



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
*Катедра Обща и клинична патология,
съдебна медицина и деонтология*

АПОПТОЗА И НЕКРОПТОЗА ПРИ БАЗОЦЕЛУЛАРЕН И СПИНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ НА КОЖА

д-р Пламен Петров Василев

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „**доктор**“
Научна специалност: „Патологоанатомия и цитопатология“

Научен ръководител:
проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.

Варна, 2025

Дисертационният труд съдържа 139 стандартни страници и е онагледен с 66 таблици и 35 фигури. Литературната справка включва 355 литературни източника, от които 6 на кирилица и 349 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на катедрен съвет на Катедрата по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна на 17.09.2025 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 08.12.2025 г, понеделник, пред научно жури в състав:

Външни членове:

Проф. д-р Юлиан Ананиев, д.м.

Доц. д-р Силвия Генова, д.м.

Доц. д-р Екатерина Софтова-Златарова, д.м.

Вътрешни членове:

Проф. д-р Илко Бакърджиев, д.м.

Доц. д-р Мартина Стоева, д.м.

Резервен външен член:

Проф. д-р Добринка Радойнова, д.м.

Резервен вътрешен член:

Доц. д-р Калин Калчев, д.м.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	10
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	18
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
VI. ИЗВОДИ	87
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	89
VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	91

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

БЦК – базоцелуларен карцином

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

КРК – колоректален карцином

ПКК – плоскоклетъчен карцином

СЗО – световна здравна организация

На латиница:

AIF - Apoptosis-inducing factor

COX-2 - Cyclooxygenase-2

GSDME – Gasdermin-E

IDH - Isocitrate Dehydrogenase gene

MLKL - Mixed lineage kinase domain like pseudokinase

PIN - Prostatic Intraepithelial Neoplasia

PSA - Prostate-Specific Antigen

RIPK - Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase

TILs - Tumor-infiltrating lymphocytes

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Злокачествените заболявания на кожата са хетерогенна група неоплазми, които се срещат навсякъде по света, но с различна честота. Те се категоризират основно в две групи: меланомни и немеланомни злокачествени неоплазми. Тези две групи представляват повече от 90% от всички малигнени тумори на кожата. Карциномите на кожата с произход от епидермиса са два основни хистологични типа: базоцелуларен (БЦК) и спиноцелуларен или плоскоклетъчен карцином (ПКК), които заедно представляват 99% от злокачествените епителни тумори. БЦК се среща по-често, расте бавно и има предимно локален инвазивен растеж, чиято клинична проява е разрушаване на съседните тъкани, особено при локализация в областта на лицето, главата и шията. Води началото си от базалните кератиноцити и метастазира рядко (Madan V et al., 2010).

ПКК се среща по-често сред европейската, отколкото при другите раси. По-чест е при мъже, отколкото при жени и честотата му значително нараства с възрастта. Води началото си от епидермалните кератиноцити (Combalia AA et al., 2020).

Роля за възникване на БЦК и ПКК имат редица мутации на протоонкогени и тумор супресорни гени. През последните години, наред с добре познатите тумор-асоциирани гени, бяха открити редица нови тумор-супресорни гени, на мутациите на които се отдава голямо значение в туморната генеза (Pickering C et al., 2014). Неконтролируемото активиране на някои сигнални пътища може да доведе до развитие на БЦК (Saran A et al., 2010).

Терапевтичното поведение при БЦК и ПКК включва

оперативна интервенция, таргетна лъче- и химиотерапия (Firnhaber JM, 2012). Последните две терапии индуцират апоптоза, естествен процес на програмирана клетъчна смърт, чрез който се осъществява елиминиране на туморните клетки. В някои случаи индуцирането на апоптозата не е възможно поради вродена или придобита резистентност на определени тумори към проапоптотични стимули. В тези случаи терапевтичният подход изисква търсене на алтернативни пътища за унищожаване на туморните клетки, резистентни на апоптоза посредством инициация на други сигнални пътища на клетъчна смърт, различни от апоптоза.

Известни са различни видове смърт на клетките: апоптоза, некроза, автофагия, некроптоза, случайна клетъчна смърт, аноиксис, автоза, ентотична клетъчна смърт, фероптоза, имуногенна клетъчна смърт, лизизомно-зависима клетъчна смърт, митохондриално предизвикана некроза, митотична катастрофа, партанатос, пироптоза и регулирана клетъчна смърт (Galluzzi L et al., 2018). Апоптозата може да се осъществи по т. нар. „външен“ и „вътрешен“ сигнален път (You Yu et al., 2017, Xu X et al., 2019). Най-манифестният белег, както на ранните, така и на късните етапи на апоптозата е активирането на цистеинови протеази (каспази). Детайлното изследване на експресията на каспаза-3 в клетките и тъканите, посредством имунохистохимично оцветяване е важен метод за изясняване механизмите на апоптозата, индуцирана от различни апоптотични сигнали (Mazumder S et al., 2008).

Рецепторите и лигандите, които активират външния сигнален път на апоптозата могат да инициират и некроптоза (Galluzzi L et al., 2018). Иницирането на

некроптоза е свързано с експресия на рецептор серин-треонин киназа 3 (RIPK3) и може да се осъществи независимо от RIPK1. RIPK3 е ключова сигнална молекула по пътя на некроптозата. Този път играе важна роля при различни физиологични и патологични състояния, като елиминиране и унищожаване на туморни клетки (Sun L et al., 2012).

Механизмите и сигналните пътища на различните видове клетъчна смърт могат да бъдат в сложни взаимодействия. Подробното изследване на експресията на Caspase-3 и RIPK3 при пациенти с БЦК и ПКК би допринесло за изясняване на предиктивната роля на протеините, откриване и въвеждане на нови терапевтични подходи.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел

Цел на настоящото изследване е да се проучи имунохистохимичната експресия на маркера за апоптоза Caspase-3 и маркера за некроптоза Receptor-interacting kinase 3 (RIPK3) при пациенти с базоцелуларен и плоскоклетъчен карцином на кожата и да се определи предиктивната им стойност.

Във връзка с поставената цел бяха формулирани следните задачи:

2.2. Задачи

1. Да се проучат клинико-морфологичните характеристики на пациентите с БЦК и ПКК.
2. Да се проучи нивото на имунохистохимична експресия на Caspase-3 в туморна тъкан на БЦК и ПКК.
3. Да се сравни имунохистохимичната експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК и ПКК със съседна нетуморна тъкан.
4. Да се анализира експресията на Caspase-3 във връзка с клинико-морфологични показатели: възраст и пол на пациентите с БЦК и ПКК, TILs, туморна некроза, рискова група, степен на диференциация и локализация на тумора.
5. Да се проучи нивото на имунохистохимична експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК и ПКК.
6. Да се сравни имунохистохимичната експресия на RIPK3 в туморна тъкан на БЦК и ПКК на кожата със съседна нетуморна тъкан.

7. Да се анализира експресия на RIPK3 във връзка с клинико-морфологичните показатели: възраст и пол на пациентите с БЦК и ПКК, TILs, туморна некроза, рискова група, степен на диференциация и локализация на тумора.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология към Медицински университет-Варна и Диагностично-консултативен център „Света Марина“ ЕООД-Варна.

3.2. Пациенти и характеристика на проучваните групи

В настоящото проучване са включени общо 91 пациенти, от които 46 са с БЦК на кожата и 45 с ПКК на кожата за периода от 2015 г до 2021 г. При всички изследвани пациенти е проведено радикално хирургично отстраняване на тумора на кожата и е определено нивото на имунохистохимична експресия на Caspase-3 и RIPK3.

3.3. Рутинни изследвания

От всеки туморен резектат са изследвани средно по два-три материала, включващи туморен паренхим и съседна нетуморна тъкан. Материалите са фиксирани в 10 % неутрален буфериран формалин и след съответната обработка, включени в парафин с точка на топене 52-54°C с цел изготвяне на парафинови блокчета. Срези с дебелина 5 µm са стандартно оцветени с хематоксилин-еозин за оценка на хистологичните промени в тумора и извънтуморната околна тъкан. На изследваните тумори са определени: локализация, хистологичен тип на тумора, TILs (tumor infiltrating lymphocytes), степен на диференциация на тумора, наличие на съдова и периневрална инвазия, площ на некрози и Т-стадий.

3.4. Критерии за категоризиране на всеки параметър

Локализация на тумора. Туморите бяха разпределени според локализацията им на: глава, шия, трункус, крайници, пенис/вулва.

Хистологичен тип на тумора. Диагнозата е поставена чрез прилагане на класификацията на СЗО за немелномните кожни туморни заболявания, съответно ПКК според 8-ма ревизия на TNM класификацията на Американския съвместен комитет по карциноми (AJCC) и Международният съюз за контрол на карциноми (UICC) от 2017 и БЦК класификация от 2010 г.

TNM – стадий. Стадирането на БЦК и ПКК е на базата на СЗО класификацията от 2017 г и ревизираната ѝ версия от 2023 г (Peris K et al. 2023). TNM класификация на ПКК на глава и шия е на базата на СЗО класификацията от 2017 (TNM Classification of Malignant Tumours, Eighth Edition, Brierley J, Gospodarowich MK, Wittekind C, 2017).

Базирайки се на тази класификация бяха определени Т-стадия и степента на туморна диференциация-Г. Степента на туморната диференциация е определена за ПКК, като високо- умерено- и нискодиференциран в зависимост от образуването на кератин от туморните клетки. При БЦК е определен риска от прогресия: с нисък риск: нодуларен, суперфициален, пигментен, инфундибулокистичен, БЦК с аднексиална диференциация и фиброепителен и с висок риск: базосквамозен карцином, склерозиращ, инфилтриращ, БЦК със саркоматоидна диференциация, микронодуларен, съгласно Европейското ръководство за диагностика и лечение на БЦК от 2023 г.

Тумор инфилтриращи лимфоцити. TILs (tumor infiltrating lymphocytes) бяха оценени според критериите на Klintrup K et al. (2005) Туморите се оценяват чрез използване на 4 - степенна скала в зоните с най-голяма инфилтрация на TILs. Липсват TILs – 0;

- Слабо изразени - леко изразено и неравномерно увеличение на TILs – 1;

- Умерено изразени - умерено изразен лентовиден инфилтрат от TILs с частична деструкция на острови от туморни клетки - 2;

- Изразени – изобилие от TILs, разположени на гнезда с често разрушаване на острови от туморни клетки - 3.

Съдова инвазия (LVI) и перинеурална инвазия (PNI). Съдовата и перинеурална инвазия беше оценена в две категории: липва – 0 и присъства - 1.

Площ на некрози. Степента на некроза в туморната тъкан беше определена полуколичествено, прилагайки четиристепенна скала:

- Липсва - 0
- Под 10 % - 1
- Между 10-30 % - 2
- Над 30 % - 3

3.5. Специфични методи на изследване

3.5.1. Имунохистохимични методи. Използван бе индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024.

3.5.1.1 Антитела, реактиви за оцветяване и използвани работни концентрации представени в таблица 4 и 5.

Използвани са следните антитела:

Anti-pro Caspase-3 antibody (E61), кат. № ab32150, Rabbit Recombinant Monoclonal Caspase-3 antibody, моноклонално заешко антитяло, като маркер за апоптоза (ABCAM's RabMab technology) (таблица 4).

Anti-RIPK3 antibody кат. № ab62344, поликлонално заешко антитяло, маркер за некроптоза (ABCAM's RabMab technology) (таблица 4).

Негативни контроли:

При негативните контроли, вместо първичното антитяло, срези от използваните парафинови блокчета се инкубират с нормален неимуни серум.

За позитивни контроли е използвана тъкан от бял дроб - за Anti-Caspase-3 и тъкан от черен дроб за Anti-RIPK3.

Таблица 4. Използвани реагенти

Антитяло	Разреждане	Позитивна контрола	Маркер	Фирма производител
Anti-pro Caspase-3 antibody (E61) (ab32150) Rabbit Recombinant Monoclonal Caspase-3 antibody	1:500	Бял дроб	Апоптоза	ABCAM's RabMab technology
Anti-RIPK3 antibody (ab62344) Rabbit Polyclonal RIP3 antibody	1:300	Черен дроб	Некроптоза	ABCAM's RabMab technology

Таблица 5. Системи за оцветяване и други реактиви

HRP - DAB system	Оригинална оцветяваща система	Dako
Mayer's hematoxylin	Counterstaining	Dako

3.5.1.2. Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимично изследване.

- От биопсичните материали (фиксиран в неутрален формалин и включени в парафинови блокчета) се изработиха срези с дебелина 5µm и се поставиха върху силанизирани стъкла.

- Депарафинирането се извърши в низходяща редица от алкохоли, както следва: етанол 100 % - 3 мин, етанол 90 % - 3 мин, етанол 80 % - 3 мин, етанол 70 % - 3 мин, ксилол 3 x 10 мин. Срезите се измива с течаща вода и се поставиха в дестилирана вода.

- Антигенно разкриване: разкриването на антигените се извърши с предварително загрят до 65°C En Vision FLEX Target Retrieval Solution (работен разтвор) в PT Link контейнер, като срезите се инкубираха за 20 мин. при температура 97°C и pH=9. След охлаждане пробите се промива на стайна температура с измиващ буфер FLEXWash Buffer (20x) за 1-5 минути.

3.5.1.3. Имунохистохимичен протокол.

Срезите се оцветиха по FLEX протокол, като на всички стъпки се използва влажна камера.

Инкубация с пероксидазен блокиращ разтвор (3% H₂O₂) за 5 минути на стайна температура, за блокиране на ендогенната пероксидазна активност. Изплакване с измиващ буфер за 5 мин.

- Инкубация с първичното антитяло Anti-pro Caspase3 antibody (E61) (ab32150) и Anti-RIPK3 antibody (ab62344), с разреждане за 20 мин. на стайна температура.

- Промиване с измиващ буфер за 2 x 5 мин. на стайна температура.

- Инкубация с маркиран полимер HRP за 20 мин. на стайна температура.

- Промиване с измиващ буфер за 3 x 5 мин. на стайна температура.

- Инкубация на срезове с хромоген DAB пероксидазен разтвор за 2 x 5 мин. при непрекъснато микроскопиране.

- Промиване с буфер за 2 мин.

- Изплакване с дестилирана вода за 2 мин.

- Контраоцветяване с Mayer's hematoxylin за 5 мин.

- Изплакване на пробите с дестилирана вода за 5 мин.

- Дехидриране в обратен възходящ ред етанол 70%, етанол 80%, етанол 90%, етанол 100% със същата продължителност както при депарафинирането.

- Поставяне в монтираща среда.

3.5.1.4. Метод на отчитане на експресията на Caspase-3 и RIPK3.

Оценката на имунохистохимичната експресия на Caspase-3/RIPK3 е извършена, като са изследвани 10 полета на най-голямо увеличение (x400) за всеки отделен случай. Имунохистохимичната експресия на всяко антитяло бе оценена полуколичествено, чрез използване на H - score (histo - score) върху тъканните срези. За всяка клетка в различни полета бе определена цитоплазмената, съответно ядрената интензивност (0, 1+, 2 + или 3+). Процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет бе пресметнат, като накрая H-

score бе изчислен посредством следната формула (Ishibasshi H et al., 2003):

- $\{1x (\% \text{ клетки с } 1+) + 2x (\% \text{ клетки с } 2+) + 3x (\% \text{ клетки с } 3+)\}$, в диапазон от 0 до 300.
- H - score се използва и за оценка на ядрената експресия на Caspase-3 и RIPK3. Резултатът се оцени по формулата: $\{1x (\% \text{ ядра с } 1+) + 2x (\% \text{ ядра с } 2+) + 3x (\% \text{ ядра с } 3+)\}$, в диапазон от 0 до 300.

3.6. Статистически методи

Използваните статистически методи са съобразени с поставените задачи, изследваните клинико-морфологични показатели и отчитането на получените резултати.

3.6.1. Дескриптивен статистически анализ

Използва се за представяне честотата на разпределение на анализирания показател по групи, на средните стойности и стандартните отклонения и 95% доверителен интервал (CL) на изменение на средните стойности за променливите величини и експресия на антителата.

3.6.2. Тест на Стюdent (t-критерий) за две независими извадки

За анализиране на статистически значима разлика между средните стойности на измерените количествени и качествени показатели (размер в см, интензивност на експресия и др.) при сравняване на две групи.

3.6.3. Дисперсионен анализ (ANOVA)

Прилага се за оценка на присъствие или липса на влияние на два и повече фактора върху средните стойности на изследваните показатели. Ако нивото на $p < 0,05$ се отхвърля

нулевата хипотеза т.е. факторът влияе върху средните стойности на разглежданата променлива.

3.7. Статистическа обработка на данните

За статистическия анализ на данните е използван специализиран за статистически анализ софтуерен пакет STATISTICA (StatSoft Inc, USA, STATISTICA Manual (Data analysis software system), Version 13.0, 2022). Графиките са построени в Microsoft Excel for Windows.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Клинико-морфологични характеристики на пациентите с БЦК и ПКК

На таблица 6 са представени клинико-морфологичните характеристики на изследваните пациенти с БЦК и ПКК.

Таблица 6. Клинико-морфологични характеристики на изследваните пациенти с БЦК и ПКК

Характеристики		Брой (n) пациенти	%
Общ брой изследвани		91	100
1. Пол	Мъже	45	49,5
	Жени	46	50,5
2. Хистологичен тип	Базоцелуларен карцином (БЦК)	46	100
	Нодуларен БЦК	24	52,17
	Суперфициален БЦК	10	21,74
	Фиброепителен БЦК	7	15,22
	Микронодуларен БЦК	5	10,87
	Плоскоклетъчен карцином (ПКК)	45	100
	Конвенционален ПКК	33	73,33
	Верукозен ПКК	5	11,11
	Кератоаканто-ма/високодиференциран ПКК	7	15,56
3. Диференциация	БЦК	46	100
	С нисък риск	34	73,91
	С висок риск	12	26,09
	ПКК	45	100
	G1	30	66,67
	G2	15	33,33
4. Площ некроза	БЦК	46	100
	Липсва /I група/	41	89,13
	Под 10 % /II група/	5	10,87
	ПКК	45	100
	Липсва /I група/	34	75,55
	Под 10 % /II група/	8	17,78
	Между 10-30 % /III група/	3	6,67

Характеристики		Брой (n) пациенти	%
Общ брой изследвани		91	100
5. Тумор инфилтриращи лимфоцити /TILs/	БЦК	46	100
	Липсват	18	39,13
	Слабо изразени	16	34,78
	Умерено изразени	12	26,09
	ПКК	45	100
	Липсват	15	33,33
	Слабо изразени	22	48,89
	Умерено изразени	8	17,78
6. Съдова инвазия (LVI)	БЦК	46	100
	Липсва	46	100
	ПКК	45	100
	Липсва	45	100
7. Т стадий	БЦК	46	100
	T1	46	100
	ПКК	45	100
	T1	43	95,56
	T2	2	4,44
8. Локализация	БЦК	46	100
	Глава	37	80,43
	Трункус	4	8,7
	Крайници	2	4,35
	Гениталии (пенис, вулва)	3	6,52
	ПКК	45	100
	Глава	31	68,89
	Шия	2	4,44
	Трункус	3	6,67
	Крайници	8	17,78
	Гениталии (пенис, вулва)	1	2,22

От анализиранияте 91 пациента, 46 са с БЦК и 45 с ПКК. Средната възраст на болните е $58,3 \pm 14,47$ години. Средната възраст на пациентите с БЦК е $56,5 \pm 13,50$ години, а на пациентите с ПКК е $60,2 \pm 15,32$ години. По пол пациентите се разпределят както следва: 45 (49,5 %) мъже и 46 (50,5 %)

жени. Мъжете с ПКК са 25 (55,6 %) пациента и 20 (44,5 %) са с БЦК. При жените 20 (43,5 %) пациентки са с ПКК, а 26 (56,5 %) са с БЦК.

От проучените 46 пациенти с БЦК, 24 (52,17 %) са с нодуларен субтип (фигура 12), 10 (21,74 %) са със суперфициален субтип (фигура 13), 7 (15,22 %) са от фиброепителен субтип (фигура 14) и 5 (10,87 %) са от микронодуларен субтип (фигура 15). От проучените 45 пациенти с ПКК 33 (73,33 %) са от конвенционален субтип (фигура 16), 5 (11,11 %) с верукозен субтип (фигура 17) и 7 (15,56 %) са с кератоакантома/високодиференциран ПКК (фигура 18). Ние установихме, че БЦК се среща по-често при жените, като съотношението е 1,3:1, а ПКК се среща по-често при мъжете, като съотношението е 1,25:1.

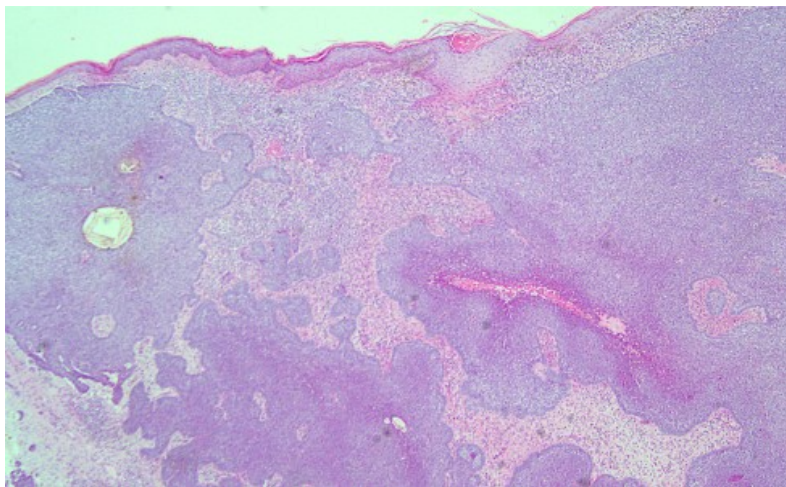
По отношение степента на диференциация, в групата на G1 попадат 30 (66,67 %) пациента с ПКК (фигура 19) и с G2 са 15 (33,33 %) случая. От БЦК 34 (73,91 %) пациента са с нисък риск и 12 (26,09 %) са с висок риск.

При анализа на некрозата се откри, че при 8 (17,78 %) от ПКК и при 5 (10,87 %) от БЦК има некроза до 10 % от площта на тумора (фигура 20 и 21). Некроза между 10 % и 30 % от площта на тумора се установи при 3 (6,67 %) от ПКК.

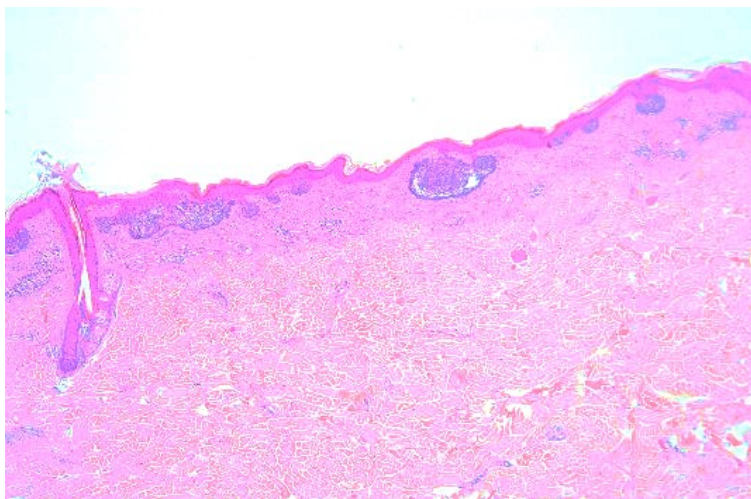
При всеки отделен случай се определиха тумор инфилтриращи лимфоцити (TILs) в туморната тъкан. TILs липсват при 15 (33,33 %) от ПКК и при 18 (39,13 %) от БЦК, слабо изразени са при 22 (48,89 %) от ПКК и при 16 (34,78 %) от БЦК (фигура 22) и са умерено изразени при 8 (17,78 %) от плоскоклетъчните (фигура 23 и 24) и при 12 (26,09 %) от

базоцелуларните карциноми. Лимфоваскуларна инвазия не беше установена при изследваните тумори на кожата.

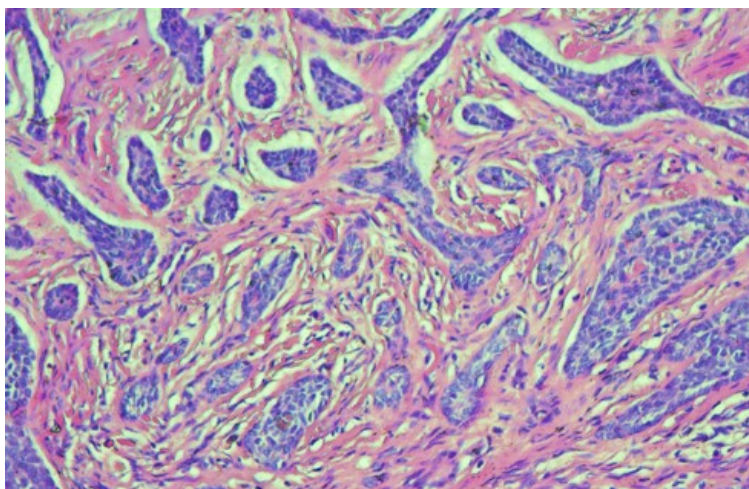
Според Т стадия на тумора ние установихме, че ПКК в 43 (95,56 %) случая е в стадий Т1 и само в 2 (4,44 %) случая в стадий Т2. Всичките 46 (100 %) пациента с БЦК са в стадий Т1. Според локализацията на тумора 2 (4,44 %) от ПКК са в областта на шията. В областта на главата са локализирани 31 (68,89 %) от ПКК и 37 (80,43 %) от БЦК. В областта на трункуса са 3 (6,67 %) от ПКК и 4 (8,7 %) от БЦК. Осем (17,78 %) от ПКК и 2 (4,35 %) от БЦК са локализирани по крайниците, а в областта на гениталиите 1 (2,22 %) от ПКК и 3 (6,52 %) от БЦК.



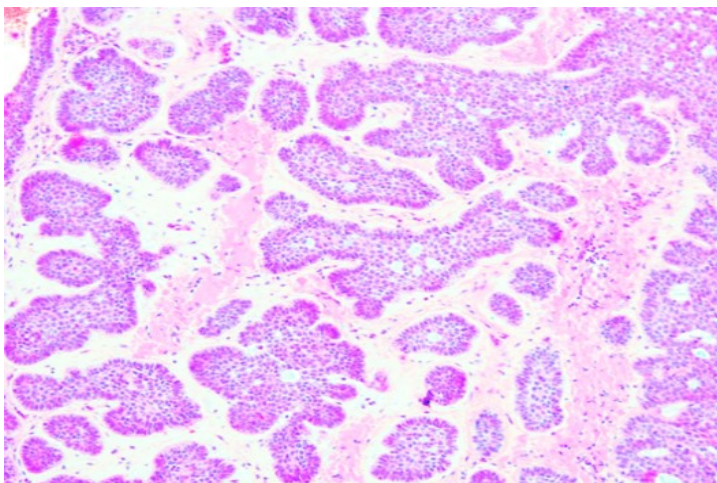
Фигура 12. Нодуларен тип базоцелуларен карцином. Големи лобули от базалоидни клетки с лек плеоморфизъм, с палисадно периферно разположение сред фибромиксоидна строма. Оцв. ХЕ x200



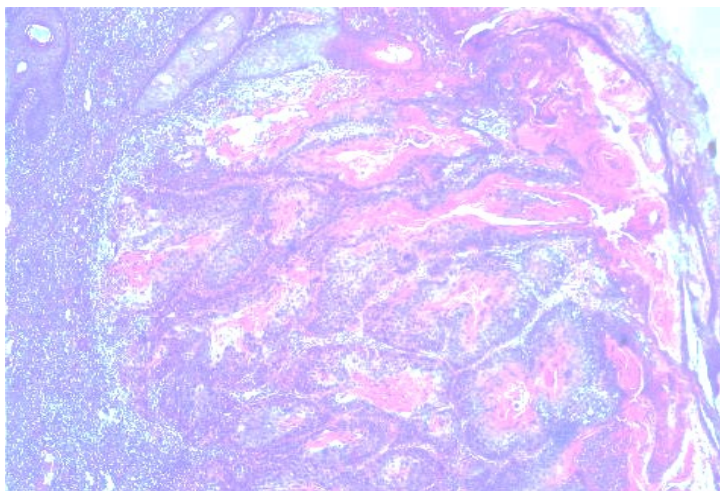
Фигура 13. Суперфициален базоцелуларен карцином. Изолирани лобули от базалоидни клетки, свързани с базалния слой на епидермиса. Оцв. ХЕ x200



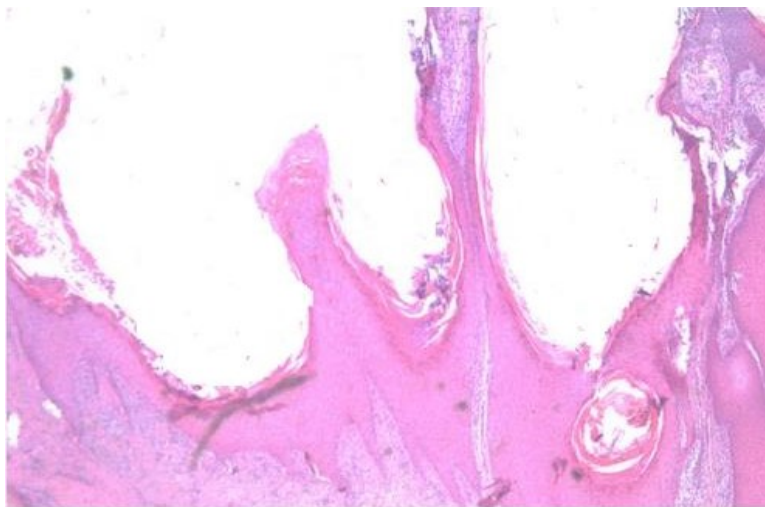
Фигура 14. Фиброепителиом на Пинкус, тип базоцелуларен карцином на кожата. Анастомозиращи епителни повлекла сред значителна дермална фиброза. Оцв. ХЕ x200



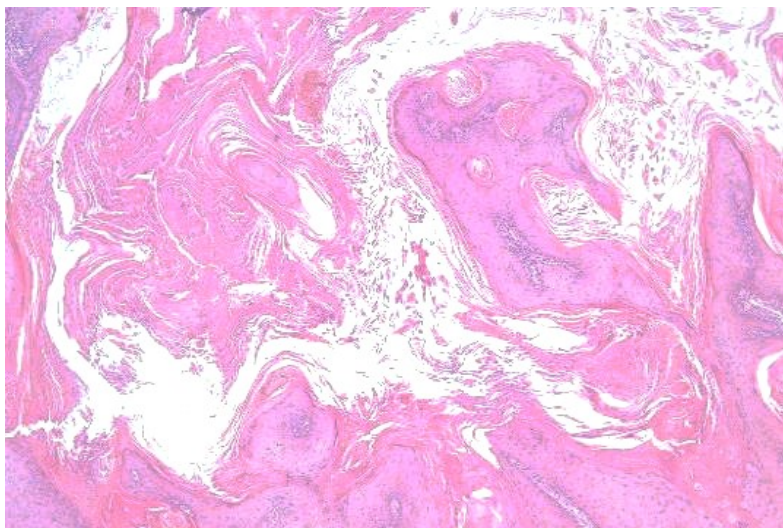
Фигура 15. Микронодуларен тип базоцелуларен карцином на кожата. Малки гнезда от базалоидни клетки с периферно палисадно разположение. Оцв. ХЕ x200



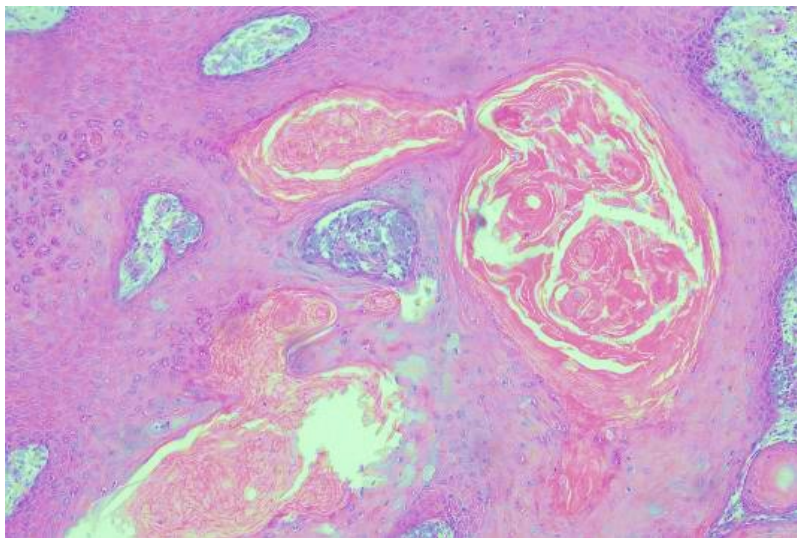
Фигура 16. Конвенционален плоскоклетъчен карцином представен от атипични клетки с полигонална форма, интрацелуларно образуване и екстрацелуларно отлагане на кератин под формата на ракови перли. Оцв. ХЕ x200



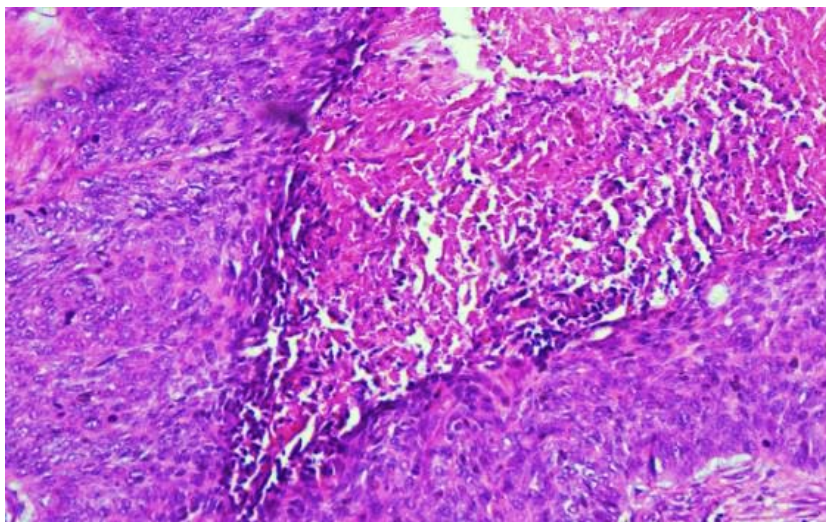
Фигура 17. Верукозен тип плоскоклетъчен карцином на кожата с характерния за тумора растеж с избутване на стромата (pushing borders). Оцв. ХЕ x200



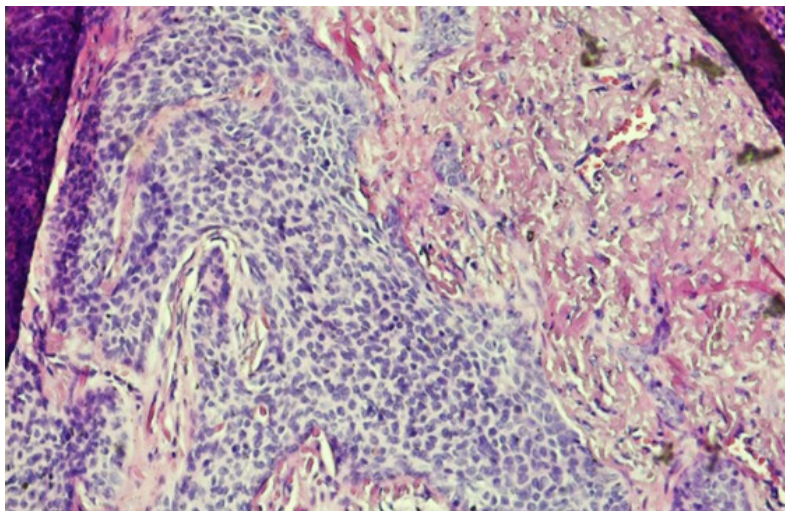
Фигура 18. Кератоакантом/високодиференциран плоскоклетъчен карцином с характерен кратероподобен модел на строеж. Оцв. ХЕ x200



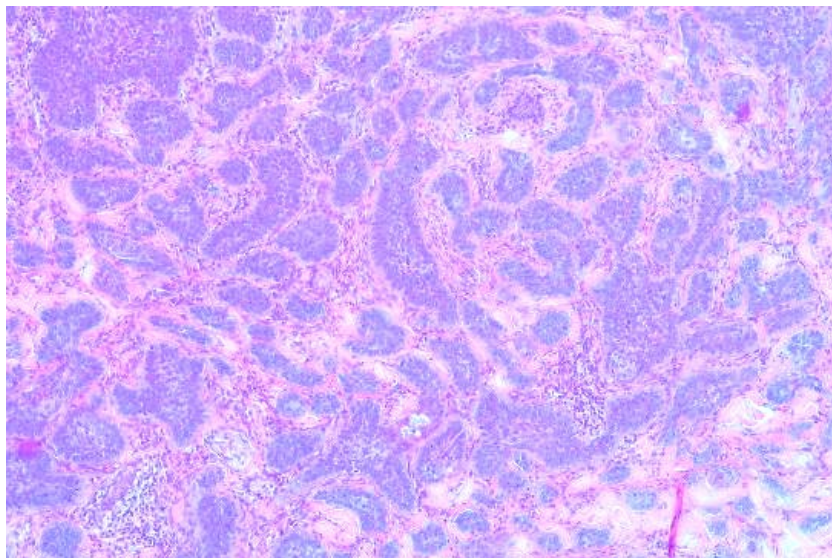
Фигура 19. Високодиференциран плоскоклетъчен карцином с итрацелуларно образуване и екстрацелуларно отлагане на кератин под формата на ракови перли. Оцв. ХЕ x200



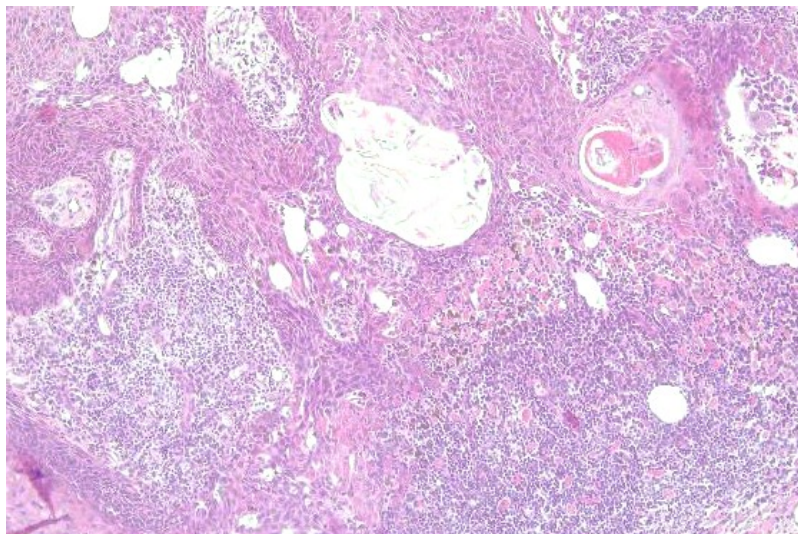
Фигура 20. Туморни некрози при плоскоклетъчен карцином до 10 % от площта на тумора. Оцв. ХЕ x200



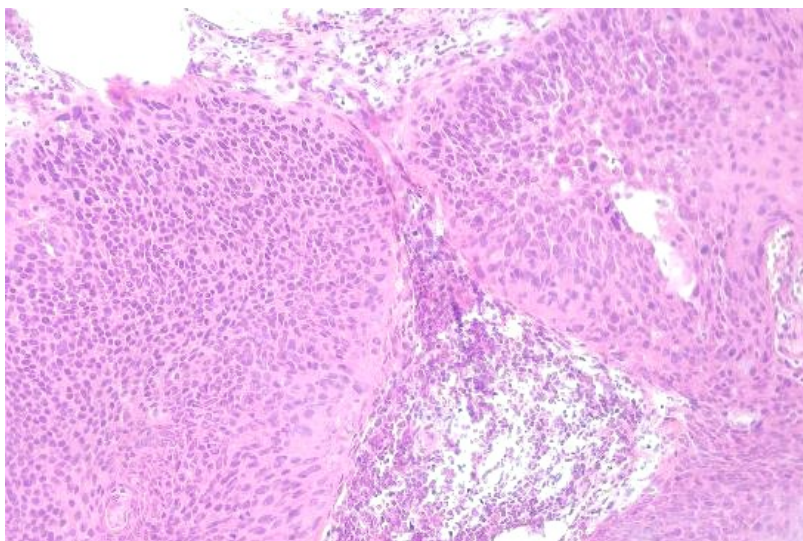
Фигура 21. Туморни некрози при базоцелуларен карцином до 10 % от площта на тумора. Оцв. ХЕ x200



Фигура 22. Слабо изразена инфилтрация на TILs в туморната тъкан на базоцелуларен карцином. Оцв. ХЕ x200



Фигура 23. Умерено изразена инфилтрация на TILs в туморната тъкан на плоскоклетъчен карцином. Оцв. ХЕ x200

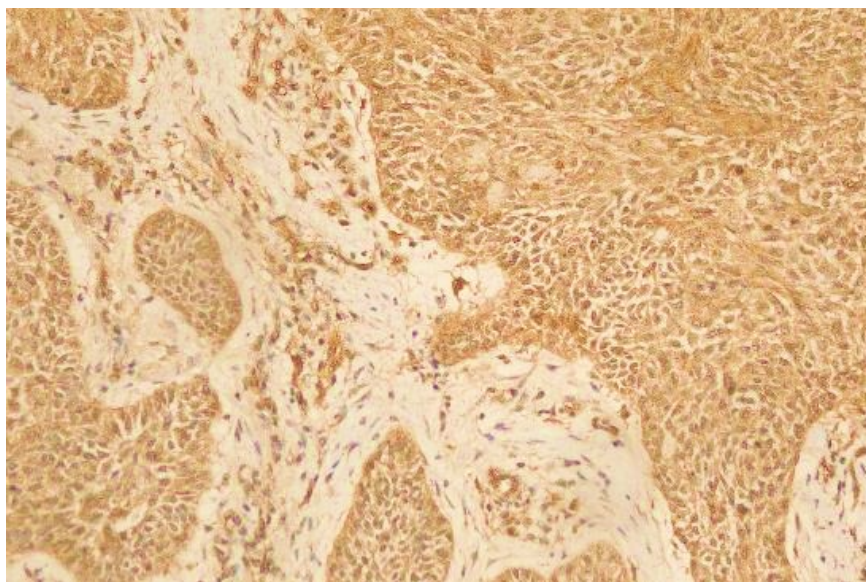


Фигура 24. Умерено изразен инфилтрат на TILs с подчертано гнездно разположение. Оцв. ХЕ x200

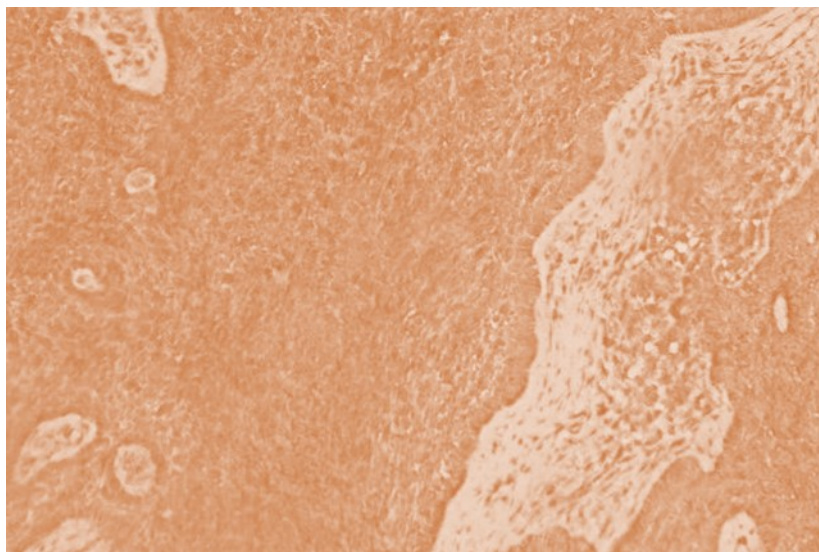
4.2. Експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК и ПКК и в съседната нетуморна тъкан

4.2.1 Цитоплазмена и нуклеарна експресия на Caspase-3 в туморната тъкан при БЦК и в съседна нетуморна тъкан

Средната стойност на цитоплазмената експресия в туморната тъкан на БЦК определена чрез H-score е $20,20 \pm 60,44$, като минималната стойност е 0, а максималната е 300 (фигура 25). Средната стойност на ядрена експресия в туморната тъкан на БЦК на Caspase-3 е $17,87 \pm 56,74$, като минималната стойност е 0, а максималната е 293 (фигура 26).

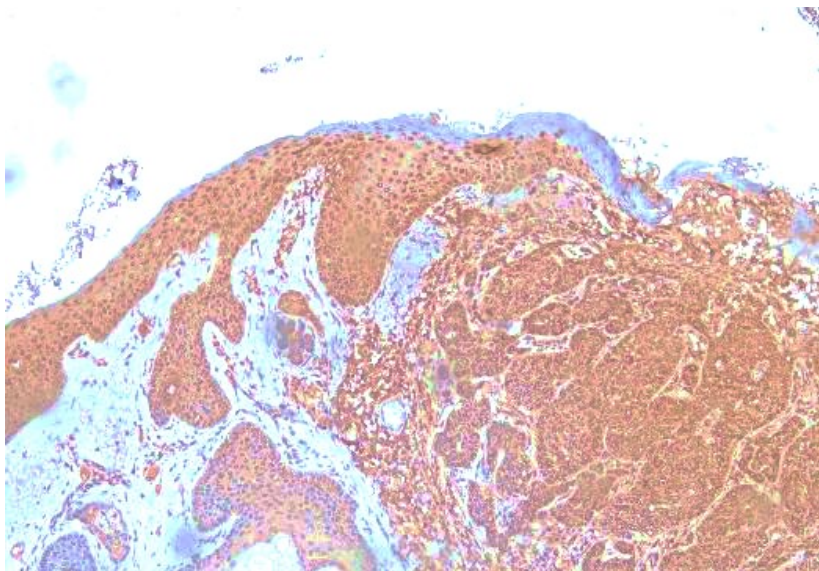


Фигура 25. Висока цитоплазмена експресия на Caspase-3 при базоцелуларен карцином. IXX x200.



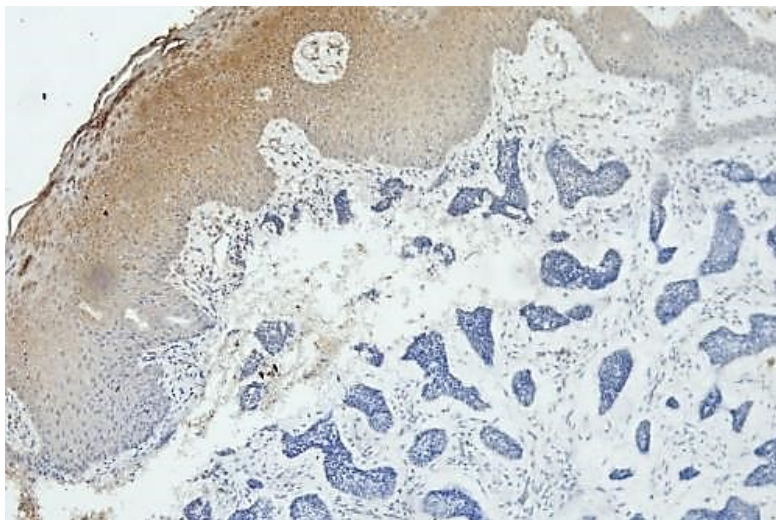
Фигура 26. Висока ядрена и цитоплазмена експресия на Caspase-3 при базоцелуларен карцином. ИХХ x200.

Цитоплазмена експресия на Caspase-3 в нетуморна тъкан при БЦК е със средна стойност $18,02 \pm 37,12$. Нуклеарната експресия на Caspase-3 в съседната тъкан при БЦК е със средна стойност $18,27 \pm 44,35$ (фигура 27)



Фигура 27. Висока ядрена експресия на Caspase-3 в съседната нетуморна тъкан и слаба цитоплазмена и умерена нуклеарна експресия в туморна тъкан при пациенти с БЦК. IXX x200.

На фигура 28 е показана умерена цитоплазмена експресия на Caspase-3 в нетуморните клетки в съседство на БЦК. В базалния слой липсва както нуклеарна, така и цитоплазмена експресия.

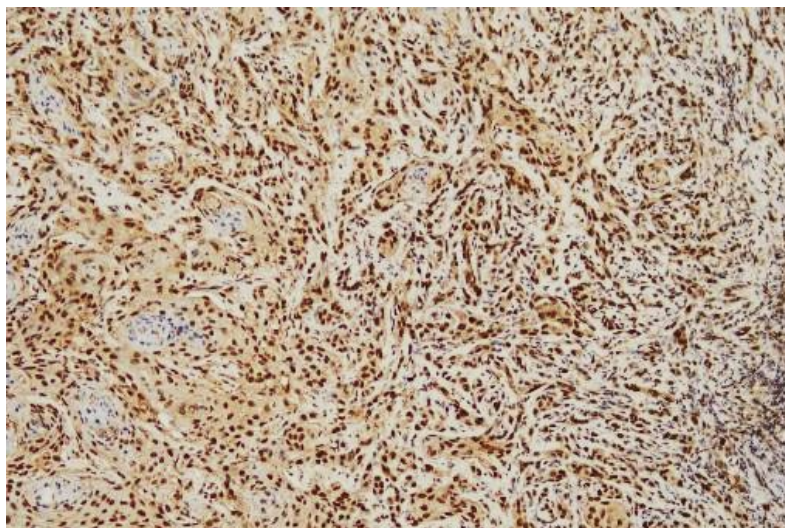


Фигура 28. Експресия на Caspase-3 в съседната нетуморна тъкан. Липсва в туморните клетки при базоцелуларен карцином. IXX x200

Ниски нива на експресия в базалния слой на епидермиса в съседство на туморния процес са установени и от други автори (Veeran Veeravarmal et al., 2016). Според Heshiki W et al., (2015) това може да се дължи на ниско ниво на апоптоза в нетуморните клетки в базалния слой.

5.2.2. Цитоплазмена и нуклеарна експресия на Caspase-3 в туморната тъкан при ПКК и в съседна нетуморна тъкан.

Средната стойност на цитоплазмената експресия определена чрез H-score при ПКК е $16,86 \pm 28,57$, като минималната стойност е 0, а максималната е 110 (фигура 29). Средната стойност на ядрена експресия на Caspase-3 е $6,48 \pm 19,58$, като минималната стойност е 0, а максималната е 84.



Фигура 29. Слаба до умерена цитоплазматична и интензивна нуклеарна експресия на Caspase-3 в туморните клетки при плоскоклетъчен карцином. IХХх100.

По отношение на ядрена и цитоплазматична експресия в съседната нетуморна тъкан при ПКК тя е съответно: $8,05 \pm 9,88$ за нуклеарна (фигура 30) и $8,18 \pm 9,22$ за цитоплазматична.



Фигура 30. Умерена ядрена експресия на Caspase-3 в нетуморните клетки и интензивна цитоплазмена при плоскоклетъчен карцином. ИХХ х200

4.2.3. Сравнителен анализ между средните стойности на експресия на Caspase-3 в туморната тъкан и съседната нетуморна тъкан при пациенти с БЦК и ПКК

4.2.3.1. Експресия на Caspase-3 при БЦК.

При анализиране на средните стойности на цитоплазмената и ядрената експресия на Caspase-3 в туморните и нетуморни клетки не се установи статистическа значима разлика за цитоплазмената ($p=0,74$) и за ядрената експресия ($p=0,94$) (Таблицы 7 и 8).

Таблица 7. Средни стойности на цитоплазматична експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК и в съседната нетуморна тъкан.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазматична експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
В туморни клетки	46	20,2	60,44	0,74
В нетуморни клетки	46	18,02	37,12	

Таблица 8. Средни стойности на ядрена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК и в съседната нетуморна тъкан.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрена експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
В туморни клетки	46	17,87	56,74	0,94
В нетуморни клетки	46	18,27	44,35	

Повишена експресия на Caspase-3 е установена при различни видове карциноми: карцином на стомаха, хепатоцелуларен карцином, карцином на простатната жлеза и др. Високи нива на експресия са намерени при глиални тумори, малигнен меланом, остра миелоидна левкемия и ПКК на устната кухина (Huang J et al., 2017). При БЦК на кожата на клепачите, Koyun E et al. (2020) установяват ниски нива на експресия на протеина, участващ в процеса

на апоптоза. Такива ниски нива са намерени и при други неоплазми като карцином на маточна шийка и млечна жлеза (Devarajan E et. 2002). Според някои автори, намалената експресия на Caspase-3 може да води до „бягство“ от апоптоза и ускоряване процеса на туморогенеза, като туморните клетки придобиват устойчивост към стресовите фактори в микросредата. (Huang Q et al., 2011). От друга страна свръхекспресията на Caspase-3 от загиналите туморни клетки може да доведе до освобождаване на сигнали, които да стимулират растежа на неопластичните клетки, което да им позволи да се размножават и оцеляват при стресови условия.

Взети заедно данните от литературата сочат, че експресията на апоптозният маркер Caspase-3 може да бъде повишена или намалена в зависимост от хистологичния вариант на тумора и неговата локализация.

Ние установихме, че Caspase-3, маркерът за апоптозата се експресира в еднаква степен в туморната и нетуморна тъкан на БЦК. При настоящото изследване сме използвали pro-Caspase-3, която е неактивната форма на Caspase-3. Получените от нас резултати съответстват на данните, получени при анализ на pro-Caspase-3 при стомашен карцином, при който се установява, че само тя присъства в туморната и в съседната нетуморна тъкан, докато активната форма липсва (Kania J et al., 2003). Предполага се, че в хода на туморогенезата Caspase-3 изчезва и апоптозата се блокира. Подобни резултати на понижена до липсваща експресия на Caspase-3 в цитоплазмата на епителните клетки при премалигнени лезии и стомашен карцином са наблюдавани и от други автори (Sun Y et al., 2006). Анализът

на апоптозата в букална мукоза с помощта на метода TUNEL показва обратното - постепенно повишаване на броя на апоптозните клетки, като най-малко те са в нормалната букална мукоза, повишават се при дисплазия и карцином *in situ*, а най-високи са стойностите при карцином (Huang JS et al. 2017).

Други проучвания (Huang Q et al., 2011) установяват, че Caspase-3 е промотор на канцерогенезата както при *in vivo*, така и при *in vitro* изследвания. По-високо ниво на експресия на Caspase-3 е установено при инвазивен карцином на млечна жлеза в сравнение с нетуморната тъкан на гърдата и повишеното ниво е маркер за неблагоприятна прогноза при тези пациенти. Huang Q et al. (2011) откриват, че високото ниво на Caspase-3 чрез активиране на простагландин E2, оказва мощно стимулиращо действие върху растежа на оцелелите от лъчетерапия туморни клетки и в резултат се повишава значително честотата на поява на рецидиви и се увеличава риска от настъпване на смърт. При дефицит на Caspase-3 в туморните клетки значително се повишава чувствителността на тумора към лъчетерапия. Освен апоптоза, Feng X et al. (2015) показват, че след облъчване при *in vivo* (HT-29 и CASP3DN клетъчни линии) и при *in vitro* модели, Caspase-3 медира проангиогенни свойства на загиващите туморни клетки. Неактивната Caspase-3 значително подтиска туморната ангиогенеза в ксенотрансплантантен модел при туморния растеж.

Huang YL et al (2021) установяват статистически значима разлика между експресията на Caspase-3 в туморната тъкан спрямо нормалната. Такава зависимост е установена и при гасдермин Е (GSDME) при пациенти с белодробен

карцином. GSDME е протеин, който играе ключова роля в пироптозата, форма на програмирана клетъчна смърт, която е свързана с освобождаването на възпалителни цитокини. Клетки с високи нива на експресия на GSDME пренасочват медираната от Caspase-3 апоптоза към пироптоза. Cousin F. et al. (2000) установяват по-ниска експресия на Caspase-3 при БЦК, спрямо нормалната тъкан. Все още проучванията са малко на брой и се нуждаят в бъдеще от нови и по-задълбочени анализи за ролята на Caspase-3 в туморната генеза (Koyun E et al., 2020). Ниски нива на експресия на Caspase-3 в туморната спрямо нормалната тъкан са установени при пациенти с аденокарцином на простатната жлеза и някои нискодиференцирани карциноми (Winter RN et al., 2001). Според Devarajan et al. (2002) ниското ниво на експресия на Caspase-3 е свързано с химиорезистентност на туморната тъкан.

Данните от литературата относно експресията на Caspase-3 се различават съществено, което според нас може поне отчасти да се дължи на различните методи на изследване и оценка на имунохистохимичната експресия на анти-тялото. В настоящото изследване оценката на Caspase-3 се базира на два показателя: интензивност на оцветяването и процент клетки със съответния интензитет, което според нас дава доста точна представа за тъканното ѝ ниво в туморната и извънтуморна тъкан.

4.2.3.2. Експресия на Caspase-3 при ПКК.

При ПКК, анализът между средните стойности на Caspase-3 на цитоплазмената експресия на туморните и нетуморни клетки установи, че има статистически значима разлика ($p=0,03$). В туморната тъкан цитоплазменото ниво

на експресия на Caspase-3 е по-високо в сравнение със съседната нетуморна тъкан (таблица 9).

При ядрената експресия на Caspase-3 в туморна и нетуморна тъкан не се установява статистически значима разлика ($p=0,58$) (таблица 10).

Таблица 9. Средни стойности на цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на ПМК и в съседната нетуморна тъкан.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
В туморни клетки	45	16,86	28,59	0,03
В нетуморни клетки	45	8,18	9,22	

Таблица 10. Средни стойности на ядрена експресия на Caspase-3 в туморната на ПМК и в съседната нетуморна тъкан.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
В туморни клетки	45	6,48	19,58	0,58
В нетуморни клетки	45	8,05	9,88	

Caspase-3 е ключов изпълнител на апоптозата, който съществува като проензим в цитоплазмата на клетките (Yu You et al., 2017). По време на апоптоза, тя се разцепва, последва активация и транслокация в ядрото. В ядрото

активираната каспаза-3 разцепва специфични нуклеарни субстрати, което води до характерни апоптотични промени като кондензация на хроматина, фрагментация на ДНК и разрушаване на ядрото и така тя изпълнява ефекторните си функции.

Ние установихме цитоплазмена и нуклеарна експресия на Caspase-3, както в туморната, така и в нетуморната тъкан при ПКК. В цитоплазмата на туморните клетки нивото на Caspase-3 е повишено. Повишеното ниво може да означава, че апоптотичният път е активен при ПКК. Важно е да се отбележи, че активната Caspase-3 може да бъде открита в цитоплазмата и дори в ядрото на клетки, които не показват явни белези на апоптоза (Krajewska M et al. 1997). Това може да означава, че активността на каспаза-3 може да не е винаги строго ограничена до апоптотичния път.

Huang JS et al. (2017) анализират сквамозноклетъчен карцином на букалната мукоза и установяват повишена експресия на Caspase-3. Според авторите ниската експресия на Caspase-3 е асоциирана с по-добра обща преживяемост, по-ранен стадий на заболяването и липса на метастази в лимфните възли. Според същите автори Caspase-3 участва активно в туморогенезата (Huang JS et al. 2017). Според нас, повишената тъканна цитоплазмена експресия на Caspase-3 може да бъде една от причините за по-агресивното биологично поведение на ПКК в сравнение с БЦК.

4.2.4. Сравнителен анализ на експресия на Caspase-3 при БЦК и ПКК в зависимост от клинично-морфологичните характеристики.

4.2.4.1. Зависимост между експресия на Caspase-3 и възрастта на пациентите

За да анализираме зависимостта между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и възрастта на пациентите, те бяха разделени в две възрастови групи (Таблица 11). На таблицата са посочени средните стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3 в туморните клетки при БЦК. С помощта на дисперсионния анализ, ние не установихме зависимост между експресията на Caspase-3 и възрастта на пациентите ($p=0,44$).

Таблица 11. Средни стойности на цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК във връзка с възрастта.

Възраст	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
31-60 г.	27	11,61	44,39	0,44
61- 90 г	19	25,93	69,34	

На таблица 12 са посочени средните стойности на нуклеарната експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК във връзка с възрастта. Дисперсионният анализ показва, че няма статистически значима зависимост между показателя ядрена експресия на Caspase-3 и възрастта на пациентите в туморната тъкан на БЦК ($p=0,37$).

Таблица 12. Средни стойности на ядрена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК във връзка с възрастта.

Възраст	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
31-60 г.	27	8,44	32,65	0,37
61- 90 г.	19	24,15	68,19	

Пациентите с ПМК също са разпределени в две групи: до 60 години и над 60 години. На таблица 13 са посочени средните стойности на цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на пациентите с ПМК във връзка с възрастта. Дисперсионният анализ показва, че няма статистическа зависимост между показателите цитоплазмена експресия на Caspase-3 и възрастта на пациентите с ПМК ($p=0,87$).

Таблица 13. Средни стойности на цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на ПМК във връзка с възрастта.

Възраст	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
31-60 г.	20	17,12	32,15	0,87
61-90 г.	25	15,70	23,6	

На таблица 14 са представени средните стойности на нуклеарната експресия на Caspase 3 в туморната тъкан на ПМК при пациенти в двете възрастови групи. Статистически

значима зависимост между ядрена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан при ПМК във връзка с възрастта на пациентите не се установи ($p=0,58$).

Таблица 14. Средни стойности на ядрена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на ПМК във връзка с възрастта.

Възраст	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
31-60 г.	20	7,76	22,28	0,58
61-90 г.	25	4,55	15,39	

Липса на зависимост между експресия на Caspase-3 в туморната тъкан и възрастта е наблюдавана при редица тумори. Dozic B et al. (2016) не установяват зависимост между двата показателя при аденоиднокистичен карцином на паротидната жлеза. Tanimoto T et al. (2005) също не откриват зависимост между експресия на протеина и възрастта на пациентите със ПМК на глава и шия. Авторите отчитат едновременно цитоплазмената и нуклеарна имунохистохимичната експресия на Caspase-3, като в изследваната група са включени сквамозни карциноми на устна кухина, назална кухина, фаринкс, ларинкс и параназални синуси. При плоскоклетъчния карцином на букалната мукоза също не е установена зависимост между експресия на Caspase-3 в туморната тъкан и възрастта на пациентите (Huang JS et al., 2017). За разлика от горните автори Oudejans JJ et al. (2005) установяват статистически сигнификантна зависимост между експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на назофарингеа-

лен карцином и възрастта на пациентите. Липсата на Caspase-3 се среща при по-възрастни пациенти.

Ние установихме, че цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 при двата карцинома на кожата: БЦК и ПКК не показват зависимост от възрастта.

4.2.4.2. Зависимост между експресия на Caspase-3 и пола на пациентите

При анализиране на средните стойности на цитоплазмената и нуклеарната експресия на Caspase-3 в туморните клетки спрямо пола на пациента (таблица 15 и 16) не се установи статистическа значима зависимост, както по отношение на цитоплазмената ($p=0,14$), така и по отношение на ядрената експресия ($p=0,16$) при БЦК.

Таблица 15. *Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 в туморните клетки спрямо пола на пациентите с БЦК.*

Пол	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Мъже	20	31,69	15,05	0,14
Жени	26	4,47	3,94	

Таблица 16. *Зависимост между ядрената експресия на Caspase-3 в туморните клетки спрямо пола на пациентите с БЦК.*

Пол	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Мъже	20	28,08	14,18	0,16
Жени	26	3,89	3,63	

При сравняване средните стойности на цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 в туморните клетки спрямо пола на пациента при ПМК не се установи статистическа значима зависимост при цитоплазмена ($p=0,17$) и при ядрена експресия ($p=0,55$) (таблица 17 и 18). Получените от нас резултати показват, че експресията на Caspase-3 в туморната тъкан не се влияе от пола на пациента.

Таблица 17. Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 в туморните клетки спрямо пола на пациентите с ПМК.

Пол	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Мъже	25	21,44	33,83	0,17
Жени	20	10,3	18,60	

Таблица 18. Зависимост между ядрена експресия на Caspase-3 в туморните клетки спрямо пола на пациентите с ПМК.

Пол	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Мъже	25	7,68	20,65	0,55
Жени	20	4,5	14,98	

Получените от нас резултати показват, че цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БМК и ПМК не се влияят от пола на пациентите.

Подобни резултати се съобщават и от други автори при различни видове карциноми: колоректален (de Heer P et al.

2007, Koelink P et al. 2009, Ahmed S et al. 2022), стомашен, овариален и цервикален карцином (Hu Q et al. (2014)

4.2.4.3. Зависимост между експресия на Caspase-3 и рисковата група БЦК.

Различните хистологични варианти на БЦК в настоящото изследване са представени от сравнително малък брой случаи, поради което не беше анализирана зависимостта на Caspase-3 от хистологичния вариант. Определи се зависимостта на Caspase-3 от рисковата група. БЦК бяха разпределени в две категории: с нисък и висок риск. Нискорисковата група включва: нодуларен, фиброепителен и суперфициален БЦК. Към високорисковите се отнася микронодуларния БЦК. На таблицата 19 и 20 са представени средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на Caspase-3 в зависимост от риска. Не се установи статистически значима зависимост, както за цитоплазмената ($p=0,41$), така и ядрената експресия ($p=0,32$) на маркера за апоптоза от рисковата група при БЦК.

Таблица 19. *Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и БЦК с нисък и висок риск.*

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Нисък риск	40	17,55	56,37	0,41
Висок риск	5	41,40	92,57	

Таблица 20. Зависимост между ядрената експресия на Caspase-3 и БЦК с нисък и висок риск.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Нисък риск	40	14,88	51,52	0,32
Висок риск	5	41,8	93,47	

Статистически значима зависимост липсва между различните хистологични варианти на ПКК и двете експресии на Caspase-3: цитоплазмена ($p=0,39$) и нуклеарна експресия ($p=0,45$) (Таблица 21 и 22).

Таблица 21. Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и хистологичния вариант на ПКК.

Хистологичен тип	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Конвенционален ПКК	33	13,22	23,21	0,39
Верукозен ПКК	5	25,00	47,68	
Кератоакантом	7	27,71	35,98	

Таблица 22. Зависимост между нуклеарната експресия на Caspase-3 и хистологичния вариант на ПКК.

Хистологичен тип	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Конвенционален ПКК	33	4,25	15,67	0,45
Верукозен ПКК	5	14,8	33,09	
Кератоакантом	7	10,71	25,39	

O' Donovan N et al. (2003) установяват по-високи нива на експресия Caspase-3 при дуктален спрямо лобуларен карцином на млечна жлеза. Според други автори експресията на Caspase-3 е по-висока при пациенти с глиален тумор G4 степен, спрямо туморите с грейдинг G1 и G2 (Feng X et al. 2023). Високи нива на експресия на разцепената Caspase-3 са установени при пациенти с глиални тумори (Feng X et al. 2023). Авторите намират, че високите нива на експресия на разцепената Caspase-3 са свързани с по-висок стадий, злокачествен хистологичен тип, див тип IDH и висока микроваскуларна плътност в тумора. Получените данни от клетъчни култури на облъчени глиомни клетки показват, че Caspase-3 медира образуването на проангиогенни комплекси и стимулира клетъчното делене чрез COX-2. Пациенти с глиомы с високи нива на разцепена каспаза-3 и експресия на COX-2 имат най-ниска преживяемост. Според авторите резултатите от проучването на сигналния път Caspase-3/COX-2 може да намери приложение в терапията и прогнозирането на терапевтичния ефект при глиални тумори (Feng X et al., 2023).

Ahmed S et al. (2022) установяват статистически значима разлика между експресията на Caspase-3 и хистологичния вид на колоректалния карцином. По-висока е експресията на антиятлото при конвенционален аденокарцином, отколкото при муцинозен аденокарцином на дебелото черво. Според авторите Caspase-3 действа като туморен супресор при колоректален карцином, защото се асоциира с благоприятни клиничко-морфологични характеристики.

Липсата на зависимост между цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 във връзка с рисковата стратификация на БЦК и хистологичния вариант на ПМК според нас може да бъде тъканно обусловено.

4.2.4.4. Зависимост между експресия на Caspase-3 и степента на диференциация на ПКК

Ние установихме статистически значима разлика при цитоплазмената ($p=0,01$) и нуклеарната ($p=0,0001$) експресия на Caspase-3 във връзка със степента на диференциация на ПКК (Таблица 23 и 24). При ниско- и умеренодиференцираните карциноми взети заедно, експресията на антитялото е по-висока спрямо карциномите с G1 диференциация.

Таблица 23. Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и степен на диференциация на тумора при пациенти с ПКК.

Грейд	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Високодиференциран	29	13,21	21,33	0,01
Умеренодиференциран	14	18,43	33,86	
Нискодиференциран	1	101,00		

Таблица 24. Зависимост между ядрената експресия на Caspase-3 и степен на диференциация на тумора при пациенти с ПКК.

Грейд	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Високодиференциран	29	4,10	13,69	0,0001
Умеренодиференциран	14	5,86	19,73	
Нискодиференциран	1	84,00		

Получените от нас резултати показват обратна зависимост между цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 и диференциацията на ПКК. С намаляване на диференциацията на тумора, експресията на Caspase-3 се увеличава. Нашите резултати се различават от данните получени при колоректален карцином, за нуклеарната експресия (Ahmed S et al. 2022). Авторите установяват, че има редуциране на нуклеарната експресия на Caspase-3 при ниско диференцираните тумори в сравнение с високодиференцираните. При тяхното изследване цитоплазмена експресия на Caspase-3 не е намерена.

При Ходжкинов лимфом, класически вариант, експресията на Caspase-3 е изразена, но липсва при лимфоцитното доминиране (Izban KF, 1998). Анализирайки тъканната експресия на Caspase-3 при простатен карцином е установено, че цитоплазмената експресия е редуцирана при нискодиференцирания аденокарцином спрямо карцинома с висока диференциация и нормална простатна жлеза (Winter RN, 2001).

4.2.4.5. Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и площта на некроза при пациенти с БЦК и ПКК

На таблица 25 и 26 са посочени средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на Caspase-3 във връзка с площ на некрозата при пациентите с БЦК. Между цитоплазмената и ядрена експресия на Caspase-3 и площта на туморната некроза при БЦК не се установи статистически значима зависимост ($p=0,43$ за цитоплазмена и $p=0,46$ за ядрена експресия).

Таблица 25. Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и площ на туморната некроза при пациенти с БЦК.

Площ некроза	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Липсва	40	22,73	63,74	0,43
Под 10 %	5	00,00	0,00	

Таблица 26. Зависимост между ядрената експресия на Caspase-3 и площ на туморната некроза при пациенти с БЦК.

Площ некрози	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Липсва	40	20,10	59,89	0,46
Под 10 %	5	0,00	0,00	

Средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на Caspase-3 във връзка с площта на туморната некроза при пациентите с ПМК е посочена на таблица 27 и 28. При анализа на цитоплазмената и ядрена експресия на Caspase-3 във връзка площ на туморната некроза при ПМК не се установи статистически значима зависимост ($p=0,58$ за цитоплазмена и $p=0,54$ за ядрена експресия).

Таблица 27. Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и площ на туморната некроза при пациенти с ПМК.

Площ некрози	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Липсва	33	17,91	30,09	0,58
Под 10%	8	8,63	11,61	
10-30%	3	27,33	46,48	

Таблица 28. Зависимост между нуклеарната експресия на Caspase-3 и площ на туморната некроза при пациенти с ПМК.

Площ некрози	Брой случаи, N	Средни стойности на нуклеарната експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Липсва	33	8,39	22,32	0,54
Под 10%	8	1,00	2,83	
10-30%	3	0,00	0,00	

При злокачествените тумори на кожата могат да се появят зони на коагулационна некроза в резултат от неадекватна васкуларизация и метаболитен стрес (хипоксия). Некрозата в тумора често е свързана с по-агресивно поведение и може да бъде неблагоприятен прогностичен фактор за общата преживяемост при пациенти с колоректален (Стефанова Н, 2018) и бъбречноклетъчен карцином (Янулова Н, 2024). Ние установихме, че в болшинството от случаите на БЦК и ПМК липсва некроза. Статистически значима зависимост между цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 във връзка с туморна некроза при двата карцинома не се установи. С изключение на трите случая на ПМК с по-висока цитоплазмена експресия на Caspase-3 при площ на некрозата между 10% и 30%, по-висока експресия на антиятлото има, когато липсват некрози. Това може да означава, че некрозата в туморната тъкан при БЦК и ПМК се развива по друг независим път от този на апоптозата.

4.2.4.6. Зависимост между експресия на Caspase-3 и тумор-инфилтриращите лимфоцити при БЦК и ПМК

На таблица 29 и 30 са посочени средните стойности на цитоплазмената и нуклеарна експресия на апоптотичния маркер във връзка с TILs при БЦК. Експресията на Caspase-

3 в цитоплазмата и ядрата на туморните клетки не показва зависимост от TILs ($p=0,55$ за цитоплазмената и $p=0,58$ за ядрената експресия).

Таблица 29. Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и TILs в туморната тъкан при пациенти с БЦК.

TILs	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Липсват	18	22,28	70,82	0,55
Слабо изразени	15	7,40	19,82	
Умерено изразени	12	33,08	77,13	

Таблица 30. Зависимост между ядрената експресия на Caspase-3 и TILs в туморната тъкан при пациенти с БЦК.

TILs	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Липсват	18	20,17	68,87	0,58
Слабо изразени	15	6,20	17,93	
Умерено изразени	12	29,00	69,35	

По отношение на средните стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3 в туморната тъкан и TILs при ПКК не се установи статистическа значима зависимост ($p=0,06$) (Таблица 31). Липсва зависимост и по отношение на ядрената експресия ($p=0,91$) (Таблица 32).

Таблица 31. Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и TILs в туморната тъкан при пациенти с ПКК.

TILs	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Липсват	14	13,79	26,93	0,06
Слабо изразени	22	11,05	17,68	
Умерено изразени	8	38,25	45,68	

Таблица 32. Зависимост между ядрена експресия на Caspase-3 и TILs в туморната тъкан при пациенти с ПКК.

TILs	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Липсват	14	6,00	22,45	0,91
Слабо изразени	22	5,77	15,54	
Умерено изразени	8	9,25	26,16	

Независимо, че няма сигнификантна зависимост на цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 от TILs при двата карцинома, прави впечатление, че стойностите на апоптотичния фактор са по-високи при умерено изразени TILs.

При колоректален карцином, пациентите със силно изразени TILs имат най-голяма обща преживяемост в сравнение с пациентите при които липсват TILs (Стефанова Н, 2018). Съществена разлика е установена в общата преживяемост при пациентите със силно изразен антитуморен възпалителен отговор и тези с леко изразен отговор, при които общата преживяемост е най-ниска. При

бъбречноклетъчен карцином не е открита зависимост между цитоплазмената и нуклеарна експресия на Apoptosis-inducing factor (AIF) - друг маркер за апоптоза и TILs (Янулова Н, 2024).

Според нас, различните данни могат да се дължат на различните критерии при определяне на TILs, различните антитета, а също така и да са тъканно обусловени.

4.2.4.7. Зависимост между цитоплазмена и ядрена експресия на Caspase-3 и локализация на БЦК и ПКК

Средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на Caspase-3 във връзка с локализацията на БЦК и ПКК са посочени на таблица 33 и 34. В настоящото проучване не установихме статистически значима разлика между експресията на протеина спрямо локализацията на туморния процес при БЦК както за цитоплазмена ($p=0,90$), така и за ядрена експресия ($p=0,91$).

Таблица 33. Зависимост между цитоплазмената експресия на Caspase-3 и локализацията на БЦК.

Локализация	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмена експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Глава	36	22,47	66,47	0,90
Трункус	4	25,00	35,36	
Крайници	2	0,00	0,00	
Гениталии	3	0,00	0,00	

Таблица 34. Зависимост между ядрената експресия на *Caspase-3* и локализацията на БЦК.

Локализация	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на <i>Caspase-3</i>	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Глава	36	19,94	62,49	0,91
Трункус	4	21,50	32,66	
Крайници	2	0,00	0,00	
Гениталии	3	0,00	0,00	

При ПКК също не се установи зависимост между експресията на антитялото за апоптоза и локализацията на туморния процес ($p=0,13$ за цитоплазмената и $p=0,81$ за нуклеарната експресия). Данните са посочени на таблици 35 и 36.

Таблица 35. Зависимост между цитоплазмената експресия на *Caspase-3* и локализацията на ПКК.

Локализация	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на <i>Caspase-3</i>	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Глава	31	11,71	22,51	0,13
Шия	2	57,00	33,94	
Трункус	2	4,50	6,36	
Крайници	8	30,25	43,02	
Гениталии	1	14,00		

Таблица 36. Зависимост между ядрената експресия на Caspase-3 и локализацията на ПКК

Локализация	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на Caspase-3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Глава	31	5,65	19,13	0,81
Шия	2	0,00	0,00	
Трункус	2	0,00	0,00	
Крайници	8	13,75	26,33	
Гениталии	1	0,00		

Данните от литературата показват, че при ПКК на хранопровода, експресия на Caspase-3, определена имунохистохимично и чрез Western blot се установява в 60% от случаите и корелира с благоприятна прогноза при пациенти претърпели резекция (Hsia JY et al., 2003). Подобни резултати са получени и при анализиране на експресията на Caspase-3 в туморната тъкан на невробластом, където високата експресия е асоциирана с по-млада възраст на пациентите, с по-нисък стадий на тумора и с по-добра прогноза (Nakagawara A et al., 1997). Според други автори високата експресия Caspase-3 е свързана с по-висок риск от рецидив, но без връзка с прогнозата на пациентите с колоректален и хепатоцелуларен карцином (Jonges LE et al., 2001, Persad R et al., 2004). Позитивност на Caspase-3 е открита при недребноклетъчен карцином на белия дроб, като тази позитивност е независим прогностичен фактор за преживяемостта при тези пациенти. Положителните за Caspase-3 пациенти имат по-голяма средната преживяемост, отколкото пациентите негативни на протеина (Yoo J et al., 2004). Тези данни са в съответствие с резултатите на Koornagel R, Volm M (2000), които

установяват, че има експресия при 72% от недребноклетъчните белодробни карциноми при пациенти с благоприятна клинична прогноза.

Данните, получени от Таката T et al. (2001) се различават съществено от тези на Koomag R, Volm M (2000) и на Yoo J et al., (2004). Ретроспективно са изследвани резецирани недребноклетъчни карциноми на белите дробове в патологичен стадий I и е установено, че 5 годишната преживяемост на пациентите със силна експресия на Caspase-3 е значително по-малка, отколкото при слаба експресия (Таката T et al. 2001). Авторите изследват също Caspase-3 във връзка с апоптозата, защото е известно, че тя играе ключова роля в апоптотичната клетъчна смърт. Те откриват, че експресията на каспаза-3 не корелира с честотата на апоптозните клетки, определена чрез TUNEL, с пролиферативната активност на тумора, изследвана с пролиферативния клетъчнонуклеарен антиген PCNA или статуса на p53 при недребноклетъчен белодробен карцином. Таката T et al. (2001) стигат до заключението, че повишената експресия на неразцепена каспаза-3, т.е. неактивирана каспаза-3 е свързана с неблагоприятна прогноза при пациенти с резециран недребноклетъчен карцином на белия дроб .

Резултатите на Таката T et al. (2001) по отношение на недребноклетъчния карцином на белия дроб не се различават от тези на Huang JS et al., (2017) относно плоскоклетъчен карцином на букалната лигавица. Високата имунохистохимична експресия на Caspase-3 е асоциирана с напреднал патологичен стадий, по-голям размер на тумора и лоша преживяемост при пациенти с резециран

плоскоклетъчен карцином на устната кухина и проведена постоперативна лъчетерапия. Освен неразцепена Caspase-3, авторите изследват и разцепена Caspase-3 и установяват, че ниската експресия на двете: Caspase-3 и разцепена Caspase-3 са свързани с по-добра обща преживяемост, ранен патологичен стадий и липса на метастази в лимфните възли в сравнение с високата експресия. Таката T et al. (2001) стигат до заключението, че разцепена Caspase-3 и/или Caspase-3 могат да бъдат прогностични биомаркери при ПКК на букалната мукоза.

Сравнителният анализ на имунохистохимичната експресия на Caspase-3 в тъкани на простатен карцином и простатна хиперплазия показва по-ниска експресия при карцинома (Gu J et al. 2015). Ниската експресия се среща при авансирал стадий на заболяването, ниска диференциация на тумора (Gleason score), но експресията на Caspase-3 в тъкани на простатен карцином не показва зависимост от стойностите на PSA (простатспецифичен антиген) и далечните метастази. Gu J et al. (2015) търсят зависимост между проапоптотичния сигнален път, оценен чрез Caspase-3 и инхибиторите на апоптозата: ливин и сървивин. Данните от изследването сочат, че двата инхибиторни протеина са в негативна корелация с експресията на Caspase-3. Според авторите трите протеина: Caspase-3, ливин и сървивин са тясно свързани с появата и развитието на простатния карцином.

В настоящото изследване не се осъществи анализ между T стадия на тумора и експресията на Caspase-3, защото с изключение на двама пациента, които бяха във II-ри стадий, останалите са в I-ви стадий. Не беше извършен сравнителен

анализ на експресията на Caspase-3 спрямо лимфоваскуларна инвазия и лимфни метастази, защото туморни емболи в съдове не бяха установени и не бяха налични данни за лимфния статус на изследваните пациенти.

Акцент на изследванията на Zhang Z. et al. (2015) са причините за поява на рецидиви след проведена лъчетерапия при колоректален карцином. След облъчване, колоректалните туморни клетки претърпяват апоптоза и некроза, синтезират разцепена Caspase-3 и протеин High-mobility group box 1 (HMGB1) и когато се култивират с макар и малко на брой живи туморни клетки, те стимулират тяхната пролиферация. Авторите стигат до заключението, че както апоптотичните, така и некротичните клетки могат да стимулират пролиферацията на оцелелите от лъчетерапия клетки.

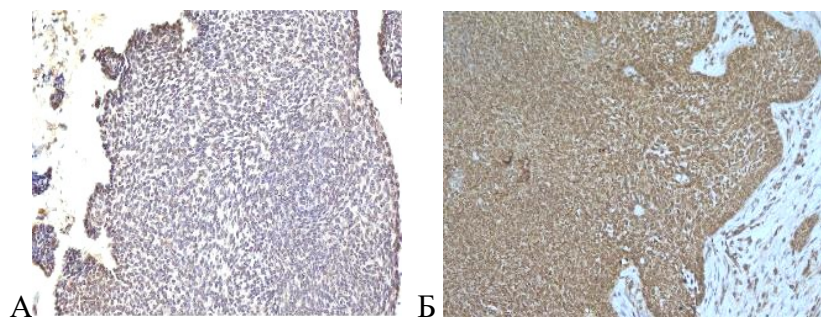
Devarajan E et al. (2002) установяват, че около $\frac{3}{4}$ от туморите на млечната жлеза както и съседните нетуморни тъкани не съдържат транскрипти на Caspase-3 и не експресират протеина Caspase-3. Независимо от липсата на Caspase-3, нивата на Caspase-8 и Caspase-9 остават непроменени. Според авторите загубата на експресия на Caspase-3 спомага за оцеляване на неопластичните клетки при карцином на гърдата.

4.3. Експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК и ПКК и в съседната нетуморна тъкан

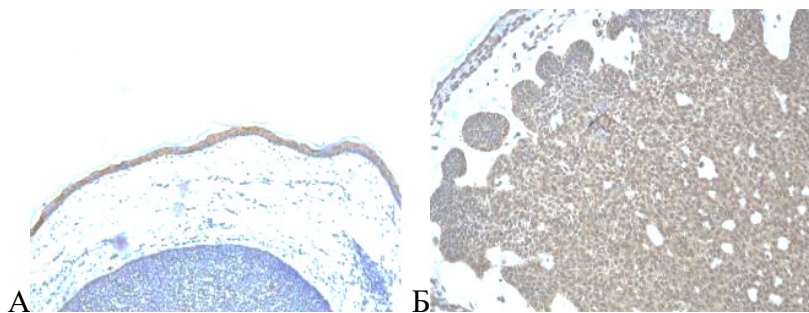
4.3.1. Цитоплазмена и нуклеарна експресия на RIPK3 в туморна тъкан на БЦК и в съседната нетуморна тъкан

Цитоплазмената и ядрена експресия на RIPK3 е изследвана в туморната тъкан на всички 91 пациента. Средната стойност на цитоплазмената експресия определена

чрез H- score при БЦК $121,72 \pm 98,66$, като минималната стойност е 0, а максималната е 300 (фигура 31А, 31Б, 32А). Средната стойност на ядрената експресия на RIPK3 при БЦК е $117,56 \pm 109,12$, като минималната стойност е 0, а максималната е 300 (фигура 32Б). Средната стойност на цитоплазмената експресия на RIPK3 в нетуморна тъкан при БЦК е $68,35 \pm 40,28$ (фигура 32А). Нуклеарната експресия на RIPK3 в нетуморната тъкан е със средна стойност $101,04 \pm 77,09$ (фигура 33Б).



Фигура 31. А. Ниска до липсваща цитоплазмена експресия на RIPK3 при БЦК. ИХХ x200. Б. Интензивна цитоплазмена експресия на RIPK3 при БЦК. ИХХ x200.



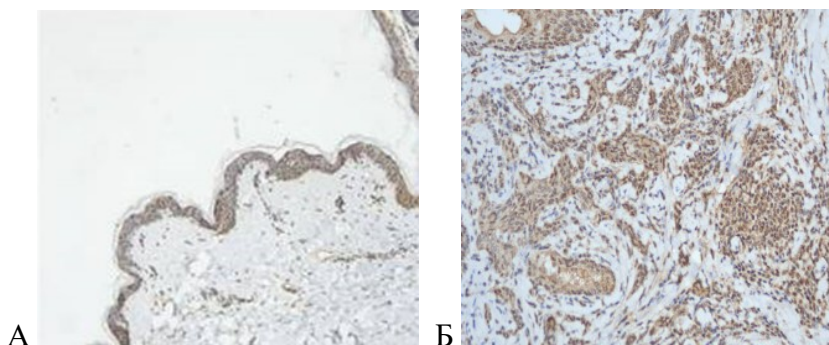
Фигура 32. А. Липсваща цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан и слабо изразена в нетуморна тъкан

при БЦК. IХХ х100. Б. Ядрена експресия в туморна и нетуморна тъкан при БЦК. IХХ х200.

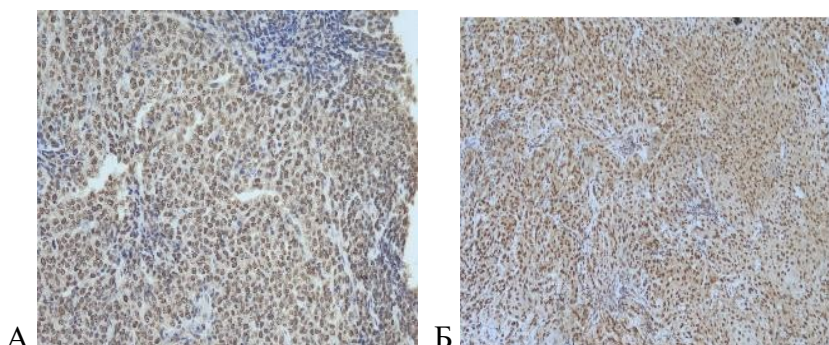
Средната стойност на цитоплазмената експресия в туморната тъкан при настоящото проучване почти не се различава от средната стойност на цитоплазмената експресия на RIPK3 при мамарен карцином, определена също чрез H-score (Стоева М, 2022). По отношение на средната нуклеарна стойност при мамарен карцином, стойностите са доста по-високи в сравнение с настоящото изследване (Стоева М, 2022). Цитоплазмената експресия на RIPK3 при бъбречен карцином е малко по-висока от тази при БЦК, но нуклеарната е четири пъти по-ниска (Янулова Н, 2024). Посредством човешки *in vitro* колоректални карциномни линии, Feng X et al. (2015) установяват, че свръхекспресията на RIPK3 се асоциира с инхибиране на туморната пролиферация, миграция и инвазия.

5.3.2. Цитоплазмена и нуклеарна експресия на RIPK3 в туморна тъкан при ПКК и в съседна нетуморна тъкан

Средната стойност на цитоплазмената експресия, определена чрез H-score при ПКК е $88,93 \pm 74,23$, като минималната стойност е 0, а максималната е 222. Средната стойност на ядрена експресия на RIPK3 е $119,00 \pm 99,01$, като минималната стойност е 0, а максималната е 300. Средната стойност на експресията на RIPK3 в ядрата на нетуморните клетки е $45,95 \pm 79,13$, докато цитоплазмената експресия в нетуморната тъкан е $34,23 \pm 42,42$.



Фигура 33. А. Слаба цитоплазмена експресия на RIPK3 в съседна нетуморна тъкан при ПКК. ИХХ x 100. Б. Умерена до изразена ядрена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на ПКК. ИХХ x100.



Фигура 34. А. Изразена ядрена и Б. изразена ядрена и слабо изразена цитоплазмена експресия в туморните клетки на RIPK3 при ПКК. ИХХ x200.

При КРК (Стефанова Н, 2018) анализът на цитоплазмената експресия на RIPK3 в съседната нетуморна тъкан, на базата на средните стойности е почти четири пъти по-висока в сравнение с настоящите резултати. Стоева М (2022) определя цитоплазмената експресия на RIPK3 в 19 случая с пролиферативен и непролиферативен тип

фиброкистична болест. Средната стойност в групата на пролиферативния тип фиброкистична болест е повече от пет пъти по-висока, отколкото в нетуморната тъкан на ПМК. Пет пъти по-високи стойности са отчетени от Янулова Н (2024) в цитоплазмата на клетките в съседство на бъбречноклетъчен карцином (Янулова Н, 2024).

Калчев К (2020) открива, че експресията на RIPK3 в туморните клетки на простатен карцином е по-висока в сравнение с експресията в жлезите без PIN (простатна интраепителна неоплазия). Най-висока е експресията на антиятлото в туморните жлези и намалява при диспластичните и бенигнените жлези.

Взети заедно получените от нас резултати и тези от литературата показват, че експресията на RIPK3 е различна, както по отношение на туморната, така и по отношение на нетуморната тъкан.

4.3.3. Сравнителен анализ между средните стойности на експресия на *RIPK3* в туморната тъкан и в съседната, нетуморна тъкан при пациенти с БЦК и ПМК.

На таблица 37 са представени средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната и съседната нетуморна тъкан. Средната стойност на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК е по-висока в сравнение с нетуморната тъкан и разликата е статистически значима ($p=0,0007$) при БЦК. По отношение на нуклеарната експресия подобна разлика не се установи ($p=0,31$) (Таблица 38).

Таблица 37. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморна и нетуморна тъкан при пациенти с БЦК.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
В туморни клетки	46	121,72	98,66	0,0007
В нетуморни клетки	46	68,35	40,28	

Таблица 38. Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 в туморна и нетуморна тъкан при пациенти с БЦК.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
В туморни клетки	46	117,57	109,12	0,31
В нетуморни клетки	46	101,04	77,09	

На таблица 39 и 40 са представени средните стойности на цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 в туморна тъкан при пациенти с ПКК и в съседната нетуморна тъкан. Средните стойности на цитоплазмената и ядрена експресия на RIPK3 в туморната тъкан са по-високи спрямо нетуморната тъкан и тази разлика е сигнификантна (за цитоплазмената $p=0,00001$ и ядрената $p=00006$).

Таблица 39. Цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморна тъкан при пациенти с ПМК и в съседната нетуморна тъкан.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
В туморни клетки	45	88,93	74,23	0,00001
В нетуморни клетки	45	34,23	42,42	

Таблица 40. Зависимост между ядрената експресия на RIPK в туморна тъкан при пациенти с ПМК и в съседна нетуморна тъкан.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
В туморни клетки	45	119,00	99,01	0,000006
В нетуморни клетки	45	45,95	79,13	

Ние установихме, че цитоплазмената и нуклерна експресия на RIPK3 в туморната тъкан на ПМК е по-висока в сравнение с нетуморната тъкан, докато при БЦК това се отнася само за цитоплазмената позитивност.

Янулова М (2024), също отчита статистически значима разлика между цитоплазмената експресия в туморната и нетуморна тъкан при бъбречноклетъчен карцином, но в туморната тъкан RIPK3 експресията е по-ниска спрямо тази в съседната нетуморна тъкан. Получените от нас резултати се различават и от тези на Feng X et al. (2015), които

оценяват имунохистохимичната цитоплазмена експресия на RIPK3 при колоректален карцином и я сравняват с експресията в запазена тъкан, използвайки тристепенна скала за оценка на интензивността. Те установяват по-високо цитоплазмено ниво на експресия на RIPK3 в нормалната тъкан в сравнение с туморната тъкан. Moriwaki et al. (2015) също установяват понижено ниво на тъканна експресия на RIPK3 при КРК, в сравнение със съседната нетуморна тъкан, докато подобна зависимост не е установена от Стефанова Н (2018), която също изследва КРК. Сточева М (2022) изследва цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморна тъкан на мамарен карцином и в контролна група на фиброкистичната болест и установява, че експресията в нетуморната тъкан е по-висока в сравнение с туморната.

4.3.4. Сравнителен анализ на експресия на RIPK3 при БЦК и ПКК в зависимост от клинично-морфологичните характеристики

4.3.4.1. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и възрастта на пациентите.

На таблица 41 и 42 са посочени средните стойности на цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 в туморната тъкан при БЦК във връзка с възрастта на пациентите. Пациентите са групирани в две възрастови групи: до 60 г включително и над 60 г. Статистически значима зависимост не се установи между цитоплазмената експресия на RIPK3 и възрастта на пациентите с БЦК ($p=0,44$). Подобна зависимост липсва и при нуклеарната експресия ($p=0,48$).

Таблица 41. Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на пациенти с БЦК в зависимост от възрастта.

Възраст	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
31-60 г.	27	135,16	93, 64	0,44
61-90 г	19	112,26	102,72	

Таблица 42. Средни стойности на ядрена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на пациенти с БЦК в зависимост от възрастта.

Възраст	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
31-60 г.	27	131,26	104,86	0,48
61-90 г.	19	107,93	112,91	

Средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на ПКК във връзка с възрастта на пациентите са посочени на Таблица 43. Между цитоплазмената експресия на RIPK-3 в туморната тъкан на ПКК и възрастта на пациентите има статистическа разлика, но тя е минимална ($p=0,048$).

При ПКК статистически значима зависимост не се установи за ядрената експресия спрямо възрастта ($p=0,89$).

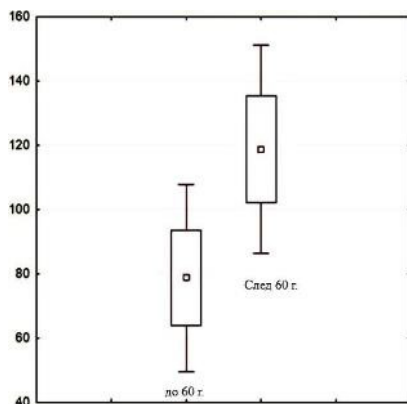
Таблица 43. Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на пациенти с ПКК във връзка с възрастта.

Възраст	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
31-60 г.	25	78,70	72,83	0,048
61- 90 г.	20	118,76	68,19	

Таблица 44. Средни стойности на ядрена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на ПКК на пациенти с ПКК във връзка с възрастта.

Възраст	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3 в туморните клетки	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
31-60 г.	25	123,84	104,86	0,89
61- 90 г.	20	119,90	96,33	

На фигура е представена зависимостта на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на пациенти с ПКК във връзка с възрастта. С увеличаване на възрастта се повишава цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на пациенти с ПКК.



Фигура 35. Графично представяне на средните стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3 в туморната тъкан на пациенти с ПМК във връзка с възрастта.

Получените от нас резултати показват, че с увеличаване на възрастта на пациентите с ПМК на кожата се увеличава цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан. Получените данни не се различават от тези при бърбечноклетъчен карцином (Янулова Н, 2024). Експресията на RIPK3 в туморната тъкан при бърбечноклетъчен карцином се увеличава с напредване на възрастта на пациентите. При КРК, Feng X et al. (2015) не установяват зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан и възрастта на пациентите. При неговото изследване, пациентите са били разпределени в две групи: < 65 години и > 65 години. При карцином на гърдата не се установява зависимост между двата показателя: тъканна експресия на RIPK3 и възраст на пациентите (Стоева М, 2022). При белодробен карцином, Chung J. et al. (2019) също не намират зависимост между експресията на RIPK3 в цитоплазмата на туморните клетки и възрастта на пациентите.

По отношение на БЦК липсва зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и възрастта на пациентите.

Взети заедно настоящите резултати и данните от литературата показват, че цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан може да зависи не само от органната локализация на тумора, но и от хистологичния му вариант.

Ние не установихме зависимост между нуклеарната експресия на RIPK3 при двата карцинома: БЦК и ПМК във връзка с възрастта на пациентите. Подобна липса на зависимост е установена и при бъбречноклетъчен карцином (Янулова Н, 2024). Н. Янулова разпределя пациентите в три групи: първа група до 44 г, втора между 45 и 64 г и трета над 65 години. При колоректален карцином, също нуклеарната експресия на RIPK3 не показва зависимост от възрастта. Н. Стефанова Н (2018) разделя ядрената експресия на RIPK3 в туморните клетки на две категории: ниска и висока степен според cut off стойността, а пациентите са разделени в две групи: над и под 65 години.

4.3.4.2 Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и пола на пациентите

Сигнификантна разлика между ядрената и цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК във връзка с пола не се установи ($p=0,35$ за цитоплазмената и $p=0,42$ за нуклеарната експресия). На таблица 45 и 46 са представени средните стойности на цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК.

Таблица 45. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и пола при пациенти с БЦК.

Пол	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Мъже	20	137,50	92,57	0,35
Жени	26	109,58	103,23	

Таблица 46. Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и пола при пациенти с БЦК.

Пол	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Мъже	20	132,6	103,08	0,42
Жени	26	106,03	114,18	

Средните стойности на цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 в туморната тъкан на ПМК са дадени на таблица 47 и 48. Полът на пациентите с ПМК не показва зависимост от цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK3 ($p=0,38$ за цитоплазмената и $p= 0,43$ за ядрената експресия).

Таблица 47. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и пола на пациенти с ПМК.

Пол	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Мъже	25	88,08	73,38	0,38
Жени	20	99,75	73,75	

Таблица 48. Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и пола на пациенти с ПКК.

Пол	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрена експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Мъже	25	105,76	98,04	0,43
Жени	20	132,1	98,55	

Ние установихме, че двете локализации на RIPK3: цитоплазмена и нуклеарна при двата карцинома на кожата: БЦК и ПКК не показват зависимост от пола. Подобна липса на зависимост между цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 от пола е установена при бъбречноклетъчен карцином (Янулова Н, 2024). Цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан не показва зависимост от пола при пациентите с КРК (Feng X. et al., 2015; Стефанова Н, 2018). Подобни резултати са съобщени и от Chung J et al., (2019) при пациенти с белодробен аденокарцином, при които в туморната тъкан е анализирана, както цитоплазмена, така и нуклеарна експресия на RIPK3, като е използвана четиристепенна скала (0, 1+, 2+, 3+). Липсата на зависимост между ядрената експресия на RIPK3 от пола на пациентите с БЦК и ПКК не се различава от данните при бъбречноклетъчен и мамарен карцином, при които също не е установена зависимост (Стоева М, 2022, Янулова Н, 2024).

4.3.4.3. Зависимост между експресия на RIPK3 и рисковата група на БЦК.

На таблица 49 са посочени средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 при различните хистологични варианти на БЦК, обединени в зависимост от риска. Между цитоплазмената експресия на RIPK3 и БЦК с

нисък и висок риск има статистическа разлика, но тя е минимална ($p=0,048$). Същото се установи и за нуклеарната експресия ($p=0,047$). При високорисковите БЦК цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK-3 са по-високи в сравнение с нискорисковата група.

Таблица 49. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и рисковата група на БЦК.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Нисък риск	41	112,59	93,74	0,048
Висок риск	5	196,60	117,39	

Таблица 50. Зависимост между ядрена експресия на RIPK3 и рисковата група на БЦК.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Нисък риск	41	108,22	105,17	0,047
Висок риск	5	204,20	128,80	

4.3.4.4. Зависимост между експресия на RIPK3 и хистологичния вариант на ПКК

Средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 във връзка с хистологичния вариант на ПКК са посочени на таблица 51. Липсва статистически значима зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и хистологичния вариант на ПКК ($p=0,10$). На таблица 52 са представени данните на нуклеарната експресия на RIPK3 при ПКК относно хистологичния вариант. Не се установява статистически сигнификантна зависимост ($p=0,25$).

Таблица 51. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и хистологичния вариант на ПКК.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Конвенционален ПКК	32	74,38	73,81	0,10
Верукозен ПКК	5	128,20	50,64	
Кератоакантом	7	127,43	74,06	

Таблица 52. Зависимост между ядрената експресия RIPK3 и хистологичния вариант на ПКК.

Група	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Конвенционален ПКК	32	103,59	102,24	0,25
Верукозен ПКК	5	157,6	76,28	
Кератоакантом	7	161,86	87,87	

Резултатите при БЦК, показват, че цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 относно рисковата група на БЦК показват статистическа разлика, но тя е минимална. При ПКК липсва зависимост между цитоплазмената и нуклеарна експресия във връзка с хистологичния вариант на ПКК. Цитоплазмената експресия на RIPK3 при лобуларен мамарен карцином е по-висока в сравнение с дукталния, но статистическата значимост е минимална (Стоева М, 2022). Нуклеарната експресия на RIPK3 не се различава между дукталния и лобуларния карцином. При бъбречноклетъчен карцином цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 не показват зависимост от хистологичния вариант: папиларен, хромофобен и светлоклетъчен (Янулова Н, 2024).

4.3.4.5. Зависимост между експресия на RIPK3 и степен на диференциация на ПКК

На таблица 53 са представени средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 във връзка със степента на диференциация на ПКК. Липсва статистически значима разлика за цитоплазмената експресия ($p=0,48$). Статистически значима разлика не се установи и за нуклеарната експресия ($p=0,30$) (таблица 54).

Таблица 53. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и степента на диференциация на ПКК.

Грейд	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Високодиференциран	29	92,69	68,88	0,48
Умеренкодиференциран	14	87,50	85,80	
Нискодиференциран	1	0,00		

Таблица 54. Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и степента на диференциация на ПКК.

Грейд	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрена експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Високодиференциран	34	108,47	100,34	0,30
Умеренкодиференциран	12	147,50	136,20	

Нашите резултати не показват статистически значима зависимост между цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK3 в зависимост от степента на диференциация на ПКК. Получените от нас резултати са в съответствие с данните при колоректален карцином при които също липсва

сигнификантна зависимост между цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 и степента на диференциация (Feng et al., 2015, Стефанова Н, 2018). За разлика от нас, при бъбречноклетъчен карцином е установена зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и степента на диференциация. Тумори с диференциация G2 имат по-висока експресия на RIPK3, отколкото тези с G4 (Янулова Н, 2024). Подобни данните са получени и при мамарен карцином. Висока цитоплазмена експресия се среща при по-добре диференцираните тумори (Стоева М, 2022).

Липса на зависимост между нуклеарната експресия на RIPK3 и степента на диференциация е установена при мамарен и бъбречноклетъчен карцином (Стоева М, 2022, Янулова Н, 2024).

4.3.4.6. Зависимост между експресията на RIPK3 и площта на некроза при БЦК и ПКК.

На таблица 55 са посочени средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 и площта на некроза при БЦК. Между цитоплазмената експресия на RIPK3 и присъствието на некрози има статистически значима зависимост ($p=0,011$). Цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК е по-висока, когато има некроза в сравнение с групата при които тя липсва.

Таблица 55. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и площ на туморната некроза при пациенти с БЦК.

Площ некроза	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Липсва некроза	41	109,1	93,95	0,011
Некроза до 10 % от площта	5	225,2	78,83	

Средните стойности на ядрената експресия на RIPK3 във връзка с площта на некрозата при пациенти с БЦК са представени на таблица 56. Сигнификантна разлика е установена между ядрената експресия на RIPK3 и присъствието на некрози ($p=0,006$). При наличие на некрози, експресията на RIPK3 е значително по-висока спрямо групата в която липсват.

Таблица 56. Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и площ на туморната некроза при пациенти с БЦК.

Площ некроза	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	Р-стойност
Липсва некроза	41	103,41	105,32	0,006
Некроза до 10 % от площта	5	243,6	68,11	

Цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 в туморната тъкан на ПКК са показани на таблица 57 и 58. Статистически значима разлика между цитоплазмената експресия и площта на некрози в туморната тъкан при пациенти с ПКК липсва ($p=0,06$). По отношение на нуклеарната експресия при ПКК между двата показателя стойностите са гранични (0,0498).

Таблица 57. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и площ на туморната некроза при пациенти с ПКК.

Площ некроза	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Липсва некроза	33	76,00	73,99	0,06
Некроза до 10% от площта	8	111,38	59,50	
Некроза от 10% до 30% от площта	3	171,33	59,37	

Таблица 58. Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и площ на туморната некроза при пациенти с ПКК.

Площ некроза	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
0	33	99,00	99,18	0,0498
1	8	166,50	80,20	
2	3	212,33	46,72	

Ние установихме, че цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 в туморната тъкан при БЦК е по-висока когато има некроза в сравнение с групата в която такава липсва. Получените от нас резултати за БЦК се различават от тези при бъбречноклетъчен карцином при който не е установена сигнификантна разлика между експресията на RIPK3 във връзка с некрозата за двете локализации на антиялото (Янулова Н, 2024). За разлика от БЦК, при ПКК няма сигнификантна зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и туморната некроза, докато при нуклеарната експресия стойностите са гранични.

4.3.4.7. Зависимост между експресия на RIPK3 и TILs при БЦК и ПКК

На таблица 59 са посочени средните стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3 при БЦК във връзка с TILs. Ние установихме, че между цитоплазмената експресия на RIPK3 и различната степен на изразеност на TILs има статистически значима разлика ($p=0,036$). Интензивността на маркера за некроптоза е по-висок при по-изразена инфилтрация на тумора от TILs.

Подобна зависимост е установена и при ядрената експресия ($p=0,025$) (фигура 60).

Таблица 59. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и степента на изразеност на TILs при пациенти с БЦК.

TILs	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Липсват	18	114,00	94,13	0,036
Слабо изразени	16	86,31	97,95	
Умерено изразени	12	180,50	85,77	

Таблица 60. Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и степента на изразеност на TILs при пациенти с БЦК.

TILs	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Липсват	18	109,89	102,30	0,025
Слабо изразени	16	76,81	105,40	
Умерено изразени	12	187,58	103,96	

Средните стойности на цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 при ПКК са посочени на таблици 61 и 62.

Ние установихме, че има сигнификантна разлика между цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK3 при ПКК и степента на изразеност на TILs ($p=0,00007$ за цитоплазмената и $p=0,006$ за нуклеарната експресия). При висока експресия на RIPK3 има по-изразена инфилтрация от TILs.

Таблица 61. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и степен на изразеност на TILs при пациенти с ПКК.

TILs	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Липсват	14	53,29	57,74	0,00007
Слабо изразени	22	78,05	68,03	
Умерено изразени	8	181,25	33,42	

Таблица 62. Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и степен на изразеност на TILs при пациенти с ПКК.

TILs	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Липсват	14	77,50	80,93	0,006
Слабо изразени	22	112,09	104,06	
Умерено изразени	8	210,63	48,81	

Получените от нас резултати показват, че при БЦК и ПКК цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 са в права корелационна зависимост от TILs. Високата експресия на антиялото е асоциирана с по-висок интензитет на TILs в туморната тъкан. Получените от нас данни се различават отчасти от тези при колоректален карцином (Стефанова Н, 2018). Н. Стефанова установява обратна зависимост между TILs и цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан, при висока експресия на антиялото броят на TILs е нисък, докато високата интензивност на TILs обикновено е

асоциирана с негативна реакция на RIPK3. При анализа на нуклеарната експресия, тя установява права корелационна зависимост, високата експресия на RIPK3 корелира със силно изразена имунна реакция.

При бърбечноклетъчен карцином не е открита зависимост между цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK3 и TILs (Янулова Н, 2024).

Ролята на TILs в туморната тъкан е обект на задълбочена дискусия. Известно е, че апоптозата не води до възпалителна реакция за разлика от некроптозата. Има данни, че в туморната тъкан на хепатоцелуларен карцином при човек TILs са увеличени и това е асоциирано с повишена експресия на гени, свързани с некроптозата, като: *RIPK1*, *RIPK3*, *MLKL* (Nicolè L et al. 2022). Според други изследвания има позитивна корелация между некроптотичните протеини: RIPK3, MLKL, pMLKL и CD163+ M2 макрофаги, докато е открита обратна зависимост със CD8+ Т лимфоцитите при недребноклетъчен белодробен карцином (Duangthim N et al. 2024). Авторите считат, че туморната микросреда при недребноклетъчен белодробен карцином има супресивно действие и ключовите некроптотични протеини, особено RIPK3 могат да бъдат свързани с терапевтична резистентност (Duangthim N et al. 2024).

Медиаторите и възпалителните клетки са важни съставки на локалната микросреда при туморите (Mantovani A et al., 2008). При някои злокачествени процеси, възпалителната реакция предхожда появата на тумора, докато при други тумори тя индуцира възпалителна микросреда. Според Mantovani A (2008) възпалението в туморната среда има стимулиращо действие върху злокачествения процес, защото благоприятства ангиогенезата, клетъчната пролиферация и оцеляване и стимулира метастазирането.

Получените от нас резултати са в подкрепа на схващането за имуногенните свойства на некроптозата, защото маркера за некроптоза RIPK3 е повишен при двата карцинома на кожата, когато интензитетът на TILs е най-висок.

Данните получени при имунохистохимичния анализ на RIPK3 в туморната тъкан на КРК показват, че високата цитоплазмена експресия на анти тялото инхибира имунната реакция, докато локализиранят в ядрото RIPK3 активира вродения имунитет (Стефанова Н, 2018). Според нас, при карцином на кожата, независимо от хистологичния вариант, високата цитоплазмена и нуклеарна експресия на RIPK3 стимулира TILs.

4.3.4.8. Зависимост между експресията на RIPK3 и локализацията на БЦК и ПКК

На таблици 63 и 64 са дадени средните стойности на цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК във връзка с локализацията му. Липсва статистически значима разлика между експресия на RIPK3 във връзка с локализацията ($p=0,66$ за цитоплазмена и $p=0,66$ за ядрена експресия).

Таблица 63. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и локализацията на БЦК.

Локализация	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Глава	37	127,46	98,55	0,66
Трункус	4	132,00	125,64	
Крайници	2	49,00	69,30	
Пенис/Вулва	3	85,67	100,38	

Таблица 64. Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и локализацията на БЦК.

Локализация	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Глава	37	124,35	110,53	0,66
Трункус	4	128,00	122,63	
Крайници	2	47,50	67,18	
Пенис/Вулва	3	66,67	115,47	

Средните стойности на цитоплазмената и нуклеарната експресия на RIPK3 в туморната тъкан на ПКК във връзка с локализацията на тумора е посочена на таблица 65 и 66. Сигнификантна зависимост се установи между цитоплазмената експресия на RIPK3 в зависимост от локализацията на ПКК ($p=0,02$). Най-висока е експресията при туморните неоплазми, локализирани в областта на шията и крайниците, а най-ниска в областта на главата. Локализацията на ПКК в областта на половите органи не е включена в анализа на средните стойности, защото пациентът е само един.

Таблица 65. Зависимост между цитоплазмената експресия на RIPK3 и локализацията на ПКК.

Локализация	Брой случаи, N	Средни стойности на цитоплазмена експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Глава	31	72,26	69,71	0,02
Шия	2	198,50	33,23	
Трункус	2	76,50	10,61	
Крайници	8	140,38	63,12	
Пенис/Вулва	1	-		

На таблица 66 са представени средните стойности на ядрената експресия на RIPK3 в зависимост от локализацията на ПКК. Не се открива статистически значима разлика между двата показателя ($p=0,08$).

Таблица 66. *Зависимост между ядрената експресия на RIPK3 и локализацията на ПКК.*

Локализация	Брой случаи, N	Средни стойности на ядрената експресия на RIPK3	Стандартно отклонение (SD)	P-стойност
Глава	31	91,06	89,83	0,08
Шия	2	236,50	13,44	
Трункус	2	168,50	47,38	
Крайници	8	200,38	87,15	
Пенис/Вулва	1	-		

Получените от нас резултати показват, че цитоплазмената експресия на RIPK3 при ПКК в туморната тъкан зависи от локализацията на ПКК. Относно БЦК, липсва сигнификантна зависимост на цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 от локализацията на тумора. Не се установи статистическа зависимост между нуклеарната експресия на RIPK3 в туморната тъкан на ПКК и локализацията му.

Получените от нас резултати за цитоплазмената експресия на ПКК, съответстват на данните получени от Н. Стефанова (2018), която открива сигнификантна разлика между експресия на RIPK3 и локализация на КРК. При локализация на карцинома в дясната половина на дебелото черво има ниска експресия на антитялото, а при левостранна локализация, експресията е висока. По отношения на ядрената експресия на RIPK3 при двата хистологични варианта на кар-

цином на кожата, подобно на нас, тя не установява сигни-
фикантна зависимост между двете локализации. Липса на
зависимост между нуклеарната експресия на RIPK3 в ту-
морната тъкан от локализацията е установена и при бъбреч-
ноклетъчен карцином (Янулова Н, 2024).

Липсата на зависимост между цитоплазмената експресия
от локализацията на БЦК не се различават от данните полу-
чени при колоректален и бъбречен карцином (Feng X. et al.
2015; Янулова Н, 2024).

RIPK3 се открива в ядрото и клетъчната цитоплазма на
двата типа карциноми на кожата: БЦК и ПКК.
Изследванията показват, че след активиране на
некроптозата настъпва транслокация на RIPK3 от ядрото в
цитоплазмата на клетките и този експорт е важен за
некроптотичната клетъчна смърт (Weber K et al. 2018).

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение, проведеното проучване предоставя нова информация за изразеността и локализацията на експресията на RIPK3 и Casp-3 в БЦК и ПКК, като очертава възможността тези маркери да бъдат използвани в бъдеще като мощни диагностични и прогностични инструменти. Необходимо е допълнително проучване с по-големи кохорти, както и интегриране на данни от геномни анализи, за да се дефинира по-точно тяхната роля в патогенезата на немеланомните кожни карциноми и потенциалът им в персонализираната онкология.

VI. ИЗВОДИ

1. Не се открива статистическа значима разлика за цитоплазмения и нуклеарен интензитет на Caspase-3 в туморната и нетуморна тъкан на БЦК.
2. Цитоплазмената експресия на Caspase-3 в туморните клетки на ПМК е по-висока в сравнение с нетуморната тъкан, за разлика от нуклеарната експресия при която няма статистически значима разлика.
3. Цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК и ПМК не корелира с възрастта на пациентите.
4. При БЦК и ПМК цитоплазмената и нуклеарна експресия на апоптотичния протеин не показва зависимост от пола, площта на туморната некроза, TILs в туморната тъкан и от локализацията на тумора.
5. Експресията на Caspase-3 в цитоплазмата и ядрата на БЦК и ПМК не показва зависимост от рисковата стратификация на БЦК и хистологичните варианти на ПМК.
6. Умерено и нискодиференцираните карциноми (G2+G3) са с по-високи стойности на цитоплазмената и нуклеарна Caspase-3 в сравнение с вискодиференцираните ПМК.
7. Цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК и ПМК е по-висока в сравнение със съседната нетуморна тъкан.
8. Нуклеарната експресия на RIPK3 в туморната тъкан на ПМК е по-висока спрямо нетуморната тъкан. Подобна зависимост липсва при БЦК.
9. С увеличаване на възрастта се повишава цитоплазмената експресия на RIPK-3 в туморната тъкан на пациенти с ПМК.

10. Липсва зависимост между цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК и ПКК и пола на пациентите.
11. При БЦК цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 е по-висока при високорисковите в сравнение с нискорисковите хистологични варианти. При ПКК липсва зависимост на експресията на RIPK3 в зависимост от хистологичния вариант за двете локализации на антитялото.
12. Експресията на RIPK3 в клетъчната цитоплазма и ядрото не показва зависимост от степента на диференциация на ПКК.
13. Цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 при БЦК е по-висока при тумори при които има некроза в сравнение с тези, при които липсва.
14. Интензивността на маркера за некроптоза е висока в цитоплазмата и ядрото на БЦК и ПКК при изразена инфилтрация на тумора от TILs.
15. Експресията на RIPK3 в клетъчната цитоплазма и ядрото не показва зависимост от локализацията на БЦК.
16. Цитоплазмената експресия на RIPK3 е най-висока при ПКК, локализирани в областта на шията и крайниците, а най-ниска в областта на главата.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

7.1. Научни приноси с оригинален характер

- Осъществен е комплексен клинико-морфологичен и имунохистохимичен анализ на Caspase-3, маркер за апоптоза при пациенти с БЦК и ПМК.
- Анализирана е експресията на RIPK3, маркер за некроптоза във връзка с клинико-морфологичните характеристики на пациенти с БЦК и ПМК.

7.2. Научни приноси с практично-приложен характер

- Доказано е, че БЦК и ПМК се различават по цитоплазмената експресия на Caspase-3 в туморната тъкан в сравнение с нетуморната тъкан.
- Установено е, че цитоплазмената и нуклеарна експресия на Caspase-3 в туморната тъкан на БЦК и ПМК не зависят от следните клинико-морфологични показатели: възраст, пол, площ на туморната некроза, рисковата стратификация на БЦК, хистологичния вариант на ПМК, TILs и от локализацията на тумора.
- Доказано е, че с намаляване на диференциацията на ПМК се увеличава цитоплазмената и нуклеарна експресия на маркера за апоптоза Caspase-3.
- Запазената нуклеарна и цитоплазмена експресия на Caspase-3 в туморната тъкан при БЦК, както и повишената цитоплазмена и непроменената ядрена експресия на анти тялото при ПМК, предполагат активна апоптотична форма на клетъчна смърт, която може да бъде индуцирана след прилагане на химио- и лъчетерапия.

- Установено е, че цитоплазмената експресия на RIPK3 в туморната тъкан на БЦК и ПМК е по-висока в сравнение със съседната нетуморна тъкан.
- Оценена е цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 при рисковите групи на БЦК.
- Доказано е, че цитоплазмената и нуклеарна експресия на RIPK3 при БЦК е по-висока при тумори с некроза и изразена инфилтрация на тумора от TILs.
- Повишената цитоплазмена експресия на RIPK3 при БЦК и ПМК, както и повишената при ПМК и непроменена при БЦК нуклеарна експресия на антиятлото, подкрепят наличието на активен некроптолитичен път на клетъчна смърт, който може да се индуцира от приложена терапия.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Пълнотекстови публикации

1. **Vasilev P**, Bakardzhiev I. Expression of apoptosis and necroptosis markers caspase-3 and receptor-interacting protein kinase-3 in malignant neoplasms. Varna Medical Forum, 2023; Vol 12 (1):122-133
2. **Vasilev P**. Updating the classification of cutaneous squamous sell carcinoma. Varna Medical Forum, 2023; Vol 12 (2):25-38

С БЛАГОДАРНОСТ

- *На научния ми ръководител проф. д-р Мария Цанева, д.м., за напътствията и помощта.*
- *На проф. д-р Илко Бакърджиев, д.м. за отзивчивостта и подкрепата.*
- *На колегите ми от Клиниката по обща и клинична патология, за професионализма и споделения опит.*