

УМБАЛСМ „Н. И. ПИРОГОВ“

Д-р Тодор Юриев Джендов

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

по научна специалност „Гръдна хирургия“,

на тема

**Мултимодален подход при лечението на езофагеалния карцином.
Прогностични и предиктивни маркери.**

Научен ръководител:

доц. д-р Стоян Сопотенски, дм

София

2022

Дисертационния труд съдържа 146 страници, от които 23 страници библиографска справка. Илюстриран е с 33 фигури и 13 таблици.

Библиографската справка включва 301 литературни източника.

Проучванията са осъществени в Първа хирургична клиника на УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”, София, България и в Клиниката по хирургия на УБ, Линшьопинг, Швеция.

Статистическата обработка на данните е осъществена от автора на дисертационния труд.

Дисертационния труд е обсъден, приет и насочен за защита от Научен съвет при УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”, София.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 14.09.2022 год. от 13:30 в Рапортната зала на Специализиран травматологичен комплекс, етаж 5, УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”, София.

Материалите по защитата са на разположение в отдел „НДСК и ВВУНО” при УМБАЛСМ „Н.И. Пирогов” и са публикувани на официалната страница на УМБАЛСМ „Н.И. Пирогов” - <https://pirogov.eu/>

Научно жури:

Проф. Д-р Александър Червенияков дмн – УМБАЛ „Н.И.Пирогов”, София

Проф. Д-р Христо Шивачев, дм – УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”, София

Проф. Д-р Деян Йорданов дм – ВМА, София

Проф. Д-р Антоний Филипов, дм – УМБАЛ „Св. Иван Рилски”, София

Доц. Д-р Теодор Атанасов, дм – УМБАЛ „Софиямед”, София

Резервни членове:

Проф. Д-р Владислав Христов дм – УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”, София

Доц. Д-р Михаил Табаков, дм – УМБАЛ „Св. Иван Рилски”, София

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на използваните съкращения.....	5
1. Въведение.....	7
2. Цел и задачи.....	9
3. Материали и методи.....	10
3.1 Дизайн на проучването и контингент пациенти.....	10
3.2 Статистически методи.....	23
4. Резултати.....	24
4.1 Демографски и клинични характеристики.....	24
4.2 Преживяемост според пол и възраст.....	28
4.3 Преживяемост според коморбидитет.....	31
4.4 Преживяемост според Т стадий и дължина на тумора.....	34
4.5 Преживяемост според N стадий.....	37
4.6 Съотношение метастатични към общ брой лимфни възли.....	39
4.7 Нерадикална резекция.....	41
4.8 Резултати от генетичното проучване.....	42
5. Обсъждане.....	47
6. Заключение.....	66
7. Изводи.....	68
8. Публикации, свързани с дисертационния труд.....	69
Приложение 1 WHO класификация на туморите на хранопровода – 5-то издание.....	70
Приложение 2 Стадиране на плоскоклетъчния карцином на хранопровода според хистологичния резултат (pTNM).....	71

Приложение 3	Стадиране на аденокарцинома на хранопровода според хистологичния резултат (pTNM).....	72
Приложение 4	Стадиране на карцинома на хранопровода според хистологичния резултат след получена неoadювантна терапия (ypTNM).....	73
Приложение 5	Информирано съгласие за вземане на материал за генетично изследване.....	74
Приложение 6	Анкетна форма при вземане на материал за генетично изследване.....	76

Списък на използваните съкращения

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Antigen presenting cell
ASA	American Society of Anesthesiology
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BMI	Body mass index
CCI	Charlson Comorbidity Index
CI	Confidence Interval
CPR	Complete Pathological Response
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMR	Endoscopic mucosal resection
ESD	Endoscopic submucosal dissection
ESGE	European Society of Gastrointestinal Endoscopy
ESMO	European Society of Medical Oncology
EUS	Endoscopic Ultrasound
FDG	Fluorodeoxyglucose
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
HER	Human epidermal growth factor receptor
HPV	Human papilloma virus
HR	Hazard Ratio
IARC	International Agency for Research on Cancer
JES	Japanese Classification of Esophageal Cancer
JPOG	Japan Clinical Oncology Group
JSED	Japanese Society for Esophageal Diseases
MHC	Major histocompatibility complex
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCDB	National Cancer Database
PCR	Polymerase Chain Reaction
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results program
UICC	International Union Against Cancer
WHO	World Health Organisation

АК	Аденокарцином
ЕК	Езофагеален карцином
ЕР	Ендоскопска резекция
ИБС	Ишемична болест на сърцето
КТ/ СТ	Компютърна томография
КХ	Карцином на хранопровода
ЛТ	Лъчетерапия
ПЕТ	Позитрон – емисионна томография
ПКК	Плоскоклетъчен карцином
ХЛТ	Химиолъчетерапия
ХОББ	Хронична обструктивна белодробна болест

1. Въведение

Карциномът на хранопровода е един от най - агресивните висцерални тумори с тенденция за нарастване на честотата му, висока резистентност към модерните методи на лечение и лоша прогноза. Поради късната поява на симптомите, туморите на хранопровода често се откриват в напреднал стадий, когато лечението е агресивно и не винаги успешно.

Понятието карцином на хранопровода включва различни хистологични варианти, от които двата преобладаващи са плоскоклетъчният карцином и аденокарцинома. В тази категория е и карциномът на гастро-езофагеалната връзка, клас I и клас II според класификацията на Siewert.

Значителни разлики се наблюдават в географското разпространение на двата основни хистологични варианта на езофагеалния карцином. Преобладаващ в азиатските страни е плоскоклетъчният карцином , докато в западните страни доминира аденокарцинома. Честотата на последния бележи четирикратно увеличение през последните няколко десетилетия, вероятно в резултат на промени в начина на живот на пациентите.

Хирургичната резекция на тумора с прилежащите групи от лимфни възли е все още основен метод в куративното лечение на тези тумори.

Мултимодален подход, комбиниращ оперативна интервенция (езофагектомия) с неoadювантна и/или адювантна онкологична терапия под формата на химиотерапия или химиолъчетерапия, подобрява преживяемостта и понастоящем се препоръчва при всички пациенти, които могат да толерират това лечение.

За съжаление, поради агресивния характер на този вид тумори и липсата на ефективно индивидуализирано лечение, 5-годишната преживяемост дори при комбинирано лечение остава лоша и не надминава 46% [71].

С развитието на медицинската наука и техника в клиничната практика навлизат по – малко инвазивни методи на лечение при пациентите с карцином на хранопровода като ендоскопските резекции и дефинитивната химиолъчетерапия. С тези техники е възможно разширяване на критериите за започване на лечение и третирането на пациенти, които не са в състояние или не желаят да бъдат оперирани. Миниинвазивните резекции на хранопровода в т.ч и роботизираната хирургия осигуряват по-малка хирургична травма, по-малко болка в постоперативния период, по-добри козметични резултати и по-бързо възстановяване на пациентите.

Съществуващите разлики в терапевтичните алгоритми в различните части на света, основно по отношение на онкологичната терапия, водят и до различни резултати по отношение на общата преживяемост. В допълнение на това, тези алгоритми непрекъснато се променят и усъвършенстват, като крайната цел е постигане на колкото е възможно по- висока преживяемост.

Разликите в преживяемостта между пациенти с еднакъв хистологичен вариант и локализация на тумора и намиращи се в еднакъв клиничен стадий налагат търсенето на допълнителни прогностични маркери, които да помогнат за идентифицирането на пациентите с висок риск за развитие на рецидив или метастази. Тези пациенти биха били кандидати за по - агресивни терапевтични протоколи, целящи постигане на ремисия и удължаване на преживяемостта.

2. Цел и задачи

В лечението на пациентите с рак на хранопровода и гастроезофагеалната връзка се наблюдават значителни различия в различните региони на света, което рефлектира и в разлики в преживяемостта на пациентите. Петгодишната преживяемост за България е значително по-ниска от средната за Европа и САЩ стойност. Постигането на подобрена преживяемост при пациентите с КХ е възможно с въвеждането на системен подход в лечението с функциониране на всички части от системата.

2.1. Цел

Цел на това проучване е да се извърши оценка на съвременните методи за лечение на рака на хранопровода и да се извърши дефиниране на прогностичните маркери за оптимизиране на терапевтичния протокол.

2.2. Задачи

За постигане на целта бяха поставени следните задачи:

1. Извършване на амбиспективен анализ на резултатите от лечението на пациенти с карцином на хранопровода, оперирани в Клиники по хирургия на две университетски болници в две европейски страни.
2. Сравняване на резултатите в анализирани извадки и съпоставка с литературните данни.
3. Определяне на корелация между избор на терапевтичен протокол и преживяемост.
4. Анализ на прогностични маркери за преживяемост.
5. Генетичен анализ на проби от тумора при част от пациентите
6. Изготвяне на препоръчителен терапевтичен протокол, съобразен с хистологичния тип и стадия на тумора

3. Материали и методи

В настоящият труд се анализират резултатите от лечението на пациенти, оперирани за карцином на хранопровода и кардията в Първа хирургична клиника на УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”, София, България и в Клиника по хирургия на Университетска болница, Линщъопинг, Швеция.

3.1 Дизайн на проучването и контингент пациенти

3.1.1 Пациенти, оперирани в УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”, София, България

В проучването са участвали 129 пациенти, приети за лечение и оперирани за карцином на хранопровода и гастро-езофагеалната връзка в Първа хирургична клиника на УМБАЛСМ „Н.И. Пирогов”, София, България в периода 2013 – 2015 година. Изключени са 12 пациенти, при които интраоперативно се установи напреднал (нерезектабилен) или метастатичен туморен процес. Останалите 117 пациенти са претърпели куративна резекция на хранопровода и при тях се извърши проспективен анализ.

3.1.1.1 Дигностичен процес и предоперативна подготовка

Всички пациенти са преминали през диагностичния алгоритъм, установен в клиниката и включващ:

- Анамнеза
- Обстоен клиничен преглед
- Лабораторни изследвания с определяне на кръвна група, пълна кръвна картина, биохимия (албумин, урея, креатинин, трансаминази), коагулограма и урина
- Ултразвуково изследване на корем
- Рентгенография на гръден кош и корем
- Гастроскопско изследване с биопсия
- Рентгеноконтрастно изследване с бариев сулфат
- Компютърна томография на гръден кош и корем с интравенозен контраст
- Функционално изследване на дишането
- Анестезиологична и кардиологична консултация

Приемането на пациентите и обработката на документацията е извършена в приемно – диагностичния кабинет на клиниката. Събрана е информация за начало и тип на симптомите, наличието на редуция в теглото и в какъв обем. Регистрирани са придружаващите заболявания и евентуално минали оперативни интервенции.

При физикалния преглед са отбелязани наличието на увеличени лимфни възли, разположението на cicatricexи, ако има предходни операции.

Пациентите с установена анемия са трансфундирани до достигане на ниво на хемоглобин предоперативно над 100 g/l.

Ехографското изследване, рентгенографията и кръвните изследвания са извършени в деня на приема.

Ако пациентите не са провели компютър-томографско изследване в последните 4 седмици преди приема, такова се е извършило в клиниката преди планираната операция.

Проведено е рентгеноскопско изследване с бариев сулфат с цел точна локализация на процеса, а ако има съмнение за хистологичния резултат предоперативно е извършена гастроскопия с биопсия.

Всички пациенти са провели функционално изследване на дишането и са консултирани с кардиолог, както и с анестезиолог с определяне на анестезиологичния риск по ASA (American Society of Anesthesiology) от 1 (клинично здрав) до 4 (тежко общо заболяване, което е постоянна заплаха за живота).

3.1.1.2. Оперативен подход

Оперативния метод при пациентите е избран на базата на локализацията на тумора, данните за предходни операции и общото състояние на пациентите. Приложени са описаните в литературния обзор оперативни процедури: Sweet, Ivor-Lewis, Orringer, McKeown и трансабдоминална резекция на хранопровода. Част от оперативните интервенции са извършени миниинвазивно, като всички процедури са извършени според стандартизирани протоколи. Тези протоколи са подробно описани в дисертационния труд на д-р Десислав Врачански [204].

Процедура на Sweet – Garlock (лява трансторакална трансдиафрагмална езофагектомия)

Този достъп е най-често използвания оперативен метод при българските пациенти при тумори в дистална трета на хранопровода и гастро-езофагеалната връзка.

Болните са под обща инхалационна анестезия с разделна вентилация и в дясна декубитална позиция. Извършва се предностранична торакотомия вляво в седмо междуребрие. След освобождаване на белодробния лигамент се отваря плеврата между аортата и хилуса на белия дроб до дъгата на аортата. Хранопровода се отпрепарира и повдига на държалка, като се освобождава на около 10 см проксимално от тумора. Извършва се медиастинална лимфна дисекция, след което се прави циркумферентна паракостална френотомия на около 2 см от залавното място на диафрагмата за реброто. Стомахът се скелетира, като първо се лигираат аа. gastricae breves, след което а. gastroepiploica sin. Отделяйки големия оментум от стомаха се освобождава голямата кривина на стомаха, запазвайки аркадата на а.gastroepiploica dex.

След скелетиране на малката кривина на стомаха се извършва дисекция около truncus celiacus, отпрепарирайки лимфните възли (групи 7, 9, 11p, 8a) и лигирайки v coronaria и а. gastrica sin.

В следващия етап се преминава към прекъсване на хранопровода на около 8-10 см проксимално от тумора и изтегляне на стомаха в гръдния кош, от който след това се скроява трансплантата. Езофаго-гастроанастомозата е термино-латерална (между края на хранопровода и задната стена на скроения трансплантат) и обикновено се конструира с автоматичен кръгов ушивател ЕЕА 28. Стомахът може да се фиксира с няколко единични шева за париеталната плевра, за да се намали напрежението върху анастомозата. Операцията завършва с възстановяване на диафрагмата на два етажа с продължителен шев с нерезорбируеми конци, поставяне на два коремни и два гръдни дрена и послойно възстановяване на гръдната стена.

Процедура на Orringer (конвенционална трансхиатална езофагектомия)

Този оперативен метод е показан при пациенти с тумори в горна/средна трета на хранопровода. Състои се от два етапа – абдоминален и цервикален етап. Болните са под обща инхалационна анестезия, лежат по гръб на операционната маса с руло под раменния пояс и глава отведена леко надясно и назад.

Абдоминален етап

Извършва се горна срединна лапаротомия. След експлорацията при отсъствие на метастази се прекъсва левия триангуларен лигамент и се поставя компрес зад слезката. Мобилизацията на стомаха започва с отваряне на бурса оменталис и дисекция по голямата кривина на стомаха до хиатуса проксимално и пилора дистално, но запазвайки аркадата на *a. gastroepiploica dex* и лигирайки *a. gastroepiploica sin* и *aa. gastricae breves*. След това се мобилизира стомаха по малката кривина, близо до чернодробния ръб. *A. gastrica dex* може да се прекъсне при тази дисекция с цел постигане на по-голяма дължина на трансплантата.

Последно се лигират *v. coronaria* и *a. gastrica sin*, като се препоръчва артерията да се прекъсне над двойна лигатура.

При лимфната дисекция се отпрепарират лимфните възли около *a. gastrica sin* (група 7), *truncus coeliacus* (група 9), около проксималната част на *a. lienalis* (група 11p), около група *a. hepatica communis* (група 8a) и лимфните възли в хепато-дуоденалния лигамент (група 12).

Кардията и хранопроводът се дисецират, колкото е възможно по-високо в медиастинума.

Цервикален етап

Извършва се 7 - 10 см кожен разрез по предния ръб на *m sternocleidomastoideus* вляво. С внимателна дисекция в аваскуларния участък между каротидната артерия и житовидната жлеза се достига до превертебралната фасция, където се мобилизира хранопровода. Поставена предварително назагастрична сонда, която алинира хранопровода, улеснява дисекцията. Хранопровода се повдига на държалка, след което се преминава към медиастинална дисекция. Тя се осъществява на сляпо и поради това с повишено внимание като операторът използва и двете си ръце – бимануална дисекция. Дисекцията се извършва близо до стената на хранопровода за да се избегне нараняване на съседни структури като трахея, възвратен ларингеален нерв или вена азигос.

Хранопроводът се прекъсва на нивото на цервикотомията и се изтегля в коремната кухина. Скроява се стомашния трансплантат, като оптималната ширина на получената тръба е между 4 и 6 см. Препаратът се отделя и изпраща за хистологично изследване, а получения неоезофаг се подвежда в задния медиастинум. Езофаго-гастроанастомозата

се конструира през цервикотомията с единични монофиламентни конци на два етажа. Поставят се два медиастинални и два коремни дрена и оперативните рани се възстановяват послойно.

Трансхиатална езофагектомия

Тази техника е показана при тумори на кардията, които инфилтрират освен дисталния хранопровод, също така и голяма част от стомаха. Извършва се гастректомия и резекция на дисталната трета на хранопровода, като пасажът се възстановява с езофаго-йеюноанастомоза високо в медиастинума (може да се достигне около 10 см над диафрагмата). Обикновено се налага отваряне на диафрагмата по метода на Pinotti (вертикален разрез) за по – добра визуализация при дисекцията в медиастинума. Анастомозата високо в медиастинума винаги се извършва с циркулярен ушивател.

Техника на Ivor-Lewis и McKeown

Ivor-Lewis техниката сме прилагали при пациенти с тумори в средна трета на хранопровода, а McKeown техниката при тумори в горна трета на хранопровода, където се е налагала щателна лифна дисекция в високо в медиастинума. Двете оперативни процедури са описани по-надолу в изложението.

3.1.1.3. Онкологична комисия

Всички пациенти са обсъдени на онкологична комисия след получаване на хистологичен резултат и са насочени към съответния регионален онкодиспансер за регистрация и проследяване. В онкокомисията задължително са участвали хирург, патолог, химиотерапевт и лъчетерапевт.

3.1.2 Пациенти, оперирани в УБ Линшъопинг, Швеция

Втората кохорта се състои от 115 пациенти, оперирани в периода 2010 - 2017 година в Клиниката по хирургия на Университетската болница в Линшъопинг, Швеция. Извършен е амбиспективен анализ. В тази група няма изключени пациенти.

Всички пациенти са изследвани предоперативно според съществуващия в Швеция алгоритъм (Nationellt vårdprogram för matstrups- och magsäckscancer). Диагностичния протокол според този алгоритъм се състои от:

- Анамнеза и подробен клиничен преглед
- Лабораторни показатели (Пълна кръвна картина, биохимия, коагулограма, кръвна група)
- Компютърна томография с интравенозен контраст на гръден кош и корем
- Гастроскопия с биопсия и хистологично доказан карцином.
- При суспекция за чернодробни метастази – магнитен резонанс с чернодробно-специфичен контраст
- ПЕТ – КТ при суспектни далечни метастази, от 2015 година задължително при всички пациенти с КХ
- Функционални тестове – спирометрия и велоергометрия
- Анестезиологична консултация

Повторно гастроскопско изследване от езофагеален хирург е извършено при всички оперирани пациенти с цел определяне локализацията на тумора (горна и долна граница) и вида на оперативната интервенция. В повечето случаи не е взета повторна биопсия т.к туморът е доказан.

От 2015 година при всички пациенти с езофагеален карцином задължително се извършва ПЕТ-КТ като част от предоперативния диагностичен алгоритъм.

При съмнение за сърдечна патология от велоергометрията, пациентите са изследвани допълнително с ехокардиография и в определени случаи с коронарография преди да се насрочи операция.

3.1.2.1 Мултидисциплинарна конференция

Поради централизирането на езофагеалната и стомашна онкохирургия в 7 центъра в Швеция (университетските болници), всички болни с езофагеален карцином са обсъдени на т.н. регионални мултидисциплинарни конференции.

На тези конференции чрез видеовръзка са свързани УБ Линшьопинг, регионалните болници в Норшьопинг, Йоншьопинг, Екшьо, Вернамо, Калмар и Вестервик и всички

болни с КХ са дискутирани в присъствието на хирурзи, онколози и рентгенолози, а в определени случаи и на патолози. Винаги присъства т.н. сестра за контакт, към която пациентите се обръщат по телефона при въпроси и проблеми, възникнали по време на лечението. Решението на мултидисциплинарната конференция е базирано на туморния стадий, функционалното състояние на пациента, придружаващите заболявания и желанието на пациента от лечение.

3.1.2.2 Предоперативна химиолъчетерапия

Предоперативна химиолъчетерапия е проведена при по – голямата част от болните според CROSS протокола.

Тази терапия се състои от химиотерапия с Carboplatin/ Paclitaxel в 5 цикъла на 1, 8, 15, 22 и 29 ден в комбинация с конкомитантна лъчетерапия с обща доза 41.1 Gy, разделени в 23 цикъла от 1,8 Gy, започваща в първия ден на химиотерапията, общо 5 фракции в седмица (без събота и неделя).

3.1.2.3 Оперативен метод

Оперативната интервенция е извършена минимум 4 седмици след последния цикъл химиотерапия. Двата типа оперативни процедури са операцията на Ivor-Lewis и операцията на McKeown.

Процедура на Ivor-Lewis

Тази процедура се състои от два етапа, които се изпълняват последователно - абдоминален и торакален етап. За разглеждания период тази процедура е извършена по конвенционалния метод (лапаротомия и дясностранична торакотомия) или като хибридна интервенция, при която се прави лапароскопско мобилизиране на стомаха и дясна торакотомия за извършване на анастомоза.

Болните са под обща инхалационна анестезия и разделна вентилация.

Абдоминален етап

Това е първия етап на операцията. Болният лежи по гръб. При отворения метод се извършва горна срединна лапаротомия. Ако операцията е лапароскопска се поставя 10 мм порт за камерата инфраумбиликално, след което се поставят допълнително 2 порта 5мм и 2 порта 10 мм от двете страни на пъпа по линията свързваща пъпа и точката на пресичане на предната аксиларна линия с ксифоидната линия. Допълнителен разрез се прави субксифоидно за чернодробен ретрактор тип Nathansson.

Мобилизацията на стомаха започва с отваряне на бурса оменталис и дисекция по голямата кривина на стомаха до хиатуса проксимално и пилора дистално, но запазвайки аркадата на *a. gastroepiploica dex* и лигирайки *a. gastroepiploica sin* и *aa. gastricae breves*. След това се мобилизира стомаха по малката кривина, близо до чернодробния ръб. *A. gastrica dex* може да се прекъсне при тази дисекция, но това не се налага в повечето случаи. Добре е през този етап да се мобилизира хранопровода, колкото се може по-високо в хиатуса, за да се улесни дисекцията в торакалната част.

Последно се лигират *v. coronaria* и *a. gastrica sin*, като се препоръчва артерията да се прекъсне над двойна лигатура.

При лимфната дисекция се отпрепарират лимфните възли около *a. gastrica sin* (група 7), *truncus coeliacus* (група 9), около проксималната част на *a. lienalis* (група 11p), около група *a. hepatica communis* (група 8a) и лимфните възли в хепато-дуоденалния лигамент (група 12).

След това се скроява трансплантата с помощта на EndoGia, като обикновено се използват 6-7 съшивателя. Коремната кухина не се дренира освен ако имаме съмнителна хемостаза.

Торакален етап

Това е вторият етап на операцията. Пациентът се поставя в лява декубитална позиция, като дясната ръка се отвежда напред и нагоре под ъгъл около 120 градуса. Под гърдите се поставя руло или ако операцията се извършва с механизъм за повдигане, то тялото се позиционира над този механизъм на нивото на мамилите. Това помага за разширяване на междуребрията при торакотомията. Преминва се към еднобелодробна вентилация. Самата торакотомия се прави в 5-то междуребрие. След поставяне на ретрактор на Finochietto се прекъсва белодробния лигамент и се лигира *v.*

azygos. Хранопроводът се отпрепарира надрязвайки медиастиналната плевра от двете му страни до 2-3 см над бифуркацията на трахеята, като цялата периезофагеална мастна тъкан заедно с лимфните възли остава към препарата. Субкариналните лимфни възли, заедно с лимфните възли около десния и левия главен бронх обикновено се отпрепарират отделно. Внимание се отделя за идентифициране и съхраняване на d. thoracicus, който трябва задължително да се лигира, ако бъде прекъснат по време на дисекцията.

Анастомозата се конструира на нивото на карината чрез единичен продължителен шев с 4-0 монофиламентен конец между края на хранопровода и задната стена на скроения стомах. Операцията завършва с поставяне на един торакален дренаж, включен на моделиран вакуум – 20cmH2O.

Процедура на McKeown

Операцията на McKeown се състои от три етапа. Започва се с торакален етап, след което се преминава на абдоминален и цервикален. Също се осъществява като хибридна техника с дясна торакотомия, лапароскопия и лява цервикотомия.

Торакален етап

Този етап не се различава значително от торакалния етап при Ivor-Lewis процедурата. Разликата е, че хранопровода се мобилизира по цялото си протежение проксимално до купола на плеврата. Никаква анастомоза не се прави на този етап. Поставя се един гръден дренаж и торакотомията се затваря послойно.

Абдоминален и цервикален етап

Болният лежи по гръб с леко отведена надясно глава. Абдоминалният етап при McKeown операцията се състои от горна срединна лапаротомия. След прекъсване на lig. teres hepatis и lig. falciforme се поставя автоматичен ретрактор тип Omnitract. Поставя се компрес зад слезката и стомахът се мобилизира по гореописания ред. Трансплантата се скроява по същия начин. След това се преминава към цервикотомия вляво, която се прави по предния ръб на m. sternocleidomastoideus. Отпрепарира се шийната част на хранопровода, като е желателно да има сонда в него. Хранопровода се

прекъсва на това ниво и към дисталната му част се прошива памучна лента. Препаратът се изтегля към корема като се внимава проксималния край на лентата да не хлътне в медиастинума. След това препаратът се изтегля от медиастинума и се изпраща за хистологични изследване. Дисталния край на лентата се зашива за скроения стомах и трансплантата внимателно се подвежда в задния медиастинум. Анастомозата се конструира на шията по същия начин, по който се описва за Ivor –Lewis процедурата – краят на хранопровода към задна стена на стомашната тръба с продължителен шев с 4-0 монофиламентен конец. Цервикотомията и лапаротомията се затварят послойно без да се поставят дренажи.

3.1.3 Хистологично изследване и стадиране

Хистологичния анализ на препаратите е извършен от опитен хистопатолог от Клиниката по клинична патология при УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов” за българските пациенти и съответно Клиника по патология при УБ Линшъопинг за шведските пациенти. Стадирането и при двете групи е според актуалната към този момент 7-ма ревизия на TNM класификацията.

3.1.4. Генетични изследвания

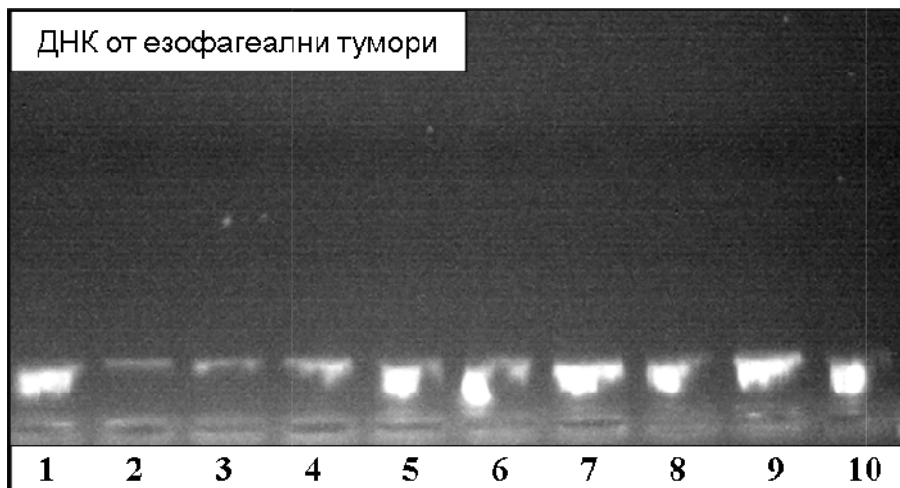
При част от анализиранияте пациенти, оперирани в Първа хирургична клиника на УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов” за карцином на хранопровода се извърши генетичен анализ на проби от тумора. Събраната група се състоеше от 20 пациенти, всеки от които получи подробна информация за целите на изследването и беше включен в проекта след подписване на информирано съгласие. **Приложение 4**

От всеки пациент, включен в проучването, бяха събрани туморни и кръвни проби. Туморната тъкан, отстранена по време на операцията, беше замразена и транспортирана до Центъра по Молекулна Медицина (ЦММ), където се съхранява в това състояние при -80°C в създадената туморна банка за рак на хранопровода. Кръвните проби, които бяха взети от пациентите, също бяха транспортирани до ЦММ и беше изолирана ДНК. От кръвта бяха отделени серум и плазма, които се съхраняват за бъдещи проучвания.

По време на болничния престой на пациентите бяха събрани необходимите клинични данни - по стандартен протокол, включващ демографски, епидемиологични, медицински и др. данни. Информацията за пациентите се съхранява в съответствие със законите за конфиденциалност на личните данни. **Приложение 5**

3.1.4.1. ДНК изолиране

За провеждане на генетичния анализ се използва високомолекулна ДНК, изолирана от туморна тъкан – замразена до 15 мин след отпрепарирането на -20°C и до един час след операцията – на -80°C . Изолирането на ДНК от туморна тъкан се извърши с помощта на готов кит с цел намаляване времето за извършването на дейността, получаване на високомолекулна ДНК с добро качество и без наличие на нежелани онечистващи вещества, следвайки препоръките на производителя (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) на принципа на колонният метод на екстракция. Всички ДНК-и бяха количествено и качествено определени, съответно чрез спектрофотометричен анализ на Nanodrop и агарозна гел електрофореза при използване на 0.8% агарозен гел и 1x TBE (трисборатен буфер) – **Фигура 9**. Визуализацията на фрагментите се осъществи посредством флуоресцентното багрило етидиев бромид.



Фигура 9. Агарозна гел електрофореза (0.8%) на геномна ДНК, изолирана от туморна тъкан на пациенти 01-10

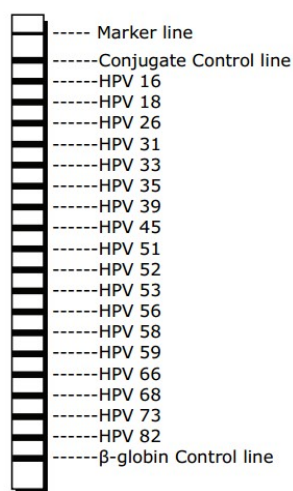
С цел дълготрайно съхранение, по-голямата част от изолираната ДНК беше замразена и се съхранява в специално създадената ДНК банка за тумори на

хранопровода в Центъра по Молекулна Медицина на -80°C . Останалата част от материала използвахме за генетичен анализ.

3.1.4.2. Изследване за HPV

Съществуват голям брой методи за детекция на HPV: PCR, RT-PCR, real-time PCR, FISH, антитела и др. Най-широко използваните и изключително чувствителни методи се основават на PCR амплификация на вирусната ДНК, поради което те в комбинация с хибридизацията са в основата на редица сертифицирани комерсиални китове за детекция на HPV. В настоящето проучване беше използван digene HPV Genotyping RH test (Qiagen), който включва два кита, съответно за амплификация и детекция чрез хибридизация на 18 високо-рискови типа HPV (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 и 82). Първият кит за амплификация на вирусната ДНК се използва за размножаване и първоначална детекция. Високо консервативната L1 секвенция се амплифицира благодарение на GP5+/6+ праймерите. Амплификацията се провежда с помощта на HotStarTaq Plus DNA полимераза. GP6+ праймера е биотинилиран, което дава възможност за детекция и анализ на амплифицираната секвенция с помощта на втория кит, а именно digene HPV Genotyping RH Test, Detection Kit. Праймерите за нуклеотидната последователност на гена, кодиращ бета-глобин (β -globin), позволяват ко-амплификацията на човешката геномна ДНК, налична в изследваните проби и използвана като вътрешна контрола, онагледяваща липсата на инхибиране на PCR реакцията, както и наличието на ДНК с добро качество и без онечистващи вещества. При наличие на PCR продукт с дължината на L1 секвенция (около 150bp) е необходимо последващо процесирание на тези проби с втория кит, с чиято помощ се определя конкретния HPV серотип.

The digene HPV Genotyping RH Test, Detection Kit е кит базиран на инвитро обратно-хибридизационна реакция използваща вече амплифицираните участъци от ДНК, с помощта на праймерите GP5+/6+*биотин, за качествено идентифициране на изследваните високо-рискови HPV генотипове 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, и 82. Амплифицираните вече ампликони, както беше обяснено по-горе, са маркирани с биотин и след преминаване през денатурационен процес се хибридизират със специфично проектирани олигонуклеотидни проби, които от своя страна са имобилизирани под формата на права линия върху лента (стрип) изградена от мембрана (**Фигура 10**).



Фигура 10. Схематично представяне на генотипиращата лента (стрип). Маркерната линия (Marker line) е нарисувана най-отгоре на лентата за по-лесна ориентация. Двете контролни линии (Conjugate Control line, β -globin Control line) са първата и последната след Marker line.

След хибридизацията и неколкократно промивания се извършва третиране със стрептавид-спрегната алкална фосфатаза, която се свързва специфично с наличния биотинилиран хибрид. Последващата инкубация с BCIP/NBT хромоген води до получаването на лилаво оцветен преципитат, който позволява и визуалното интерпретиране на резултатите. Като вътрешна контрола за наличие на качествена ДНК молекула, която може да бъде амплифицира, е ампликона на бета-глобиновия ген. Той се амплифицира едновременно с ампликоните на вируса в мултиплексна реакция.

По литературни данни чувствителността за откриване на HPV при използване на PCR с праймери GP5+/GP6+ (каквито са включени в посочения по-горе кит за амплификация на HPV ДНК) е около 74%, за MY09/MY11 праймери е около 73.7%, а за двете двойки заедно MY/GP при nested PCR – 93.1% [207]. Заради тези разлики в чувствителността и липсата на положителен резултат от кита, ние решихме да изследваме пробите и чрез nested PCR с MY/GP праймери. В **таблица 4** са посочени секвенциите на използваните праймери и установените оптимални условия за амплификация на съответните ДНК фрагменти.

Праймер	Секвенция	Големина	T _{анилинг}	MgCl ₂
GP5+/F	5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3'	~150bp	38°C	1.5mM
GP6+/R	5' GAAAAATAAACTGTAATCATATTC 3'			
MY11/F	5' GCACAGGGACATAACAATGG 3'	~450bp	55°C	4.5mM
MY09/R	5' CGTCCAAAAGGAAACTGAGC 3'			

Таблица 4. Секвенции на праймерите GP5+/GP6+ и MY09/MY11 и оптимални условия за амплификация (температура на анилинг и концентрация на MgCl₂)

3.2 Статистически методи

Данните са обработени със статистически пакет IBM SPSS Statistics 28.0.0.0. За ниво на значимост се прие $p < 0,05$.

Основните демографски и клинични характеристики на двете кохорти бяха анализирани посредством дескриптивен анализ и са представени в табличен вид.

Общата преживяемост бе анализирана посредством Каплан-Майер метод, а log-rank тест се използва за оценка на разликата между отделните групи.

Мултивариационен анализ бе извършен с Cox регресионен метод, калкулирайки Hazard ratio с 95% доверителен интервал (95% CI).

Пациентите са проследени до месец април 2022. В анализа на преживяемостта, общата преживяемост се определя от датата на операцията до датата на смъртта, независимо от причината или до края на периода на проследяване.

4. Резултати

4.1. Демографски и клинични характеристики

Основните демографски, клинични и хистопатологични признаци на двете кохорти са представени в **таблица 5**.

Анализираните променливи са пол, възраст (до 60 г и над 60 г), ASA индекс, тютюнопушене (непушачи, пушачи, бивши пушачи, липсват данни), предоперативен ВМІ (нормален ВМІ между 18,5 и 24,9; нисък под 18,5; висок над 25; липсват данни), локализация (горна, средна, долна трета и кардия), провеждана неoadювантна терапия (да, не), патологичен Т стадий (Tis, T0, T1, T2, T3, T4, Tx, пълен хистологичен отговор/PCR (pathology complete response), дължина на тумора (до 3 см, между 3 и 6 см, над 6 см, липсват данни), патологичен N стадий (N0, N1, N2, N3, липсват данни), M стадий (M0 и M1), радикалитет на резекцията (R0, R1, R2, липсват данни или не е актуално), хистологичен субтип (аденокарцином (вкл. аденосквамозен), плоскоклетъчен карцином, друг тип или няма тумор), степен на диференциация (пълен хистологичен отговор/PCR, добре диференциран (G1), умерено диференциран (G2), слабо диференциран (G3), липсват данни или Gx).

И в двете кохорти преобладаващи са мъжете, като съотношението е 4:1 в българската кохорта и 3:1 в шведската.

По отношение на възрастта прави впечатление, че почти половината от пациентите в българската група са в трудоспособна възраст, докато в групата от Швеция младите пациенти са три пъти по-малко от пенсионерите.

Голяма част от пациентите в Швеция (90%) са получили неoadювантна терапия. Над половината болни (60%) са с негативен нодален статус (N0).

Не се отчитат съществени разлики между двете групи що се касае до M и R статуса.

Преобладаващ хистологичен вариант и в двете кохорти е аденокарцинома.

За българската група, тригодишната преживяемост е 12.8 %, а петгодишната е 11.1. За шведската група стойностите са 53.04% тригодишна преживяемост и 43,5% петгодишна преживяемост.

	БЪЛГАРИЯ N=117	ШВЕЦИЯ N=115
ПОЛ ЖЕНИ МЪЖЕ	20 (17.1%) 97 (82.9%)	27 (23.5%) 88 (76.5%)
ВЪЗРАСТ, СРЕДНА ДО 60 ГОДИНИ МЪЖЕ ЖЕНИ НАД 60 ГОДИНИ МЪЖЕ ЖЕНИ	59.0 66 55 11 51 42 9	64.9 27 18 9 88 70 18
ASA-ИНДЕКС I II III IV ЛИПСВАТ ДАННИ	4 (3.4%) 41 (35.0%) 61 (52.1%) 3 (2.6%) 8 (6.9%)	20 (17.4 %) 61 (53 %) 32 (27.8 %) - 2 (1.7 %)
КОМОРБИДИТЕТ ДА НЕ	60 (51.3%) 57 (48.7%)	54 (47 %) 61 (53 %)
ТЮТЮНОПУШЕНЕ НЕПУШАЧИ ПУШАЧИ БИВШИ ПУШАЧИ ЛИПСВАТ ДАННИ	55 (47%) 57 (48.7%) 2 (1.7%) 3 (2.6%)	49 (42.6%) 16 (13.9%) 27 (23.5%) 23 (20%)
ПРЕДОПЕРАТИВЕН ВМІ НОРМАЛЕН ВМІ 18.5-24.9 НИСЪК ВМІ < 18.5 ВИСОК ВМІ > 25 ЛИПСВАТ ДАННИ	46 (39.3%) 5 (4.3%) 50 (43.5%) 16 (13.7%)	48 (41.7%) 1 (0.9%) 60 (52.2%) 5 (4.4 %)
ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГОРНА ТРЕТА СРЕДНА ТРЕТА ДОЛНА ТРЕТА И КАРДИЯ	5(4.3%) 24 (20.5%) 88 (75.2%)	0 (0%) 37 (32.2%) 78 (67.8%)
НЕОАДЮВАНТНА ТЕРАПИЯ ДА НЕ	0 (0 %) 117 (100%)	103 (89.6%) 12 (10.4%)
ПАТОЛОГИЧЕН Т СТАДИЙ TIS T0 T1 T2 T3 T4 TX ИЛИ ЛИПСВАТ ДАННИ ПАТОЛОГИЧЕН ПЪЛЕН ОТГОВОР/CPR	0 (0%) 0 (0%) 1 (0.9%) 23 (19.7%) 81 (69.2%) 8 (6.8 %) 4 (3.4 %) -	3 (2.6%) 2 (1.7%) 12 (10.4%) 20 (17.4%) 34 (29.6%) 2 (1.7%) 9 (7.8%) 33 (28.7 %)
ДЪЛЖИНА ДО 3 CM НАД 3 CM ЛИПСВАТ ДАННИ	13 (11.1%) 92 (78.6%) 12 (10.3%)	34 (29.6%) 68 (59.1%) 13 (11.3%)
ПАТОЛОГИЧЕН N СТАДИЙ N0 N1 N2	30 (25.6%) 28 (23.9%) 25 (21.4)	68 (59.1%) 25 (21.7%) 16 (13.9%)

N3	19 (16.2%)	3 (2.6%)
NX OR MISSING	12 (10.3%)	3 (2.6%)
М СТАДИЙ		
M0	110 (94%)	115 (100%)
M1	7 (6%)	
РАДИКАЛИТЕТ		
R0	101 (86.3%)	104 (90.4%)
R1	12 (10.3%)	5 (4.4%)
R2	1 (0.8%)	4 (3.5%)
ЛИПСВАТ ДАННИ ИЛИ НЕ Е АКТУАЛНО	3 (2.6%)	2 (1.7%)
ХИСТОЛОГИЧЕН СУБТИП		
АДЕНОКАРЦИНОМ (АДЕНОСКВАМОЗЕН)	72 (61.5%)	89 (77.4 %)
ПЛОСКОКЛЕТЪЧЕН КАРЦИНОМ	41 (35.1%)	23 (20%)
ДРУГ ТИП ИЛИ НЯМА ТУМОР	4 (3.4%)	3 (2.6%)
СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ		
ПЪЛЕН ПАТОЛОГИЧЕН ОТГОВОР	-	31 (27%)
ДОБРЕ ДИФЕРЕНЦИРАН (G1)	14 (12%)	4 (3.5%)
УМЕРЕНО ДИФЕРЕНЦИРАН (G2)	52 (44.4%)	19 (16.5%)
СЛАБО ДИФЕРЕНЦИРАН (G3)	47 (40.2%)	41 (35.6%)
ЛИПСВАТ ДАННИ ИЛИ GX	4 (4.4%)	20 (17.4%)

Таблица 5. Демографски и клинични характеристики в двете кохорти

Допълнително се извърши мултивариационен регресионен Cox анализ по всички показатели. Резултатите от анализа по определени показатели са показани в **таблица 6**.

Фактори, повлияващи преживяемостта са мъжкия пол (в шведската кохорта), възрастта (в българската кохорта), радикалитета на резекцията (и в двете кохорти), хистологичния тип (плоскоклетъчен карцином за шведската кохорта).

	БЪЛГАРИЯ HR (95% CI)	ШВЕЦИЯ HR (95% CI)
ПОЛ ЖЕНИ МЪЖЕ	1 (ref) 1.52 (0.8 -2.88)	1 (ref) 2.87 (1.15 -7.14)
ВЪЗРАСТ, СРЕДНА	1.02 (1.01- 1.05)	1.04 (0.99- 1.11)
ТЮТЮНОПУШЕНЕ НЕПУШАЧИ ПУШАЧИ БИВШИ ПУШАЧ	1 (Ref) 0.82 (0.56 – 1.22) 1.29 (0.31 – 5.35)	1 (Ref) 1.36 (0.65 – 2.85) 1.22 (0.67 – 2.21)
ПРЕДОПЕРАТИВЕН ВМІ, СРЕДЕН	24.58 1.00 (0.94 – 1.06)	26.82 0.97 (0.92 – 1.01)
ДЪЛЖИНА ДО 3 СМ НАД 3 СМ	1 (Ref) 2.37 (1.06 – 5.25)	1 (Ref) 2.01 (1.10 – 3.63)
РАДИКАЛИТЕТ R0 R1	1 (Ref) 2.37 (1.11 – 5.06)	1 (Ref) 3.30 (1.64 – 6.66)
ХИСТОЛОГИЧЕН СУБТИП АДЕНОКАРЦИНОМ (АДЕНОСКВАМОЗЕН) ПЛОСКОКЛЕТЪЧЕН КАРЦИНОМ	1 (Ref) 0.68 (0.08 – 5.53)	1 (Ref) 2.99 (1.16 – 7.72)
СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ GX ИЛИ ПЪЛЕН ПАТОЛОГИЧЕН ОТГОВОР ДОБРЕ ДИФЕРЕНЦИРАН (G1) УМЕРЕНО ДИФЕРЕНЦИРАН (G2) СЛАБО ДИФЕРЕНЦИРАН (G3)	1 (Ref) 0.21 (0.10 – 4.64) 0.48 (0.25 – 9.62) 1.10 (0.54 – 22.60)	1 (Ref) 0.6 (0.2 – 1.97) 0.6 (0.2 – 1.81) 0.8 (0.32 – 1.99)

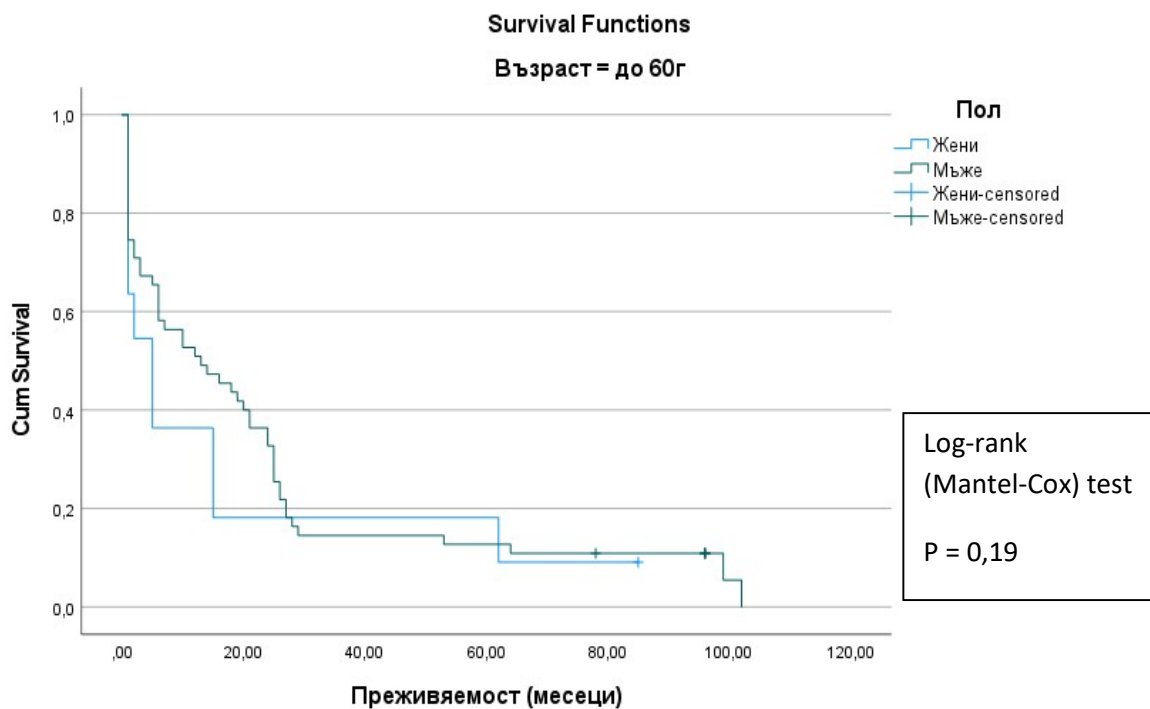
Таблица 6. Hazard ratio за преживяемостта при 95% CI (Confidence Interval) от Cox регресионен анализ на двете кохорти

4.2. Преживяемост по пол и възраст

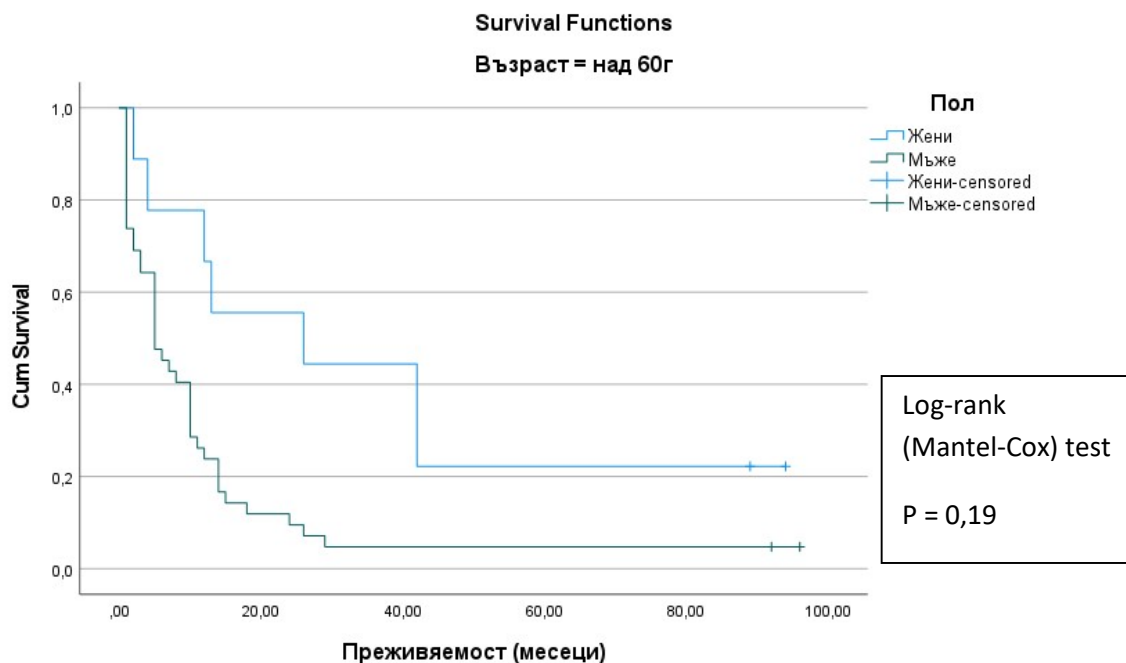
Значителни полови и възрастови различия в средната преживяемост се установиха в двете кохорти.

При българските пациенти до 60 годишна възраст, средната преживяемост при жените е 17,5 месеца (95% CI 1,42 – 33,7 месеца), а при мъжете е 23,0 месеца (95% CI 14,8 – 31,0).

Над 60 г възраст стойностите са 36,6 месеца за жените (95% CI 14,6 – 58,5 месеца), а за мъжете 11,8 месеца (95% CI 5,7 – 17,9 месеца). **Фигура 11 и 12**



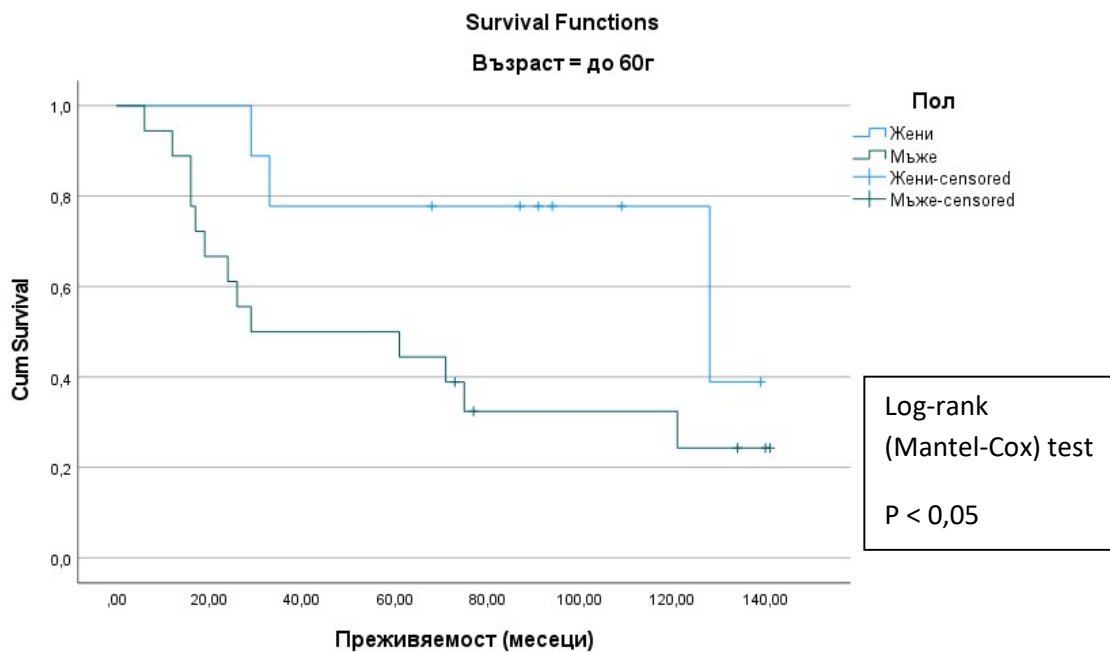
Фиг. 11 Карпан–Meier крива на обща преживяемост при пациенти до 60 годишна възраст, оперирани в УМБАСЛМ „Н.И. Пирогов“



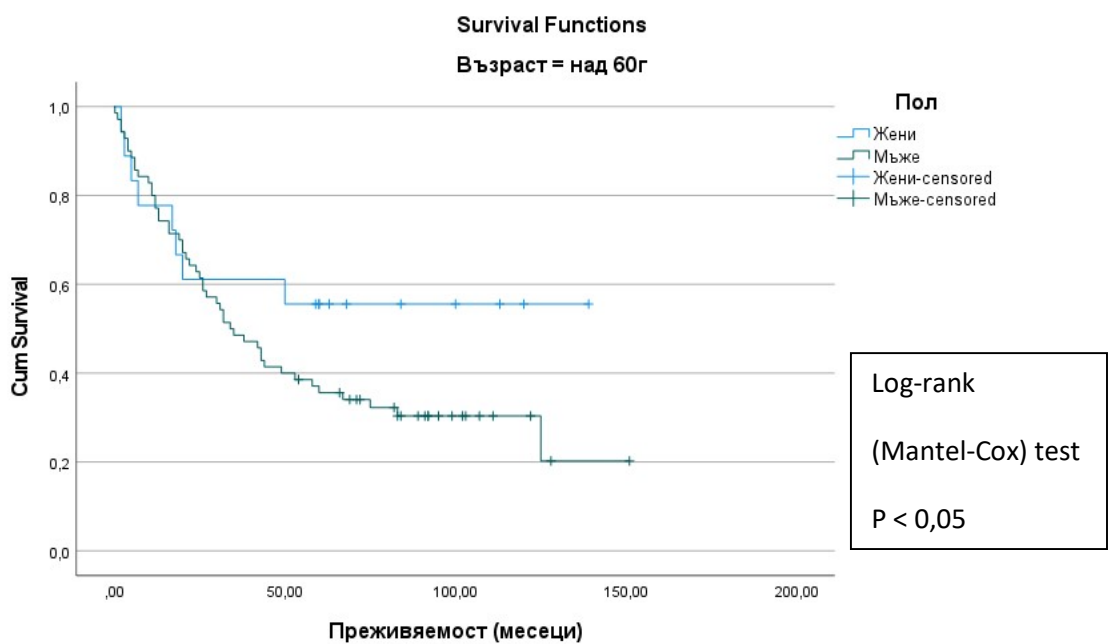
Фиг. 12 Карпан–Meier крива на обща преживяемост при пациенти над 60 годишна възраст, оперирани в УМБАСЛМ „Н.И. Пирогов“

В шведската кохорта жените до 60 г преживяват 110,7 месеца (95% CI 82,2 – 139,1 месеца), а мъжете 65,4 месеца (95% CI 40,9 – 89,9 месеца). Над 60 г възраст жени 84,0 месеца (95% CI 55,2 – 112,8 месеца), мъже 61,6 месеца (95% CI 47,8 – 75,5 месеца).

Фигура 13 и 14



Фиг. 13 Карпан–Meier крива на обща преживяемост при пациенти до 60 годишна възраст, оперирани в УБ Линшюпинг



Фиг. 14 Карпан–Meier крива на обща преживяемост при пациенти над 60 годишна възраст, оперирани в УБ Линшюпинг

4.3. Преживяемост според коморбидитет

Пациентите от всяка кохорта са разделени в две групи според наличието или липсата на придружаващи заболявания. Допълнително всяка от двете групи е разделена на субгрупи и по възраст (до 60 г и над 60 г).

Като придружаващи заболявания се отчитат диабет и неговите усложнения, исхемична болест на сърцето (ИБС), сърдечна недостатъчност, прекаран инфаркт, клапни пороци, мозъчно-съдова болест и прекаран инсулт, епилепсия, чернодробна цироза, хепатит В и С, хронична обструктивна белодробна болест (ХОББ), астма, ампутации на крайници, предишни операции за карцином.

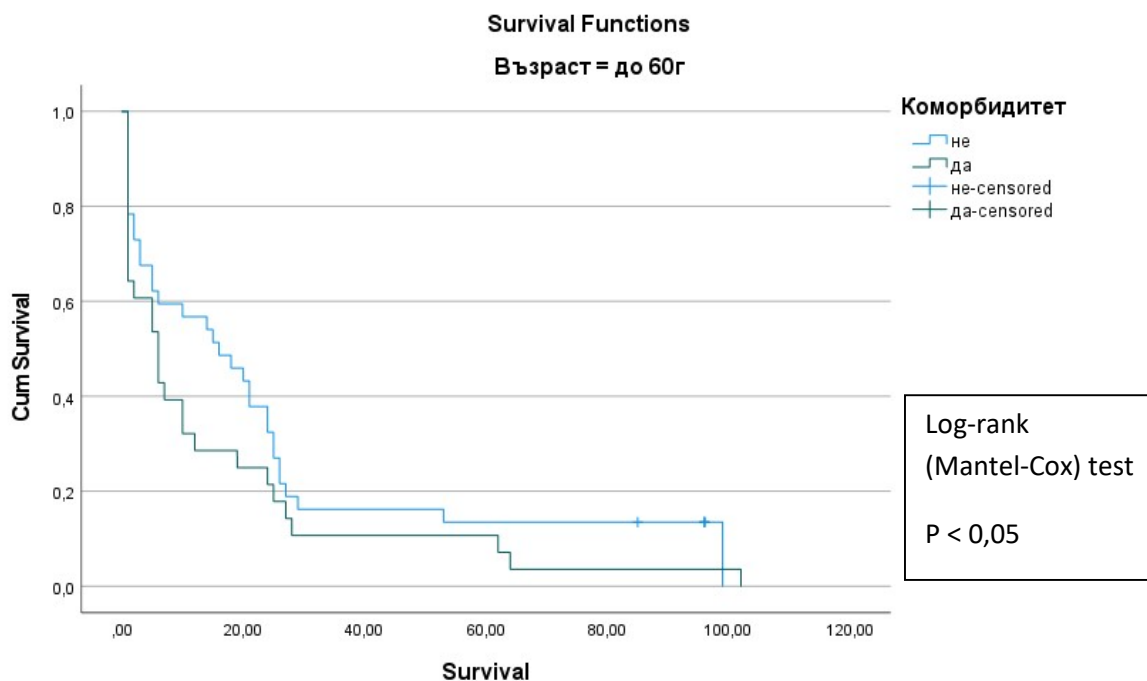
Средната преживяемост при българските пациенти до 60 г възраст без придружаващи заболявания е 24,9 месеца (95% CI 14,6 – 35,2 месеца), а с придружаващи заболявания – 15,4 месеца (95% CI 6,5 – 24,2 месеца). Над 60 г възраст, здравите пациенти са със средна преживяемост 23,9 месеца (95% CI 9,8 – 38,0 месеца), а при тези с коморбидитет – 11,9 месеца (95% CI 5,6 – 18,3 месеца); log rank $p < 0,05$.

За шведската кохорта данните показват средна преживяемост: здрави до 60 години – 74,3 месеца (95% CI 51,0 – 97,4 месеца), до 60 г с коморбидитет – 111,0 месеца (95% CI 75,2 – 146,8 месеца), здрави над 60 г – 68,6 (95% CI 49,9 – 87,3 месеца), над 60 г с коморбидитет – 62,8 месеца (95% CI 46,4 – 87,4 месеца); log rank $p = 0,9$.

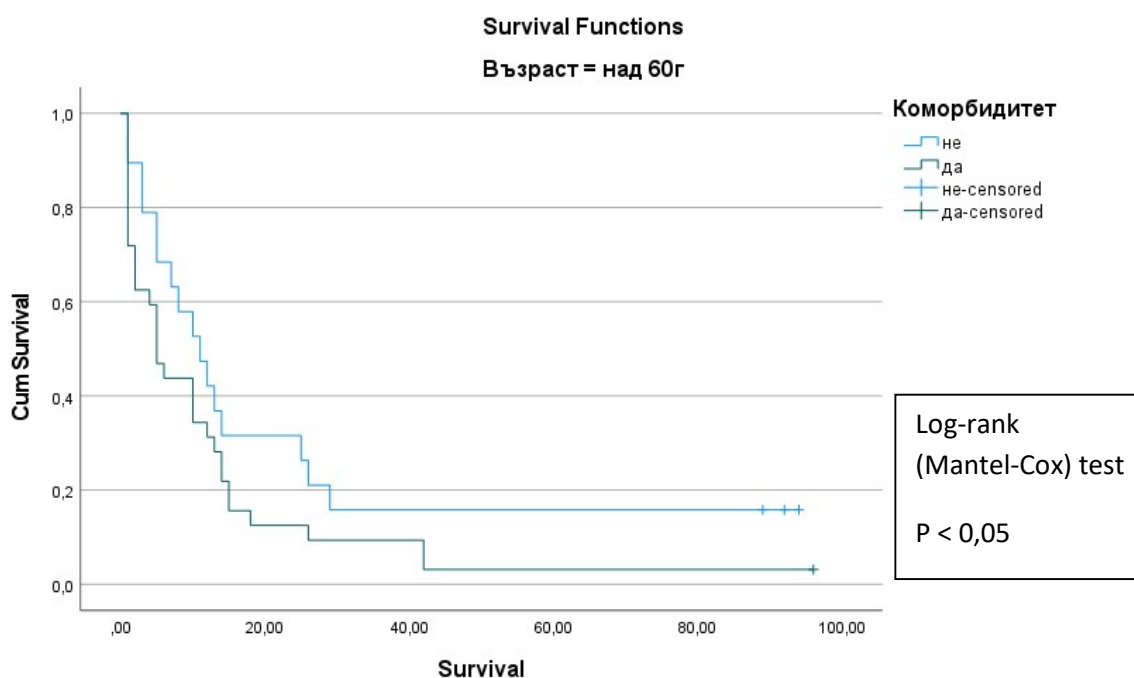
Резултатите са представени в обобщен вид в **таблица 7**.

Коморбидитет	Българска кохорта			Шведска кохорта			
	Преживяемост в месеци			Преживяемост в месеци			
		Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост
До 60 г.	Да	15.4	6.5	24.2	111.0	75.2	146.8
	Не	24.9	14.6	35.2	74.3	51.0	97.4
Над 60 г.	Да	11.9	5.6	18.3	62.8	46.4	87.4
	Не	23.9	9.8	38.0	68.6	49.9	87.3

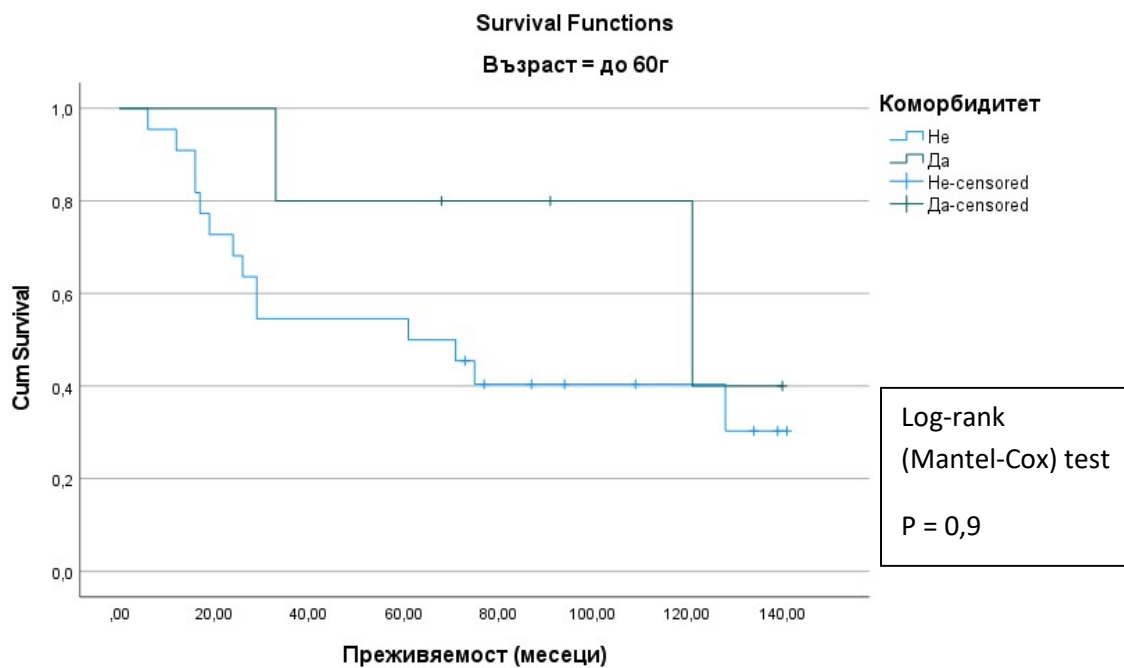
Таблица 7. Средна, минимална и максимална преживяемост според коморбидитет за пациенти, оперирани в УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, София и УБ Линшьопинг, Швеция



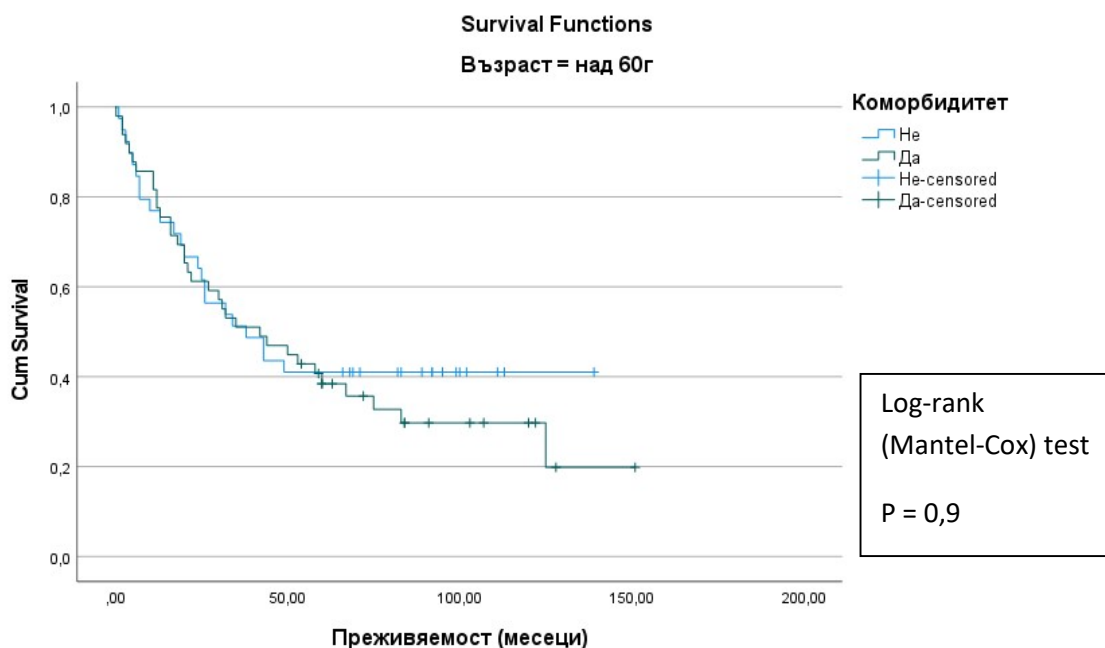
Фиг. 15 Карпан–Meier крива на обща преживяемост на пациентите до 60 г, оперирани в УМБАСЛМ „Н.И. Пирогов” според коморбидитет



Фиг. 16 Карпан–Meier крива на обща преживяемост на пациентите над 60 г, оперирани в УМБАСЛМ „Н.И. Пирогов” според коморбидитет



Фиг. 17 Карпан–Мејер крива на обща преживяемост на пациентите до 60 г, оперирани в УБ
Линшьопинг според коморбидитет

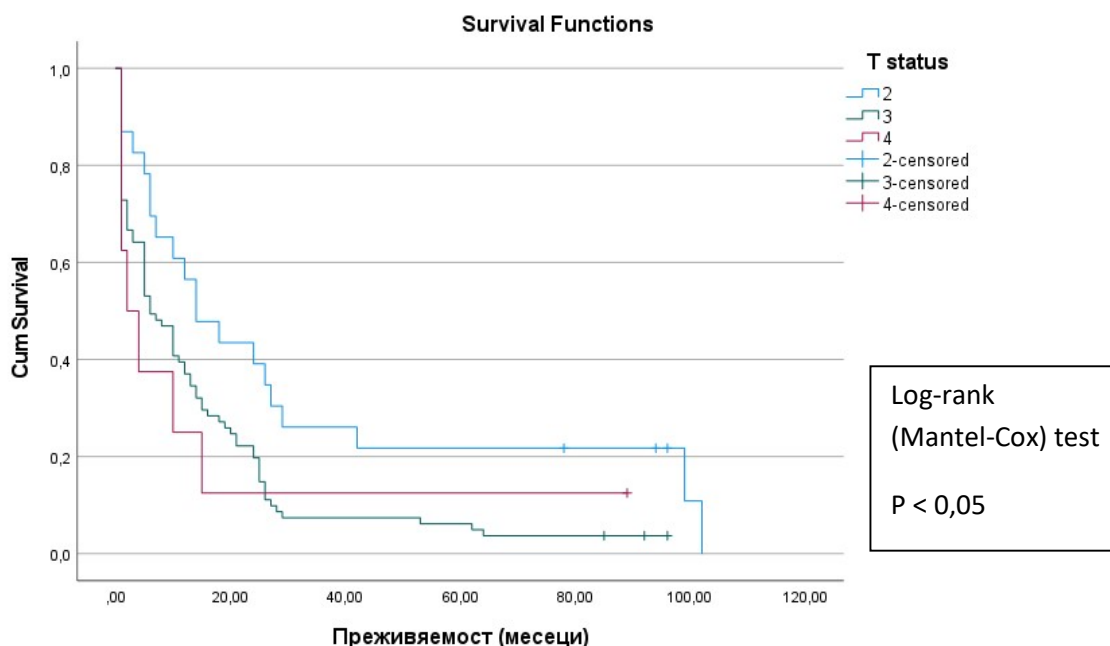


Фиг. 18 Карпан–Мејер крива на обща преживяемост на пациентите над 60 г, оперирани в УБ
Линшьопинг според коморбидитет

4.4. Преживяемост според Т стадий и дължина на тумора

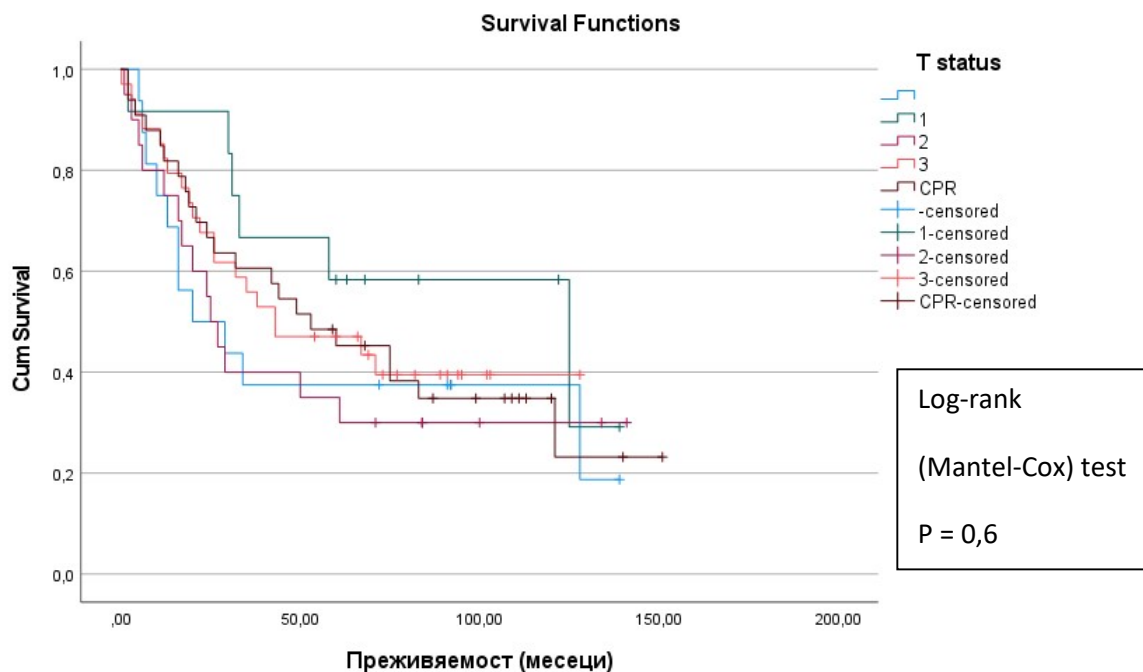
От анализа на пациентите според Т стадия са изключени пациентите с Т1 тумори в българската кохорта и пациентите с Т0, Тis и Т4 тумори в шведската кохорта поради малкия брой, който не позволява адекватна статистическа обработка.

В българската група средната преживяемост в месеци при пациентите с Т2 тумори е 32,5 (95% CI 16,9 – 48,1), с Т3 - 14,5 (95% CI 10,0 – 19,0) и с Т4 15,3 (95% CI 1,0 - 34,9).



Фиг. 19 Карпан–Meier крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УМБАСЛМ „Н.И. Пирогов” според Т стадия

В шведската кохорта средната преживяемост в месеци при пациентите с Т1 тумори е 89,8 (95% CI 60,3 – 119,3), с Т2 тумори - 57,1 (95% CI 32,3 – 81,9), с Т3 тумори - 66,7 (95% CI 48,9 - 84,3). Пациентите с пълен регрес на тумора (CPR) са със средна преживяемост 70,7 месеца (95% CI 59,4 – 81,9).



Фиг. 20 Карпан–Meier крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УБ Линшьопинг според Т стадия

В обобщен вид данните са представени в **таблица 8**.

Т стадий	Българска кохорта			Шведска кохорта		
	Преживяемост в месеци			Преживяемост в месеци		
	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост
T1	-	-	-	89.8	60.3	119.3
T2	32,5	16.9	48.1	57.1	32.3	81.9
T3	14.5	10.0	19.0	66.7	48.9	84.3
T4	15.3	1.0	34.9	-	-	-
CPR	-	-	-	70.7	59.4	81.9

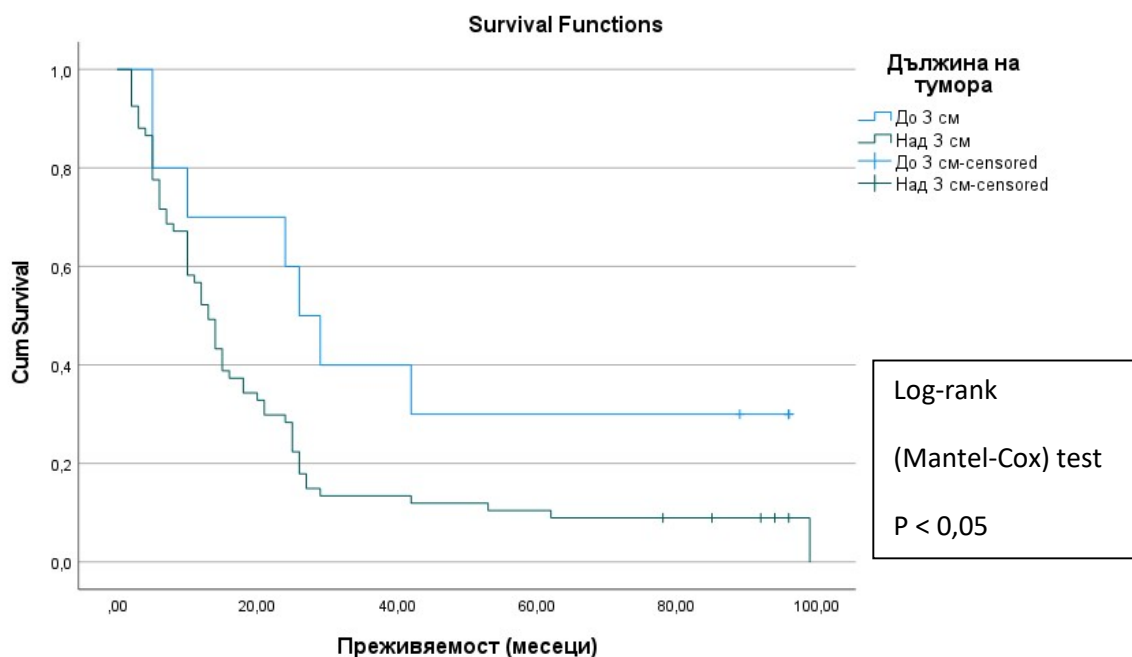
Таблица 8. Средна, минимална и максимална преживяемост според патологичен Т стадий за пациенти, оперирани в УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, София и УБ Линшьопинг, Швеция

Според дължината на тумора, пациентите са разделени в две групи – до 3 см и над 3 см. Средната преживяемост за българските пациенти е 42,9 месеца (95% CI 20,3 – 65,5 месеца) в групата до 3 см и 22,1 месеца (95% CI 15,7 – 28,6 месеца).

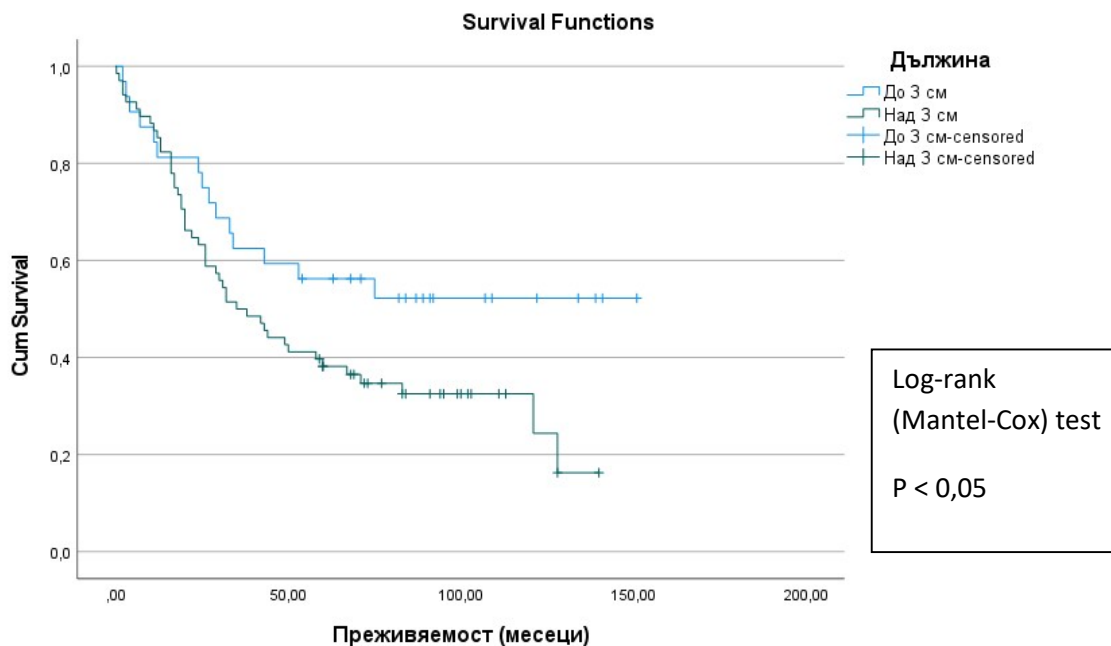
За шведската кохорта преживяемостта е 91,5 месеца (95% CI 69,2 – 113,8 месеца) при пациентите с тумори до 3 см и 61,6 месеца (95% CI 48,9 – 74,3 месеца) в групата с тумори над 3 см. **Таблица 9**

Дължина на тумора	Българска кохорта			Шведска кохорта		
	Преживяемост в месеци			Преживяемост в месеци		
	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост
До 3 см	42.9	20.3	65.5	91.5	69.2	113.8
Над 3 см	22.1	15.7	28.6	61.6	48.9	74.3

Таблица 9. Средна, минимална и максимална преживяемост според дължината на тумора за пациенти, оперирани в УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, София и УБ Линшьопинг, Швеция



Фиг. 21 Kaplan–Meier крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УМБАЛСМ „Н.И. Пирогов“ според дължината на тумора



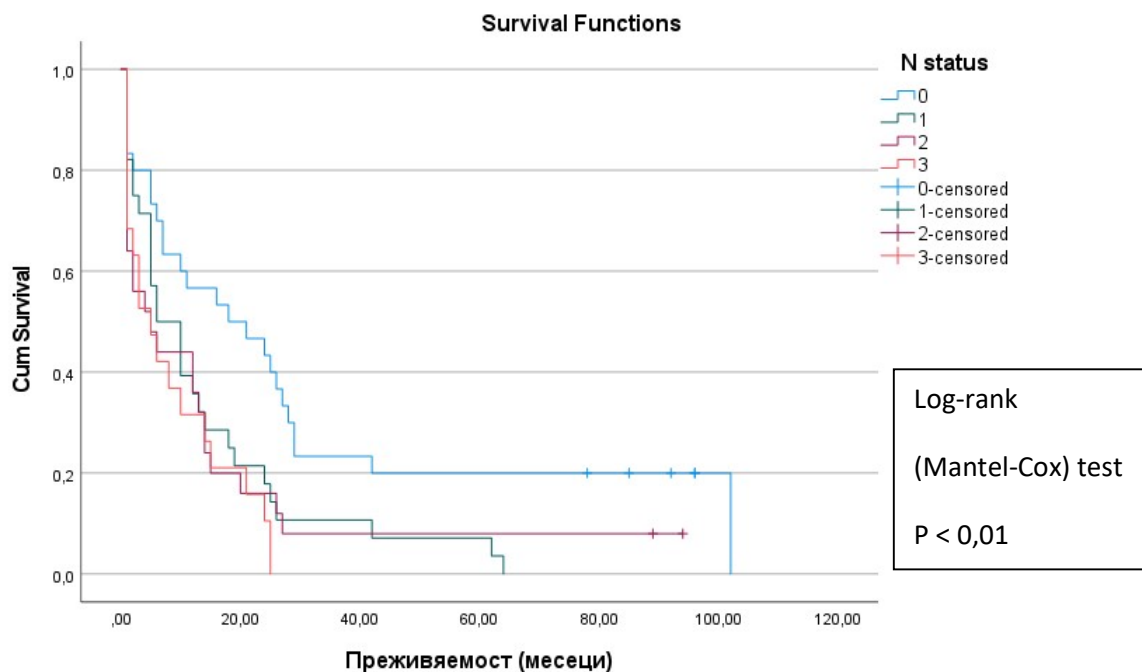
Фиг. 22 Карпан–Meier крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УБ Линшьопинг според дължината на тумора

4.5. Преживяемост според N стадий

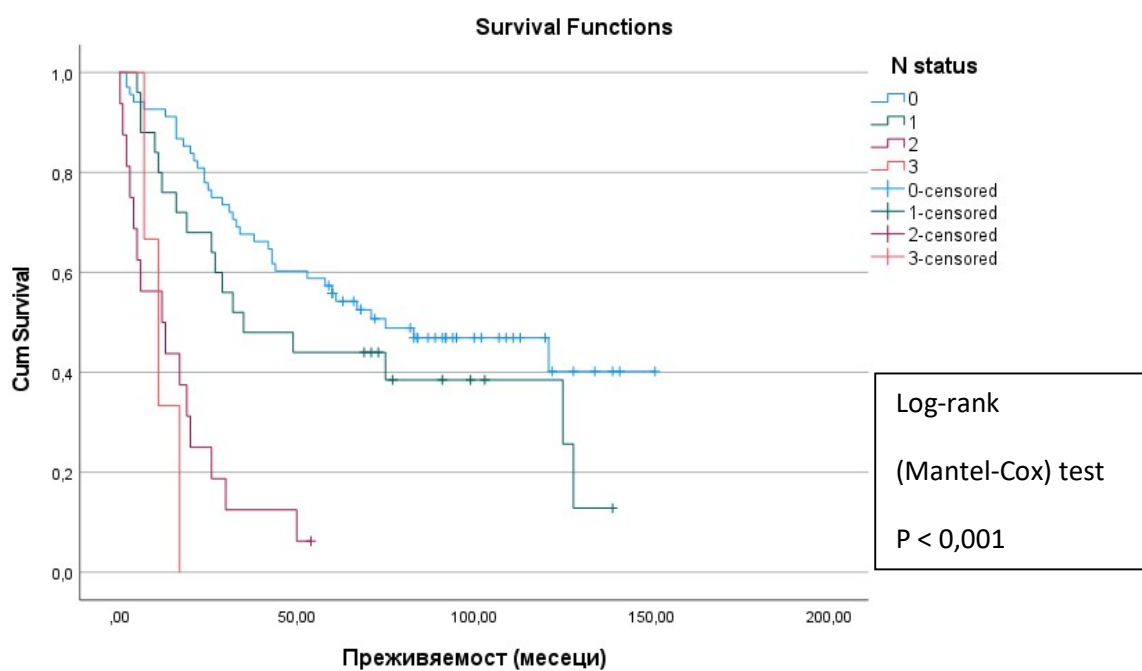
Средния брой на екстирпираните лимфни възли в българската кохорта е 11 (2 – 33), а в шведската е 12 (1 – 51). Преживяемостта в месеци според N стадия е показана в **таблица 10** и илюстрирана в Каплан- Майерови криви на **фигура 23** и **фигура 24**.

N стадий	Българска кохорта			Шведска кохорта		
	Преживяемост в месеци			Преживяемост в месеци		
	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост
N0	31.8	18.4	45.2	87.0	72.5	101.6
N1	14.0	7.8	20.3	65.7	44.4	87.2
N2	14.8	5.1	24.4	16.4	8.5	24.3
N3	8.8	4,7	12.9	11.7	5.9	17.4

Таблица 10. Средна, минимална и максимална преживяемост според N стадий за пациенти, оперирани в УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, София и УБ Линшьопинг, Швеция



Фиг. 23 Карпан–Мејер крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УМБАСЛМ „Н.И. Пирогов” според N стадия



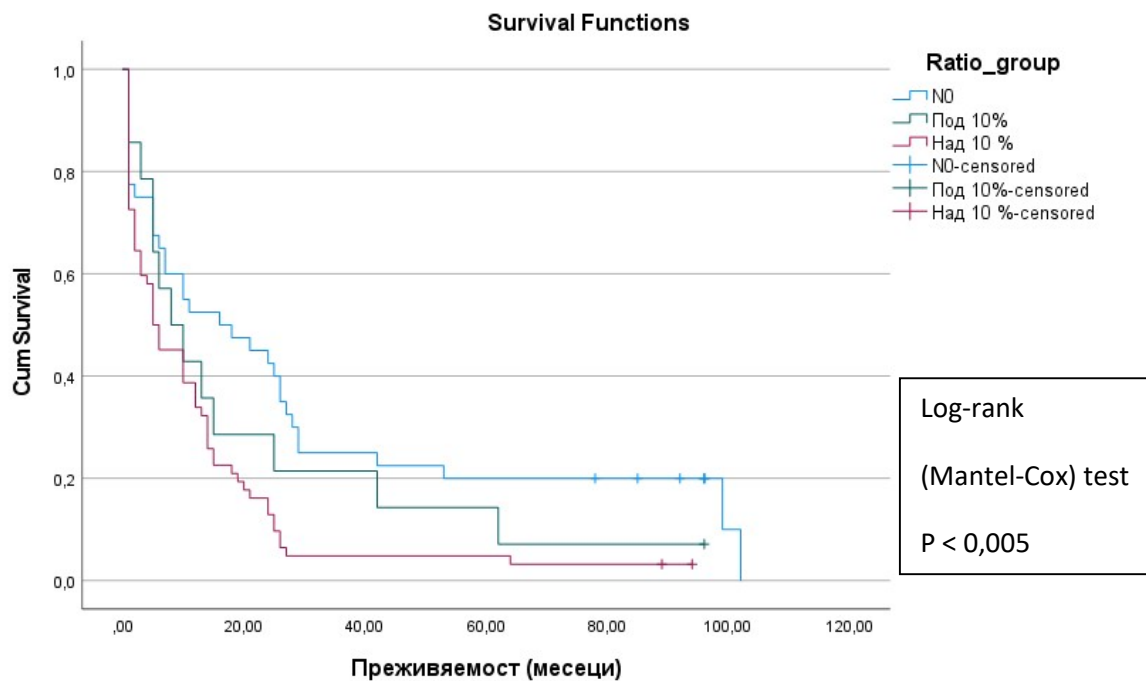
Фиг. 24 Карпан–Мејер крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УБ Линшюпинг според според N стадия

4.6. Съотношение метастатични към общ брой лимфни възли

За целите на нашия анализ пациентите с позитивен нодален статус (N1, N2, N3) са разделени в две групи. В първата група са пациентите със съотношение метастатични към общ брой екстирпирани лимфни възли под 10%. Втората група включва тези, които имат съотношение над 10%. Данните са статистически достоверни и в двете популационни кохорти.

За българската кохорта средната преживяемост в първата група е 20,8 месеца (95% CI 6,8 – 34,8 месеца) и 12,3 месеца (95% CI 7,8 – 16,9 месеца) във втората група.

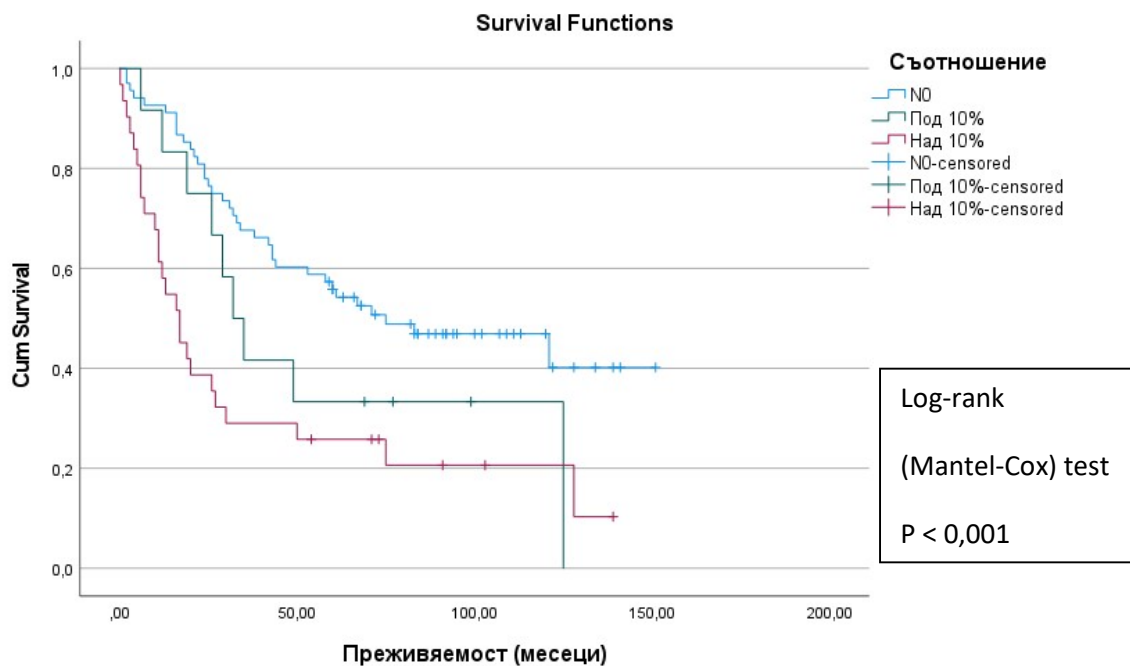
Фигура 25



Фиг. 25 Kaplan–Meier крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УМБАСЛМ „Н.И. Пирогов“ според съотношението метастатични/общ брой екстирпирани лимфни възли

За шведската кохорта средната преживяемост в първата група е 59,0 месеца (95% CI 30,3 – 87,7 месеца) и 41,5 месеца (95% CI 23,6 – 59,4 месеца) във втората група.

Фигура 26



Фиг. 26 Kaplan–Meier крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УБ Линшьопинг според съотношението метастатични/общ брой екстирпирани лимфни възли

Преживяемостта (в месеци) в обобщен вид е показана в **таблица 11**.

Нодален статус	Българска кохорта			Шведска кохорта		
	Преживяемост в месеци			Преживяемост в месеци		
	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост
Под 10%	20.8	6.8	34.8	59.0	30.3	87.7
Над 10%	12.3	7.8	16.9	41.5	23.6	59.4

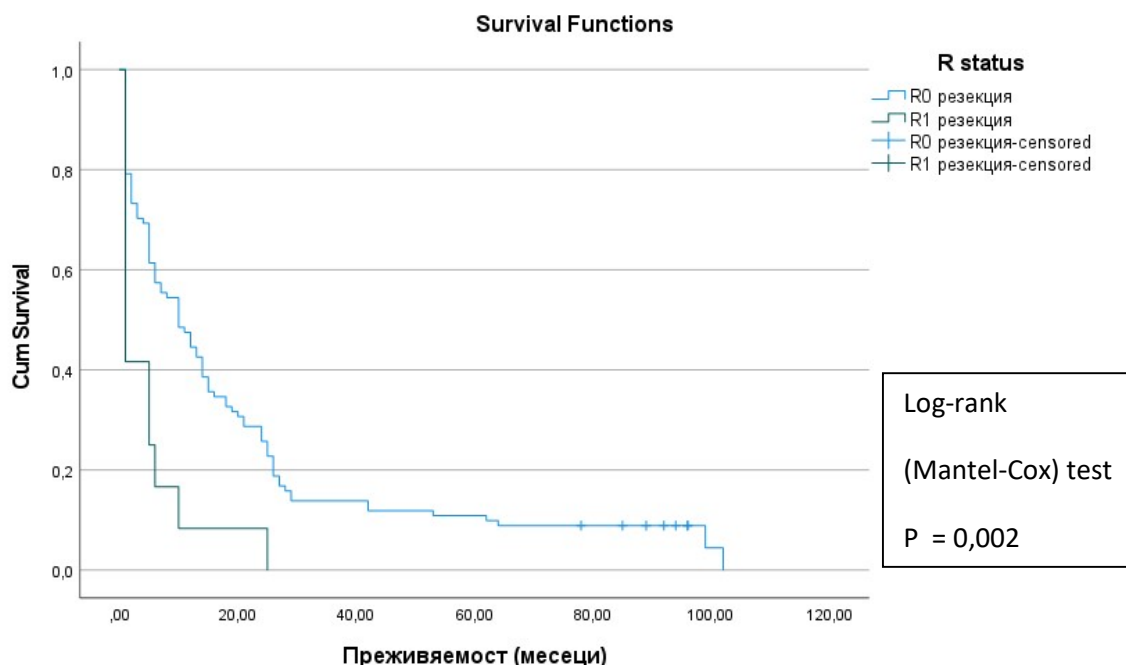
Таблица 11. Средна, минимална и максимална преживяемост според съотношението метастатични/общ брой екстирпирани лимфни възли за пациентите, оперирани в УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, София и УБ Линшьопинг, Швеция

4.7. Нерадикална резекция

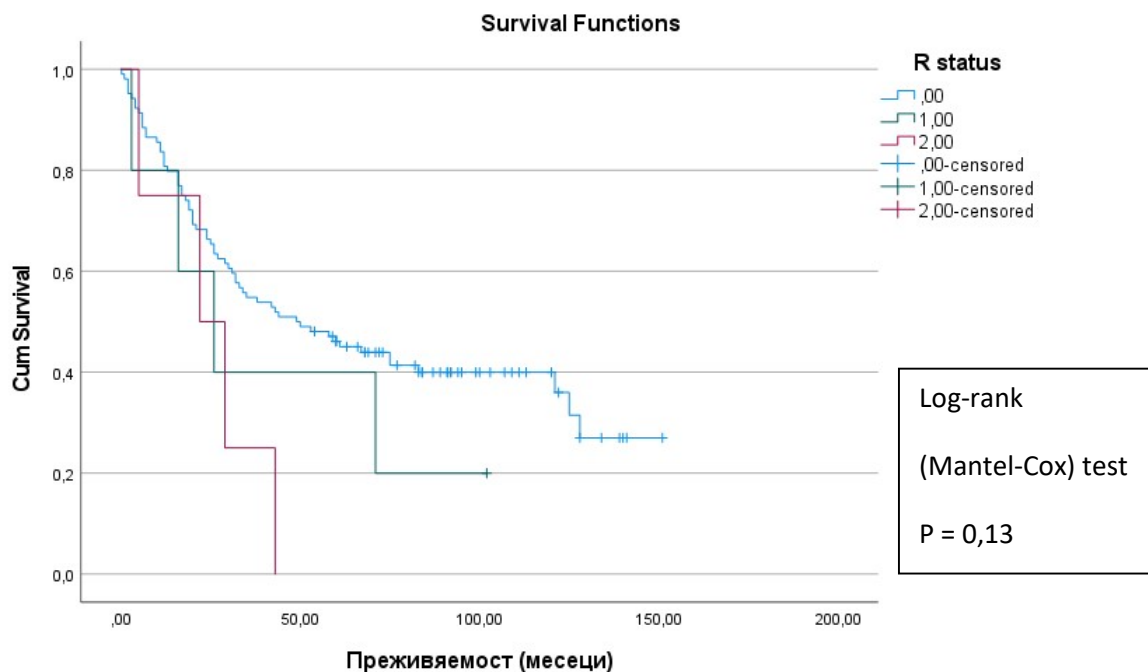
Средната преживяемост според радикалността на резекцията също се различава значително между двете кохорти, но анализираният пациент са малко и генерален извод не може да се направи. Само един пациент е с R2 резекция в българската кохорта и той е починал в рамките на 3 месеца след операцията, заради което е изключен от анализа.

Радикалитет на операцията	Българска кохорта Преживяемост в месеци			Шведска кохорта Преживяемост в месеци		
	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост	Средна	Минимална преживяемост	Максимална преживяемост
R0	20.3	14.9	25.9	73.0	61.1	84.9
R1	4.8	0.9	8.8	43.6	11.1	76.1
R2	-	-	-	24.7	9.3	40.2

Таблица 12. Средна, минимална и максимална преживяемост според радикалитет на резекцията за пациентите, оперирани в УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, София и УБ Линшьопинг, Швеция



Фиг. 27 Kaplan–Meier крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УМБАЛСМ „Н.И. Пирогов“ според радикалността на резекцията



Фиг. 28 Карпан–Meier крива на обща преживяемост на пациентите, оперирани в УБ Линшьопинг според радикалността на резекцията

4.8. Резултати от генетичното проучване

Изследваната група се състои от 20 пациента с хистологично доказан карцином на хранопровода. Хистологичният анализ на туморите е основен фактор, определящ както прогнозата, така и лечението на пациентите. Включените в изследването тумори бяха оценени хистопатологично в Клиниката по клинична патология, УМБАЛСМ "Н. И. Пирогов". Беше потвърден типа на езофагеалните карциноми. Освен това бяха определени особеностите на клетъчната диференциация и туморният стадий.

Таблица 13.

КЛИНИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА**БРОЙ
ПАЦИЕНТИ**

ХИСТОЛОГИЯ		
	ПЛОСКОКЛЕТЪЧЕН КАРЦИНОМ	12
	АДЕНОКАРЦИНОМ	8
СТЕПЕН НА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ		
	G1	3
	G2	6
	G3	11
T СТАТУС		
	T2	3
	T3	14
	T4	3
N СТАТУС		
	N0	8
	N1-3	9
	NX	3
M СТАТУС		
	M0	18
	M1	2
ЛОКАЛИЗАЦИЯ		
	ГОРНА ТРЕТА	4
	СРЕДНА ТРЕТА	5
	ДОЛНА ТРЕТА	11

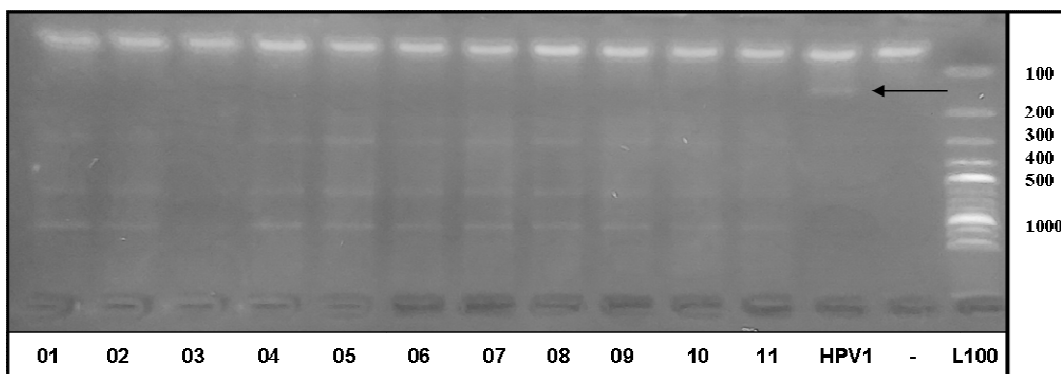
Таблица 13.**Характеристика на пациентите, включени в генетичното проучване**

Висок процент пациенти (25%) съобщават за наличие на роднина по пряка линия боледувал от друго злокачествено заболяване. При двама от тях се касае за развитие на рак на стомаха (Ca ventriculi), при двама рак на дебелото черво (Ca coli), като единия пациент има двама болни близки родственика, а при един рак на простатата (Ca glandulae prostatae).

4.8.1. Резултати от анализа на HPV

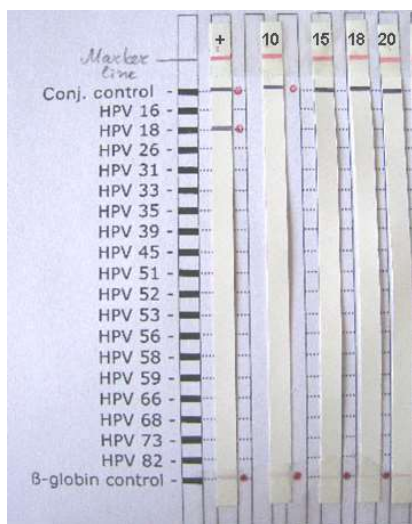
В настоящето проучване с помощта на комерсиалния кит digene HPV Genotyping RH test (Qiagen) бяха изследвани всичките 20 пациента, но при нито един от тях не беше установено наличие на HPV ДНК.

Първоначално беше проведена реакцията за размножаване на HPV ДНК фрагмента с помощта на GP5+/GP6+*биотин праймери, използвайки digene HPV Genotyping RH Test, Amplification Kit. **Фигура 29**



Фигура 29. Анализ за наличие на HPV ДНК чрез PCR реакции с GP5+/GP6+*биотон праймери (The digene HPV Genotyping RH Test, Amplification Kit), продукта в положителната контрола HPV1 е посочен от стрелката и се намира на около 150 бази

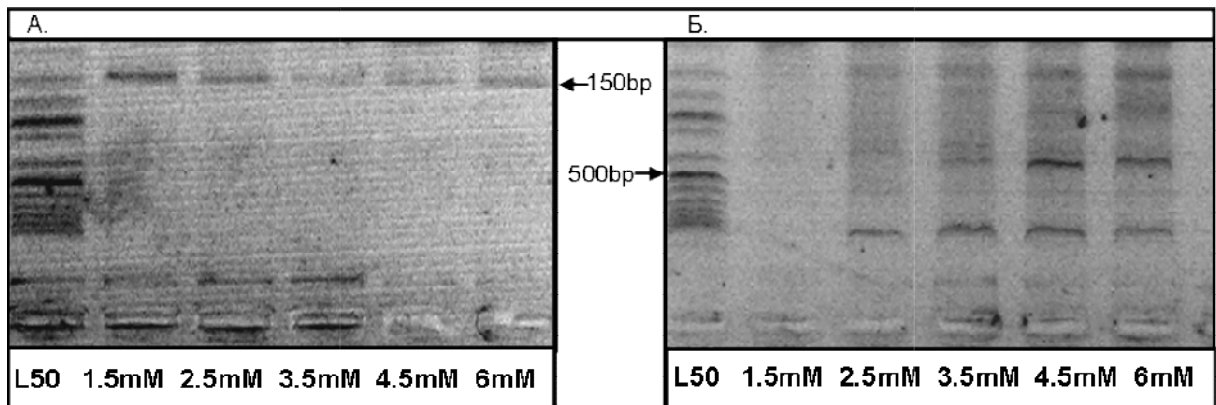
Въпреки, че нито един от пациентите не показва ясно наличието на фрагмент с такава дължина, пациентите с диагноза ПКК на хранопровода и по-ранно начало на възникване на карцинома бяха анализирани с втория кит (The digene HPV Genotyping RH Test, Detection Kit) за определяне на серотипа на HPV вируса. На **Фигура 30** е показан резултата от анализа, който показва липсата на инфекция с HPV.



Фигура 30. Резултат от изследване на ЕК проби за наличие на HPV ДНК чрез digene HPV Genotyping RH test (Qiagen). В ляво е дадено разпределението на HPV типове по дължината на стрипа (HPV16 до HPV82) и контролните ивици (за β -глобиновия ген, т.е. за амплификационната, и за конюгационната реакции). При всички стрипове се наблюдават 2 контролни ивици, но само при положителната контрола има ивица, показваща наличие на HPV18. Следващите ленти са на пробите 10, 15, 18 и 20.

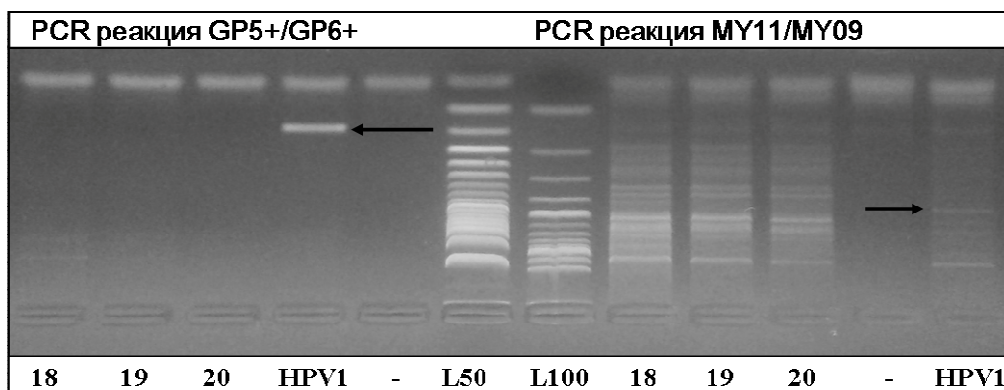
Поради липсата на положителен резултат с кита беше проведена оптимизация на условията за анализ чрез вариране концентрациите на $MgCl_2$, dNTPs, праймери и температурата на анилинг – за всяка от двете PCR реакции.

На **Фигура 31** е представен резултатът от оптимизацията на PCR реакцията за праймерите GP5+/GP6+ (А) и MY09/MY11 (Б) при вариране концентрацията на $MgCl_2$.



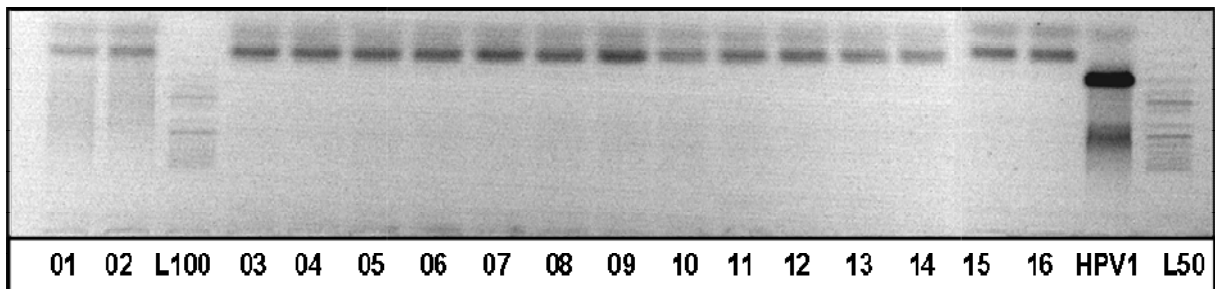
Фигура 31. Оптимизация на PCR реакцията за праймерите GP5+/GP6+ (А) и MY09/MY11 (Б) при вариране концентрацията на $MgCl_2$ между 1.5 и 6 mM. L50 – молекулен маркер за размер 50bp.

На **фигура 32** е показан резултат за част от пациентите осъществен чрез индивидуални PCR реакции с GP5+/GP6+ и MY11/09 праймери.



Фигура 32. Анализ за наличие на HPV ДНК чрез две отделни PCR реакции с GP5+/GP6+ и MY11/09 праймери. Амплификация се наблюдава само при положителната контрола (HPV1) – по-силен продукт има около 150 бази (GP5+/GP6+) и по-слаб около 450 бази (MY09/MY11) маркирани със стрелка.

Резултатите от двете самостоятелни PCR реакции, както и nested PCR с MY/GP праймерите (**Фигура 33**) потвърдиха тези, получени с HPV кита – нито една проба не показва наличие на амплификация, т.е. не беше установен нито един КХ, който може да се асоциира с HPV инфекция.



Фигура 33. Анализ за наличие на HPV ДНК чрез nested PCR с MY/GP праймери. Амплификация се наблюдава само при положителната контрола (HPV1) – по-силен продукт има около 150 бази (GP5+/GP6+) и по-слаб около 450 бази (MY09/MY11) маркирани със стрелка.

Като цяло нито един от изследваните 20 пациента с КХ не показва наличие на HPV-ДНК, т.е. вероятно този механизъм на възникване на езофагеалния карцином не се среща при българските пациенти или се среща по-рядко поради което е необходимо изследването на по-голяма група от пациенти.

5. Обсъждане

Представените резултати са от проучване, включващо две популационни кохорти с приблизително равен брой пациенти (117 vs 115). Не се отчитат разлики по отношение на проведеното хирургично лечение, но около 90% от пациентите в шведската кохорта са с проведена неoadювантна терапия, което според нашите резултати и литературните данни значително повлиява преживяемостта.

Епидемиологичните данни на двете групи показват значителен превес на мъжете спрямо жените. В българската кохорта съотношението мъже : жени е 4.85, като за АК е 5, а за ПКК е 4.1. За шведската кохорта стойностите са 3.3, респ 5.4 за АК и 1.2 за ПКК.

Тези данни съвпадат с докладваната от други автори от три до пет пъти по – висока заболяемост от карцином на хранопровода при мъжете [208].

За АК това съотношение е около 4.4, вариращо от 1.7 в Суб-Сахарна Африка до 8.5 в Северна Америка. За ПКК съотношението е 2.7, като най – високо е в Източна Европа (7.8) и най – ниско в Северна Африка и Западна Азия (1.2) [209].

Анализирайки базата данни SEER, Mathieu и сътр установяват, че съотношението мъже: жени при пациентите с АК на хранопровода е 7.66 за периода 1973 – 2008, което е най – високо във възрастния диапазон 50 – 54 години (11:1) и се понижава до 4:1 във възрастта 75 – 79 години [213].

Причините за половите различия по отношение на заболяемостта все още остават неясни т.к. никой от известните рискови фактори за КХ не може да обясни тези различия. Предполага се, че половите хормони осигуряват известна протекция срещу този вид тумори при жените. Cronin – Fenton и сътр анализират 218 случая с КХ и 862 контроли и доказват, че кърменето намалява риска от развитие на аденокарцином на хранопровода и гастро-езофагеалната връзка [210]. Друг възможен фактор допринасящ за различна заболяемост от АК при двата пола е промененото ниво на адипокини като например лептин, продуциран от висцералните мастни клетки, което се наблюдава по – често при мъжете. Това предположение се базира на наблюденията, че пациентите с Баретов хранопровод са с по – голяма коремна обиколка спрямо контролите, дори и при еднакъв ВМІ [211, 212].

Стратифицирайки пациентите по възрастови групи (до 60 год и над 60 год) установяваме значителни разлики между двете популации. В българската кохорта преобладават пациентите в трудоспособна възраст (66 vs 51), докато в шведската младите пациенти са три пъти по – малко (27 vs 88). Средната възраст за българските пациенти е 59.0 години, като възрастта е негативен прогностичен маркер от проведеня Cox анализ (HR 1.02, 95% CI 1.01 – 1.05). Шведските пациенти са със средна възраст 64.9 години, но регресионния анализ не показва корелация между възрастта и нивата на преживяемост.

Половото съотношение се запазва в тези подгрупи с изключение на групата до 60 год в шведската кохорта, където то е 2:1 (мъже: жени).

Общата преживяемост при жените до 60 години в българската извадка е по – ниска от тази при мъжете (17,5 vs 23,0 месеца), докато над 60 години е три пъти по – висока (36,6 vs 11,8 месеца). Въпреки че, преживяемостта в групата над 60 години съвпада с резултатите, докладвани от други автори, стойностите не са статистически сигнификантни.

В шведската група, жените живеят значително по-дълго от мъжете независимо от възрастта, като стойностите са статистически достоверни (до 60 г. жени vs мъже – 110,7 vs 65,4 м.; над 60 г. жени vs мъже – 84,0 vs 61,6 м.). Регресионния анализ потвърждава, че мъжкия пол е негативен предиктивен фактор с HR 2.87 (95% CI 1.15 – 7.14).

По – добрата преживяемост в тази група се обяснява с по – рано посочения факт, че голяма част от тези пациенти са получили неoadювантна терапия. Малкия процент пациенти, които не са третирани мултимодално са били в напреднала възраст, с придружаващи заболявания или в ранен стадий на тумора и са преминали към директно хирургично лечение. Част от пациентите не са получили неoadювантно лечение в пълен обем поради усложнения или влошаване на общото състояние, като преобладаващия процент отново са в групата над 60 години. С това се обяснява по – ниската преживяемост в групата над 60 години.

Резултатите на други автори показват по-добра прогноза при жените с КХ в сравнение с мъжете [97, 214, 215].

Анализирайки пациентите, включени в Националния регистър за карцином на хранопровода и стомаха в Швеция (NREV), Каурпила и сътр демонстрират по – нисък

морталитет при жените с ПКК на хранопровода, но не и при тези с АК (HR 0.83, 95% CI 0.78 – 0.89) [216]. В допълнително изследване, същите автори потвърждават по-добрата прогноза при жените, оперирани за ПКК в сравнение с мъжете, като половите разлики са още по-изразени при ранните туморни стадии [217]. Популяционно проучване от Нидерландия на 703 болни с КХ също показва по – добра обща преживяемост при жените, но без да се коментира хистологичния вариант (HR 0.56, 95% CI 0.32 – 0.99) [215].

В изследване от Иран на 426 пациенти с ПКК на хранопровода, Aghcheli и сътр не намират по – лоша преживяемост при жените спрямо мъжете (HR 0.91, 95% CI 0.72 – 1.15) [218].

В обобщение, повечето изследвания подкрепят хипотезата за по – висока преживяемост при жените спрямо мъжете с ПКК на хранопровода, особено ако заболяването се развие след 55 годишна възраст.

Допълнителен фактор, който оказва влияние върху изборът на терапевтичен алгоритъм (мултимодален подход или само операция), видът и обема на хирургичната резекция и съответстващата лимфна дисекция и по - този начин върху резултатите от лечението вкл преживяемостта е наличието или липсата на придружаващи заболявания. Логично с напредване на възрастта на пациентите се увеличава коморбидния товар, което в много случаи ограничава терапевтичните опции. Тези пациенти са с много по – голяма вероятност от развитие на усложнения и с по – висок периперативен морбидитет и морталитет.

В разглежданите кохорти, данните за българската популация са статистически значими поради равномерното разпределение на пациентите в отделните субгрупи. За шведската резултатите са недостоверни, вероятно поради малкия брой пациенти в групата до 60 години с придружаващи заболявания (само 5 болни).

Наличието на придружаващи заболявания е неблагоприятен фактор, който значително намалява общата преживяемост, независимо от възрастта на пациентите, което се подкрепя от нашите резултати.

Пациентите със сърдечна патология в повечето случаи са контраиндицирани за химиотерапия, дори и при напреднал стадий на тумора и наличието на лимфни

метастази. В тези случаи хирургичната резекция е единствената терапевтична алтернатива за тези болни, които могат да я толерират.

В нашето изследване сме оценили пациентите според наличието или липсата на определени заболявания. Оценка е дадена от анестезиолозите според ASA критериите, но това отразява по – скоро функционалното състояние на болните и способността им да понесат травмата от хирургичната интервенция.

В повечето международни проучвания, коморбидитетът на болните се оценява според Charlson Comorbidity Index (CCI), който беше споменат в литературния обзор.

Yamashita и сътр разглеждат 548 пациенти с КХ и установяват, че най – честата придружаваща патология е ХОББ, следвана от наличието на предишни тумори в анамнезата [219]. Те разделят пациентите на такива с висок CCI (≥ 2) и с нисък CCI (0 или 1). Висок CCI корелира сигнификантно с напреднала възраст ($p < 0.001$), само операция без съпътстваща онкологична терапия в лечебния протокол ($p = 0.02$), по – малък брой екстирпирани лимфни възли ($p < 0.001$), по – ниско ниво на R0 резекции ($p = 0.048$) и дълъг болничен престой ($p < 0.001$). Авторите не намират разлика в специфичната за заболяването преживяемост между двете групи, но пациентите с висок индекс и стадий на тумора ≥ 2 са с по-лоша прогноза.

В проучване на Tanaka и сътр, включващо 484 пациенти, резецирани за езофагеален карцином се установява, че напредналата възраст, придружаващите белодробни заболявания и продължителната операция са рискови фактори за развитие на остра пневмония в постоперативния период. Този тип пневмония е независим прогностичен фактор за влошена преживяемост ($p = 0.0002$) [220].

Vakhos и сътр сравняват резултатите от лечението на пациенти над 80 годишна възраст с тези на по – млади пациенти с КХ за периода 2004 – 2014, екстрахирайки данните от National Cancer Database (NCDB). От 107 921 лекувани пациенти, 16 388 (15.2 %) са на възраст над 80 години и повечето са жени, имат по- висок социо-икономически статус и са с по – висок CCI. Възрастните пациенти, третирани мултимодално са с по – лоша преживяемост в сравнение с младите пациенти с изключение на тези със стадий III на тумора и без придружаващи заболявания [221].

На базата на посочените проучвания може да се предположи, че въпреки многото включени в Charlson Comorbidity Index заболявания, основно неблагоприятно влияние

оказва сърдечната и белодробната патология. В метаанализ, публикуван през 2020 година Zheng и сътр изследват ефекта на захарния диабет, който е едно от най-честите съпътстващи заболявания върху общата преживяемост на пациенти, резецирани за КХ [222]. Анализирани са 8 кохортни студия с общо 5 044 пациенти без да се установи сигнификантна разлика в 3 и 5 - годишната преживяемост при пациенти със и без захарен диабет.

Общото състояние на пациентите е безспорен фактор, оказващ влияние върху избора на терапевтичен протокол, но водещ фактор в това решение е туморния стадий, определен според AJCC/ UICC класификацията.

В нашето проучване, по – голямата част от пациентите в българската група са диагностицирани в късен стадий Т3 (81 пациента), докато пациентите в шведската кохорта се разпределят във всички стадии (в Т3 са 34 пациента). Резултатите по отношение на преживяемостта са сигнификантни за оперираните в УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов” болни, но не и за тези, оперирани в УБ Линшьопинг. Въпреки това прави впечатление значително по – добрата преживяемост в шведската група, което без съмнение се дължи на проведената неoadювантна терапия. В тази група има немалка част пациенти (33 болни), при които се отчита пълен хистологичен отговор (Complete pathological response) след проведената неoadювантна ХЛТ т.е. туморът, доказан на биопсия не се открива на траен препарат. За да се оцени степента на туморната регресия има разработени различни системи – Mandard, Becker, Dworak, Rödel [223 - 226]. Възприета в Швеция е класификационната система на Mandard и всички хистологични препарати са оценени според нея.

Както се вижда от данните за преживяемостта в таблица 7 и представените криви на фигура 19 и 20, има известно несъответствие между очакваната по – ниска преживяемост с напредване на дълбочината на туморната инвазия (Т стадий). Това отчасти може да се дължи на разнородните групи и малкото болни в част от тях, но други фактори вероятно оказват влияние върху тези резултати. Това се подкрепя от изследванията на други автори, които демонстрират различна преживяемост при пациенти с еднакъв туморен стадий. Възможно обяснение на този факт е различната агресивност на туморите.

В увеличаващ се брой публикации се дискутира откриването на далечни метастази при относително ранни тумори. Deng и сътр допускат, че ранен КХ, който е с далечни

метастази е с много по-агресивен фенотип и води до по – лоша преживяемост в сравнение с метастазирал КХ в по – висок Т стадий [227]. Извършвайки анализ на пациентите в базата данни SEER, авторите установяват, че пациентите с T1M1 тумори са със сигнификантно по-лоша преживяемост от тези с T2M1 и T3M1.

Усложняващ анализа факт е, че част от пациентите са получили неoadювантна терапия. В ретроспективно проучване от 2006 година, Korst и сътр демонстрират по - висока обща и специфична преживяемост за пациенти, които са рестадирани в по-нисък Т и N стадий след получено неoadювантно лечение. За съжаление такъв анализ не може да се извърши в нашето проучване, т.к. липсват данни за клиничния стадий на пациентите преди получената предоперативна химио-лъчетерапия. Туморния TNM статус и в двете кохорти е отчетен само на базата на трайните хистологични резултати.

При определяне на Т стадия се отчита само степента на туморна инвазия в стената. В редица изследвания дължината на тумора се утвърждава като важен прогностичен маркер, като различните автори приемат различни гранични стойности за критични.

В нашето изследване сме разделили пациентите в две групи според дължината на тумора до 3 см и над 3 см. Резултатите, които получаваме и в двете кохорти са статистически значими и показват намаляваща преживяемост с увеличаване големината на тумора. Преживяемостта при тумори над 3 см е два пъти по – ниска от тази при тумори по – малки от 3 см. Негативната предиктивна стойност на големина на тумора, повече от 3 см се доказва и регресионния анализ (HR 2.37 (95% CI 1.06 – 5.25); $p = 0,035$ за българските пациенти и HR 2.01 (95% CI 1.10 – 3.63); $p = 0,022$ за шведските пациенти).

Следователно дължината на тумора е мощен прогностичен критерий, по – чувствителен от Т стадия на тумора и не се влияе от получената предоперативна химио-лъчетерапия по отношение на своята предиктивна стойност.

Това заключение се потвърждава от публикациите на други автори. Song и сътр намират, че при пациенти с КХ в еднакъв стадий, дължината на тумора е независим прогностичен фактор [228].

Освен прогностичната си стойност, този показател оказва влияние и върху избора на хирургичния метод. При тумори по-дълги от 5 см с цел постигане на радикалитет (R0

резекция) може да се наложи извършване на McKeown езофагектомия, дори и при тумори в дисталната част на хранопровода.

Интересен факт е, че туморната дължина е фактор, който се използва за дефиниране на Т стадия в по – старите версии на AJCC TNM класификации (3-та ревизия от 1982 г.). Въпреки, че през 1987 година този показател е заменен с дълбочината на туморната инфилтрация в езофагеалната стена, туморната дължина все още се счита от много автори за показател, свързан с обхвата на туморната инвазия.

Освен Т статусът, негативен N статус е друг важен независим прогностичен фактор за преживяемост и адекватната лимфна дисекция е съществен елемент от оперативната интервенция за КХ. В предишните класификационни системи липсваха препоръки за минималния брой лимфни възли, които да бъдат екстирпирани при езофагектомия, но последните алгоритми посочват, че е необходима дисекция на минимум 15 лимфни възли за коректно стадиране.

За изследвания период, всички анализирани пациенти и в двете страни са стадирани според актуалната към този момент 7-ма ревизия на AJCC/ UICC TNM класификация, в която както беше споменато не се определя минимален брой на изследвани лимфни възли.

Извършена е лимфна дисекция на два етажа при всички болни. Средния брой на екстирпираните лимфни възли е 11 броя за българската кохорта и 12 броя за шведската кохорта.

Преживяемостта при пациентите и в двете извадки е в пряка зависимост от N стадия, като прогресивно намалява с увеличаване на броя позитивни лимфни възли. Резултатите са статистически значими и за двете кохорти.

Интересен факт е, че средната преживяемост не се различава съществено в N1 и N2 групата, като за това има две възможни обяснения. Първо, броят на позитивните лимфни възли може да бъде подценен, ако не всички лимфни възли са изследвани от патолога. В повечето случаи резецирания препарат се изпраща en bloc, като само малка част от лимфните възли се изпращат отделно маркирани от хирурга. Това недостатъчно изследване резултира в неадекватно стадиране (стадиране в по-нисък стадий). Изследването на повече лимфни възли теоретично води до детекция на повече метастатични възли [229].

Второ, част от негативните лимфни възли може да съдържат неразпознати туморни клетки. Имунохистохимични анализи са показали, че голям процент от N0 пациентите са с нодални метастази, които са пропуснати на рутинно хистопатологично изследване [230, 231]. Ето защо премахването на повече лимфни възли води до елиминиране и на окултни карциномни клетки и редуцира риска от развитие на последващи рецидиви на тумора и на метахронни метастази.

В изследване на Rizk и сътр. на 4627 пациенти, резецирани за КХ се установява, че при над 60% от оперираните пациенти са премахнати >15 регионални лимфни възли [232]. В друго изследване на Altorki и сътр, статистически значимо намаление на риска от смъртен изход (Hazard ratio) при N0 пациентите се установява при екстирпирани повече от 40 лимфни възли. За позитивните пациенти, по –нисък е риска в групите, където са екстирпирани повече от 16 лимфни възли [233].

В предишно наше изследване, пациентите с 3 и повече позитивни лимфни възли (в шведската кохорта) са с изключително лоша прогноза, дори и след проведена неoadювантна терапия. В тази група средната преживяемост е 331 дни (публикация, свързана с дисертационния труд).

Ключово значение в лечението на пациентите с карцином е точното стадиране на туморния процес, основаващо се на международно приети стандарти. Адекватното стадиране е важно не само по отношение на прогнозата, но също така при планиране на лечението и за сравняване на резултатите от това лечение между различните центрове. Недостатъчният брой на изследваните лимфни възли и пропускането на метастатични такива води до т.н миграция на стадия т.е. категоризиране на пациентите в по – нисък туморен стадий и грешно дефиниране на по – добра прогноза [234, 235].

Съотношението на метастатичните към общия брой екстрипирани лимфни възли е прогностичен параметър, който беше предложен и въведен в клиничната практика в последните години. Той е лесен, удобен и репродуцируем и се използва за по – коректно определяне на субгрупите пациенти с карцином на стомаха, гърдата и колона, имащи подобна прогноза [236 - 240].

Значимостта на нодалното съотношение е безспорна, но не съществува консенсус относно точната стойност на това съотношение при езофагеалния карцином. За целите на нашето проучване приехме стойност на съотношението от 10 % и пациентите бяха

разделени в три групи – с негативен N статус (N0), със съотношение под 10% и със съотношение над 10%. Установихме статистически значими разлики в средната преживяемост и в двете кохорти между различните групи (20.8 месеца за пациентите със съотношение под 10% (95% CI 6,8 – 34,8 месеца) и 12.3 месеца (95% CI 7,8 – 16,9 месеца) за тези с над 10% в българската популация; 59.0 месеца (95% CI 30,3 – 87,7 месеца) респ 41.5 месеца (95% CI 23,6 – 59,4 месеца) в шведската популация).

Тези резултати съвпадат с резултатите, докладвани от Yukaawa и сътр, които в своето проучване също разделят пациентите в две групи според нодално съотношение под и над 10% [241]. Наблюдаваната три и петгодишна обща преживяемост е 65.5% и 57.0% в групата със съотношение под 10%, а в групата с нодално съотношение над 10% - 11.8% респ 0%. Пациентите в разглежданото проучване, за разлика от предходни изследвания, са преминали освен оперативна интервенция и периоперативна адювантна терапия, което според авторите може да оказва влияние върху нодалното съотношение. Теоретично, ефективната адювантна терапия може да подобрява преживяемостта чрез инхибиране на микрометастазите. Предходни публикации при други типове гастроинтестинални тумори са демонстрирали, че периоперативната онкологична терапия се асоциира с по – ниско нодално съотношение [242, 243]. Друг фактор, който може да има значение е средния брой на екстирпираните лимфни възли. В гореспоменатото проучване на Yukaawa, средно премахнати са 37 лимфни възли за пациент. Големият брой изследвани лимфни възли вероятно се дължи на факта, че проучването е японско. Японските хирурзи и патолози са изключително педантични при лимфната дисекция за всички видове карциноми.

Нодалното съотношение запазва своята прогностична стойност и при по-малък среден брой на екстирпираните лимфни възли. Според някои проучвания при пациентите, които са преминали неoadювантна терапия, се изолират по – малко лимфни възли, отколкото при оперираните директно [245]. Bhamidipati и сътр изолират средно 13 – 15 лимфни възли на пациент и приемат съотношение 20% като сигнификантно [244]. Според тях съотношението е по – достоверен предиктор на преживяемостта от pN без значение дали е проведена индукционна терапия и без значение на хистологичния тип на КХ.

Статистическата достоверност на нашите резултати подкрепя това твърдение. Изолирания среден брой лимфни възли са 11 за българската група и 12 за шведската.

Освен това едната кохорта са оперирани директно без предоперативна ХЛТ, а в другата над 90 % от пациентите са получили такава.

В групата предиктивни фактори, зависими от обема на извършената оперативна интервенция при пациентите с КХ е радикалитета на операцията. R1 резекцията при карциномите на хранопровода и гастро-езофагеалната връзка се свързва с намалена обща петгодишна преживяемост и според литературните данни варира между 8 и 19% [158, 246, 247]. В нашата извадка стойностите са 10,3% за българската група и 4,4% за шведската група.

С макроскопски нерадикална резекция R2 е 1 пациент, опериран в УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“ (0,8%), който е починал в първите 3 месеца след операцията. От оперираните в УБ Линшьопинг, 4 пациента са с R2 резекция (3,5%), като средната преживяемост в тази малка група е 24 месеца.

Причините за нерадикална резекция са ясни в повечето случаи – това са пациенти с големи тумори, разположени често в горна или средна трета на хранопровода. Голяма част не са в състояние да понесат предоперативна терапия поради наличието на придружаващи заболявания и операцията е единственото възможно лечение за тези пациенти.

При интраоперативно установен T4b тумор т.е. инфилтриращ съседни органи, които не могат да се резецират обикновено се извършва тумор-редуцираща операция, която не е радикална циркуферентно, но с презумпция за постоперативна адювантна онкотерапия. В такъв случай мястото на туморната инфилтрация може да се маркира, което улеснява идентифицирането му при определяне на полето за облъчване.

Според литературните данни по – често радикална е резекцията при жени, пациенти със затлъстяване, с по-малко напреднали тумори и пациенти, получили неoadювантна терапия [248]. Тези данни съвпадат и с нашите резултати, като установяваме, че в R1 групата съотношението мъже:жени е 4:1 и всички пациенти са с напреднали тумори (T3-4, N2 – 3).

Преживяемостта е значително редуцирана при установена нерадикална резекция, като в българската кохорта е четирикратно понижена (20 vs 4.8 месеца), което е статистически достоверен резултат. Вероятно обяснение за тази кратка преживяемост е, че в повечето случаи пациентите с R1 резекция не са получили адювантна терапия,

което може да се дължи на придружаващите заболявания, дългата реконвалесценция след операцията или административни неуредици и забавяне в старта на онкологичната терапия, която при нерадикална операция е задължително индицирана.

В шведската кохорта данните са недостоверни ($\log \text{rank } p = 0.13$), но показват същата тенденция на скъсяване на преживяемостта при нерадикална операция. В този случай обаче имаме много по-добри показатели със средна преживяемост при R0, R1 и R2 резекция съответно 73, 43.6 и 24.7 месеца. От всички болни само един не е получил неoadювантна терапия, а половината са получили и адювантна такава.

Според регресионния анализ R1 резекцията е негативен прогностичен фактор и в двете кохорти. В българската група HR е 2.37 (95% CI 1.11 – 5.06), а в шведската група е 3.30 (95% CI 1.64 – 6.66).

В изследването на Hollerz и сътр обхващащо 1460 пациенти, оперирани за карцином на хранопровода и гастро-езофагеалната връзка, 142 пациенти (9,7%) са с R1 резекция. Средната преживяемост в R0 групата е 50 месеца, докато в R1 кохортата е 20 месеца [248].

Неoadювантната терапия редуцира риска от R1 резекция, като проучванията посочват, че колкото по – голям е отговорът на тумора след неoadювантна терапия, толкова по-голям е процента на радикално резецираните пациенти [247, 249, 250]. Въпреки че предишни изследвания не установяват, че неoadювантното лечение е независим прогностичен фактор при R1 резекция, това може да се дължи на факта, че преди имплементирането на съвременните протоколи в клиничната практика, това лечение се предлагаше само на пациенти с авансирани тумори, докато тези с по – малки тумори се оперираха директно [158]. Дори и при пациенти с T2 тумори, при които туморът не преминава мускулния слой на стената на хранопровода, резекцията може да е нерадикална в лонгитудинално направление, ако резекционните линии не са на достатъчно отстояние от тумора или циркумферентно нерадикална, ако препаратът се увреди по време на дисекцията. Лонгитудиналното микроскопско разпространение на туморни клетки през субмукозата при карциномите на хранопровода може да бъде екстензивно. За да се осигури R0 резекция някои автори препоръчват проксималната резекционна линия да е на 12 см от тумора, а дисталната да е на 5 см [251, 252]. Това разбира се е трудно осъществимо в част от случаите, особено при по – проксимално

разположени тумори, но с цел постигане на радикалитет е желателно резекцията да е на поне 5 см от тумора.

За карциномите на гастро-езофагеалната връзка се предполага, че отстояние на проксималната резекционна линия от 8 см е адекватно [253].

Въпросът с циркуферентно нерадикалната резекция е по – дискутабилен. При големи тумори, екстериоризиращи през адвентицията на хранопроводната стена, понякога е изключително трудно за патолога да прецени дали резекцията е радикална или не. В повечето случаи при наличието на туморни клетки на външната повърхност на стената се приема, че се касае за микроскопска инфилтрация от тумора т.е. R1 резекция. Това понякога може да се дължи на грубо манипулиране на препарата, отваряне на лумена на хранопровода и интраоперативно нарушаване целостта на тумора.

Отделно от това след проведена предоперативна ХЛТ са налични адхезии в медиастинума, които затрудняват намирането на коректен дисекционен план. Особено тежки са срастванията при пациенти, които са стентирани преди операцията. Понякога е трудно да се разграничи дали се касае за туморна инфилтрация или адхезии, но препоръките са при съмнение за туморна инфилтрация, въпросната тъкан да се ексцизира.

Многократно беше дискутиран въпросът за неoadювантната терапия като част от терапевтичния подход. Видно от нашите резултати е, че пациентите получили комбинирано лечение са със значително по-добра преживяемост спрямо директно оперираните.

При пациентите, получили предоперативно лечение (в шведската кохорта) е приложен CROSS протокола, включващ химиолъчетерапия. Поради тежки странични реакции или усложнения (белодробна емболия, дълбоки венозни тромбози) при 7 от пациентите, лечението е прекъснато и те са получили част от планирания курс преди оперативната интервенция. Един от пациентите е провел единствено химиотерапия предоперативно според FLOX (Акроним от **F**luorouracil, **L**eucovorin, **O**xaliplatin) протокола.

След публикуването на резултатите от CROSS проучването предоперативната химиолъчетерапия се превърна в златен стандарт в комбинираното лечение на

пациентите с КХ. По – късно бяха оповестени резултатите на FLOT4 проучването и периперативната химиотерапия без лъчетерапия разшири терапевтичните опции и стана метод на избор в терапевтичния протокол на тези болни. FLOT протокола е предпочитан при пациенти с аденокарцином, особено в областта на гастро-езофагеалната връзка, както и в центрове, където няма възможност за лъчетерапия. По този начин, прилагайки само химиотерапия се спестява на пациентите едно неудобно пътуване до центрове, разполагащи с линейни ускорители.

Дискусията за оптималната онкологична терапия продължава, като непрекъснато се сравняват различни терапевтични алтернативи. В скандинавското NeoRes проучване се сравняват неoadювантна химиолъчетерапия с неoadювантна химиотерапия при пациенти с ПКК и АК на хранопровода [254]. Резултатите от проучването показват, че в групата, получила химиолъчетерапия се отчита по – голяма процент на пациенти с пълен хистологичен отговор (28 vs 9%), но също така по – висок процент постоперативни усложнения. Не се отчита статистически значима разлика в преживяемостта между двата терапевтични режима.

Неoadювантната терапия за карцином на хранопровода и гастро-езофагеалната връзка е тежко лечение, което води до лесна уморяемост, редуцирани белодробни и сърдечни резерви, повишен риск от инфекции [257, 258, 259]. Тези ефекти са особено изразени в края на лечението и в първите няколко седмици след приключването му. Обикновено оперативна интервенция се планира 4 – 6 седмици след приключване на предоперативната терапия. В този период една част от пациентите не са се възстановили достатъчно, за да понесат хирургичната травма от една голяма операция и обикновено в тези случаи се предпочита да се изчака няколко седмици допълнително. Факта, че са получили лечение, осигурява спокойствие на пациентите, че прогресията на тумора е стопирана. Освен това се постига облекчаване на дисфагията и болните могат да се хранят по-адекватно, наддавайки на тегло и постигайки по –добри кръвни и биохимични показатели.

В предишни проучвания се съобщава, че с увеличаване на времевия интервал между края на предоперативната терапия и оперативната интервенция, се увеличава процента пациенти с CPR, без да се повлиява периперативния морбидитет [256].

В NeoRes II проучването се сравняват пациенти, получили неoadювантна химиолъчетерапия и последваща езофагектомия за карцином на хранопровода и гастро-

езофагеалната връзка според времевия интервал от приключване на лъчетерапията до операцията [255]. В първата група попадат пациентите, които се оперират 4 - 6 седмици, а във втората 8 - 12 седмици след последния химиолъчетерапевтичен курс. Авторите не намират разлика по отношение на краткосрочните резултати след операцията. Предстои да се публикуват данните за преживяемостта.

Сравнявайки хистологичните резултати на пациентите, получили неoadjuвантна химиолъчетерапия прави впечатление, че в групата с ПКК около 50 % са с CPR. Високата лъчечувствителност на ПКК е известен феномен, на чиято база се основава SANO проучването.

През 2021 година стартира мащабно международно проучване наречено NEEDS (NEoadjuvant chemoradiotherapy for Esophageal squamous cell carcinoma versus Definitive chemoradiotherapy with salvage Surgery as needed), целящо да проучи дали дефинитивната химиолъчетерапия е адекватна терапевтична алтернатива при пациенти с езофагеален ПКК. Проучването ще включва 1200 пациенти, които се рандомизират в две групи. Първата група се състои от пациенти, получаващи дефинитивна ХЛТ, които ще се проследяват с чести контроли и ще се оперират с езофагектомия в случай на рецидив. Втората група пациенти ще се лекуват според сега съществуващия протокол с неoadjuвантна терапия според CROSS протокола с последваща езофагектомия.

След приключване на проучването е възможно тотална промяна в препоръките за лечение на ПКК на хранопровода, където хирургичната интервенция ще бъде индицирана само в случай на рецидив.

Повишена радиосензитивност се установява и при HPV – позитивните тумори. Пациентите с КХ, които са HPV позитивни са с по – добра преживяемост.

В нашето проучване в нито един от анализиранияте 20 пациенти не се откри HPV – ДНК. Доколкото ни е известно, това е първото генетично изследване на български пациенти с КХ, в което се търси HPV- ДНК.

Въпреки повишения интерес към този възможен етиологичен фактор и активните изследвания в тази област, литературните данни са противоречиви. В своите изследвания, екип от Бразилия открива инфекция с високо-рискови HPV щамове в проби от езофагеални тумори в 13,8% [260, 261]. В следващо проучване, същите автори не откриват влияние на HPV инфекцията върху преживяемостта при пациентите с ПКК

на хранопровода [262]. Dreilich и сътр засичат само HPV 16 в своите езофагеални проби и не намират никаква асоциация на HPV с преживяемостта или с терапевтичния отговор [263]. Същия резултат с детекция на HPV16 в езофагеални тумори и никакъв ефект върху преживяемостта се докладва от Herbster и сътр. [264]. Преди няколко години, Wang и сътр демонстрираха, че няма съществена разлика по отношение на риска от развитие на мултифокален ПКК между HPV – позитивните и HPV – негативните пациенти. Интересно е обаче, че пациентите, инфектирани с HPV 16 имат по –добър отговор на химиолъчетерапия в сравнение с негативните за HPV 16 пациенти [265].

Различни са резултатите, докладвани от други автори. Сао и сътр намират по –добра петгодишна преживяемост и редуциран риск от смърт при пациенти с HPV [266]. Точно обратния резултат докладват Furihata и сътр, които установяват по – лоша преживяемост при HPV позитивни в сравнение с HPV негативни с свръхекспресия на p53 пациенти с КХ [267].

Честотата на HPV – позитивните пациенти с ПКК на хранопровода варира между 11.7% и 38.9% според метаанализа на Ludmir и сътр [268]. В повечето проучвания от Китай се намира позитивна асоциация между HPV и КХ, докато проучванията от западните страни не могат да потвърдят такава корелация [269 - 272].

В скорошен обзор Международната Агенция за Изследване на Рака (International Agency for Research on Cancer – IARC) заключава, че доказателствата за HPV индуцирана карциногенеза при ПКК са недостатъчни [273].

От извършения регресионен анализ на нашите пациенти установяваме, че в шведската кохорта ПКК е негативен прогностичен маркер с HR 2.99 (95% CI 1.16 – 7.72). Това се потвърждава и от Log rank тест, при който се установява статистически значима разлика в преживяемостта между пациентите с АК и ПКК в шведската група ($p < 0.05$). Средната преживяемост за АК пациентите е 75.69 месеца (95 % CI 62.95 – 88.44 месеца), а за ПКК пациентите е 53.90 месеца (95% CI 32.46 – 75.36 месеца).

Сох анализа не показва корелация между хистологията и преживяемостта за българските пациенти, но такава се намира при използването на Log rank тест ($p < 0.05$). Средната преживяемост е 24.45 месеца (95% CI 17.07 – 31.83 месеца) за АК и 10.27 месеца (95% CI 5.83 – 14.71 месеца) за ПКК пациентите.

Според нашите резултати, пациентите с ПКК са с по – лоша прогноза от тези с АК.

При анализ на литературата данните за асоциация между хистологичния тип на КХ и преживяемостта са противоречиви и може да са в зависимост от терапевтичния протокол. При пациентите, които са оперирани директно без онкологична терапия се наблюдава по – добра преживяемост и по – нисък риск от развитие на рецидив при тези с АК в сравнение с тези с ПКК [274]. Влиянието на хистологичния вариант на тумора върху преживяемостта е неясно при пациентите, получили неoadювантно лечение преди операцията. Различните автори съобщават за по – добра, по – лоша или еднаква преживяемост за ПКК пациентите спрямо АК пациентите [71, 275 - 278]. Chang и сътр анализират пациентите в SEER, стратифицирайки ги според терапевтичната стратегия и установяват, че преживяемостта между АК и ПКК не се различава, с изключение на пациентите, получили дефинитивна ЛТ, където преживяемостта е по- висока за АК [279].

В нашето проучване не намираме асоциация между индекса на телесната маса (ВМІ) и преживяемостта, както и между тютюнопушенето и преживяемостта.

Както при карциноми с друга локализация, затлъстяването ($\text{BMI} > 30\text{kg/m}^2$) е известен рисков фактор за развитие на АК на хранопровода, но не е ясно съществува ли корелация между ВМІ и преживяемостта при АК [280 - 283]. Повечето проучвания върху прогностичната стойност на ВМІ се фокусират върху промяната в теглото на пациентите след езофагектомия или сравняват теглото преди и след лечението. Резултатите са смесени, като една част от авторите не намират влияние на ВМІ върху общата преживяемост [284 - 290], докато други установяват по – добра преживяемост при пациентите с висок ВМІ [291 - 295].

Малко са проучванията, които изследват теглото или промяната в теглото преди началото на заболяването като прогностичен фактор при езофагеалния АК.

Spreafico и сътр не намират асоциация между стойността на ВМІ 1 година преди диагнозата и общата преживяемост в две кохорти с аденокарцином на хранопровода (235 пациенти от Торонто и 329 пациенти от Бостън). Авторите обаче установяват по – лоша преживяемост при пациентите с $\text{BMI} \geq 25$, както и при тези с $\text{BMI} < 18$. Влошена е прогнозата и при пушачите [296].

Рязката загуба на тегло в месеците след началото на заболяването (над 10% от телесното тегло) също се асоциира с лоша прогноза при пациентите с АК [296, 297]. Около 80% от пациентите с КХ съобщават за загуба на тегло в период около 6 месеца преди откриването на карцинома. Т.к.голяма част от пациентите с АК са с висок ВМІ преди това, при поставяне на диагнозата повечето пациенти са все още със затлъстяване въпреки загубата на тегло [298].

Както беше споменато по –рано в регресионния анализ на нашите пациенти не се установява корелация между преживяемостта и тютюнопушенето. Малко са публикациите, които разглеждат този проблем и обикновено са ограничени до малки кохорти пациенти от Азия с ПКК на хранопровода [30, 299].

За първи път през 2008 година в проучване от Швеция беше докладвано, че при пациенти с ПКК бившите пушачи са с по-лоша прогноза, докато за активните пушачи не се установява статистически значима разлика в преживяемостта [300]. В противовес на това, Sun и сътр демонстрират влошена обща преживяемост при активни пушачи след езофагектомия за ПКК [299]. Kamarajah и сътр установяват по – кратка средна преживяемост при активни пушачи (35 месеца) спрямо бивши пушачи (43 месеца) и непушачи (48 месеца) [301].

Предложение за терапевтичен алгоритъм

На базата на нашите резултати, анализирайки литературния обзор и съобразявайки се със съвременните тенденции в лечението на езофагеалния карцином предлагаме терапевтичен алгоритъм, в зависимост от хистологичния вид и стадия на тумора. Не бива да се забравя, че всички пациенти трябва да се обсъждат на онкологична комисия, за да може да се осигури оптимално, съобразено с физическото състояние и желанието на пациента мултимодално лечение.

Стандартното лечение на пациентите в добро общо състояние с курабилен карцином в средна и долна трета на хранопровода и гастро-езофагеалната връзка е комбинация от онкологична терапия и хирургична резекция.

Ранните стадии на заболяването могат да се третират с ендоскопска резекция или само с хирургична резекция, докато пациентите в увредено общо състояние могат да се лекуват единствено с операция или дефинитивна химиолъчетерапия.

Аденокарцином на хранопровода

КЛИНИЧЕН СТАДИЙ	cT	cN	cM	ЛЕЧЕНИЕ
0	Tis	N0	M0	Ендоскопска резекция
I	T1	N0	M0	T1aN0 – Ендоскопска резекция T1bN0 – Операция
II A	T1	N1	M0	Операция + онкологично лечение
II B	T2	N0	M0	Само операция или операция + онкологично лечение
III	T2	N1	M0	Операция + онкологично лечение
	T3-4a	N0-1	M0	Операция + онкологично лечение
IV A	T1-4a	N2	M0	Операция + онкологично лечение
	T1-4	N3	M0	Операция + онкологично лечение
	T4b	N0-2	M0	Дефинитивна химиолъчетерапия + евент. спасителна (salvage) хирургия
IV B	T1-4	N0-3	M1	Палиативно лечение

Плоскоклетъчен карцином на хранопровода

КЛИНИЧЕН СТАДИЙ	cT	cN	cM	ЛЕЧЕНИЕ
0	Tis	N0	M0	Ендоскопска резекция
I	T1	N0	M0	Ендоскопска резекция или само операция
	T1	N1	M0	Неoadювантна ХЛТ + операция
II	T2	N0	M0	Само операция или операция + неoadювантна ХЛТ
	T2	N1	M0	Неoadювантна ХЛТ + операция
III	T3	N0	M0	Неoadювантна ХЛТ + операция
	T3	N1	M0	Неoadювантна ХЛТ + операция
IV A	T1 - 3	N2	M0	Неoadювантна ХЛТ + операция
	T4	N0 - 2	M0	Неoadювантна ХЛТ + операция
IV B	T1-4	N3	M0	Неoadювантна ХЛТ + операция
	T4b	N0-2	M0	Дефинитивна химиолъчетерапия + евент. спасителна (salvage) хирургия
IV B	T1-4	N0-3	M1	Палиативно лечение

6. Заключение

Карциномът на хранопровода е заболяване с нарастваща честота в световен мащаб и лоша прогноза. Въпреки напредъка в онкологичната терапия, дори и при комбиниран подход петгодишната преживяемост не надминава 50 %.

Данните за България са изключително тревожни т.к. наблюдаваната петгодишна преживяемост е двукратно по-ниска от средноевропейската.

Значителна част от пациентите с КХ в България са в активна, трудоспособна възраст, което прави тази болест социално – значима поради значителната инвалидизация в резултат на заболяването и лечението. Самото лечение е комплексно, скъпоструващо и изискващо специално обучени специалисти и високотехнологична апаратура.

От друга страна младите пациенти са в запазено общо състояние и могат да понесат агресивен терапевтичен протокол, с помощта на който да се постигне по - добра преживяемост.

Превенцията на КХ е трудна и неспецифична, като профилактичните мерки би трябвало да се развиват на национално ниво. Основни насоки в тази профилактика са стимулиране на отказ от тютюнопушене и поддържане на здравословно тегло.

Важно за успешното лечение е откриването на туморите в ранен стадий, което осигурява по – добър шанс за преживяване. Поради късния дебют на симптомите е важна бързата и своевременна диагностика. Основен диагностичен метод е гастроскопското изследване и всички пациенти с дисфагия следва директно да се насочват към гастроентеролог с искане за гастроскопия.

Съвременното лечение на КХ се състои от комбиниран подход с тримодална терапия - химиотерапия, лъчетерапия и хирургична резекция. Всички пациенти трябва да се дискутират на онкологична комисия.

При ранни карциноми (Tis) в съображение влиза ендоскопската резекция. Препоръчва се тези болни да се проследяват с чести контроли - гастроскопско изследване с биопсия на всеки 6 месеца през първите 2 години.

Индицирана при всички пациенти, които са в добро общо състояние е неoadювантна химиолъчетерапия или периперативна химиотерапия с последваща оперативна

интервенция. Никоя от двете онкологични алтернативи не е показала превъзходство в сравнение с другия подход по отношение на преживяемостта.

Оперативната интервенция се планира 4 - 6 седмици след приключване на предоперативната терапия.

Важни прогностични маркери са освен T, N и M категориите (според TNM класификацията), също така и дължината на тумора, хистологичния тип, възрастта на пациентите, наличието на придружаващи заболявания, съотношението метастатични към общ брой екстирпирани лимфни възли при позитивен нодален статус, радикалитета на резекцията.

Тези прогностични критерии трябва да се вземат под внимание при обсъждане на терапевтичния режим, като при наличие на негативни предиктивни показатели се препоръчва прилагане на по – агресивни протоколи.

С цел постигане на радикалитет при езофагеалната резекция е необходимо достатъчно отстояние от границите на тумора. Препоръчва се в проксимален аспект резекцията да е на поне 8 см от горния край на тумора.

Лимфната дисекция е неотменима част от оперативната интервенция и за да се стадират коректно пациентите, се препоръчва екстирпиране на поне 16 лимфни възли. При по – малък брой на хистологичния отговор е желателно извършване на ревизия на макроскопския препарат от отговорния патолог.

Комбинирания подход при лечението на КХ осигурява по- добра обща преживяемост на пациентите при поносими нива на токсичност и понастоящем е златен стандарт в лечението на това заболяване.

За постигането на докладваната от западноевропейски и северноамерикански автори средна обща преживяемост при пациентите с курабилен карцином на хранопровода е необходимо ревизиране на съществуващите в България терапевтични алгоритми.

С настоящата работа предлагаме съвременен мултимодален терапевтичен протокол за всеки отделен стадий при аденокарцинома и плоскоклетъчния карцином на хранопровода.

7. Изводи

1. При лечението на пациентите с карцином на хранопровода и гастро-езофагеалната връзка мултимодалната терапия осигурява значително по – добра преживяемост в сравнение с операция като единствен терапевтичен метод.

2. При избор на онкологична терапия са налични две алтернативи, с които се постигат еднакви резултати – неoadювантна химиолъчетерапия (CROSS протокол) или периоперативна химиотерапия (FLOT протокол).

Въпреки това, при плоскоклетъчен карцином на хранопровода е желателно включването на лъчетерапия поради по – високата лъчечувствителност на този хистологичен тип.

3. Стадирането на туморите се осъществява според последната 8 - ма ревизия на TNM класификацията, която е съобразена с хистологичния тип и проведената неoadювантна терапия.

4. Освен TNM стадия, за определяне прогнозата на пациентите са налични допълнителни статистически сигнификантни предиктивни маркери като дължина на тумора над 3 см, съотношение на метастатични към общ брой лимфни възли над 10%, микроскопски нерадикална резекция, наличие на придружаващи заболявания. Вторични прогностични показатели са млада възраст, мъжки пол и плоскоклетъчен карцином.

5. При наличието на негативни предиктивни маркери се препоръчва агресивен терапевтичен протокол с евентуално добавяне на адювантна онкологична терапия.

6. Инфекцията с HPV не е фактор в етиопатогенезата на карцинома на хранопровода в българската популация.

8. Публикации, свързани с дисертационния труд

1. Т. Джендов, А. Червеняков. Роля на периперативната онкологична терапия при лечението на езофагеалния карцином . *Медицински преглед*, 58, 2022, N 2, с. 5-10; ISSN 1312-2193
2. Т. Джендов, И. Халдестам, Г. Лукас, П. Гулстранд, Т. Гасландер, Б. Бьорнсон, П. Санстрьом. Прогностична стойност на съотношението метастатични към общ брой изолирани лимфни възли след езофагеална резекция при пациенти с рак на хранопровода и кардията след неoadювантна терапия. В Сборник „*Доклади от XVI Национален Конгрес по Хирургия*”, под редакцията на проф Г. Тодоров, 2018, стр. 685 – 686
3. Т. Джендов. Мултимодален подход при лечението на езофагеалния карцином. *Спешна медицина*, 2022, 25, 1: с. 13-19, ISSN 0861-9964

Приложение 1 WHO класификация на туморите на хранопровода – 5-то издание

Епителни тумори		Невроендокринни неоплазии
Доброкачествени	Злокачествени	Невроендокринни тумори (NET) - 1, 2 и 3 степен
Плоскоклетъчен папилом	Аденокарцином	Невроендокринен карцином (NEC) - дребноклетъчен и едроклетъчен
	Аденоидно кистичен карцином	Смесени невроендокринни - неневроендокринни неоплазии (MİNENs)
Преканцерози	Мукоепидермоиден карцином/аденосквамозен карцином	Смесени плоскоклетъчени - NEC
Баретова дисплазия - нискостепенна и високостепенна	Плоскоклетъчен карцином - обикновен, верукозен, вретеновидноклетъчен, базалоидноклетъчен	Смесени аденокарциноми - NEC
Плоскоклетъчна дисплазия - нискостепенна и високостепенна	Недиференциран и лимфоепителиоиден карцином	Смесени аденокарциноми - NET

Неепителни тумори			Хематолимфоидни тумори
Мезенхимални			Други тумори
Гастроинтестинални стромални тумори - ГИСТ	Гладкомускулни и скелетномускулни тумори	Капоши саркоми	
Миофибробластни и тумори на мастната тъкан	Лейомиоми	Ангиосаркоми	Мукозални меланоми
Инфламаторни миофибробластни тумори	Лейомиосаркоми	Гломус тумори	Метастатични тумори
Солитарни фиброзни тумори	Рабдомиосаркоми	Лимфангиоми	
Липоми	Съдови тумори	Неврални тумори	
Инфламаторни фиброидни полипи	Хемангиоми	Шваноми	
Синовиални тумори	Грануларноклетъчни тумори		

Приложение 2 Стадиране на плоскоклетъчния карцином на хранопровода според хистологичния резултат (pTNM)

Плоскоклетъчен карцином					
Стадий	pT	pN	pM	Степен на диференциация	Локализация
0	Tis	N0	M0	-	Всяка
IA	T1a	N0	M0	G1,X	Всяка
IB	T1b	N0	M0	G1, X	Всяка
	T1	N0	M0	G2-3	Всяка
IIA	T2	N0	M0	G1	Всяка
	T2	N0	M0	G2-3, X	Всяка
	T3	N0	M0	Всяка	Долна трета
	T3	N0	M0	G1	Горна/средна трета
IIB	T3	N0	M0	G2-3	Горна/средна трета
	T3	N0	M0	X	Всяка
	T3	N0	M0	Всяка	X
	T1	N1	M0	Всяка	Всяка
IIIA	T1	N2	M0	Всяка	Всяка
	T2	N1	M0	Всяка	Всяка
IIIB	T4a	N0-1	M0	Всяка	Всяка
	T3	N1	M0	Всяка	Всяка
	T2-3	N2	M0	Всяка	Всяка
IVA	T4a	N2	M0	Всяка	Всяка
	T4b	N0-2	M0	Всяка	Всяка
	T1-4	N3	M0	Всяка	Всяка
IVB	T1-4	N0-3	M1	Всяка	Всяка

Приложение 3 Стадиране на аденокарцинома на хранопровода според хистологичния резултат (pTNM)

Аденокарцином				
Стадий	pT	pN	pM	Степен на диференциация
0	Tis	N0	M0	-
IA	T1a	N0	M0	G1,X
IB	T1a	N0	M0	G2
	T1b	N0	M0	G1-2,X
IC	T1	N0	M0	G3
	T2	N0	M0	G1-2
IIA	T2	N0	M0	G3, X
IIB	T1	N1	M0	Всяка
	T3	N0	M0	Всяка
IIIA	T1	N2	M0	Всяка
	T2	N1	M0	Всяка
IIIB	T4a	N0-1	M0	Всяка
	T3	N1	M0	Всяка
	T2-3	N2	M0	Всяка
IVA	T4a	N2	M0	Всяка
	T4b	N0-2	M0	Всяка
	T1-4	N3	M0	Всяка
	T1-4	N0-3	M1	Всяка

Приложение 4 Стадиране на карцинома на хранопровода според хистологичния резултат след получена неoadювантна терапия (ypTNM)

Стадиране след неoadювантна терапия			
Стадий	ypT	ypN	ypM
I	T0-2	N0	M0
II	T3	N0	M0
IIIA	T0-2	N1	M0
IIIB	T4a	N0	M0
	T3	N1-2	M0
	T0-3	N2	M0
IVA	T4a	N1-2, X	M0
	T4b	N0-2	M0
	T1-4	N3	M0
IVB	T1-4	N0-3	M1

Приложение 5 Информирано съгласие за вземане на материал за генетично изследване



ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

НАЦИОНАЛНА ГЕНЕТИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ



СБАЛАГ "МАЙЧИН ДОМ" ЕАД ул. "Здраве" № 2, гр. София, 1431

Тел: (+ + 359) 2 9172 214, Факс: (359) 2 9172 46 9 Email: kaneva@mmcbg.org; kremenski@yahoo.com

Web-site: <http://www.mmcbg.org>

и

УНИВЕРСИТЕТСКА МНОГОПРОФИЛНА БОЛНИЦА ЗА АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ И СПЕШНА МЕДИЦИНА „Н. И. ПИРОГОВ“

София-1606, бул. „Ген. Тотлебен“ №21 тел.: 915-44-11

За контакти: д-р Тодор Джендов, асистент в Първа хирургична клиника, УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, тел. 9154357, e-mail: todor_dzhendov@abv.bg;

проф. Александър Червеняков, началник на Първа хирургична клиника, УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“, тел. 9154340, e-mail: tcherveniakov@hotmail.com

По проект „Проучване експресията на EGFR, p27 и ролята на HPV в патогенезата на карцинома на хранопровода при български пациенти“

Участието в генетичното изследване е с изследователска цел и е само **ДОБРОВОЛНО!**

Аз долуподписан(ият/ата).....

съм съглас(ен/на) да участвам в изследване за **Новообразувания на хранопровода** чрез генетичен анализ.

Информиран/а съм, че:

■ **Новообразуванията на хранопровода (доброкачествени и злокачествени тумори) е вероятно да се дължат на изменения (мутации) в определени гени и да се предават по наследство. Клетките съдържат генетичен материал - дезоксирибонуклеинова киселина или ДНК за кратко. Тя пренася гените отговорни за физическия облик на човека, като цвят на косата и очите. Разликата в нашите гени обяснява защо ние изглеждаме различно. Различията в гените могат да обяснят защо някои хора развиват тумори, а други - не. Тези изменения се откриват чрез генетичен анализ на проби от различни биологични материали (кръв, оперативно взети тъкани и др). Целта на изследването е да се открият евентуални изменения в наследствения материал (ДНК и РНК) на клетките, което да подпомогне точното определяне на стадия на болестта (по TNM класификацията) и назначаването на по-ефикасно лечение. **Съгласието или отказа да участвам в това проучване няма по абсолютно никакъв начин да повлияе на диагностично лечебния ми процес, който ще се извършва в съответствие със съвременните световни тенденции и правила за добра клинична практика.****

Разбрах че:

■ На приелите да участват в това изследване ще бъде взето малко количество кръв (до 10 мл) по начина, по който това се прави при всички медицински изследвания на кръвта в Р. България - с игли за еднократна употреба.

■ Кръвта ще се използва за извличане на ДНК, която ще бъде обект на генетично изследване. За същата цел ще се използва и част от туморът, отстранен по време на операцията ми. ДНК пробите от кръв и туморна тъкан ще бъдат обозначени с уникален код, което ще осигури моята анонимност. **Информацията за мен ще бъде достъпна само за насочващия ме лекар и оторизираните членове на изследователския екип, които носят отговорност за запазване на моята анонимност.**

■ Получените данни биха били от изключително важно значение за по - точното определяне на стадия на болестта и разработване на нови и още по-ефективни методи за лечение за определения пациент. Това би помогнало и за по-ранната диагностика на заболяването.

■ След приключване на изследванията, част от моята ДНК ще се съхранява в ДНК банката на Центъра по молекулярна медицина, при пълно спазване на условията за поверителност на личната ми информация, единствено за целите на бъдещи научни изследвания, свързани с тумори на хранопровода. **Вашите данни ще се съхраняват сигурно и никой неоторизиран няма да има възможност да получи информация за Вас.**

Поставеният от мен подпис по-долу потвърждава моето доброволно участие в това изследване, но в никакъв случай не освобождава изследователите от тяхната професионална и етична отговорност.

В случай, че получените резултати имат диагностична стойност за мен, желая те да ми бъдат съобщени лично чрез насочващия ме лекар.

Съглас(ен/а) съм доброволно да участвам в изследването

Дата:..... Подпис:.....

Обясних същността на ДНК изследването на пациента. Отговорих на всички въпроси.

Име:..... Дата:..... Подпис:.....

Приложение 6 Анкетна форма при вземане на материал за генетично изследване



Център по молекулна медицина

Медицински Университет - София

Ул. "Здраве" № 2, гр. София, 1431

Тел: (+ + 359) 2 9172 214 Факс: (+ + 359) 2 9172 469

Email: mmcbg@abv.bg

Езофагеални Тумори

Пациент

[] [] []
/дата/

ПОРЪЧКА ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ДНК/РНК АНАЛИЗ

НАСОЧВАЩ ЛЕКАР:

[] []
/име, фамилия/ /подпис/

Отделение по гръдна хирургия, УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”

Друго:

НАЛИЦЕ СА СЛЕДНИТЕ ДОКУМЕНТИ И МАТЕРИАЛ, ГАРАНТИРАЩИ ДИАГНОЗАТА :

<input type="checkbox"/> ДА <input type="checkbox"/> НЕ	ЕПИКРИЗА	ИД No	
<input type="checkbox"/> ДА <input type="checkbox"/> НЕ	ПИСМЕНА МЕДИКОГЕНЕТИЧНА КОНСУЛТАЦИЯ	<input type="checkbox"/> ДА <input type="checkbox"/> НЕ	Свеж материал /НОРМА/
<input type="checkbox"/> ДА <input type="checkbox"/> НЕ	ВЗЕТО Е ПИСМЕНО СЪГЛАСИЕ ЗА ДНК / РНК АНАЛИЗ	<input type="checkbox"/> ДА <input type="checkbox"/> НЕ	Свеж материал /ТУМОР/
<input type="checkbox"/> ДА <input type="checkbox"/> НЕ	КРЪВ с K ₂ EDTA (виолетов вакутейнер) НЕ ЗАМРАЗЯВАЙ!	<input type="checkbox"/> ДА <input type="checkbox"/> НЕ	Свеж материал
<input type="checkbox"/> ДА <input type="checkbox"/> НЕ	КРЪВЕН СЕРУМ (жълт/оранжев/червен вакутейнер) НЕ ЗАМРАЗЯВАЙ!		

ПАЦИЕНТ

[]

Трите имена

години

[] [] []

ЕГН / Дата на раждане

Етническа принадлежност

Професия

[_____]
Пълен домашен адрес

[_____] [_____]
Пълен домашен адрес Телефон

[_____] [_____] [_____]
Диагноза Стадиране по TNM Телефон за връзка с роднина

[_____] [_____] [_____]
Окончателен Хистологичен резултат No хистологичен материал ИЗ номер

ФАМИЛНА ИСТОРИЯ

ДА НЕ , ако ДА

моля попълнете

Име:	Роднинска връзка с пациента	Заболяване:	Статус:	Забележки:

ОПЕРАЦИЯ:

[_____] [_____]
Вид операция Дата на операция

Вид тумор:

първичен

вторичен

[_____] [_____]
Локализация *размер /диаметър, см/*

Диагноза

Barrett's езофагус

Аденокарцином

Плоскоклетъчен карцином

Друг _____

Метастатичен процес към датата на операцията

ДА

НЕ

[_____] [_____]
Локализация , размер *бр. засегнати лимфни възли*

Хистологично стадиране

Силно диференциран

Средно диференциран

Слабо диференциран

Друго _____

Наличие на некроза

ДА НЕ

АНАМНЕЗА:

Симптоми: _____

Първични симптоми /вид, давност/: _____

Период от началото на първия симптом до дата на операцията: _____

Предходни заболявания или операции: _____

Наличие на :

- ахалазия ДА НЕ -
- жлъчен рефлукс ДА НЕ
- тилоза ДА НЕ
- астма ДА НЕ
- диабет ДА НЕ
- хроничната гастроезофагеална рефлуксна болест (ГЕРБ) ДА НЕ
- синдром на Plummer-Vinson ДА НЕ
- инфекция: с HPV ДА НЕ
- с Helicobacter.pylori ДА НЕ
- други _____

Съпътстващи заболявания: _____

Употреба на медикаменти като :

- бисфосфонати ДА НЕ, ако ДА _____ пъти седмично,
с _____ продължителност
- антихолинови медикаменти ДА НЕ, ако ДА _____ пъти седмично,
с _____ продължителност;
- аспирин ДА НЕ, ако ДА _____ пъти седмично,
с _____ продължителност

ОСНОВНИ ФИЗИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Ръст _____

/в сантиметри/

Тегло _____

/в килограми/

ВРЕДНИ НАВИЦИ

- Кафе

[_____]
броя дневно / седмично

- Алкохол

[_____] [_____]
вид мл дневно / седмично

[_____] [_____]
вид мл дневно / седмично

[_____] [_____]
вид мл дневно / седмично

Възраст, на която започнахте да употребявате твърд алкохол: [_____]

Брой години употреба на твърд алкохол: [_____]

- Употреба на тютюн:

Не употребява

Бивш потребител [_____] [_____]

брой цигари дневно / седмично в

продължение на колко години

Настоящ потребител [_____] [_____]

брой цигари дневно / седмично

от колко годишна възраст?

ОСОБЕНОСТИ В ХРАНИТЕЛНИЯ РЕЖИМ

Консумация на пресни зеленчуци

ДА

НЕ , ако ДА

/колко пъти седмично/

Консумация на туршия ДА НЕ

Прекалена/Увеличена употреба на:

захар и захарни изделия солени храни

люти храни мазни храни

други /моля, попълнете/ _____

Консумация на червено месо ДА НЕ ,

ако ДА _____ / _____

начин на обработка

колко пъти седмично/

Употреба на много горещи напитки ДА НЕ ,

ако ДА _____

/колко пъти седмично/

ОСОБЕНОСТИ В ОКОЛНАТА СРЕДА

Излагане на:

- азбест ДА НЕ

- уреди, използващи горива ДА НЕ

(твърди, течни, газообразни), ако ДА моля попълнете _____

/уред и вид гориво/

- йонизиращо лъчение _____ (гърдна и/или горна коремна област)

ДА НЕ

, ако ДА моля попълнете _____ / _____ / _____ / _____

причина

година количество Gy режим /

- хормон заместваща терапия ДА НЕ

, ако ДА моля

попълнете _____ / _____ / _____ / _____

/ причина

вид

година

режим /

ЛЕЧЕНИЕ:

Лъчение	Пред- /След- оперативно	Продължи- телност (дни)	Доза рентгеново лъчение (Gy)	Схема (пъти седмично)	Място на провеждане (Болнично заведение)	Коментар

Химиотерапия	Вид терапия (адювантна/ нео-)	Продължи- телност (месеци)	Медикамент	Схема/ Брой курсове	Място на провеждане (Болнично заведение)	Коментар

ПРЕДХОДНИ ОПЕРАЦИИ:

№	Дата	Диагноза	TNM класификация	Вид резекция	Локализация	Лечение *			
						Лъчетерапия		Химиотерапия	
1.						Да	Не	Да	Не
2.						Да	Не	Да	Не
3.						Да	Не	Да	Не
4.						Да	Не	Да	Не

* Попълнете като оградите верния отговор

ЛАБОРАТОРНА ИНФОРМАЦИЯ

ПРИЕМАНЕ НА ПРОБА В ЦММ

ЛАБОРАНТ:

[_____]

/име, фамилия/

/дата/

/подпис/

ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК/РНК

Код на ДНК/ РНК/плазма/ серум	Вид материал	Количество (ml)	Дата изолиран е/ отделяне	Метод	Добив (µg)	Място на съхранене	Забележка

ЛАБОРАНТ:

[_____]

/име, фамилия/

/дата/

/подпис/