



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“-ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ОБЩА КЛИНИЧНА ПАТОЛОГИЯ, СЪДЕБНА
МЕДИЦИНА И ДЕОНТОЛОГИЯ**

д-р Ина Георгиева Кобакова

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ,
ХИСТОТИПИЗАЦИЯ И КОРЕЛАЦИЯТА ИМ
С НЯКОИ МОЛЕКУЛЯРНИ МАРКЕРИ
ПРИ КОЖЕН МЕЛАНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“,
научна специалност „Патологоанатомия и цитопатология“.

Шифър 03.01.03

Научен ръководител: Доц. д-р Екатерина Боянова Софтова, д.м.

Научен консултант: Доц. д-р Петър Иванов Генов д. м.

Варна

2017

Настоящият дисертационен труд е разработен в Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Медицински факултет на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна.

Дисертационният труд съдържа 164 машинописни страници и е онагледен с 36 таблици и 49 цветни фигури. Списъкът на цитираната литература включва 240 заглавия, от които 7 на кирилица и 233 на латиница.

На 05.09.2017г. дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрен съвет на Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Медицински университет ”Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна съгласно чл. 26, ал. 3 и чл. 30, ал. 3 от ППЗРАСРБ и чл. 44, ал. 2 от ПРАС на МУ-Варна и Решение на ФС по протоколи № 40/09.10.2017г. и №41/30.10.2017г. на Факултет „Медицина“, във връзка съответно с доклади с вх. №102-1959/19.09.2017 г. и №102-2287/25.10.2017г. от доц. д-р Петър Генов, д. м., Ръководител на Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при МУ-Варна.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 02.03. 2018г. от 16⁰⁰ часа в Ректората на Медицински университет ”Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна въз основа на Заповед № Р-109-385/09.11.2017 г. на проф. д-р Красимир Иванов, д. м. н., Ректор на МУ-Варна, пред научно жури в състав:

Външни членове:

Доц. д-р Екатерина Боянова Софтова-Златарова, д. м.
Проф. д-р Ангел Атанасов Ангелов, д. м. н.
Проф. д-р Георги Константинов Чернев, д. м.н.

Вътрешни членове:

Доц. д-р Мария Ангелова Цанева, д. м.
Доц. Д-р Илко Георгиев Бакърджиев, д.м.

Резервен външен член:

Доц. д-р Елена Гълъбова Порязова-Маркова, д. м.

Резервен вътрешен член:

Доц. д-р Иван Донеv Щерев, д. м.

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицински университет ”Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна и са на разположение в Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Медицински университет ”Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

1.	Въведение	4
2.	Цел и задачи	6
3.	Материал и методи	7
3.1.	Материал	7
3.2.	Методи	7
4.	Резултати и обсъждане	11
4.1.	Проучване на заболяемостта и смъртността от кожен меланом за страната и Варненска област	11
4.2.	Систематизиране на основните клинични, хистологични, имунохистохимични и молекулярни характеристики на кожния меланом	14
4.3.	Имунохистохимично тестване на злокачествените меланоцитни лезии.	21
4.4.	Определяне връзката между възрастта и клинично-морфологичния субтип спрямо молекулярно изследвания BRAF-мутационен статус	24
4.5.	Съпоставка на експресията на анти-BRAF антитяло с резултатите от молекулярното изследване за BRAF V600 мутация	26
4.6.	Определяне влиянието на параметрите ТИЛ, некрози, улцерации и брой митози спрямо експресията на анти-BRAF антитяло	27
4.7.	Определяне на влиянието на показателите клинично-морфологичен субтип, пол и възраст спрямо експресията на анти-BRAF антитяло	32
4.8.	Определяне на корелационна зависимост между експресията на анти-BRAF антитяло и експресията на анти-CD 117 антитяло	34
4.9.	Съставяне на примерен диагностичен алгоритъм според изследваните показатели и проучената литература	38
5.	Заключение	41
6.	Изводи	42
7.	Приноси на дисертационния труд	43
8.	Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд	44
9.	Благодарности	45

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Меланомът е злокачествен тумор с меланоцитен произход и изключително неблагоприятна прогноза. В съвременната литература според местоположението си той бива разглеждан предимно като кожен, мукозен и окуларен, а всеки от изброените има редица подтипове, обусловени локализационно и хистологично.

Честотата на меланомите в световен мащаб непрекъснато нараства, особено при индивиди със светъл цвят на кожата, изложени на хронична слънчева увреда. В Европа заболяемостта през 2016 г. е 10-25 нови случая на 100000 души, в САЩ тя е 20-30 нови случая на 100000 души, а в Австралия - 50-60 нови случая за 100000 души (С. Garbe и съавт., 2016).

Кожният меланом е с най-голяма честота. Той се открива в двата слоя на кожната покривка - епидермис и дерма, около придатъците ѝ - косми, космени фоликули, потни и мастни жлези, както и в подкожните тъкани при инвазивен растеж (R. L. Barnhill и съавт., 2014).

С диагностична цел на базата на вече задължително определени патоморфологични прогностични и предиктивни параметри често се извършва имунохистохимична верификация, чиито панел при необходимост бива разширен до голям брой маркери. Понастоящем процесът бива прецизиран чрез определяне на туморния молекулярно-патологичен профил с оглед верифициране и терапевтично атакуване на най-често установяваните мутации при меланома. При пациентите с налични мутации се пристъпва към провеждане на персонализирана терапия с новооткритите инхибитори. Често тези пациенти са неоперабилни или при тях липсва ефект от конвенционална терапия, поради което генетичното тестване тук е от решаващо значение за увеличаване на преживяемостта им (P. V. Chapman и съавт., 2011; K.T. Flaherty и съавт., 2012; J.A. Sosman и съавт., 2012;).

С оглед определяне поведението на тумора все по-насочено се търсят нови маркери, с помощта на които би могла да се изясни биологията на новообразуването. В областта на морфологичната диагностика на меланома навлиза практиката да се прилагат маркери, които по правило биват използвани за тумори с различна от тази на меланома хистогенеза. Те най-често се интерпретират като предиктори за прогресията на заболяването или служат като аналози на молекулярни изследвания при ниско туморно съдържание в тъканните проби (M. A. Anwar и съавт., 2016).

В настоящия труд са изследвани някои от тях като анти-VEGF антитяло, анти-BRAF антитяло и анти-CD117 антитяло.

Литературните данни относно корелацията между резултатите от имунохистохимичното изследване, прогностичните/предиктивните параметри и молекулярния статус при кожен меланом са противоречиви. Тази връзка би била полезна за осъвременяване концепцията за биологията на този тумор, определяне нуждата от молекулярно изследване на базата на хистологично

такова, както и като възможност за предикция на молекулярно-патологичния резултат чрез имунохистохимично изследване с прилагани в рутинната практика антитела и антитела-аналози на валидираното молекулярно тестване (A. I. Riker и съавт., 2008; V. Saranga-Perry и съавт., 2014; I. Gencia и съавт., 2015; P. Rutkowski и съавт., 2015; K. E. Volmar и съавт., 2015; C. Garbe и съавт., 2016; S. Rajkumar, I. R. Watson, 2016 и др.).

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е да се проучат заболяемостта и смъртността от кожен меланом в България и за Варненска област, както и да се анализират и съпоставят клинични, хистологични, имунохистохимични и молекулярни характеристики на заболяването с оглед изясняване биологията на тумора и съставяне на примерен диагностичен алгоритъм.

За изпълнението на тази цел ние си поставихме следните задачи:

1. Проучване на заболяемостта и смъртността от кожен меланом за страната и за Варненска област.
2. Систематизиране на основните клинични, хистологични, имунохистохимични и молекулярни характеристики на кожния меланом.
3. Имунохистохимично тестване на злокачествените меланоцитни лезии.
4. Определяне връзката между възрастта на пациентите и клинично-морфологичния субтип на лезиите с BRAF мутационния статус, изследван молекулярно.
5. Съпоставка експресията на анти-BRAF антитяло с резултатите от молекулярно изследване за BRAF V600 мутация.
6. Определяне влиянието на параметрите ТИЛ, некрози, улцерации и брой митози спрямо експресията на анти- BRAF антитяло.
7. Определяне влиянието на параметрите клинично-морфологичен субтип, пол и възраст спрямо експресията на анти- BRAF антитяло.
8. Определяне на корелационна зависимост между експресията на анти-BRAF антитяло и експресията на анти-CD 117 антитяло.
9. Съставяне на примерен диагностичен алгоритъм според изследваните показатели и проучената литература.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Материал

Обект на настоящото проучване са три групи болни.

Първата група се състои от регистрираните болни на територията на страната в интервала 1980-2013г., като е извършен ретроспективен анализ. Данните за стандартизирана заболяемост и смъртност (световен стандарт) от меланом на кожата на 100 000 души за някои от годините през периода 1980-2013г. са снети от съответните таблици в „Заболяемост от рак в България, 2013“ (София, 2015), ежегодно издание на Националната болница по онкология, София.

Втората група се състои от 452 пациента с кожен меланом, представляващи всички болни отразени в базата-данни на СБАЛОЗ „Д-р М. Марков“-Варна през периода 2007-2016г., за които са анализирани основните статистически показатели за заболяемост и смъртност.

Третата група се състои от 50 пациента с кожен меланом. От тях при 27 пациенти е извършен BRAF-мутационен тест в Лабораторията по молекулярна патология към Клиниката по обща и клинична патология, УМБАЛ “Св. Марина“-Варна. Лезиите при тези пациенти са определени като първични, метастатични или рецидивиращи. Останалите 23 пациента са без извършен мутационен тест и представляват еднородна група с първичен кожен меланом. Диагностицирани са в СБАЛОЗ „Д-р Марко Марков“-Варна през периода 1.1.2016 г. - 1.2.2017 г. Материалите от всеки от пациентите са изследвани и обработени по стандартния парафинов метод. При пациентите с неизвестна първична локализация на тумора е взет за изследване материал от метастаза. Всеки от материалите е фиксиран в 10% неутрален буфериран формалин за 18-24 часа и включен в парафин с точка на топене 52 - 54 градуса с цел изготвяне на парафиново блокче. Така изготвените материали са изследвани хистологично и имунохистохимично.

3.2. Методи

3.2.1. Извършен е ретроспективен анализ на данните за стандартизирана заболяемост и стандартизирана смъртност (световен стандарт) за меланом на кожата на 100 000 души население от съответните таблици в изданието „Заболяемост от рак в България, 2013“ (София, 2015) и от някои предходни издания от съответните години: 1980г., 1984г., 1985г., 1990г., 1995г., 2000г., 2005г., 2009г., 2010г., 2011г., 2012г. и 2013г. поотделно за мъжете и за жените. След това ние систематизирахме получените резултати с цел изработване на графики за конкретните динамични редове на посочените показатели.

3.2.2. Проучване на данните и съставяне на извадка в табличен и графичен вид на всички болни от кожен меланом регистрирани в базата на СБАЛОЗ „Д-р М. Марков“-Варна през периода 2007-2016г.

3.2.3. Макроскопско изследване (клинични данни)

Използвана е клинично предоставена информация – данни от епикризите на пациентите, а именно възраст и пол, място на първична локализация и размери на първичната лезия.

3.2.4 Хистологично изследване

Изготвените срези с дебелина от 5 μm са оцветени с хематоксилин-еозин с оглед определяне хистологичния субтип и стадирането на тумора, както и за наблюдение и оценка на някои морфологични параметри:

1. наличие на некроза;
2. наличие на улцерация;
3. брой митози на поле с най-високо увеличение (x400);
4. тумор инфилтриращи лимфоцити, определени посредством използване на полуколичесвен анализ чрез имунохистохимична реакция със анти-CD3 антитяло;
5. дебелина на лезията измерена чрез вертикален туморен растеж по скала на Breslow.

3.2.5. Имунохистохимично изследване

От предоставените парафинови блокчета са изготвени срези с дебелина 4 μm . За целите на имунохистохимичното изследване е извършена депарафинизация с ксилол, пробите са дехидратирани във възходяща редица етанол до дестилирана вода. Разкриването на антигените се осъществи с предварително загрят EnVision FLEX Target Retrieval Solution (работен разтвор) in PT Link контейнер и са инкубирани за 20 минути при температура 97°C и pH=6. След охлаждане, пробите са поставени в разтвор на стайна температура FLEX Wash Buffer (20x) за 1-5 минути. Оцветяването е извършено по протокол FLEX за четири от антителата и протокол FLEX+linker за анти-VEGF антитяло. Пробите са изследвани с пет вида моноклонални антитела – анти-BRAF антитяло, анти-CD117 антитяло, анти-CD3 антитяло, анти-HMB45 антитяло, анти-VEGF антитяло.

Срезове са инкубирани за 20 минути в антителата. Нивата на експресия са определени чрез използването на детекционна система анти-поливалентен HRP/DAB. Като последна стъпка реакцията бе визуализирана чрез подходящ субстратен хромоген (DAB, Diaminobenzidine) реагент. Следва контра оцветяване с хематоксилин.

Оценка на имунохистохимичното изследване е направена чрез полуколичесвен метод като са изследвани 10 полета на най-голямо учеличение (x400) за всеки отделен случай. Позитивно оцветяване се идентифицира, когато се регистрира оцветяване в кафява оцветка. Интензивността е оценена по следния начин: – (безцветно-0), + (светло жълто до кафяво-1), ++ (кафяво-2), +++ (тъмно кафяво-3). Изключение прави CD3,

където реакцията се отчита като позитивна при комплетна оцветка на мембраната.

Направени са дигитални снимки на случаите с помощта на сканиращия апарат- Leica Aperio ScanScope AT2 device (Aperio Technologies, Vista, CA) с последващи анализи на сканираните образи с ImageScope V12.1.0.5029 (Aperio).

3.2.6. Молекулярно изследване

Молекулярно профилиране на туморите е извършено чрез екстракция на ДНК изолирана от парафинови блокчета.

Тестването се извършва чрез алел-специфичен PCR – Real-time PCR (TaqMan real time PCR) с флуоресцентни репортерни проби, при които се добавят към реакцията репортерни проби за див тип и мутантен тип. След хибридизация към геномната ДНК, полимеразата удължава комплементарно пробите, като освобождава репортерните молекули за детекция. Последващите PCR цикли с тези проби амплифицират сигналите, като така се измерват точно двата, които се изследват. Време за теста: 1-2 дни.

Използвана апаратура – Cobas® 4800 BRAF V600 чрез Real-time PCR - изследване по стандартизирана методика (CE-IVD) за идентифициране на пациенти с BRAF мутации.

3.2.7. Статистически методи

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

Видове статистически методи:

1. Дескриптивни методи - изчисляване на средната аритметична величина и стандартно отклонение на количествени признаци.

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

3. Параметричен анализ - корелационен анализ. Корелациите измерват степента на асоциация между две или повече променливи. Корелационен 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) <0,05.

4. Мултифакторен регресионен анализ - анализ на причинната обусловеност на явленията. Този анализ е предназначен за даване на количествен израз на ефектите на дадена група променливи X_1, X_2, \dots, X_p , наречени независими или предиктори (фактори), върху друга променлива Y , която е резултата и се нарича зависима променлива. Всички фактори заедно със

зависимата променлива образуват т.нар. регресионен модел, в който всеки фактор има определена тежест за развитието на наблюдавания резултат. Регресията е една линейна функция, при която нарастването на X води до нарастване на Y . Означава се с R^2 и приема стойности до 1. По-голяма сила на предвидимост има анализ, при който R^2 е по-близо до 1. За силна се приема регресия над 0,5 при ниво на значимост $p < 0,005$.

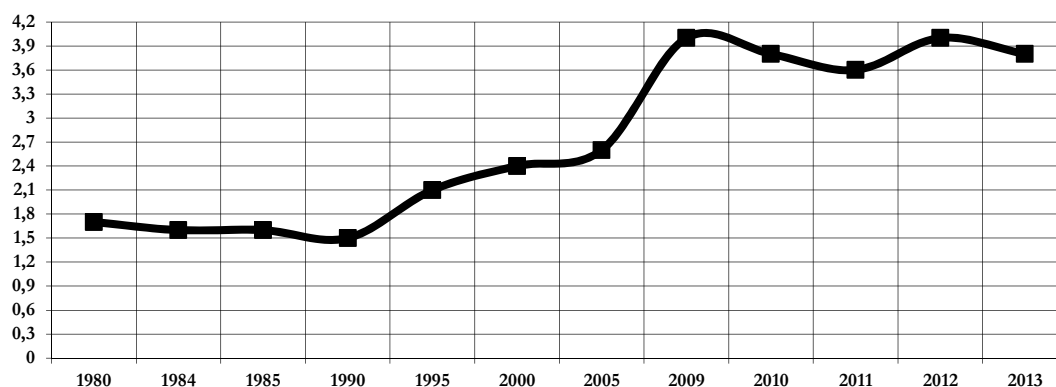
5. t -test анализ - изчислява разликите между стойностите на променливите за всеки отделен случай-пациент и тества, дали средните стойности се различават от 0, т. е. дали има разлика при сравнението или не, и дали тази разлика е статистически значима.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

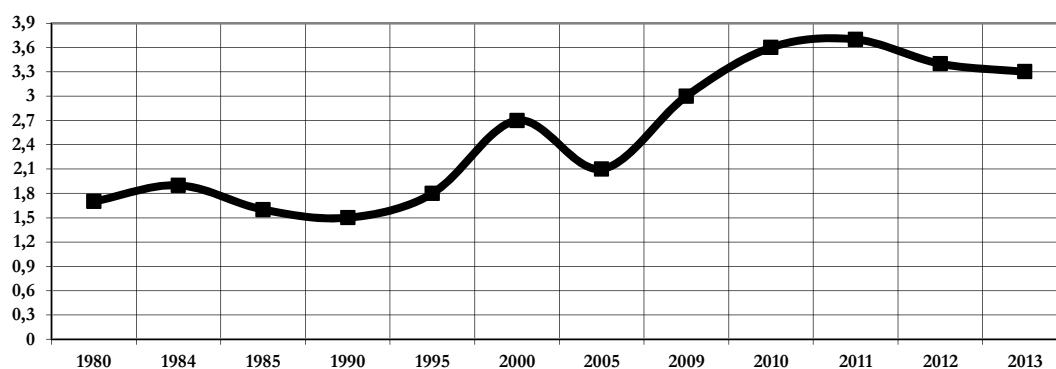
4.1. Проучване на заболяемостта и смъртността от кожен меланом в страната и Варненска област

4.1.1. Заболяемост и смъртност от кожен меланом в България

Извършен е анализ на заболяемостта и смъртността за територията на България за периода 1980-2013 г. (Заболяемост от рак в България, 2013; 2015). Динамиката на регистрираната стандартизирана заболяемост (световен стандарт) от кожен меланом показва неблагоприятна тенденция за нарастване през последните години, особено при мъжете (фиг. № 1 и фиг. № 2).



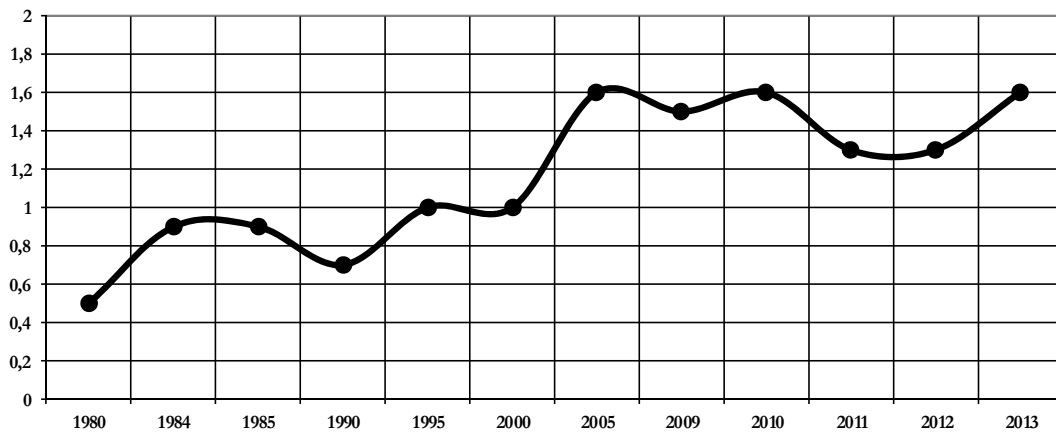
Фиг. № 1. Динамика на стандартизираната заболяемост (световен стандарт) на 100 000 от меланом на кожата (С43 по МКБ) при мъжете в България



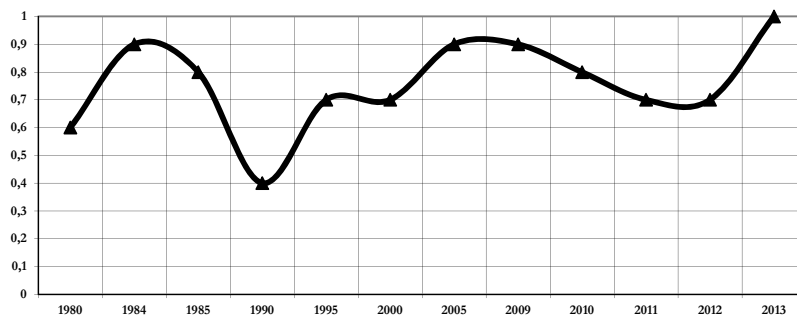
Фиг. № 2. Динамика на стандартизираната заболяемост (световен стандарт) на 100 000 от меланом на кожата (С43 по МКБ) при жените в България

В България през 2013 г. починалите от меланом на кожата са общо 199: 117 мъже и 82 жени. Смъртността възлиза общо на 2,7 на 100 000 население, като е по-висока при мъжете (3,3 на 100 000 население), отколкото при жените (2,2 на 100 000 население). Тя представлява 1.1% от всички причини за смърт от злокачествени болести (Заболяемост от рак в България, 2013; 2015) и 46,7% от тези на кожата (Н. Димитрова, 2015). Анализът на динамиката на регистрираната стандартизирана смъртност показва неблагоприятна тенденция

за нарастване през последните години, особено при мъжете (фиг. № 3 и фиг. № 4).



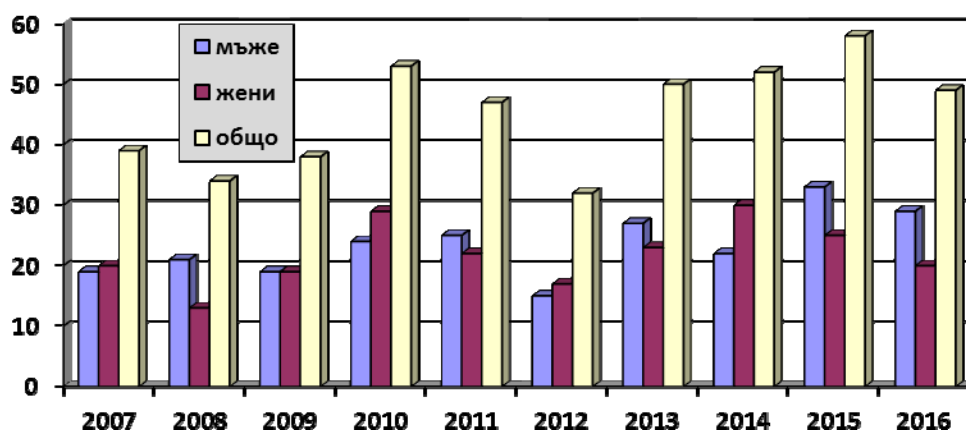
Фиг. № 3. Динамика на стандартизираната смъртност (световен стандарт) на 100 000 от меланом на кожата (С43 по МКБ) при мъжете в България



Фиг. № 4. Динамика на стандартизираната смъртност (световен стандарт) на 100 000 от злокачествен меланом на кожата (С43 по МКБ) при жените в България

4.1.2. Заболяемост и смъртност от кожен меланом за Варненска област в периода 2007-2016г.

Анализирани са основните статистически показатели на кожния меланом, отразени в базата-данни на СБАЛОЗ „Д-р М. Марков“-Варна през периода 2007-2016 г. През тези 10 години в лечебното заведение са проследени общо 452 пациента с кожен меланом, от които 234 са мъже и 218 са жени (фиг. № 5).



Фиг. № 5. Динамика на новорегистрираните случаи с кожен меланом в СБАЛОЗ „Д-р М. Марков“ - Варна през 2007-2016 г.

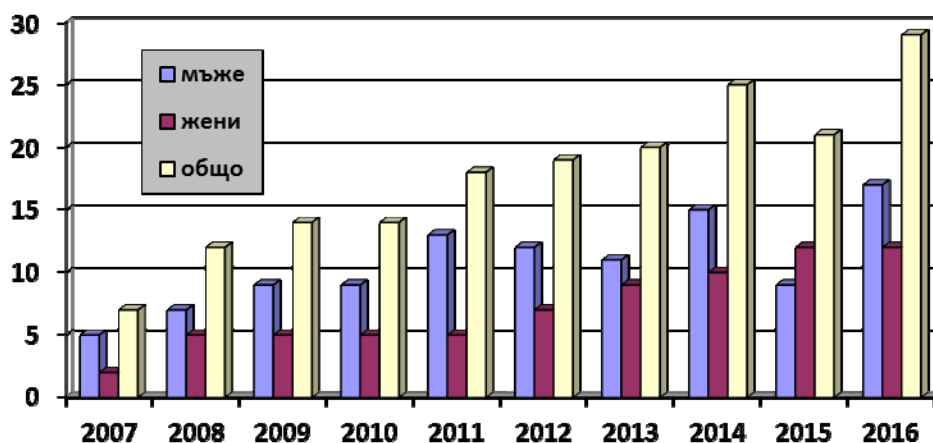
Резултатите от сравнителния анализ (t -test) на броя на новодиагностицираните случаи с кожен меланом през периода 2007-2016 г. не показват статистически значима разлика ($t=0,072$, $p=0,944$), но ясно може да се забележи тенденция за нарастване на броя на регистрираните нови случаи с кожен меланом (табл. № 1).

Табл. № 1. Сравнение на новодиагностицираните случаи с кожен меланом в СБАЛОЗ-Варна през периода между 2007 г. и 2016 г.

	t	Ниво на значимост	Средна разлика	95% Интервал на доверие	
				Долен интервал	Горен интервал
Сравнение на случаи 2007-2016г.	0,072	0,944	0,200	-6,1161	6,5161

Ние установихме, че общият брой на починалите през този период е 179, като от тях 107 са мъже и 72 са жени (фиг. № 6).

Резултатите от сравнителния анализ (t -test) на броя на смъртни случаи с кожен меланом, регистрирани в СБАЛОЗ „Д-р М. Марков“ - Варна през 2007-2016 г. показват статистически значима разлика ($t=3,847$; $p=0,004$) (табл. № 2), т.е. постепенното нарастване на смъртността през годините е прогресивна тенденция. Тези данни напълно съвпадат със световните тенденции и с тези за страната, като засвидетелстват още веднъж агресивния характер и неблагоприятната прогноза на кожния меланом.



Фиг. № 6. Динамика на смъртните случаи с кожен меланом, регистрирани в СБАЛОЗ „Д-р М. Марков“-Варна през 2007-2016 г.

Табл. № 2. Смъртни случаи с кожен меланом, регистрирани в СБАЛОЗ „Д-р М. Марков“-Варна през периода между 2007 г. и 2016 г.

	t	Ниво на значимост	Средна разлика	
			Долен интервал	Горен интервал
Сравнение на случаи 2007-2016г.	3,847	0,004	1,44184	5,55816

4.2. Систематизиране на основните клинични, хистологични, имунохистохимични и молекулярни характеристики на кожния меланом

4.2.1. Възраст на пациентите

В проведеното проучване са изследвани материали от 50 пациента, средната възраст на които е $65 \pm 13,09$ г., като най-младият пациент е на 40 години, а най-възрастният - на 87 години.

Пациентите са разделени в пет възрастови интервални групи, като най-голям е процентът на групата 61-70 години (28%) и на групата 71-80 години (26%) (табл. № 3).

Табл. № 3. Разпределение на пациентите във възрастови групи

възраст	брой пациенти	процент
40-50 години	10	20,0
51-60 години	6	12,0
61-70 години	14	28,0
71-80 години	13	26,0
81 +	7	14,0
общо	50	100,0

4.2.2. Пол на пациентите

Разпределението на пациентите по пол показва, че селектираната група е с приблизително еднакъв брой мъже и жени, съответно 26 мъже и 24 жени. Мъжете са 52% от изследваните пациенти, а жените са 48% (фиг. №7).



Фиг.№7 Пол на изследваните пациенти

4.2.3. Локализация на лезиите

При разпределението според локализацията на лезиите се установява, че най-често кожен меланом се открива по гърба на пациента (n=14,28%). Тези данни съвпадат с данните от сходни проучвания (М. В. Aksenenko и съавт., 2015).

4.2.4. Размер на лезиите

При разпределение на пациентите според размера на изследваните лезии се установи, че те са с големина от 0,30 cm до 7,00 cm при среден размер от $1,69 \pm 1,165$ cm.

4.2.5. Клинико-морфологичен субтип

При разпределение на изследваните пациенти според клинико-морфологичния субтип на лезията се установява, че най-често срещаният вариант е нодуларен меланом (40%, n=20), следван от суперфициално разпространяващия се меланом (22%, n=11) и от метастатичния меланом с неясна първична локализация (20%, n=10) (табл. № 4). Данните от извършеното проучване са близки до тези, публикувани при сходни проучвания от други автори (Т. Eigentler и съавт., 2016; G. Ferrarra, G. Improta, 2016).

Табл. № 4. Разпределение на пациентите според клинико-морфологичния субтип на изследваните кожни меланоми

Клинико-морфологичен субтип на меланом	Брой	Процент
нодуларен меланом	20	40,0
суперфициално разпространяващ се меланом	11	22,0
метастаза с неясна първична локализация	10	20,0
ахроматичен меланом	5	10,0
акрален меланом	3	6,0
меланом възникнал на базата на диспластичен невус	1	2,0
Общо	50	100,0

4.2.6. Разпределение на лезиите според измерения вертикален туморен растеж по скалата на Breslow

Измерването дълбочината на изследваните лезии по Breslow е възможно при 40 пациента, тъй като в останалите случаи първичното огнище на тумора не е установено. Според резултатите най-голям процент пациенти са категоризирани в IV степен (47,5%, n=19).

Табл. № 5. Оценка на вертикален туморен растеж в милиметри (по Breslow)

Дълбочина на лезията измерена по Breslow	Брой	Процент
II степен - от 0,76 mm до 1,50 mm	5	12,5
III степен - от 1,51 mm до 4,00 mm	16	40,0
IV степен - над 4,00 mm	19	47,5
общо	40	100,0

4.2.7. Некрози в тумора

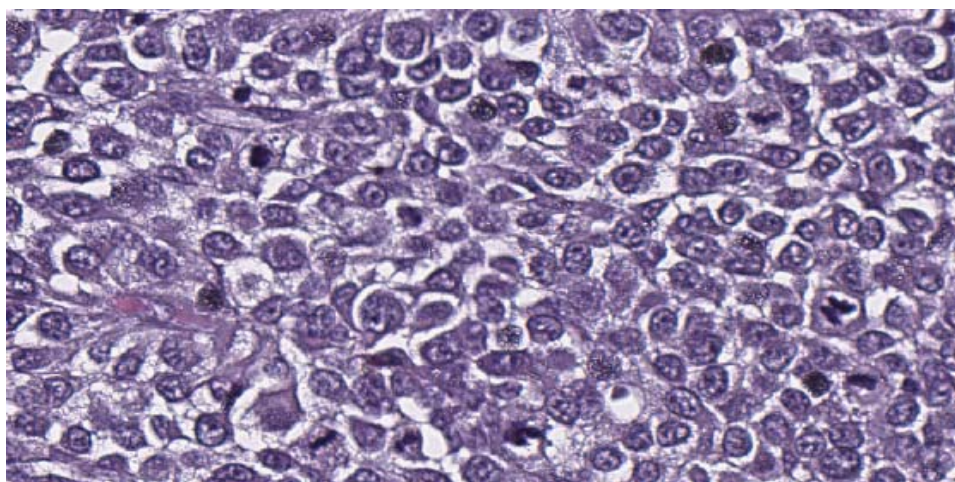
При изследваните пациенти бе отчетен показателят наличие/отсъствие на некрози в тумора. При повечето меланоцитни лезии се установиха такива (62%, n=31).

4.2.8. Митози

Ние изследвахме показателя „брой митози“, който измерихме в полето с най-висока митотична активност при най-голямо увеличение (x400). Като най-честа установихме умерената митотична активност (50%, n=25) (табл. № 6). На фиг. № 8 е представен случай с висока митотична активност.

Табл. № 6. Изследване на показателя „брой митози“

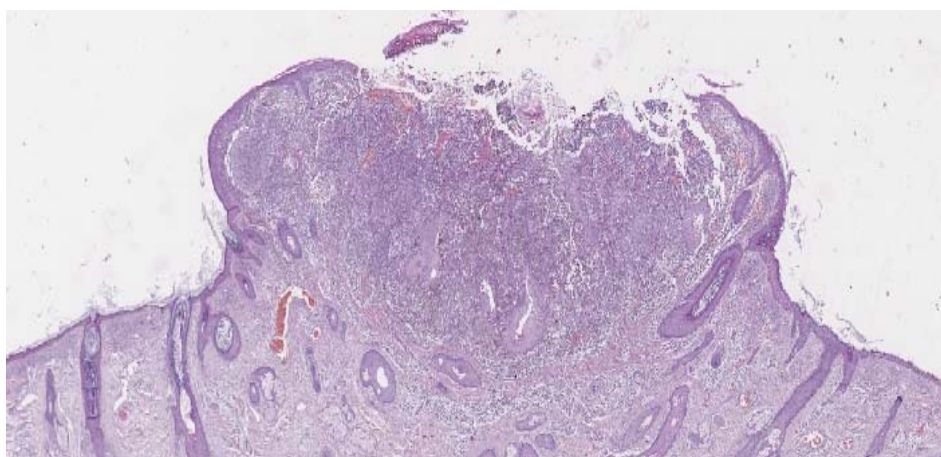
Брой митози	Брой пациенти	Процент
1-5 митози – умерена митотична активност	25	50,0
6-10 митози – висока митотична активност	24	48,0
>11 митози – много висока митотична активност	1	2,0
Общо	50	100,0



Фиг. № 8. Нодуларен меланом с висока митотична активност (ХЕ x 200)

4.2.9. Улцерации

В настоящото проучване проследихме наличието на улцерации в лезиите при 40 от изследваните пациенти с отбелязана първична локализация на тумора. Процентът на наличие и отсъствие е приблизително еднакъв. На фиг. № 9 е представен случай на пациент с нодуларен меланом с изразена улцерация.

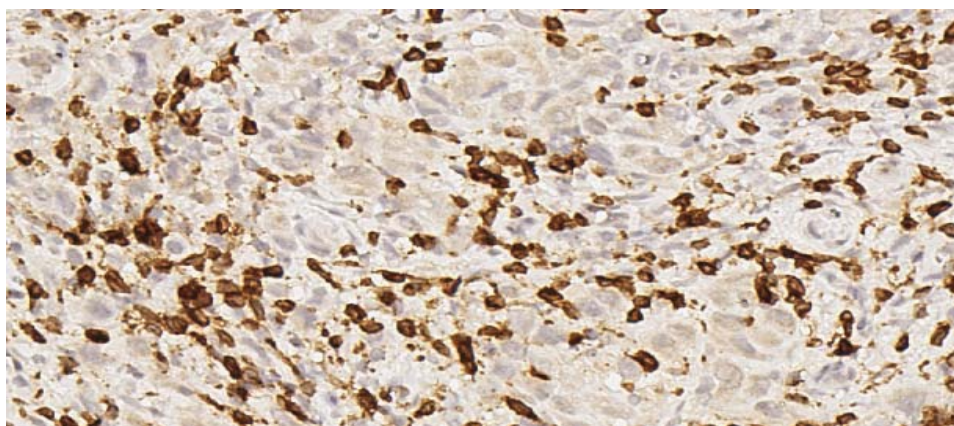


Фиг. № 9. Нодуларен меланом с изразена улцерация (ХЕ x 10)

4.2.10. Тумор инфилтриращи лимфоцити (ТИЛ)

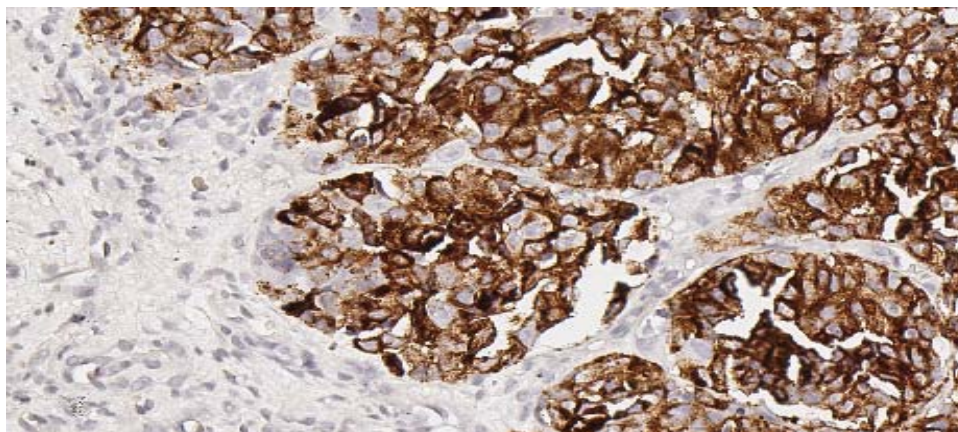
В извършеното от нас проучване туморните лезии бяха изследвани за определяне количеството и разположението на ТИЛ сред и около тумора. С цел по-добрата им визуализация, ние използвахме лимфоцитен маркер анти-CD3 антитяло, базирайки се на данните от няколко проучвания в литературата. В тях авторите установяват, че в злокачествените меланоцитни тумори CD3 ТИЛ доминират, като съвместно с тях се откриват CD5, CD8 и CD20 ТИЛ, но в пъти по-малко (M. R. Hussein и съавт., 2006; L. T. Nguyen и съавт., 2010).

При изследваните от нас 40 първични огнища на меланоцитни тумори в най-висок процент са представени лезиите с голямо количество ТИЛ, инфилтриращи периферията на тумора по цялото му протежение или с множество фокуси, разположени между туморните гнезда (77,5%, n=31). Експресия на анти-CD3 антитяло се наблюдава в почти всички ТИЛ разположени в туморните гнезда на първичните лезии. На фиг. № 10 е представен случай на първична меланоцитна лезия, послужил като образец за оценяване на тумори с голямо количество ТИЛ.



Фиг. № 10. Имунохистохимично изследване с цел визуализация на ТИЛ (CD3 x 200)

4.2.11. Анти-НМВ45 антитяло



Фиг. № 11. Силно позитивна имунохистохимична реакция във всички клетки на туморните гнезда (HMB45 x 100)

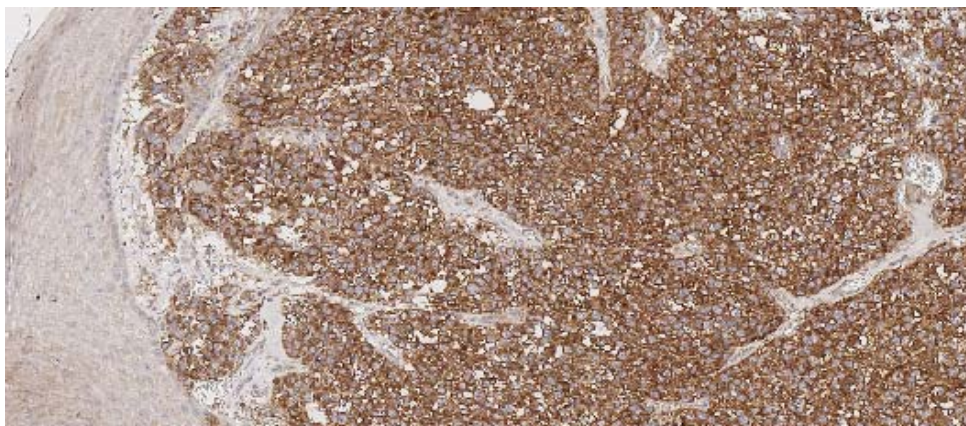
С оглед диагностична верификация на туморите проведохме имунохистохимично изследване с анти-НМВ 45 антитяло. Силна експресия се наблюдава при 42 лезии (84%, n=42), а умерена експресия - при почти всички останали (14%, n=7). Реакцията се визуализира в цитоплазмата и клетъчната мембрана на меланоцитите от туморните гнезда (фиг. № 11).

4.2.12. Молекулярно изследване на туморите за BRAF мутации чрез Real-time PCR

За молекулярно профилиране на туморите чрез ДНК, изолирана от парафинови блокчета с цел установяване на BRAF V600 мутации чрез Real-time PCR, са изследвани общо 27 пациента. От тях в по-голям процент е установена BRAF V600 E мутация (70,4%, n=19), а при останалите мутация не се открива.

4.2.13. Анти-BRAF антитяло

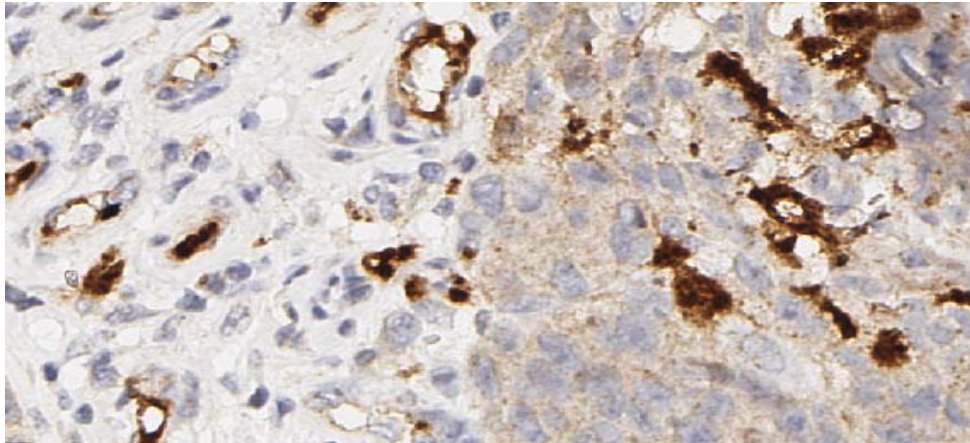
Материали от туморите на всички пациенти са изследвани имунохистохимично с анти-BRAF антитяло. Ние установихме висок процент на силно позитивна реакция (70%, n=35)(фиг. № 12).



Фиг. № 12. Имунохистохимична експресия на анти-BRAF антитяло - силно позитивна реакция във всички туморни клетки (BRAF x 50)

4.2.14. Анти-VEGF антитяло

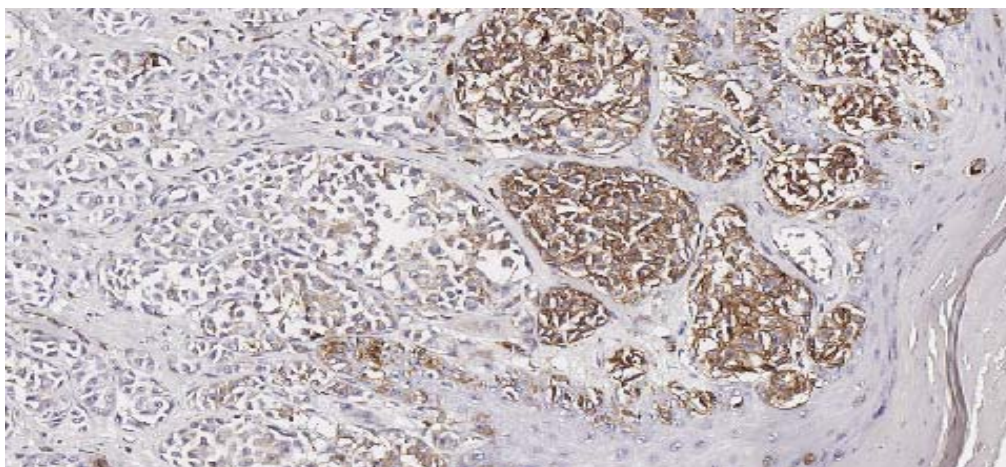
Ние проведохме имунохистохимично изследване с анти-VEGF-антитяло с цел установяване на експресията в туморните клетки, съдовите ендотелни клетки и клетките на околните за тумора тъкани. При наличие на позитивна реакция, тя се наблюдава предимно в туморните гнезда и в ендотелните клетки на младите новосформирани тънкостенни капилляри(фиг. № 13). Най-висок процент от лезиите дават отрицателна реакция (56%, n=28). При тях сформирането на нови съдове е слабо изразено или липсва.



Фиг. № 13. Имунохистохимична експресия на анти-VEGF антитяло под формата на умерено и силно пигментирани гранули в клетките от туморните гнезда, около и сред гнездата, и в стените на млади тънкостенни съдове (VEGF x 250)

4.2.15. Анти-CD117 антитяло

При проведеното от нас имунохистохимично изследване с анти-CD117 антитяло установихме, че в повечето от изследваните лезии липсва негова експресия (36%, n=18) или се проявява като слабо позитивна реакция (32%, n=16). Експресия на антитялото се наблюдава предимно в клетките от туморните гнезда около епидермиса и близките дермални участъци, което се съчетава най-често със суперфициален клинично-морфологичен субтип на изследваните кожни меланоми. Позитивна реакция обикновено липсва при туморните гнезда в дълбоката хиподерма и в метастатичните меланоми. На фиг. № 13 е представен препарат от акрален меланом с експресия на маркера в туморните гнезда от близките на епидермиса дермални участъци.



Фиг. № 13. Имунохистохимична експресия на анти-CD117 антитяло (CD117 x 60)

4.3. Имунохистохимично тестване на злокачествените меланоцитни лезии.

4.3.1. Прилагане на маркер за диференциация анти-НМВ-45 антитяло

При проведеното изследване ние установихме, че анти-НМВ-45 антитяло дава умерено или силно позитивна реакция при 98% от пациентите, което верифицира меланоцитния произход на лезиите и потвърждава високата диагностична стойност на антитялото.

Проучване в областта на диференцирането на меланом от грануларно клетъчен тумор доказва, че експресията на анти-НМВ-45 антитяло е 100% специфична при диагнозата на меланом (В. С. Gleason и А. F. Nascimento, 2007). Други автори доказват, че тройната имунохистохимична комбинация p16-Ki-67-НМВ45 е изключително ефективна не само при диагностиката на меланом, но и за диференцирането на меланом от невус (А. Uguen и съавт., 2015). Сензитивността на анти-НМВ45 антитяло е до 97% и се понижава при метастатичните лезии, но специфичността на антитялото при разпознаване на меланоцитни от немеланоцитни тумори е 91-100% (D. Weinstein и съавт., 2014). Анти-НМВ-45 антитяло поддържа високи нива на експресия в меланомните клетки както в епидермиса, така и в дермата (L. Roncati и съавт., 2017). При отстраняване на малигнени меланоцитни лезии по микрографския хирургичен метод на Mohs, имунохистохимично изследване с анти-НМВ-45 антитяло се прилага рутинно по време на същественото за този метод гефрирно изследване. Така се постига прецизна интерпретация на резултата и оценка на резекционните линии, като възможните морфологични затруднения в диагностиката поради вида на фиксация се свеждат до минимум (G. M. Menaker и съавт., 2001; R. Danialan и съавт., 2012).

4.3.2. Прилагане на маркери за прогресия анти-CD117 антитяло и анти-VEGF антитяло и съпоставката им с вертикалния туморен растеж според скалата на Breslow

При проведеното изследване съпоставихме експресията на маркерите анти-CD117 антитяло и анти-VEGF антитяло с дебелината на лезията в милиметри по скалата на Breslow с цел установяване на зависимост, която да обуслови прогресията на лезията. Известно от литературата е, че дебелината на лезията в милиметри по Breslow е най-точният прогностичен фактор за прогресия на заболяването и оцеляването на пациентите (С. М. Valch и съавт., 2009; J. F. Thompson и съавт., 2011).

Табл. № 7. Зависимост на изследваните антитела спрямо дебелината на лезията по Breslow

		анти-BRAF антитяло	Breslow	анти- CD117 антитяло	анти- VEGF антитяло
Breslow	Pearson correlation	0,433	1	-0,059	-0,199
	процент	0,005		0,719	0,219
	брой	40	40	40	40

Резултатите от извършения от нас корелационен анализ не показаха връзка между експресията на анти-CD117 антитяло и анти-VEGF антитяло с дебелината на лезията (табл. № 7). Интерес тук представлява фактът, че и двата маркера са определяни в литературата като индикатори за прогресия не заради количеството оцветени туморни гнезда, а заради локализацията на гнездата, в които се наблюдава експресия.

L. Piloni и съавт. (2011) диференцират суперфициалния меланом с дермална инвазия от диспластичен или интрадермален невус именно чрез приложението на анти-CD117 антитяло. Тези автори използват същото антитяло и при диференцирането на първичния от метастатичния меланом.

При проучване на P. M. Guerriere-Kovach и съавт. (2004) 37 метастазирани в кожата меланоми с интраепидермална съставка са сравнени с 43 хистологично сходни първични меланоми чрез приложение на общ имунохистохимичен панел. CD 117 се експресира в 65% от метастатичните меланоми с източник окуларен меланом, липсва експресия при всички останали видове метастази, а при първичните лезии се наблюдава сходна реактивност. Тази тенденция в имунореактивността би могла да улесни диференцирането на меланом с множество първични огнища от меланомните кожни метастази (P. M. Guerriere-Kovach и съавт., 2004).

Според A. Potti и съавт. (2003), проучили 202 случая с кожен меланом, CD 117 се експресира предимно в суперфициалните меланоми. Този екип открива и правопрпорционална връзка между експресията на антитялото и наличието на втора първична малигнена меланоцитна лезия (A. Potti и съавт., 2003).

При изследването на 22 меланоцитни лезии Y. Isabel Zhu и J. E. Fitzpatrick (2006) откриват, че експресията на CD117 е силна при първични меланоми и невуси на Spitz и липсва при метастатичните лезии. Това би могло да послужи при диференцирането на метастатични от първични меланоцитни лезии у пациенти с предходна анамнеза за меланом и настояща нова дермална лезия.

L. Roncati и съавт. (2017) откриват отслабване на експресията на CD117, Ki67, Cyclin D1 и E Cadherin по време на миграционната фаза на меланоцитите от епидермиса към дермата или при прехода радиален-вертикален растеж на лезията.

Според данните от цитираната литература, както и тези от настоящото проучване, би могло да се има предвид приложението в практиката на анти-CD 117 антитяло като маркер за прогресия на меланом и за диференциация на първична от метастатична лезия.

Анти-VEGF антитяло е другият маркер за прогресия, който приложихме с тази цел и в настоящото изследване.

A. Konstantina и съавт. (2011) изследват ролята на VEGF, PlGF (плацентарен растежен фактор) и HIF1-a (хипоксия индуциращ фактор 1-a) при меланомната ангиогенеза, както и експресията на тези маркери в диспластичните невуси, които са потенциални меланомни прекурсори. VEGF е

експресиран в 82 от 95 (86.31%) меланома и в 21 от 28 (75%) диспластични невуси. Установената хипоксия чрез експресията на HIF1-а играе основна роля в меланомната прогресия; тя активира секрецията на VEGF, която от своя страна индуцира ангиогенеза и процеса на метастазиране.

Според О. Simonetti и съавт. (2002) силна цитоплазмена експресия на VEGF се наблюдава в 77% от изследваните от тях първични инвазивни меланоми, докато при *in situ* меланомите експресия има само в 25% от лезиите. Те не установяват експресия в невуси и Spitz невуси и предлагат употреба на VEGF не само като маркер за прогресия, но и за диференциация на меланом от други малигнени лезии (О. Simonetti и съавт., 2002).

В насочено проучване на Р. Rajabi и съавт. (2012) пряко се изследва корелацията между експресията на анти-VEGF антитяло и дебелината на лезията по Breslow. Те установяват силна правопрпорционална зависимост между тези параметри.

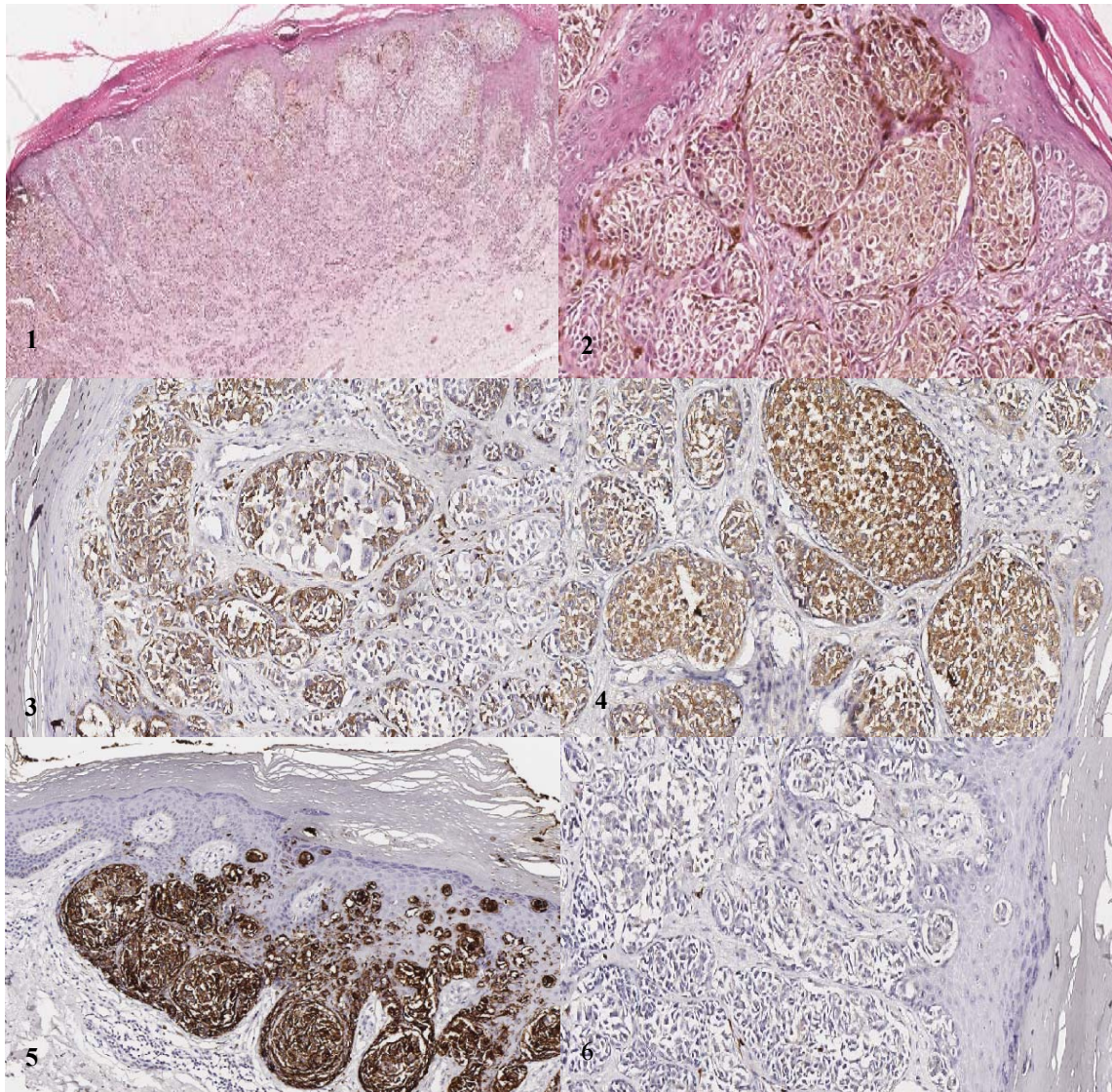
В нашето изследване такъв тип зависимост не се открива, но е желателно по-задълбочено проучване с по-голям брой пациенти с цел допълване на данните за полза на приложение на анти-VEGF антитяло в диагностиката на меланом.

4.3.3. Определяне връзката между експресията на анти-BRAF антитяло и туморната дебелина, измерена според скалата на Breslow, с оглед използване на антитялото при диагностиката на кожния меланом

Резултатите от нашето изследване сочат, че е налице положителна корелация между анти-BRAF антитяло и дебелината на лезията по Breslow ($r=0,433$, $p=0,005$). Високата експресия на анти-BRAF антитяло корелира с III-та и IV-та степен на вертикален туморен растеж по Breslow (табл. № 7, фиг. №15).

При изследване на L. Schirosi и съавт. (2016) относно сензитивността и специфичността на Ventana® VE1 антитяло, при шест от пациентите с мутация са изследвани лезии преди и след прогресията на заболяването. Имунохистохимичната експресия на антитялото преди прогресията на заболяването е по-малко интензивна и по-хетерогенна сравнена с тази след прогресията, което насочва за по-задълбочено проучване на антитялото като маркер за прогресия и прогноза. Според тези автори по-слабата експресия на антитялото е независим предиктор за слабо агресивно поведение на лезията във времето на поставяне на диагнозата.

В настоящото изследване интензивността на експресията на анти-BRAF антитяло е най-висока при лезиите с най-голяма дебелина според скалата на Breslow, което корелира с прогноза за прогресия (С. М. Balch и съавт., 2009; J. F. Thompson и съавт., 2011). Нашите данни съвпадат с тези на L. Schirosi и съавт. (2016). Този факт сугестира за по-задълбочено проучване на анти-BRAF антитяло с цел потенциалното му приложение в диагностиката и прогнозирането на поведението на меланоцитните лезии.



Фиг. № 15. Пациентка на 61 г. с първичен акрален меланом (1-ХЕ x 10; 2- ХЕ x 60; 3-CD117 x 60; 4-BRAF x 60; 5-HMB-45 x 60; 6-VEGF x 60)

4.4. Определяне връзката между възрастта и клиничко-морфологичния субтип спрямо молекулярно изследвания BRAF-мутационен статус

По отношение на молекулярното изследване за BRAF V600 мутации спрямо отделните възрастови категории, резултатите от кростабулационното разпределение на данните в нашето проучване показаха, че по-голямата част от пациентите са с установена мутация (70,4%), като най-много са в групата пациенти на възраст 61-70 години (29.6%). Резултатите от корелационния анализ показаха обратна асоциация между възрастта и мутационния статус на пациентите ($r=-0,495$; $p=0,009$). Интерес в нашето изследване представлява процентното съотношение между болните с и без мутация в рамките на един и същи възрастов интервал. Във възрастовия интервал 40-50 годишна възраст всички изследвани пациенти са с мутация. Наблюдава се спад на процента

пациенти с мутация във всяка следваща декада, като според нашето проучване съответно във възраст над 81г. възможността да се открие мутация се равнява на 0%. От казаното дотук, както и на база статистическия анализ на данните, бихме могли да направим заключението, че с напредване на възрастта вероятността да се открие мутация значително намалява.

Известен в литературата е фактът, че по-висок процент BRAF V600 мутации обикновено се установяват при пациенти в по-млада възраст. Т. Eigentler и съавт. (2016) изследват 1170 пациента с меланом, 44% от които са с установен вариант на BRAF мутация. Техните данни показват, че възрастта на пациентите и клинично-морфологичният субтип на меланома са основни предиктивни променливи в изследването, като средната възраст на пациентите с мутация е 51,73±13,94 г.

При проучване на 80 пациента с кожен меланом в Япония N. Yamazaki и съавт. (2015) отбелязват, че мутации се срещат при повече от 60% от пациентите на възраст под 60 години.

Нашите данни съвпадат с тенденциите от изнесената литература мутация да се открива най-често при по-млади пациенти (фиг.№16).



Фиг. № 16. Кростабулационна зависимост между BRAF-молекулярно изследване и възрастовия диапазон на пациентите

По-нататъшният анализ на резултатите в настоящото изследване показва, че голяма вероятност да се отчете BRAF V600 мутация има при пациентите с нодуларен субтип на меланома, както и при метастатичните меланоми с неясна първична локализация.

Т. Eigentler и съавт. (2016) отбелязват, че най-често мутация имат суперфициалните меланоми, следвани от нодуларните и тези с неясна първична локализация, докато N. Yamazaki и съавт. (2015) посочват детекция на BRAF V600 мутация при 64,7% от изследваните от тях суперфициални меланоми, при 50,0% от lentigo maligna меланомите и при 20,0% от нодуларните меланоми. Поради факта, че съществува изискване за молекулярно изследване да бъдат изпращани меланоми в стадий след pT3b, най-често в практиката се изследват метастатични и прогресирали нодуларни лезии. Такива са и установените

клинико-морфологични субтипове в настоящото проучване, поради което нашите данни не съвпадат напълно с тези на останалите автори, но частично се припокриват със световните тенденции.

4.5. Съпоставка на експресията на анти-BRAF антитяло с резултатите от молекулярното изследване за BRAF V600 мутация

Резултатите от кростабулационното съпоставяне на имунохистохимичната експресия на анти-BRAF антитяло с BRAF молекулярно изследване показват, че при 70,4% от пациентите (n=19) се наблюдава силно позитивна реакция съчетана с наличие на BRAF V600E мутация. Стойностите при анализа „хи-квадрат“ потвърждават статистическата значимост на разликите между наличие или отсъствие на BRAF V600E мутация и силно позитивната реакция ($\chi^2=22,44$; $p=0,0001$) на анти-BRAF антитяло, а резултатите от корелационния анализ показват силна взаимовръзка между експресията на анти-BRAF антитяло и BRAF V600E установена мутация ($r=0,862$; $p=0,0001$). Данните са представени в табл. № 8.

Ние извършихме сравнение с няколко сходни проучвания. В едно от тях L. Schirosi и съавт. (2016) изследват материали от 64 метастатични меланом. Високият процент на съвпадение на молекулярната с имунохистохимична реакция при тях мотивира авторите да препоръчат имунохистохимията като бърз метод за скрининг и оценка на BRAF статус у пациентите с меланом. Препоръчват също въвеждане на метода като рутинна диагностична процедура.

М. А. Anwar и съавт. (2016) провеждат мета-анализ на 287 статии от световната литература. Данните им утвърждават, че имунохистохимичната детекция на BRAF V600E мутация при меланом е високо сензитивна и специфична, както и напълно съпоставима с генетичните методи за определяне на мутационен статус. К. Dvorak и съавт. (2014) извършват мащабно проучване с цел сравнение на имунохистохимична и молекулярна детекция на BRAF V600E при различни заболявания и обобщават предимствата на имунохистохимичния метод по следния начин:

- висока аналитична чувствителност поради възможност за оценка на всяка клетка
- висока информативност на препаратите при стриктно спазени инструкции за изготвянето им
- лекота и последователност в интерпретацията на резултата
- широка достъпност на имунохистохимичното изследване
- бърз отговор
- нисък процент на грешки при изследването
- значително по-ниска цена (К. Dvorak и съавт., 2014).

Нашите резултати съвпадат с изнесените в световната литература. Ние установяваме висок процент на съвпадение между позитивното молекулярно и аналогичното му имунохистохимично изследване, когато има умерено и силно позитивна експресия на антитялото. Налице е възможност за предикция на

молекулярен чрез имунохистохимичен резултат и взаимозаменяемост на двете изследвания, особено наложителна при нисък процент туморни клетки в хистологичния препарат (К. Dvorak и съавт., 2014).

Поради невъзможност за молекулярна детекция на всички меланоми в настоящото проучване, ние извършихме имунохистохимично изследване с анти-BRAF антитяло на всички лезии, което освен с експериментална цел, е приложимо и клинично и е от значителна полза за изследваните пациенти.

Онкогенните мутации в BRAF-гена са считани за driver мутации при множество неоплазми у човека. Идентифицирани са повече от 70 различни мутации в този ген. Най-често срещана е V600E, в която тиминът е заместен с аденин в нуклеотид 1799, а това води до заместване на валинът с глутамат в позиция 600 на аминокиселинната последователност (Н. Davies и съавт., 2002). Неоплазмите с този тип мутация са изключително агресивни и се свързват с лоша прогноза. Поради това тестването и достъпността му са витални за пациентите с цел лечение с терапевтичен таргет (J. Ziai и P. Hui, 2012).

Табл. № 8. Кростабулационно съпоставяне експресията на анти-BRAF антитяло с BRAF молекулярно изследване

Анти-BRAF антитяло		BRAF		
		Не се установи мутация	Установена мутация	общо
(безцветно) - отрицателна реакция	брой	2	0	2
	%	7,4%	0,0%	7,4%
(светло жълто до кафяво) - слабо позитивна реакция	брой	4	0	4
	%	14,8%	0,0%	14,8%
(кафяво) - умерено позитивна реакция	брой	1	0	1
	%	3,7%	0,0%	3,7%
(тъмно кафяво) - силно позитивна реакция	брой	1	19	20
	%	3,7%	70,4%	74,1%
Общо	брой	8	19	27
	%	29,6%	70,4%	100,0%

4.6. Определяне влиянието на параметрите ТИЛ, некрози, улцерации и брой митози спрямо експресията на анти-BRAF антитяло

4.6.1. Определяне корелацията на ТИЛ с експресията на анти-BRAF антитяло

Въпреки че корелационният анализ не показва статистически достоверна зависимост между двата показателя ($r=-0,94$; $p=0,565$), резултатите ясно очертават, че увеличаването на количеството на ТИЛ води до по-силна експресия на анти-BRAF антитяло. Високо количество на ТИЛ и силно изразена експресия на анти-BRAF антитяло има сред 52,5% ($n=21$), а умерено количество ТИЛ със силна анти-BRAF антитяло експресия - сред 12,5% от

пациентите (n=5). Липсата на ТИЛ се съчетава със слаба анти-BRAF антитяло експресия (5%, n=2).

В известната литература ТИЛ са свързани с унищожаването на туморни клетки, а наличието на високо количество лимфоцити в тумора е добър прогностичен белег (А. Spatz и съавт., 2007). От друга страна, наличието на BRAF-V600 мутация е индикация за повишена агресивност на тумора и се свързва с увеличен риск от развитие на далечни метастази (D. Meckbach и съавт., 2014). Логиката тук сочи връзката между двата показателя да е обратно пропорционална, но J. D. Shields и съавт. (2010) излагат интересни данни на базата на дългогодишни проучвания. Според тях туморите манипулират имунитета в своя полза. При експериментално проучване с мишки тези автори откриват, че меланомните клетки имат способността да реорганизируют стромата си като структура, наподобяваща лимфоиден тъкан, и да секретират цитокин CCL21, който провокира лимфоидната неогенеза, за да създаде туморна среда с имунен толеранс. Именно чрез промяната в туморната среда CCL21-секретиращите тумори трансформират имунния отговор от имуногенен в толерогенен, като създават условие за туморна прогресия. По тази причина наличието на обилен лимфоиден инфилтрат в меланома не винаги е индикация за антитуморен имунитет и може да се свърже с туморна „стратегия“ за прогресия на заболяването (J. D. Shields и съавт., 2010).

W. Q. Li и съавт. (2006) изследват 275 пациента с колоректален карцином. От тях само 23 пациента са позитивни на BRAF V600 мутация, но морфологично в тези лезии се установява високо количество на ТИЛ. Тези автори достигат до извода, че BRAF V600 мутация се среща 5-10 пъти по-често в тумори инфилтрирани от лимфоцити. Данните от настоящото проучване съвпадат с по-горе описаните относно потенциалната агресивност на изследваните меланоми поради високия процент на лезиите с висока анти-BRAF антитяло експресия, създават предпоставка за логично обяснение на правопрпорционалната зависимост между високото количество на ТИЛ и експресията на анти-BRAF антитяло, като същевременно повдигат въпроса за това, дали именно клетките на позитивните лезии не са тези, които секретират цитокин CCL21.

4.6.2. Определяне корелацията на показателя некрози с експресията на анти-BRAF антитяло

Според проведеното проучване некрози се наблюдават у 31 от изследваните лезии, а некротични полета най-често се установяват при силно позитивна реакция на анти-BRAF антитяло (n=24), което е повече от 70% от случаите с морфологично установени некрози.

Туморната некроза и апоптоза са сигнификантни маркери за меланомна прогресия (I. M. Wachmann и съавт., 2008). Туморната некроза се асоциира с по-голяма туморна дебелина, висок митотичен индекс, наличие на улцерация и намалена преживяемост у пациентите (R. G. Ladstein и съавт., 2012). Двата изследвани показателя са предиктори за прогресия и неблагоприятна прогноза, поради което откритата в настоящото изследване правопрпорционална

зависимост между тях напълно съвпада с тенденциите в литературата.

4.6.3. Изследване корелацията на показател улцерации с експресията на анти-BRAF-антитяло

Нашите резултати сочат, че се очертава тенденция улцерация да има най-често при висока експресия на анти-BRAF-антитяло.

В проучване на D. Meckbach и съавт. (2014) са изследвани 437 пациента с кожен меланом. BRAF V600 мутация чрез метода *Sanger* секвениране се установява при 36,7% от пациентите без прогресия в заболяването и при 51,7% - при тези с далечни метастази. В малък процент от тези случаи в лезиите се наблюдават улцерации. Обект на изследването е прогностичното значение на тези и редица други параметри спрямо общата преживяемост на пациентите, поради което авторите не търсят предиктивност на двата посочени параметри един към друг. Те обаче потвърждават, че наличието на BRAF-V600 мутация е индикация за увеличен риск от развитие на далечни метастази (D. Meckbach и съавт., 2014).

Известен също е фактът, че наличието на улцерация в кожния меланом е неблагоприятен прогностичен фактор. Петгодишната преживяемост при тези пациенти се редуцира от 80% на 55% за първи стадий на меланом и от 53% на 12% за втори стадий (С. М. Valch и съавт., 1980). Наличието на двата показателя заедно не е добър прогностичен признак при кожен меланом. Това логично води до взаимното им потенциране, което вероятно е белег за още по-бърза прогресия на заболяването.

4.6.4. Изследване на зависимостта между показател брой митози и експресията на анти-BRAF антитяло

При изследване на зависимостта между показателите брой митози и експресията на анти-BRAF антитяло ясно се очертава тенденция високата митотична активност да обуславя висока експресия на антитялото.

Повечето автори приемат, че първичният кожен меланом с висок митотичен индекс се свързва с агресивни хистологични белези и атипична клинична презентация. Този тип неоплазма най-често се развива изключително бързо и се среща при пациенти в напреднала възраст (S. Shen и съавт., 2014). В споменатото по-рано проучване на D. Meckbach и съавт. (2014) от 169 пациенти с установена BRAF V600 мутация, 93 от лезиите са с висок митотичен индекс. Те достигат до извода, че детекцията на дори една митоза в рамките на 1 mm² се асоциира с BRAF мутация в цялата кохорта на проучените от тях 437 пациента ($p=0,038$). В настоящото изследване се наблюдава тенденция за правопрпорционална зависимост между тези два показателя, свързани с прогресията на заболяването, като изложените данни са в унисон с изнесените в литературата.

4.6.5. Определяне съвкупното влияние на показателите ТИЛ, некрози, улцерации и брой митози спрямо анти-BRAF антитяло

Ние тествахме мултифакторен регресионен модел, в който си поставихме за цел да определим, какво влияние оказват показателите ТИЛ, некрози, улцерации и брой митози едновременно спрямо експресията на анти- BRAF антитяло. Установихме, че моделът е със силна предиктивна стойност ($R^2=0,502$; $p=0,034$). Съвкупното влияние на тези фактори оказва силно въздействие върху експозицията на анти-BRAF антитяло. Според основните тенденции от показаните кростабулации при високо количество на ТИЛ, наличие на некроза, улцерация и умерена до висока митотична активност има умерена до висока експресия на анти-BRAF антитяло (табл. № 9).

Табл. № 9. Регресионен мултифакторен модел - влияние на ТИЛ, некрози, улцерации и брой митози спрямо експресията на анти-BRAF антитяло

	Нестандартизирани коефициенти		Стандартизирани коефициенти	<i>t</i>	Ниво на значимост
	B	Станд. грешка	Beta		
константа	2,272	0,722		3,147	0,003
некрози	-0,458	0,466	-0,186	-,0982	0,333
улцерации	-0,719	0,407	-0,291	-1,766	0,086
брой митози	0,531	0,396	0,233	1,342	0,188
ТИЛ	-0,728	0,335	-0,324	-2,174	0,037

При вече споменатото изследване на T. Eigentler и съавт. (2016) при 1170 пациента се сравняват основни меланомни характеристики, а именно възраст, пол, локализация, клиничко-морфологичен субтип, мутационен статус, туморна дебелина и наличие на улцерации. Изброените са поместени в три варианта на предиктивен модел (binary logistic regression, classification and regression trees, random forest) с цел прогнозиране на BRAF статус. Резултатите им сочат, че техните статистически модели не са достоверни и не са достатъчно акуратни относно предикцията на BRAF мутация (T. Eigentler и съавт., 2016).

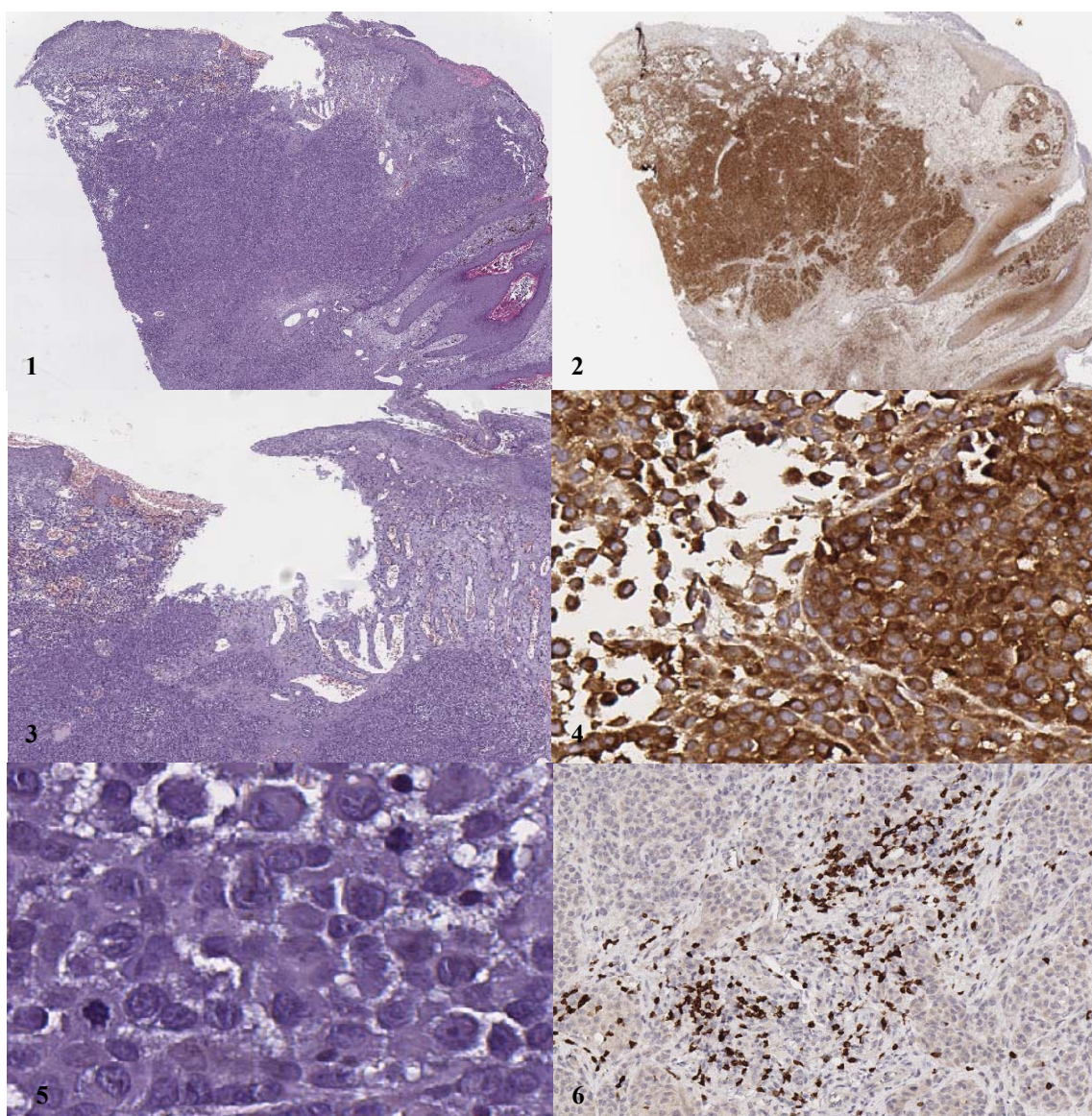
D. Meckbach и съавт. (2014) проучват 437 пациента с кожен меланом и разширяват броя на изследваните меланомни характеристики (пол, възраст, наличие на улцерация, туморна дебелина, клиничко-морфологичен субтип, ниво по Clark, брой митози и BRAF мутационен статус). В тяхното проучване са установени предимно корелационни зависимости за предикция на BRAF мутационен статус и не е търсен насочено мултифакторен регресионен модел. Очертава се тенденция, сходна на тази в настоящото проучване, като при тях основен предиктивен фактор в един потенциален мултифакторен регресионен модел вероятно би била високата митотична активност. Според тези резултати тя е един от основните предиктори за BRAF V600E мутация (D. Meckbach и съавт., 2014).

M. B. Aksenenko и съавт. (2015) изследват 80 пациента с кожен меланом и 10 пациента с невуси. Според извършените от тях корелации изследваните

хистопатологични прогностични маркери (дебелина на лезията по Breslow, митотичен индекс, наличие на улцерация и ТИЛ) не показват вариабилност и предиктивност спрямо BRAF V600E мутационен статус.

Понастоящем търсенето на предиктивен модел спрямо BRAF мутационен статус се очертава като водеща тенденция в хистопатологичните дерматологични проучвания с оглед достъпно приложение и бърз резултат.

Въпреки че предоставеният модел (фиг. № 17), който изработихме в изложеното изследване, е статистически достоверен и спазва доказани кростабулационни зависимости и тенденции, той задължително трябва да подлежи на по-разширено проучване, предимно спрямо броя на изследваните пациенти. При многократно доказване той безспорно ще бъде приложим и полезен в патологоанатомичната и клиничната практика.



Фиг. № 17. Пациентка на 40 г. с нодуларен меланом в стадий pT4b.1 – хистологичен срез (HEx10); 2 – имунохистохимично изследване (BRAFX10); 3 – дълбока улцерация с кръвоизливи (HEx20); 4 – некротични полета (BRAFX200); 5 – поле с висока митотична активност (HEx350); 6 – ТИЛ (++) (CD3x100).

4.7. Определяне влиянието на параметрите клиничко-морфологичен субтип, пол и възраст спрямо експресията на анти-BRAF антитяло

4.7.1. Определяне на корелационна зависимост между параметрите клиничко-морфологичен субтип и експресията на анти-BRAF антитяло

Нашето проучване сочи, че при изследваната корелационна зависимост голям процент от пациентите са със силно-позитивна реакция на анти-BRAF антитяло (70%). От тях с нодуларен меланом са 32%, с метастатичен меланом с неясна първична локализация са 14% и със суперфициално-разпространяващ се меланом са 12%. Установихме статистически значима корелация между показателите клиничко-морфологичен субтип и експресията на анти-BRAF антитяло ($r=-0,327$; $p=0,021$), като колкото по-интензивно позитивна е реакцията, толкова е по-висока вероятността клиничко-морфологичният субтип да е нодуларен.

D. Meskbach и съавт. (2014) проучват 437 пациента с кожен меланом поради факта, че прогностичното влияние на BRAF-V600 мутациите при пациенти в I/II стадий на заболяването все още не е подробно анализирано. Те установяват, че възрастта на пациента, клиничко-морфологичния субтип и митотичния индекс в лезиите са силно асоциирани с позитивния BRAF мутационен статус.

M. Pracht и съавт. (2015) изследват 98 пациента с кожен меланом, като прилагат корелационни модели спрямо всички варианти на изследвани мутации при този тип неоплазма. Техните данни сочат за сигнификантна корелация между наличието на BRAF мутация и меланом, който не е възникнал в резултат на хронична слънчева увреда, както и между BRAF мутация и суперфициално-разпространяващия се меланом ($P < 0.05$). Според резултатите им нодуларният клиничко-морфологичен субтип е свързан по-често с NRAS мутация (M. Pracht и съавт., 2015).

Нашите данни частично съвпадат с тези на посочените автори, като следват световните тенденции и предполагат разширяване на проучването.

4.7.2. Съпоставяне на пациентите според пола им и експресията на анти-BRAF антитяло в лезиите

Пациентите, които ние изследвахме, са почти по равно разпределени по пол, а вземаната предвид най-често силно позитивна реакция е сравнително еднакво изявена и при двата пола.

D. Meskbach и съавт. (2014) изследват 169 пациента с кожен меланом и BRAF мутация, от които 90 са мъже, а 79 са жени. При изследваните от T. Eigentler и съавт. (2016) 1170 пациента, 514 са позитивни на BRAF мутация, от които 298 са мъже и 216 са жени. В настоящото проучване също не се установява съществена зависимост между BRAF мутационния статус и пола на пациентите, но все пак съществува слаба тенденция за силна експресия на анти-BRAF антитяло при мъжете, която се потвърждава и от останалите автори

(М. В. Aksenenko и съавт., 2015).

4.7.3. Съпоставяне на показателя възраст спрямо експресията на анти-BRAF-антитяло

Според нашето изследване съществува добре очертана тенденция за висока експресия на анти-BRAF антитяло във възрастовите интервали предимно от 61 г. до 70 г. и от 71г. до 80г., тъй като броят изследвани пациенти на тази възраст е най-голям. Еквивалентно на молекулярното тестване интерес тук отново представлява възрастовата група от 40г. до 50г. В нея 70% от изследваните пациенти са със силно позитивна реакция. Тенденцията при имунохистохимичното тестване мутация да се среща по-често в туморните проби от по-млади пациенти съвпада с данните в световната литература спрямо молекулярната детекция. Това потвърждава още веднъж достоверността на изследване мутационен статус чрез приложение на анти-BRAF-антитяло (N. Yamazaki и съавт., 2015; T. Eigentler и съавт., 2016).

4.7.4. Тестване на мултифакторен регресионен модел на показателите пол, възраст и клинично-морфологичен субтип спрямо експресията на анти-BRAF антитяло

При тестване на мултифакторен регресионен модел, в който се търси да се определи, какво влияние оказват параметрите клинично-морфологичен субтип на лезията, пол и възраст на пациентите спрямо експресията на анти-BRAF антитяло, се установява, че моделът е със силна предиктивна стойност ($R^2=0,393$; $p=0,050$), т.е. едновременно влияние на тези фактори оказва силно въздействие върху експозицията на анти-BRAF антитяло. Нашите резултати ясно очертават тенденцията при пациенти от мъжки пол в по-млада възраст с нодуларен вариант на меланом да има висока вероятност за умерена до висока експресия на анти-BRAF антитяло. Резултатите показват, че сред факторите най-силно влияние има клинично-морфологичният субтип в модела ($b=-0,358$; $p=0,013$) (табл. № 10).

Табл. № 10. Мултифакторен регресионен модел на показателите пол, възраст и клинично-морфологичен субтип спрямо експресията на анти-BRAF антитяло

	Нестандартизирани коефициенти		Стандартизирани коефициенти	<i>t</i>	Ниво на значимост
	B	Станд. грешка	Beta		
Константа	4,142	0,785		5,273	0,0001
пол	-0,241	0,244	-0,134	-0,988	0,329
възраст	-0,012	0,010	-0,175	-1,270	0,211
субтип	-0,211	0,081	-0,358	-2,599	0,013

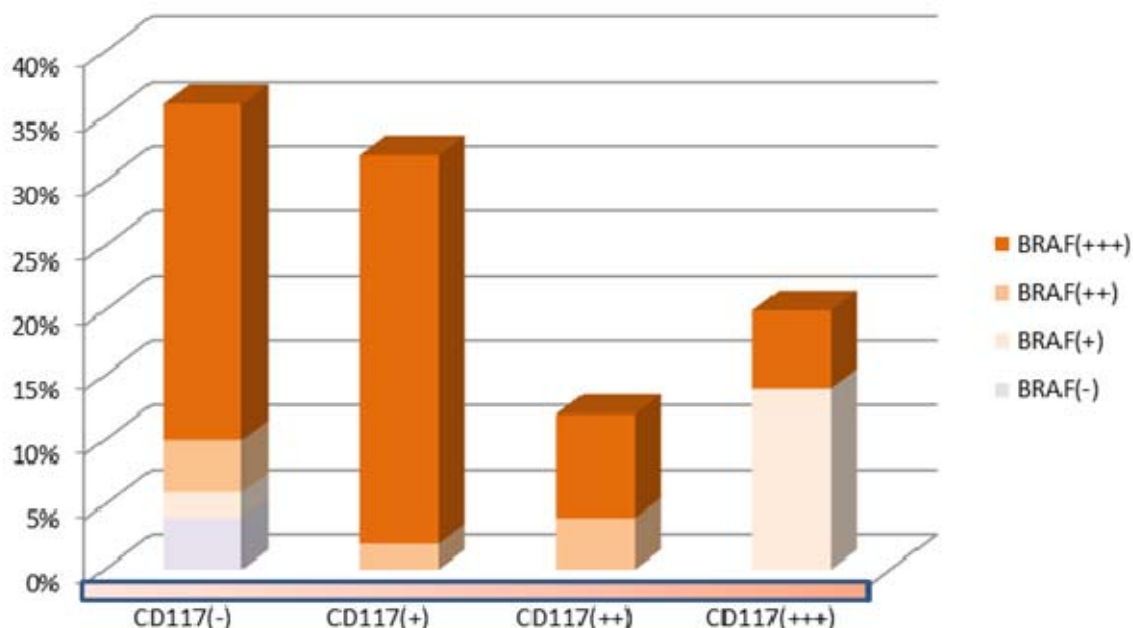
При сходни проучвания със значително по-голям брой пациенти такъв тип зависимост не се открива, тъй като авторите не прилагат модел на

мултифакторна регресионна зависимост (D. Meskbach и съавт., 2014; M. V. Aksenenko и съавт., 2015; T. Eigentler и съавт., 2016).

Предложеният вариант би бил изключително полезен в клиничната практика, но е необходимо затвърждаването му при проучване на база от по-голям брой пациенти.

4.8. Определяне на корелационна зависимост между експресията на анти-BRAF антитяло и експресията на анти-CD 117 антитяло

Анализът на взаимовръзки между анти-BRAF антитяло с анти-CD 117 антитяло показва значима обратна корелационна връзка ($r=-0,311$; $p=0,028$). Резултатът потвърждава наблюденията, че експресията на анти-BRAF антитяло се увеличава с намаляване на експресията на анти-CD 117 антитяло. От друга страна, при силно позитивна реакция на анти-CD 117 антитяло има малък процент на пациенти със силно позитивна реакция на анти-BRAF антитяло (6%), докато при отрицателна и слаба експресия на анти-CD 117 антитяло се наблюдава голям брой пациенти с силно позитивна реакция на анти-BRAF антитяло (56%)(фиг.№ 18).



Фиг. № 18. Зависимост между експресията на анти-BRAF антитяло и експресията на анти-CD117 антитяло

Под формата на имунохистохимичен маркер анти-CD 117 антитяло се прилага в диагностиката на меланома като вариант за детекция прогресията на заболяването. Характерна за това антитяло е високата експресия в туморните гнезда на меланоцитните лезии, разположени в граничните участъци епидермис-дерма. Също така за анти-CD 117 антитяло е характерна по-често липсващата експресия в метастатичните меланоцитни лезии с произход от кожен меланом (L. Piloni и съавт., 2011). Анти-BRAF антитяло от своя страна е

аналог на молекулярното тестване и се експресира най-силно и хомогенно при лезии с налична BRAF V600E мутация, като е предиктор за лоша прогноза (L. Schirosi и съавт., 2016).

Обратно пропорционалната зависимост между двата маркера би могла да се тълкува като неблагоприятна прогноза във варианта силна експресия на анти-BRAF антитяло съчетана със слаба експресия на анти-CD 117 антитяло или като добра прогноза при висока експресия на анти-CD 117 антитяло съчетана със слаба експресия на анти-BRAF антитяло. Оттук логично следва, че според настоящото проучване анти-CD 117 антитяло, приложен самостоятелно, е маркер за благоприятен изход от заболяването при проява на умерена до висока имунохистохимична експресия. Тези данни подлежат на по-задълбочено проучване, тъй като вероятно са достоверни при кожните, но не и при окуларните и мукозните меланоми.

Анти-CD 117 антитяло често се експресира в метастатични лезии от окуларен меланом (P. M. Guerriere-Kovach и съавт., 2004). R. A. Salcedo-Hernandez и съавт. (2017) изследват вулварни мукозни меланоми, известни като втори по честота след меланомите с епидермален произход. Екипът провежда клиникопатологично проучване и преглед на литературата с цел идентифициране на нови предиктори спрямо прогнозата и преживяемостта от меланом на вулвата. Избран маркер за имунохистохимично изследване е анти-CD-117 антитяло (с-KIT). 50% от изследваните лезии имат силна експресия на анти-CD 117 антитяло в туморните клетки. Следователно експресията на с-KIT е прогностичен предиктор за смърт при вулварен меланом, особено когато тя се съчетава със сателитоза и дебелина по Breslow >4 mm (R. A. Salcedo-Hernandez и съавт., 2017).

Вариант на извод от откритата статистически значима корелация може да бъде също и това, че имунохистохимичната реакция с маркер анти-CD 117 антитяло би могла да служи като предиктор за мутационен статус относно BRAF V600E мутация. В достъпната литература не е изследвана такъв тип взаимовръзка, която би била полезна и лесно приложима в рутинната практика.

Логично следва и предположението, че тъй като при определяне молекулярния статус на пациентите BRAF V600E мутация и с-KIT мутация са взаимно изключващи се, то имунохистохимичната реакция с маркер анти-CD 117 антитяло би могла да послужи като аналогична на молекулярно тестване за с-KIT мутация.

с-KIT и BRAF мутациите играят важна роля в патогенезата на меланома. Честотата на тези мутации е различна при различните клиничко-морфологични субтипове с разнообразна първична локализация на лезията. Предвид тези данни, S. Ni и съавт. (2012) анализират с-KIT и BRAF мутационен статус при 40 пациента с аноректален меланом чрез ДНК секвениране на материал от парафинови блокчета. Установените с-KIT мутации са в екзони 9, 11, 13 и 17. Успоредно с това се проследява и експресията на маркер анти-CD117 антитяло, приложен имунохистохимично. с-KIT мутация е налична при седем от четридесетте обследвани пациенти с аноректален меланом, докато умерена до

висока експресия на анти-CD117 антитяло има при 16 от пациентите. Трима от тези 16 пациенти са с установена с-KIT мутация. BRAF мутация се наблюдава само при двама от пациентите. Тези резултати сочат, че киназните инхибитори могат да бъдат прилагани в лечението на аноректален меланом при наличие на с-KIT мутация. Резултатите също сочат обаче, че не се открива връзка между с-KIT мутационен статус и имунохистохимичната експресия на анти-CD117 антитяло (S. Ni и съавт., 2012).

L. Alessandrini и съавт. (2013) изследват 85 пигментни тумори с произход от конюнктивата - доброкачествени и злокачествени, чрез имунохистохимична реакция с анти-CD117 антитяло. Те оценяват както интензитета, така и мястото на експресия, с цел категоризиране на туморите в цифров порядък, който статистически да бъде съпоставен с редица клинични и патологични показатели. На 15 от туморите с туморно съдържание в материала >50% е извършен и молекулярен анализ за с-KIT мутация. Установява се умерена до висока експресия на анти-CD 117 антитяло в почти 50% от меланомите и в 24% от невусите, но с-KIT мутация не се открива в нито една от лезиите. Те достигат до два основни извода:

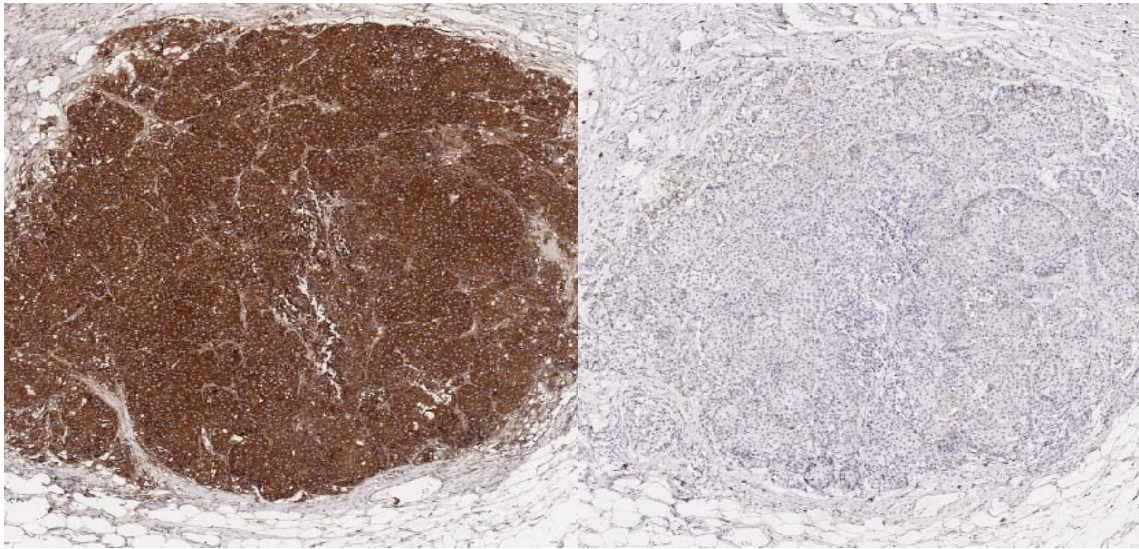
- въпреки високият процент на тумори, които експресират анти-CD117 антитяло, този маркер не е надежден за предикция на мутационен статус;
- KIT-активиращите мутации трябва да бъдат считани за редки при меланоцитните тумори с произход от конюнктивата (L. Alessandrini и съавт., 2013).

B. Dai и съавт. (2013) анализират анти-CD117 антитяло експресията едновременно с с-KIT мутационния статус при 39 пациента с първичен акрален меланом, както и в 26 от метастатичните лезии на същите тумори. Приоритет тук е изследването на връзките между имунохистохимичната реакция, мутационния статус и клинично-патологичните характеристики на туморите. Цитоплазмена и мембранна експресия на анти-CD117 антитяло се наблюдава в 17 от 39-те първични акрални меланоми (43.6%), като експресията е значително по-висока в лезиите без метастази ($P = 0.024$). с-KIT мутации са установени в 9 от 39-те случая с първичен акрален меланом (23.1%). Не се установява корелация между експресията на анти-CD117 антитяло и с-KIT мутационния статус на пациентите. с-KIT мутации се установяват при 6 от случаите на тези от акралните меланоми, които имат метастази. Следователно с-KIT мутациите са чести при акралните меланоми, поради което тези лезии задължително трябва да подлежат на молекулярно тестване. Но според тези данни мутационният статус на пациентите може да се промени от момента на изследване на първичния тумор до момента на изследване на метастаза от този тумор, което би имало съществено клинично значение (B. Dai и съавт., 2013).

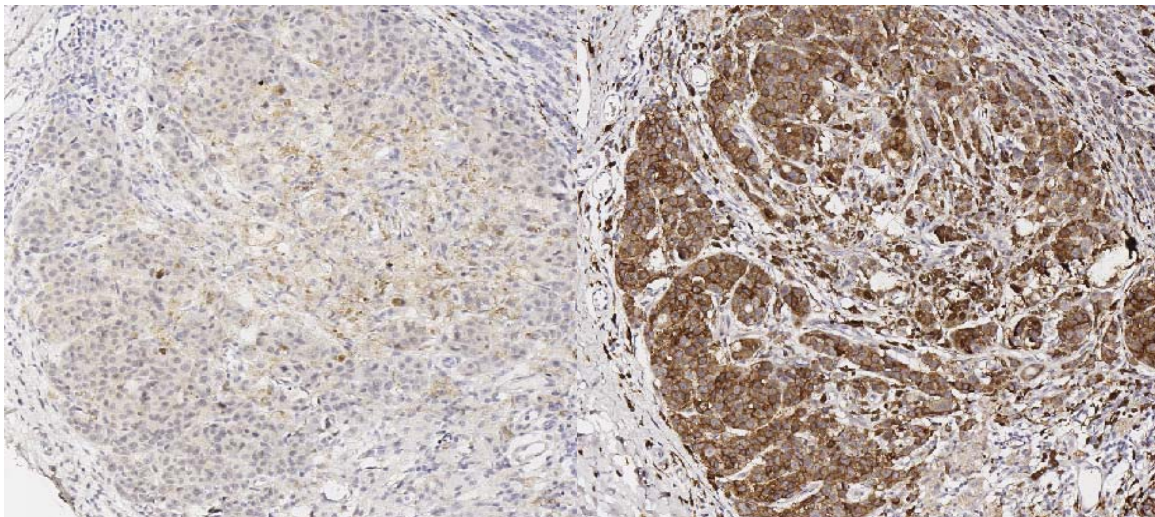
С оглед на цитираната литература, данните от нашата работа безспорно будят интерес и изискват по-нататъшно разширено проучване с цел утвърждаването на анти-CD117 антитяло като маркер при диагностиката на кожния меланом, при прогнозата на заболяването и за изследване на възможността за приложението му като потенциален предиктор на резултат от

молекулярно тестване за BRAF V600E мутация и с-KIT мутация.

На фиг. № 19 и фиг. № 20 са показани срезове от имунохистохимични препарати на двама от пациентите, репрезентативни спрямо откритите кростабулационни взаимоотношения. Показан е един и същи локус от туморите с двата възможни варианта на противоположна експресия.



Фиг. № 19. Пациентка на 51 г. с рецидивиращ нодуларен меланом (BRAF x 20, CD117 x 20)



Фиг. № 20. Пациентка на 31 г. с нодуларен меланом (BRAF x 60, CD117 x 60)

4.9. Съставяне на примерен диагностичен алгоритъм според изследваните показатели и проучената литература.

Въз основа на получените резултати от настоящото изследване и данните от проучената литература, ние съставихме следния списък от задължителни за определяне показатели при кожен меланом:

I. Клинично изследване – необходими данни:

- Възраст на пациента
- Пол на пациента
- Цвят на кожата – расова принадлежност
- Предшестващи пигментни лезии и брой
- Локализация по тялото на суспектната лезия
- Фамилна обремененост
- Периодичност и продължителност в излагането на ултравиолетово облъчване

II. Морфологично изследване:

- Макроскопска оценка
 - а) размер на кожния резектат, заедно с лезията (три измерения);
 - б) рамер на лезията (две измерения);
 - в) цвят (еднороден, нееднороден);
 - г) граници на лезията (равномерни, неравни);
 - д) възел (наличие, липса);
 - е) резекционни линии (странични, в дълбочина).
- Хистологична оценка – критерии степенувани по важност:
 - а) дебелина на инфилтрация според скалата на Breslow;
 - б) наличие или липса на улцерация;
 - в) брой на митозите в полето с най-висока митотична активност;
 - г) фаза на растеж - хоризонтален (радиален) – интраепидермално, *in situ* с микроинвазия и вертикален;
 - д) хирургични резекционни линии- в периферията и в дълбочина;
 - ж) степен на регресия (обратно развитие);
 - з) дълбочина на инфилтриране според скалата на Clark;
 - и) клинично-морфологичен субтип
 - й) наличие или липса на лимфни или кръвоносни съдове;
 - к) наличие или липса на сателитни микроскопски лезии
 - л) клетъчен тип;
 - м) наличие и интензивност на лимфоцитната инфилтрация (тумор инфилтриращи лимфоцити – ТИЛ
 - н) наличие или липса на периневрална инвазия;

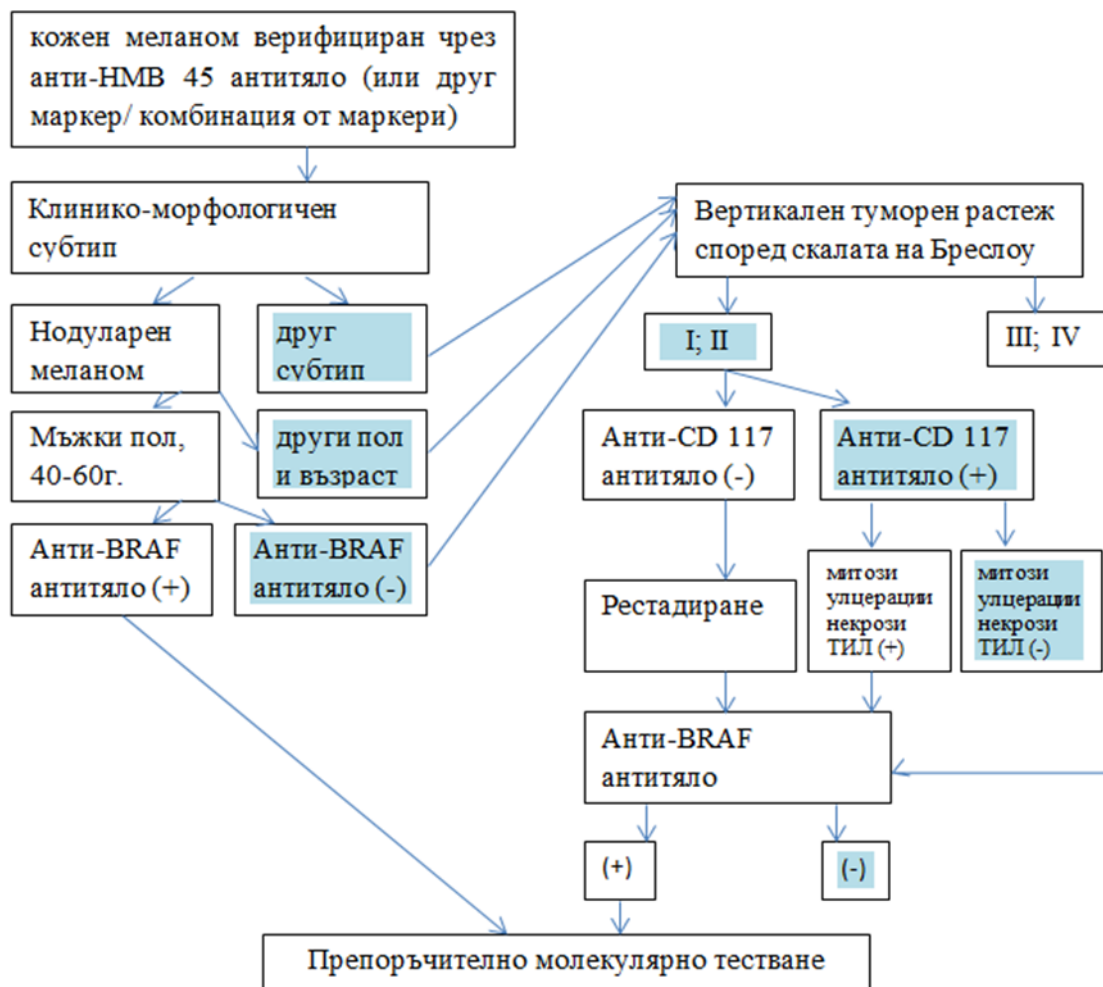
- Имунохистохимична оценка чрез приложение на маркери за:
 а) диференциация: HMB 45, protein S100, Melan A, MITF, тирозиназа

б) прогресия и прогноза: Ki 67, CD 117, CDKN2A, VEGF, p53, p16, BRAF, β -катенин, E-кадхерин, N-кадхерин

III. Стадиране на тумора според pTNM (AJCC 2009)

IV. Определяне на процентно туморно съдържание в тъканните проби и при възможност прилагане на молекулярно тестване за най-честите мутации при меланом с валидирана или в процес на разработване прицелна терапия.

На базата на тези показатели и предимно според проведеното от нас изследване предлагаме диагностичен алгоритъм за доуточняване поведението при кожен меланом, който е представен схематично чрез фиг. № 21:



Фиг. №21. Примерен диагностично-прогностичен алгоритъм при кожен меланом – със син цвят са отбелязани полетата на вариантите с вероятност за благоприятна прогноза.

Чрез горепосочената фигура представяме примерен подход на действие след верифицирането на злокачествената меланоцитна лезия.

С оглед клиничните данни на пациента, може да се приложи един от изследваните от нас регресионни модели. Ако пациентът е от мъжки пол, във възрастов интервал 40-60г. и кожният меланом е нодуларен клинично-морфологичен субтип, то лезията задължително подлежи на имунохистохимично тестване с анти-BRAF антитяло. При висока експресия на маркера, на пациента бива препоръчано молекулярно тестване.

Пациентите, които не попадат в тази група, подлежат на разпределение в две други категории спрямо морфологично определения вертикален туморен растеж по Breslow, а именно с дълбочина на лезията до 1,5см и с дълбочина на лезията над 1,5см.

Лезиите с дълбочина до 1,5см е нужно да бъдат тествани с анти-CD 117 антитяло. При липса на експресия на антитялото има вероятност тези тумори да са сателитни или метастатични, поради което те подлежат на рестадиране и ако попаднат в по-неблагоприятната категория (Breslow III,IV), трябва да бъдат тествани с анти-BRAF антитяло.

При умерена и висока експресия на анти-CD 117 антитяло, на лезиите в категория с дълбочина до 1,5см е препоръчително да бъде приложен другият изследван в настоящото проучване мултифакторен регресионен модел – наблюдава се съвкупната предиктивност на показателите брой митози, наличие на улцерация и некроза, и количество ТИЛ към експресията на анти-BRAF антитяло. Ако лезията е с висока митотична активност, наличие на улцерация, наличие на некрози и високо съдържание на ТИЛ, то тя подлежи на тестване с анти-BRAF антитяло и евентуално молекулярно изследване в зависимост от имунохистохимичния резултат. В случай че показателите не отговарят на тези критерии, не се препоръчва имунохистохимично тестване с анти-BRAF антитяло, а за лезията се счита, че е с благоприятна прогноза.

Лезиите с измерен вертикален туморен растеж по Breslow III-та и IV-та степен (над 1,5см) според нашето проучване са с агресивен ход и често се съчетават с BRAF мутация. Тези тумори подлежат задължително на тестване с анти-BRAF антитяло и последващо молекулярно тестване според имунохистохимичния резултат.

Според нашето проучване предиктивността на анти-BRAF антитяло спрямо туморната биология на кожния меланом е съществена. Поради този факт вариантът за предшестващо молекулярната детекция имунохистохимично тестване е финансово изгодна и ефективна опция, особено при лезии с ниско туморно съдържание в тъканните проби, които не подлежат на молекулярно изследване.

Нужно е да се подчертае, че този алгоритъм е примерен и изведен на база единствено настоящото изследване, като той остава отворен за допълнения след провеждане на по-задълбочени и с по-голям брой пациенти проучвания.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понастоящем диагностицирането и прогнозирането поведението на кожния меланом не е лека задача. Поставянето на точна диагноза е затруднено при препарати изработени единствено по стандартния хистологичен метод, а имунохистохимичните панели не винаги потвърждават първоначалното предположение. Отговорността на патолога е завишена и от наложилото се в практиката молекулярно тестване на лезиите.

В нашето проучване изследваме и обсъждаме само част от недостатъчно разискваните проблеми, свързани с диагностиката на меланом. От резултатите ни интерес будят:

- приложението на анти-CD 117 антитяло в диагностиката и предикцията поведението на кожен меланом;
- приложението на анти-VEGF антитяло в диагностиката и предикцията поведението на кожен меланом;
- статистически значимите мултифакторни регресионни модели, предвиждащи поведението на меланомите;
- взаимозаменяемостта на молекулярна детекция за BRAF V600E мутация и приложението на маркер анти-BRAF антитяло, което създава възможност за определяне на мутационния статус в имунохистохимична лаборатория;
- изведеният диагностичен алгоритъм.

Нашите резултати могат да послужат за основа на едно ново бъдещо проучване с оглед потвърждаване на откритите зависимости и търсене на нови такива.

6. ИЗВОДИ

Въз основа на настоящото проучване бихме могли да направим следните **изводи**:

1. Съществува статистически значимо покачване на смъртността от кожен меланом във Варненска област през периода от 2007 г. до 2016 г. и такава тенденция относно заболяемостта от тумора.

2. Най-често диагностицираният клинично-морфологичен субтип на кожен меланом е нодуларният меланом.

3. Установената експресия на анти-VEGF антитяло и анти-CD117 антитяло в изследваните случаи с кожен меланом доказва участието им в развитието на туморния процес и дава основание за по-нататъшни проучвания върху ролята им като прогностичен фактор.

4. Установява се статистически значима корелация между експресията на анти-BRAF антитяло и дебелината на лезията по Breslow: по-голямата дебелина корелира с по-високата експресия на анти-BRAF антитяло.

5. Потвърждава се възможността за взаимозаменяемост на молекулярното профилиране с имунохистохимично изследване за BRAF V600E мутация.

6. Установява се обратно пропорционална зависимост между възрастта и BRAF V600E мутационен статус на пациента.

7. Съществува статистически значима корелация между мутацията BRAF V600E и клинично-морфологичния субтип на кожния меланом.

8. Установяват се тенденциозни зависимости на показателите ТИЛ, некрози, улцерации и брой митози към експресията на анти-BRAF антитяло поотделно, както и статистическа значимост при тяхното съвкупно влияние върху експресията на същия маркер, изразена чрез мултифакторен регресионен модел, приложим в клиничната практика.

9. Установява се статистически значим мултифакторен регресионен модел на параметрите клинично-морфологичен субтип, пол и възраст на пациентите спрямо експресията на анти-BRAF антитяло, който може да бъде приложен в клиничната практика.

10. Изработен е алгоритъм, който може да послужи като база за подобряване диагностичната ефективност на патологоанатомичните звена.

7. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приносите на настоящия дисертационен труд може да се характеризират като оригинални, потвърдителни и научно-приложни.

Оригинални приноси:

1. За първи път у нас е проведена съпоставка между молекулярно и имунохистохимично изследване за BRAF V600E мутация.
2. За първи път у нас е проведено проучване с разширяване на панела за имунохистохимично изследване на кожния меланом чрез прилагане на маркерите анти-VEGF антитяло, анти-CD117 антитяло и анти-BRAF антитяло.
3. За първи път у нас се изследва мултифакторен регресионен модел на параметрите митози, улцерации, некрози и ТИЛ спрямо експресията на анти-BRAF антитяло.
4. За първи път у нас се изследва мултифакторен регресионен модел на параметрите субтип, пол и възраст спрямо експресията на анти-BRAF антитяло.
5. Проведеното проучване на заболяемостта и смъртността от кожен меланом във Варненска област за периода 2007-2016 г. е първото по рода си.

Потвърдителни приноси:

1. Доказано е, че най-често срещаният клинично-морфологичен субтип на кожния меланом е нодуларният.
2. Потвърдена е предиктивната роля на възрастта на пациента и субтипа на кожния меланом спрямо BRAF мутационния му статус.
3. Анти-НМВ45 антитяло е един от най-ефективните имунохистохимични маркери в диагностиката на кожния меланом.
4. Потвърждава се корелационната зависимост на морфологичните параметри некрози, митози и улцерации.

Научно-приложни приноси:

1. Създадена е възможност за клинично приложение на имунохистохимичното изследване за детекция на BRAF V600E мутация.
2. Създадена е възможност за клинично приложение на тестваните мултифакторни регресионни модели.
3. Изработен е примерен алгоритъм за диагностициране на кожен меланом.

8. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в научни списания

1. **Кобакова, И.,** М. Георгиева, Е. Кънчев. Морфологични особености на кожен меланом. *Известия на Съюза на учените-Варна, Серия медицина и екология*, **20**, 2015, № 1, 49-52.
2. **Кобакова, И.** Социална епидемиология на кожния меланом. *Варненски медицински форум*, **6**, 2017, № 1, 69-74.
3. **Кобакова, И.** Институционализация на изследванията върху кожния меланом на главата и шията. *MEDICAL*, 2017, № 5 (41), 68-71.
4. **Кобакова, И.,** Е. Кънчев, Д. Камбурова. Изследване на BRAF-мутации при болни с кожен меланом. *MEDINFO*, 2017, № 6, 54-56.

Участия в научни форуми

1. **Кобакова, И.,** М. Георгиева. Молекулярна патология в диагнозата и патогенезата на малигнения меланом. В: Съвременни аспекти в морфологичната диагностика на карцином на гърдата, карцином на стомаха и други локализации. Национална конференция по патология. Трявна, 16-18.IV.2015 г. Резюмета на докладите, с. 16.
2. **Кобакова, И.,** Н. Янулова, Е. Кънчев, С. Вичева. Изследване връзката на някои патоморфологични прогностични и предиктивни параметри с BRAF мутационен статус при кожен меланом. В: XII. Национален конгрес по патология. Велико Търново, 11-13.V.2017 г. Резюмета, 74-75.
3. **Кобакова, И.,** Е. Софтова, Д. Томов. Изследване на BRAF статус при болни с кожен меланом. В: VII. Национална конференция с международно участие на тема: „Новости в онкологията“. Варна, 26-28.V.2017 г. Резюмета на докладите. *Онкология*, **45**, 2017, Suppl., с. 22.

9. БЛАГОДАРНОСТИ

1. Благодаря на научния си ръководител доц. д-р Екатерина Софтова-Златарова, д.м. за търпението ѝ, за куража и увереността, които ми вдъхна. За мен беше огромна привилегия да работя с толкова опитен специалист и стойностен човек като нея.
2. Благодаря на родителите си, на съпруга си и най-вече на прекрасните ми деца за проявеното търпение и дадената подкрепа.
3. Благодаря на Ръководството на УМБАЛ „Св. Марина“-Варна и МУ-„Проф. д-р Параскев Стоянов“, Варна за предоставената възможност за работа в избраната от мен област.
4. Благодаря за оказаната помощ на доц. д-р Петър Генов, д.м., проф. д-р Ангел Ангелов, д.м.н., проф. д-р Георги Чернев, д.м.н., доц. д-р Мария Цанева, д.м., и доц. д-р Илко Бакърджиев, д.м. в качеството им на консултант и научно жури.
5. Благодаря на доц. д-р Людмила Ангелова, д.м. за съдействието при изготвянето на глава „Молекулярна патология на кожен меланом“.
6. Благодаря на доц. Димитър Томов и Силвия Павлова за помощта при обработката на статистическите данни и подредбата на глава „Литература“.
7. Благодаря на д-р Емил Кънчев и д-р Снежинка Вичева, както и на целия колектив на Клиниката по патоанатомия към СБАЛОЗ „д-р Марко Марков“-Варна за помощта в селекцията на материали и изготвяне на всички срезове за имунохистохимичното тестване на лезиите, както и за предоставяне на клинична информация за пациентите.
8. Благодаря на лаборантите Мая Василева и Велина Кеновска към УМБАЛ „Св. Марина“-Варна съответно за помощта при селекцията на молекулярно тествани пациенти и изготвянето на имунохистохимични препарати.
9. Благодаря на доц. Милка Георгиева, д.м.б. за извършеното молекулярно тестване на 27 от пациентите в проучването.

10. Благодаря на всички колеги от Клиниката по Обща и Клинична патология, УМБАЛ „Св. Марина“-Варна за оказаната помощ и подкрепа, в частност на д-р Надежда Стефанова за административните насоки и на д-р Лиляна Петкова за напътствията при селекцията на антитела за имунохистохимично тестване.

11. Благодаря на доц. д-р Зорница Златарова, д.м.н. за насоките при изграждане структурата на дисертационния труд.

12. Благодаря на доц. д-р Иван Щерев, д.м. за съдействието при изработването на материалите по дисертационния труд, както и за предоставената клинична информация за пациентите.