с който се потвърди, с висока статистическа достоверност, че липсата на градиент в НМВ45 експресията трябва да се према като предиктор на малигнен потенциал. Подобно заключение правят Uguen, а именно, че липсата на градиент в НМВ 45 експресията е по-често явление при злокачествените пигментни тумори (Uguen A, 2015). Nat Pernik обобщава, че НМВ45 се явява маркер за ММ в случаите когато той се изявява, поне с фокална дълбока реактивност на антитялото, за разлика от невусите, при които липсва експресия в дълбоките участъци на лезията (Pernik N, 2021). Доказаната НМВ45 експресия и в трите групи пигментни тумори в нашето изследване е още едно убедително доказателство за меланоцитния им произход, което дава сигурност при използването му в диагностиката на тумори с неясна хистогенеза. Липсата на градиент в експресията на НМВ45 само в малка част от атипичните невуси изисква внимателен подход при решаване на биологичния потенциал на лезията. Последният трябва да се формулира на базата на комбиниран мултифакторен (хистологичен, имунохистохимичен) анализ, за да се избегне свръхдиагностициране на малигненост.

Следователно, пъстротата на експресия в различните тумори в различните групи, степента на интензитет и разпределението ѝ в различните части на лезията са белези, които трябва да се познават и правилно отчитат. Познаването на нюансите в експресията ще предпази морфолога от грешни интерпретации, особено по посока на отчитане на малигнен потенциал. Всичко това още веднъж подчертава значението и практическата стойност на разработения от нас модел на отчитане на имунореактивността по единадесетмоделната схема. С прилагането ѝ се осигурява отчитане на всички особености в експресията на всяко антитяло, както по отношение на

интензитета, така и по топографското разпределение и градиента на разпространение.

В направените характеристики на пигментните лезии е ясно, че на използваните меланоцитни маркери се пада определено място, преди всичко за доказване на меланоцитната им природа, но в известна степен и като предиктори на малигненост, най-вече експресията на HMB45. Но търсенето на други, немеланоцитни маркери, с още по-висока сигурност характеризиращи и отразяващи туморния процес и посоките на туморното развитие, ни подтикнаха да проучим ролята на Cyclin D1, p53 protein и BCL2 в диагностиката и на пигментните тумори. С единствената цел да се повиши възможността за по-сигурно установяване на малигнен потенциал на пигментната лезия и за по-точна предикция на биологичното ѝ поведение.

**При изследването на Cyclin D1** установихме статистически значими разлики в експресията в различните групи шигментни тумори. (виж Табл.5.12) Всички, с изключение на един бенигнен невус, експресират антитялото, като най-честият модел на експресия при доброкачествените лезии е петниста експресия (в 73.68%) с умерена интензивност (в над 50% от тях); експресия, предимно в горната им порция, се наблюдава в 22.81% и само в един невус (1.75%) тя е дифузна (в цялата дебелина), но с нисък интензитет. Най-висока експресия се наблюдава при малигнените меланоми, при което тя е дифузна или петниста в цялата дебелина на тумора. Атипичните невуси, в равни съотношения (респ. по 16.67%), показват разнообразен тип експресия на Cyclin D1, а именно, с нисък и умерен интензитет в горната част или петниста, високо интензивна в горната порция, петниста или дифузна, т.е. липсва характерен модел. Така експресията на Cyclin D при атипичните лезии се явява междинна, с характеристики близки до доброкачествените и до злокачествени лезии.

Проведеният допълнителен вариационен анализ разкрива най-значима статистическа разлика в експресията на Cyclin D1 при доброкачествените невуси и меланомите. Откритата значително по – висока експресия на Cyclin D1 в меланомите спрямо тази в доброкачествените лезии разкрива и доказва връзката и ролята



на Cyclin D1 в развитието на злокачествен фенотип, тъй като е известно, че при прехода от доброкачествен в злокачествен имунофенотип основна роля играе активацията на циклините. Следователно, използването на Cyclin D1 за предикция на малигнен потенциал при пигментните тумори е оправдано. В изследванията си Алексеенко и съавт. също акцентират върху статистическата значимост на разликите в експресията на Cyclin D1 между меланомите и обикновените невуси, както и между диспластичните и обикновените невуси (Alekseenko A, 2010). Отчетената в нашия материал нехарактерна (междинна) експресия на антитялото в атипичните невуси, трябва да приемем като трудност, която да се има предвид при определянето на биологичния им потенциал. Освен това в характеристиките на антителната експресия прави впечатление топографското разпределение на Cyclin D1 експресиращите клетки. В резултатите на Алексеенко и съавт. се описва имунореактивност главно в горната порция (в меланоцитите разположени в близост с дермо – еидермалната граница) на невусите, (Alekseenko A, 2010), докато нашите резултати показват предимно петниста т.е. фокално разпределена в цялата дебелина на лезията експресия с умерен интензитет (в 73.68%) и само в 22,81% от изследваните невуси експресия в горната порция. Също така, според посочения колектив диспластичните невуси и меланомите, проявяват равномерно разпределение на Cyclin D1 - положителните клетки, а нашите резултати отчитат освен дифузна, също така петниста по разпределение и хетерогенна по интензитет експресия в рамките на една и съща лезия. Тези наши резултати са близки до съобщените от други автори (Ewanowich C, 2001), според които бенигнените невуси показват зонална експресия, диспластичните невуси свръхекспресират Cyclin D1, като експресията корелира със степента на цитологичен атипизъм. Вероятно нюансите в характеристиките на експресия в нашите резултати и тези на цитираните автори се дължат на по - детайлното описание според използваната от нас единадесет моделна схема за разпределение на експресията. В заключение е ясно, че експресията на Cyclin D1 разкрива развитие на злокачествен

фенотип, следователно се явява подходящ маркер за предикция на малигнен потенциал.

**Сравнителното изследване експресията на p53 протеин в трите групи пигментни тумори** показва, че експресия липсва в 98,25% от бенигнените лезии и в 83,33% от атипичните невуси, за разлика от меланомите, които в основната си част (79,17%) типично експресират p53. (Виж Табл. 5.16) Интересен факт при атипичните невуси е, че тези с нискостепенна дисплазия не експресират антицялото, а само единият, който е с тежка дисплазия проявява имунореактивност и то умерено интензивна петниста експресия в цялата дебелина на лезията. Установените разлики в експресията на p53 между трите групи са статистически значими (X кв.= 58, p = 0,001). Тези резултати намират потвърждение и в редица други изследвания при което Pierard уточнява, че експресия липсва при меланоцитните невуси, а в 25% до 60% присъства в мутиралата си форма при кожните малигнени меланоми (Pierard G, 2012). Според Kanoko всички изследвани невуси, включително Шпиц невусите, диспластичните и ординерни невуси са негативни (не експресират p53) (Kanoko M, 1996). Според данните на Bergman, изследвайки p53 експресията в първични меланоми, органни метастази от меланом, в Шпиц и в бенигнени съставни невуси, налице е високостепенна експресия в 31% от първичните кожни меланоми, и липва такава в изследваните невуси (Bergman R *et al.*, 1995). Действително, според нашите резултати, както и тези в литературата, при които се отчита, че най-общо, големият процент от меланомите са p53 положителни, докато невусите отрицателни, експресията на p53 трябва да се разглежда като характеристика на злокачествен имунофенотип (Cristofolini M., 1993). Въпреки това, установената, макар и в малка част от доброкачествените лезии (в 1.75%) и атипичните невуси в нашия материал имунореактивност, не позволява да се приеме p53 като абсолютен (автономен) критерий за определяне на биологичен потенциал. Обратното крие опасност от свръхдиагностика на малигненост. Това подчертават и други автори, които дори намират значително по-високи стойности на експресия на p53 (в 15%) в невусите и значително по-ниска

експресия при ММ (в 30%) в сравнение с нашите резултати (Cristofolini M., 1993).

**При изследването на експресията на BCL2** (Виж Табл.5.20) установихме, че 100% от бенигнените невуси в настоящия материал, еднотипно, високо интензивно и дифузно експресират BCL2. Всички атипични лезии също експресират BCL2, като най – голям брой лезии (66,67%), показват високоинтензивна дифузна експресия, идентична с тази на доброкачествените лезии, а в останалите случаи тя е с по-нисък интензитет. Всички изследвани 24 малигнени меланом, експресират BCL2. Високо интензивна дифузна експресия, подобна на тази при доброкачествените лезии има в 41,67% от меланомите, а в останалите 58,33% тя е с намалена интензивност или парциална. Следователно, BCL2 имунореактивност има и в трите изследвани групи, високо интензивна и дифузна в бенигнените лезии и голямата част от атипичните невуси. Макар и малкият относителен дял на атипичните невуси с нисък интензитет на експресия, подобна на доминиращата такава при меланомите, е друго потвърждение на позицията, която те заемат на интермедиерни лезии между бенигнените и малигнени пигментни неоплазми. Според проучвания на Santamaria, BCL2 имунореактивността е широко разпространена, както в нормалните меланоцити, така и в производните им неоплазми, от интрадермалните невуси до кожния меланом и метастазите му (Carmen Saenz-Santamaria M, 1994). Според авторите позитивността на BCL2 в нормалните меланоцити и в невусните клетки е еднакво интензивна, докато меланомните клетки показват променлива, но предимно слаба реактивност и изказват вероятност, че намаляването на експресията е свързано с туморната прогресия и корелира с повишена пролиферативна активност. Други автори на базата на установените в техния материал сравнително еднакво високи нива на експресия в ММ и бенигнените невуси (респ. 93.1% за меланомите и 94.3% за бенигнените меланоцитните лезии) смятат, че BCL2 експресията при кожния меланом няма прогностично значение (Cerroni L, 1995). Следва, че тези данни отразени в литературата и респективно нашите резултати, при

които е налице значимо парциално припокриване между експресията в трите групи, водят до извода, че употребата на BCL2 имунореактивността при пигментните неоплазии не е подходяща критерий за оценка на биологичния им потенциал.

Изследването на пролиферативната активност чрез експресия на **Ki 67 пролиферативния индекс** в различните туморни групи е друг важен показател в характеристиката на туморния процес. Обобщено, в изследвания материал доброкачествените невуси са с ниска средна пролиферативна активност (0,9%), с диапазон на индекса от 0 до 5% и много рядко (в единични случаи) до 10%. Атипичните невуси заемат междинно място, със средна пролиферативна активност 2,75% и в диапазон от 0 до 10%. Меланомите са с висока средна пролиферативна активност (14,96%), предимно в диапазона 11 до 20% и над 20% Ki 67 експресиращи клетки. Посочените разлики между отделните групи са статистически значими (X кв.= 65, p = 0,001). Значително висок Ki 67 индекс на пролиферация при злокачествените меланоцитни тумори, в сравнение с невусите отчитат и други автори, респективно 29,9% за меланомите и 1.7% за невусите (Uguen A, 2015). В сравнение с нашите резултати, посочената пролиферативна активност при ММ е доста по-висока. Според Lebe, сравнителните резултати между отделните групи пигментни тумори показват, че индексът Ki 67 е значително по – висок при диспластичните невуси в сравнение с обикновените меланоцитни невуси и при меланома в сравнение с диспластични невуси (Lebe B, 2007). На базата на тези резултати авторите смятат, че по този критерий (Ki 67 пролиферативен индекс) диспластичните невуси са биологично отделени от доброкачествените пигментни лезии. Въпреки статистическите значими разлики в Ki 67 пролиферативния индекс в нашите резултати, трябва да отбележим, че е налице известно припокриване на данните при отделните групи. Въпреки доминиращата ниска пролиферативна активност при невусите и атипичните лезии, единични случаи са с пролиферативен индекс 6 - 10%. При ММ, на фона на подчертано високия индекс, характерен за тях, също единични случаи показват умерен (6 - 10%), нисък (3 - 5%) или много

нисък (0 - 2%) Ki 67 пролиферативен индекс. Това го прави несигурен самостоятелен диференциално – диагностичен критерий за определяне на малигнен потенциал. Следва, че прилагането му трябва да е паралелно с други маркери (напр. Cyclin D1) или други показатели, които са с доказано статистически значими разлики между бенигнените и малигнени пигментни тумори. Последното препоръчват и други автори (Lebe B, 2007).

От сравнителния анализ на резултатите от настоящето проучване е ясно, че различните имунохистохимични маркери демонстрират разнообразие, както в интензитета, така и в топографското разпределение на експресията, характерно или не за различните групи пигментни тумори. Въпреки вариабилността, някои от тях имат висока статистическа значимост при сравняване на групите по посока бенигнени - малигнени тумори, което позволява да бъдат определяни като предиктори на малигнитет. В други случаи резултатите показват близки или припокриващи се характеристики на експресия, което размива границите между отделните групи и прави невъзможно използването на съответния маркер като самостоятелен, автономен критерий за малигненост. Ето защо, смятаме, че за по – висока достоверност на малигнена предикцията е правилно оценката да се базира на изследване на комбинация от имунохистохимични маркери, които проявяват статистически най - значима разлика в експресията при малигнените и бенигнени пигментни тумори. **Според нашите резултати, като най - значими такива приемаме експресията на Cyclin D1, p53 и HMB45.** Експресията на Cyclin D1 установихме, че е с най-значими статистически разлики в групите с доброкачествени невуси и с меланомите. Експресия на p53 доказахме, че липсва в бенигнените пигментни лезии, за разлика от MM, за който тя, и то с висок интензитет, е типична. Включването на HMB45 в комбинацията приехме на базата на установената, с висока статистическа достоверност липса на градиент в разпределението на експресията при малигнения меланом и наличието на такъв при невусите. Проведеният анализ с X – квадрат тест и корелационен анализ по Spearman,

потвърждава високата предиктивна стойност на всеки един от трите критерия самостоятелно и още по – висока в комбинацията им. Високата им предиктивна стойност особено добре се визуализира чрез изпълнения Рок крива анализ (виж Фиг. 47 и Фиг. 48), първо, на базата на оценка по единадесетмоделната схема за определяне на експресията и второ, на експресията, оценена по единдесетмоделната схема в комбинация с НМВ45 градиента на експресия. Графичният израз на Рок крива анализа доказва, че при площ на кривата близо до 1, е налице предиктивна възможност почти 100%.

Според първия анализ, и трите показателя имат висока предиктивност, като най-висока е на НМВ45 (площ = 0,975), най-ниска на p53 (площ = 0.886).

Според втория сравнителен анализ, индикаторът - липса на градиент в НМВ45 експресията е със 100% (площ = 0.937) чувствителност като предиктор на малигнен потенциал. Следователно, тези неоспорими резултати са доказателство за високите възможности на комбинацията Cyclin D1, P53 и НМВ45 за установяване на малигнен потенциал при пигментните тумори. Това още веднъж подчертава, че разумният подход изисква комбинация от маркери, в случая подбраната от нас тройна комбинация, Cyclin D1, p53 и НМВ45, чиято максимално висока статистическа достоверност осигурява достатъчна сигурност в предикцията на малигненост и допринася за максимална точност на диагнозата.

Разбира се изграждането на морфологичната диагноза е многостъпален и труден процес, базиращ се първо и основно на точната морфологична оценка на лезията, подчинена на основните изисквания за диагностика на пигментните тумори (Elder D, 2018) с отразяване на цялата специфика и особености при всеки един случай. Включването и използването на имунохистохимичните маркери в диагностиката на пигментните тумори днес е призната необходимост, тъй като правилната оценка и интерпретация на експресията им е важен показател, както за доказване произхода на тумора, така и за потвърждаване на малигнен потенциал, респективно за диференцирането на малигнения меланом от имитиращите го

гранични лезии. Агресивността в биологичното поведение на малигнения меланом изисква правилна и ранна диагноза, тъй като единствено тя би осигурила успех от лечението и възможност за добра прогноза на преживяемостта. В този аспект резултатите от проведеното от нас изследване, както и всяко научно изследване по проблемите на диагностиката на пигментните тумори, представляват научен и практически принос в борбата с тази агресивна малигнена неоплазия – кожния малигнен меланом.

## **Заклучение**

Голямото многообразие на пигментните неоплазии, включително и много дискретните морфологични разлики между малигнени пигментни тумори и атипични меланоцитни лезии, имитиращи малигнен меланом, прави морфологичната диагноза трудна. Достоверният диагностичен подход изисква познаване и оценка на голям брой хистологични параметри и често имунохистохимичен анализ, както за доказване произхода на тумора, така и за отдиференциране на малигнения меланом от имитиращите го гранични лезии. Освен хистологичните данни за туморна дебелина, митотична активност, наличието или липсата на улцерация, които са основни прогностични фактори, в съвременната диагностична практика навлиза употребата на маркери, които по правило се прилагат в туморната диагностика за потвърждаване малигнения потенциал на лезията и като предиктори на туморната прогресия. При настоящото изследване проучихме детайлизирано експресията на Cyclin D1, p53, BCL2 и Ki 67 маркерите, имащи важно значение в дележния цикъл и туморната прогресия. Също така потвърдихме неоспоримата роля на S100 protein като маркер за меланоцитна диференциация, както и значението на Melanosome clone HMB45 в доказването на туморния произход от пигментни клетки. Подробното проучване на експресията по единадесетмоделна схема за разпределение и оценка, демонстрира голямото разнообразие в имунореактивността на изследваните маркери, а познаването на нюансите в тази имунореактивност предпазва от прибързани и неточни решения, по отношение биологичния потенциал на пигментните лезии, особено в случаите, в които се опитваме да градим интерпретация, базирана на един изследван критерий. Т.е. набива на очи извода за това, че диагностичната оценка трябва да се базира на комбинирано изследване върху експресията на няколко маркера, внимателно подбрани, в зависимост от трудността на диагностичната задача, пред чието решение сме изправени. В най – висока степен настоящото проучването беше ориентирано към търсенето на маркери прогнозиращи



малигнения потенциал при пигментните неоплазии. На базата на обработка на получените резултати по различни статистически методи, направихме подбор върху най – значимите от статистическа гледна точка имунохистохимични маркери - предиктори на малигнения потенциал при пигментните неоплазии. В тази връзка установихме невъзможност да се използва BCL2 протеина и показахме неоспоримо високите възможности на Cyclin D1, P53 и HMB45 за установяване на малигнения потенциал при меланоцитните тумори. Изследването показва, че разумният подход изисква комбинация от маркери, в нашия подбор тройна такава, базирана на Cyclin D1, p53 и HMB45 експресията, която да предостави предиктивна стойност с максимално висока статистическа достоверност. Това допринася за поставянето на максимално точна диагноза при изследването на пигментните тумори. Агресивността в биологичното поведение на малигнения меланом изисква правилна и ранна диагноза, тъй като единствено тя определя успеха от лечението и преживяемостта. Най –важните компоненти в борбата с тази агресивна малигнена неоплазия са навременната диагностика и стадийно ориентираната терапия, за което има конкретен практически принос и настоящото проучване. Така проведеното изследване ни дава основание да формулираме следните изводи:

## **Изводи**

Въз основа на направената характеристика на пигментните тумори на кожата, с анализ на морфологичните особености и имунореактивността им за търсене на критерии за точна диагностика и за прогнозиране на биологичното им поведение, може да се направят следните изводи:

1. Познаването и точната оценка на морфологичната характеристика на пигментните тумори е абсолютна необходимост за морфологичната диагностика и определяне на вида им, респективно като доброкачествени лезии (невуси), атипични невуси и малигнен меланом.
2. Отразяването на всички белези и особености, характеризиращи всяка една пигментна лезия и особено отнасящите се за малигнения меланом дебелина на лезията, дълбочина на инвазия, лимфоцитна инфилтрация, разявяване и митотична активност са определящи морфологични диагностични и прогностични критерии.
3. Демографските характеристики на пигментните тумори, а именно пол, възраст, локализация могат да се разглеждат единствено и само като клинични прогностични белези.
4. Изследваните имунохистохимично S100 protein и Melanosome clone HMB45, експресиращи се във всички изследвани случаи в трите групи, потвърждава тяхната значимост като маркери, доказващи меланоцитната природа на туморите.
5. Установената особеност в експресията на HMB45, отнасяща се за липсата на градиент в разпределението на експресията при малигнения меланом и наличието на такъв при невусите се явява значим прогностичен критерий за малигненост.
6. Доказаната статистически значима разлика в експресията на Cyclin D1 в изследваните групи позволява употребата на този маркер като предиктор на малигнен потенциал с

cut-off point - умерено интензивната експресия, петниста или дифузна.

7. Въпреки високата положителна експресия на p53 в малигнените меланоми и отрицателна при невусите, характеристика на злокачествен имунофенотип, установената, обаче, макар и в малка част от доброкачествените лезии и атипичните невуси имунореактивност, не позволява да се приеме p53 като абсолютен (автономен) критерий за определяне на биологичен потенциал.
8. Експресията на BCL2 в таргетираните групи, характеризираща се с припокриване (еднаквост) в степента на експресия при доброкачествените и злокачествени пигментни тумори го прави неподходящ за предсказване на малигнен потенциал при тези неоплазми.
9. Пролиферативната активност (експресия на Ki 67), поради наличието на голям диапазон в степента на експресия в отделните групи, не може да бъде сигурен самостоятелен индикатор за възможен малигнен потенциал; прилагането му трябва да е паралелно с други маркери или други показатели, които са с доказано статистически значим характер.
10. Разумният подход в прилагане на имунохистохимичните маркери, предсказващи малигнен потенциал при пигментните тумори, за по-голяма достоверност, изисква използването им в комбинация.
11. Най – добрата комбинация, според нашите резултати е изследване на трите маркера - Cyclin D1, p53 protein и HMB 45, при които е налице най-висока статистическа достоверност в посока на малигненост.
12. Въведената от нас 11- моделна схема за детайлно отчитане на интензитета на експресия и топографското разпределение на експресиращите клетки в тумора, осигурява точност в интерпретацията и определянето на имунореактивността на всеки един маркер, важен детайл за повишаване сигурността на морфологичната диагноза

и диференциалната диагноза, особено при граничните лезии.

## **Приноси**

### **Оригинални научно-приложни приноси**

1. Осъществено е детайлизирано проучване на експресията на Cyclin D1, p53 protein, BCL2, S100 protein, Melanosime clone HMB45 с прилагане на изработена от нас 11- моделна схема за оценка, едновременно на степента (интензитета) и топографското разпределение на експресията; използването ѝ е препоръчително, тъй като тя отразява голямата вариабилност и нюанси в имунореактивността на изследваните маркери при пигментните неоплазии, с което се избягва опасността от неточни изводи и грешки при преценката на биологичния им потенциал.

2. Установена е висока прогностична стойност на предложената от нас тройна комбинация от маркери - Cyclin D1, p53 протеин експресия и HMB45 като предикция на малигнен потенциал при пигментните лезии.

### **Потвърдителни приноси**

1. Потвърждава се високата стойност на S100 protein и HMB 45 като маркери за меланоцитен произход с експресията им във всички изследвани пигментни тумори от трите групи.

2. С потвърдителен характер е установеният висок интензитет на експресия на S100 protein при доброкачествените лезии и в по – голямата част от изследваните атипични невуси, както и широката гама и особености в експресията на HMB 45.

3. Потвърдителен характер има установената липса на статистически значими разлики в експресия на BCL2 във всички пигментни лезии, обуславящи невъзможността за използването на маркера като предиктор на малигненост.

4. Потвърдена е вариабилността в експресията на Ki 67 в трите групи, особеност при бенигнени и малигнени пигментни тумори, познаването на която е необходимост при оценка на малигнения им потенциал.

## Публикации и участия свързани с дисертационния труд

### Пълнотекстови публикации

1. **L Petkova**, GS Stoyanov. Morphological diagnosis of skin melanoma. Varna Medical Forum; 2021. online first
2. **L Petkova**, GS Stoyanov. Clinical, morphological and differential diagnosis characteristics of atypical melanocytic nevi. Varna Medical Forum; 9 (2), 57-63. 2020
3. **L Petkova**. Contemporary classification and genetic profile of malignant skin melanoma. Varna Medical Forum; 9 (2), 52-56. 2020
4. **L Petkova**, GS Stoyanov. Demographic, clinical and morphological profile of malignant cutaneous melanoma in a Northeastern region of Bulgaria. Scripta Scientifica Medica; 53(3):21-24. 2021

### Участия в научни форуми

1. **Л. Петкова**, И. Кобакова, Г. Попов. Рядък случай на кожен син невус с преглед на литературата. Конференция на БДП Велинград 12-14 април 2019 г.
2. D. Dzenkov, **L. Petkova**, N.Yanulova, P.Genev. Two cases of intramammary metastases from cutaneous melanoma. 32 Congress of the ESP and XXXIII International Congress of the IAP 6-8 December 2020 - virtual
3. **Л. Петкова**, Г. Стоянов, И. Кобакова, Х. Божилова. Сравнителен анализ на експресия на BCL2, Cyclin D1, p53 в доброкачествени невуси и малигнени меланоми, значение за диагностичната практика. XIII-ти национален конгрес по патология. Бургас 10-12 септември 2021 г.

## БЛАГОДАРНОСТИ

- На научния ми ръководител проф. д-р Богомила Маневска д.м.н., с дълбока благодарност за голямото доверие, напътствия, огромната и всеотдайна помощ при написването на дисертационния труд
- На проф. д-р Мария Цанева д.м, за полезните съвети и помощ при оформлението на дисертационният труд
- На д-р Георги Стоянов и д-р Ина Кобакова за неоченимата техническа подкрепа и съдействие
- На лаборанта Светлана Костадинова, която изработи препаратите за дисертационния труд
- На целия екип на Клиниката по обща и клинична патология към УМБАЛ „Св. Марина“- Варна и Катедрата по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология към Медицински университет – Варна за разбирането и колегиалната атмосфера
- На г-жа Силвия Павлова за статистическата обработка на резултатите от изследванията свързани с дисертационния труд