



Jeļena Moisejenko-Goluboviča

**Bazālo šūnu karcinomas patoģenēzes
un lokālo recidīvu attīstības īpatnības
galvas un kakla rajonā**

Promocijas darbs zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – dermatoloģija un veneroloģija

Rīga, 2023

Jeļena Moisejenko-Goluboviča

ORCID 0000-0001-5246-1552

Bazālo šūnu karcinomas patoģenēzes
un lokālo recidīvu attīstības īpatnības
galvas un kakla rajonā

Promocijas darbs zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – dermatoloģija un veneroloģija

Promocijas darba vadītājas:

Dr. habil. med. profesore **Valērija Groma**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. docente **Anna Ivanova**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Rīga, 2023

Anotācija

Ultravioletais starojums ir pazīstams kā viens no galvenajiem ādas ļaundabīgo audzēju izraisītājiem, tostarp bazālo šūnu karcinomas (BŠK) gadījumā, kas ir visizplatītākais ādas vēža veids. Bieži attīstoties galvas un kakla rajonā, BŠK izpaužas ar dziļu audu invāziju un recidivēšanu, tāpēc svarīgi ir noteikt klīniskos, dermatoskopiskos un morfoloģiskos kritērijus dažādām BŠK formām, jo to kļūdaina interpretācija izraisa nepareizas ārstēšanas taktikas izvēli, audzēja progresēšanu un recidīvu. Ultravioletais starojums nav vienīgais predispozīcijas faktors, taču saules gaisma ir arī svarīga vispārējai veselībai un D vitamīna sintēzei ādā, jo novirzes no optimālā D vitamīna līmeņa saista ar noslieci uz BŠK attīstību. Iepriekš veiktie pētījumi ir norādījuši uz nepieciešamību novērtēt primāro un recidivējošo BŠK, pamatojoties uz izpratni par tās morfoloģisko uzbūvi, mikrovides bioloģiju. Uzkrātie literatūras dati liecina, ka D vitamīns antagonizē *Sonic Hedgehog* (SHh) signālu pārraidi, tāpēc tam ir nozīmīga aizsargājoša loma BŠK attīstībā.

Šajā pētījumā tika novērtēta gan primāro, gan recidivējošo galvas un kakla BŠK izplatība un īpatnības 79 pacientiem; BŠK dermatoskopiskie kritēriji; D vitamīna līmenis asinīs un D vitamīna saistošā proteīna (DVP) ekspresija BŠK; tika imūnhistoķīmiski novērtēti bazālās membrānas (BM) komponenti – IV tipa kolagēns un laminīns; analizētas audzēja šūnu un tā mikrovides (AM) īpatnības, pētot alfa-gludo muskuļu aktīna (*α*-GMA), podoplanīna (PDPN) un SHh ekspresiju BŠK. Tika noskaidroti biežākie dermatoskopiskie kritēriji visiem BŠK tipiem, noteikti ādas epitēlija BM integritātes bojājumi, novērota peritumorālās un visas stromas *α*-GMA reaktivitātes palielināšanās jauktā un recidivējošā BŠK. Pētījumā tika noteikta izteikta SHh ekspresijas līmeņa paaugstināšanās BŠK agresīvajos variantos – infiltratīvajos, jauktajos un mikronodulārajos. Gan primāro, gan recidivējošo galvas un kakla BŠK pacientu kohortā tika noteikts D vitamīna deficīts. BŠK pacientiem netika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība starp vīriešiem un sievietēm D vitamīna līmeņa rādītājos asins serumā. Augstāks D vitamīna līmenis novērots mazāka izmēra un zemākas agresivitātes BŠK. Imūnhistoķīmiski DVP ekspresija bija augstāka, turklāt negatīvi korelēja ar SHh mazāk agresīvos audzēju veidos, proti, virspusējās un nodulārās BŠK, kas var liecināt par D vitamīna aizsargfunkciju.

Atslēgvārdi: galvas un kakla bazālo šūnu karcinoma, dermatoskopija, podoplanīns, IV tipa kolagēns, laminīns, audzēja mikrovide, *Sonic Hedgehog*, alfa-gludo muskuļu aktīns, D vitamīns, D vitamīna saistošais proteīns.

Abstract

Pathogenesis of Basal Cell Carcinoma and Features of Development of Local Recurrences in Head and Neck

Ultraviolet radiation is known to be a major cause of skin malignancies, including basal cell carcinoma (BCC), the most common type of skin cancer. With frequent development in the head and neck region, BCC is characterized by deep tissue invasion and recurrence, therefore, it is important to investigate clinical, dermatoscopic, and morphological criteria for different forms of BCC, as misinterpretation leads to incorrect treatment tactics, aggressive tumour progression, and recurrence. Ultraviolet radiation is not the only predisposing factor, also sunlight is important for general health and vitamin D synthesis in the skin, which deviates from optimal vitamin D levels with a tendency to develop BCC. Previous studies have highlighted the need to systematically evaluate primary and relapsing BCCs based on a better understanding of their morphological structure and the biology of a tumour microenvironment. Accumulating evidence suggests that vitamin D antagonises the transmission of Sonic Hedgehog (SHh) signals, and, therefore, plays an important protective role in BCCs development.

The prevalence and characteristics of primary and recurrent head and neck BCCs were assessed in 79 subjects; dermatoscopic criteria were recognized; serum vitamin D levels and vitamin D binding protein (DBP) expression in BCC tissues were assessed. The essential components of the basement membrane (BM) – type IV collagen and laminin were evaluated immunohistochemically; a tumour cell biology and tumour microenvironment (TME) were explored by studying the expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA), podoplanin (PDPN), and SHh. The most frequent dermatoscopic criteria were established for all types of BCC; the impaired integrity of the BM in BCC was confirmed; an increase in peritumoural and whole-panstromal α -SMA reactivity was confirmed in mixed and recurrent BCC. A marked increase in the level of SHh expression was observed in the aggressive variants of the BCC – infiltrative, mixed, and micronodular. Vitamin D deficiency was determined in the cohort of patients with both primary and recurrent BCC of the head and neck. There was no statistically significant difference in serum vitamin D levels between men and women. Higher serum vitamin D levels were correlated with the appearance of smaller neoplasms and a more favorable disease prognosis. In smaller tumours with a favorable course, such as superficial and nodular BCC, the association between high-DBP and low-SHh tissue expression was found, providing supportive evidence of the existence of a link between vitamin D, proteins involved in its metabolism, and SHh signaling pathway.

Keywords: basal cell carcinoma of the head and neck, dermatoscopy, podoplanin, collagen IV, laminin, tumour microenvironment, Sonic Hedgehog, alpha-smooth muscle actin, serum D vitamin level, vitamin D binding protein.

Satura rādītājs

Anotācija	2
Abstract	3
Darbā izmantotie saīsinājumi	7
Ievads	9
Darba aktualitāte.....	9
Darba mērķis.....	10
Darba uzdevumi.....	10
Darba hipotēze.....	10
Darba novitāte.....	11
Mērķa populācija	11
Materiāli tehniskais nodrošinājums	11
Personīgais ieguldījums	11
Ētiskie aspekti.....	12
1. Literatūras apskats	13
1.1. Bazālo šūnu karcinomas epidemioloģija.....	13
1.2. Bazālo šūnu karcinomas riska faktori	13
1.3. Bazālo šūnu karcinomas klīniskā aina	16
1.4. Bazālo šūnu karcinomas patoģenēze.....	18
1.5. D vitamīna nozīme bazālo šūnu karcinomas patoģenēzē.....	18
1.6. Bazālo šūnu karcinomas starptautiskā klīniskā klasifikācija	21
1.7. Bazālo šūnu karcinomas morfoloģiskā aina un starptautiskā klasifikācija.....	22
1.8. Instrumentālo metožu nozīme bazālo šūnu karcinomas izmeklēšanā.....	26
1.8.1. Bazālo šūnu karcinomas instrumentālā izmeklēšana	27
1.8.2. Bazālo šūnu karcinomas attēldiagnostikas metodes.....	29
1.8.3. Bazālo šūnu karcinomas biopsija un indikācijas to veikšanai.....	29
1.9. Bazālo šūnu karcinomas ārstēšana	30
1.9.1. Bazālo šūnu karcinomas ķirurģiskā ārstēšana	31
1.9.2. Bazālo šūnu karcinomas staru terapija	32
1.9.3. Bazālo šūnu karcinomas lokāla medikamentozā terapija.....	33
1.9.4. Bazālo šūnu karcinomas sistēmiskā terapija	33
2. Materiāli un metodes	36
2.1. Mērķpopulācija un bazālo šūnu karcinomas pacientu atlases kritēriji.....	36
2.2. Laboratoriska D vitamīna līmeņa noteikšana asins serumā	37
2.3. Dermatoskopiskā bazālo šūnu karcinomas diagnostika, tās novērtēšanas kritēriji.....	37
2.4. Histopatoloģijas metodes	38
2.5. Imūnhistoķīmiskās metodes	38
2.6. Caurstarojošās elektronmikroskopijas metode	40
2.7. Statistiskā datu analīze	41
3. Rezultāti.....	42
3.1. BŠK pacientu klīniskās izmeklēšanas analīzes rezultāti.....	42
3.2. BŠK histopatoloģisko tipu biežuma un anatomiskās lokalizācijas analīze.....	43
3.3. Dermatoskopiskās izmeklēšanas rezultāti.....	46
3.4. D vitamīna līmeņa noteikšana un analīze asins serumā.....	54
3.5. D vitamīna līmenis saistībā ar dažādiem bazālo šūnu karcinomas tipiem.....	55

3.6. BŠK audu paraugu histopatoloģija, audzēja marķieru ekspresijas imūnhistoķīmiskā analīze	59
3.6.1. IV tipa kolagēna un laminīna ekspresijas imūnhistoķīmiskā analīze.....	59
3.6.2. a-GMA, PDPN un SHh ekspresijas imūnhistoķīmiskā analīze	61
3.6.3. DVP un SHh korelatīvā imūnhistoķīmiskā analīze zema un augsta riska BŠK	69
3.7. Bazālo šūnu karcinomas ķirurģiskā ārstēšana.....	73
3.8. BŠK uzbūves ultrastrukturālā analīze	76
4. Diskusija.....	78
Secinājumi.....	85
Praktiskās rekomendācijas	87
Publikācijas un prezentācijas par pētījuma tēmu	88
Literatūras saraksts	90
Pateicības.....	105
Pielikumi	106
1. pielikums. Pirmā publikācija	107
2. pielikums. Otrā publikācija	118
3. pielikums. Trešā publikācija.....	129
4. pielikums. RSU Ētikas komitejas atļauja	146

Darbā izmantotie saīsinājumi

Saīsinājums	Skaidrojums latviešu valodā	Nosaukums angļu valodā
AAVK	Amerikas Apvienotā vēža komiteja	<i>American Joint Cancer Committee (AJCC)</i>
<i>a</i> -GMA	Alfa-gludo muskuļu aktīns (<i>a</i> -GMA)	<i>Alpha-smooth muscle actin (a-SMA)</i>
5-ALS	5-aminolevulīnskābe	<i>5-aminolevulinic acid (ALA)</i>
AM	Audzēja mikrovide	<i>Tumour microenvironment (TME)</i>
ASV PZP	ASV Pārtikas un zāļu pārvalde	<i>The United States Food and Drug Administration (FDA)</i>
ĀPK	Ādas plakanšūnu karcinoma	<i>Cutaneous squamous cell carcinoma</i>
BM	Bazālā membrāna	<i>Basement membrane</i>
BŠK	Bazālo šūnu karcinoma	<i>Basal cell carcinoma (BCC)</i>
CE	Citohroma enzīmi	<i>Cytochrome enzymes (CYP)</i>
CPP	Cinka pirkstu proteīns jeb ar gliomu saistītais onkogēns	<i>Zinc finger protein (GLI) or glioma-associated oncogene</i>
3'-DAB	3'-diaminobenzidīns	<i>3'-diaminobenzidine</i>
7-DHH	7-dehidroholesterols	<i>7-dehydrocholesterol (7- DHC)</i>
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DVP	D vitamīna saistošais proteīns	<i>Vitamin D binding protein (VDP)</i>
DVR	D vitamīna receptors	<i>Vitamin D receptor (VDR)</i>
EM	Elektronmikroskopija	<i>Electron microscopy</i>
IHK	Imūnhistoķīmija	<i>Immunohistochemistry (IHC)</i>
MAL	Metilaminolevulināts	<i>Methyl aminolevulinate</i>
PDPN	Podoplanīns	<i>Podoplanin</i>
PTCH1	Proteīnlabota homologa 1 gēns	<i>Protein patched homolog 1 gene</i>
RRRBR α	Retīnskābes receptoram radniecīgais bāreņa receptors α	<i>Retinoic acid receptor-related orphan receptor α (RORα)</i>
RRRBR γ	Retīnskābes receptoram radniecīgais bāreņa receptors γ	<i>Retinoic acid receptor-related orphan receptor γ (ROR γ)</i>

SDVSP	Starptautiskā D vitamīna standartizācijas programma	<i>International Vitamin D Standardization Program (VDSP)</i>
SHh	<i>Sonic Hedgehog</i> proteīns	<i>Sonic Hedgehog protein</i>
SHNP	Savienotā homologa nomācējproteīns	<i>Suppressor of fused homolog (SUFU) protein</i>
SMO	<i>Smoothened</i> gēns	<i>Smoothened gene</i>
SPKC	Slimību profilakses un kontroles centrs	<i>Center of disease prevention and control</i>
SVKV	Starptautiskā vēža kontroles savienība	<i>Union for International Cancer Control (UICC)</i>
TNM	Starptautiskā ļaundabīgo audzēju klasifikācija	<i>Classification of Malignant Tumours</i>
UVA	Ultravioletie A stari	<i>Ultraviolet A</i>
UVB	Ultravioletie B stari	<i>Ultraviolet B</i>
UV	Ultravioletais starojums	<i>Ultraviolet radiation (UVR)</i>
PVO	Pasaules Veselības organizācija	<i>World Health Organization (WHO)</i>

Ievads

Darba aktualitāte

Onkoloģijas problēmas vienmēr ir bijušas visu specialitāšu ārstu uzmanības lokā. Ļaundabīgo audzēju sastopamības biežums pasaulē turpina pieaugt (Sung et al., 2021; Niculet et al., 2022). Pēdējos gados arvien vairāk klīnicistu un morfoloģu gan mūsu valstī, gan ārvalstīs pievērš uzmanību ādas bazālo šūnu karcinomai (BŠK) (Niculet et al., 2022; Derjabo, 2014). Cilvēka ļaundabīgo audzēju klāstā BŠK ieņem trešo vietu pēc izplatības biežuma aiz kuņģa un plaušu vēža, un tās īpatsvars starp ādas audzējiem veido no 50 līdz 90 % (Montagna et al., 2017). Pēdējos gados ievērojams BŠK sastopamības pieaugums ir reģistrēts daudzās valstīs, turklāt audzējs pārsvarā tiek noteikts Eiropas iedzīvotājiem ar I un II ādas fototipu pēc Ficpatrika (*Fitzpatrick*) skalas, kam mūža garumā BŠK risks pieaug līdz pat ~ 30 % (Verkouteren et al., 2017; Bauer et al., 2020; Muzic et al., 2017). Ādas vēzis arī Latvijā ieņem trešo vietu starp visām reģistrētām ļaundabīgām slimībām, un, pēc SPKC datiem, saslimstībai ar BŠK un ādas plakanšūnu (ĀPK) vēzi ik gadu ir vērojama tendence pieaugt (SPKC datubāze 2010–2019, pēdējo reizi atjaunināts 31.10.2023.).

BŠK histopatogēneses un ļaundabīguma pakāpes jautājumi joprojām raisa lielas diskusijas. Lielākajai pētnieku grupai ir stingrs priekšstats, ka BŠK ar lokāli destruktīvu augšanu un zemu metastātisku potenciālu ierindojas starp labdabīgām un ļaundabīgām neoplazmām. Tomēr pasaules literatūrā ir aprakstīti metastātiskā bazālo šūnu vēža gadījumi ar biežumu 0,0028–0,5 % (Lau et al., 2018). Jāatzīmē, ka nepastāv vispārpieņemta klīniskā un morfoloģiskā klasifikācija, kas ievērojami sarežģī gan materiāla izpēti tā analīzes nolūkā, gan dažādu specialitāšu ārstu praktisko darbību. Šādas klasifikācijas trūkums izraisa grūtības un nesaskaņas ādas bazālo šūnu vēža klīniskajā un histoloģiskajā interpretācijā, kā arī ārstēšanas metožu izvēlē, kuras var būt neatbilstošas vēža histoloģiskajam tipam.

Līdz galam nav izstrādāti arī skaidri klīniskās un instrumentālās diagnostikas metožu lietošanas kritēriji BŠK un makroskopiski līdzīgu patoloģisku procesu diferenciāldiagnozei, morfoloģiskie kritēriji audzēja agrīnai diagnostikai, slimības prognozes un profilakses faktori. Jāatzīmē, ka Latvijā izmanto modificēto Starptautisko histoloģisko klasifikāciju, ir izstrādātas klīniskas vadlīnijas par BŠK diagnostiku un ārstēšanu, taču nav vienotas pieejas, kas speciālistiem apgrūtina pareizu un savlaicīgu ārstēšanas metodes izvēli pacientam. Turklāt vēl neatrisināta problēma ir dažu BŠK biežās recidivēšanas iemeslu noskaidrošana, jo, neskatoties uz jaunām ārstēšanas metodēm, pasaulē joprojām tiek novērots augsts BŠK recidīvu skaits un audzēja rezistence pret jaunākās paaudzes ķīmijterapiju. Tādēļ audzēja patoģēneses un recidīva izraisošo faktoru izpēte ir aktuāls medicīnas un onkoloģijas pētniecības virziens.

Ņemot vērā iepriekš minēto, joprojām aktuāla ir detalizēta BŠK klīniskā un morfoloģiskā izpēte, kompleksi lietojot klīniskās diagnostikas un morfoloģiskās analīzes metodes.

Darba mērķis

Darba mērķis ir noskaidrot galvas un kakla rajona ādas primāras un recidivējošas BŠK klīniskās, dermatoskopiskās un morfoloģiskās īpatnības, raksturot pacientu D vitamīna statusu un izpētīt D vitamīna nozīmi galvas un kakla rajona BŠK attīstībā.

Darba uzdevumi

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Ievākt un analizēt galvas un kakla rajona ādas primāro un recidivējošo BŠK rekrutēto pacientu klīniskos datus, raksturot klīniskās gaitas īpatnības.
2. Veikt galvas un kakla rajona ādas BŠK dermatoskopisko izmeklēšanu, izmantojot dermatoskopu *Dermlite DL3N* ar *PigmentBoost* funkciju, analizēt audzēja dermatoskopiskos parametrus un novērtēt to nozīmi augsta riska BŠK noteikšanā.
3. Izpētīt un novērtēt izmaiņas audu un šūnu līmenī dažādos BŠK apakštipos, izmantojot metožu kompleksu, kas ietver rutīnas histopatoloģiju, imūnhistoķīmiju un elektronu mikroskopiju.
4. Izpētīt D vitamīna statusu pacientiem ar galvas un kakla rajona ādas primāro un recidivējošo BŠK, nosakot tā līmeni asins serumā, kā arī D vitamīna saistošā proteīna ekspresiju audzēja audos, noteikt iespējamo saikni ar audzēja attīstību.
5. Analizēt Latvijas BŠK pacientu kohortas klīniskos, molekulāro marķieru ekspresijas un D vitamīna līmeņa datus, lietojot to analīzei klasterizācijas metodi.

Darba hipotēze

1. Dermatoskopiskā un morfoloģiskā izvērtēšana nepieciešama efektīvai BŠK ārstēšanai un audzēja recidīva riska mazināšanai.
2. SHh signālceļam ir nozīme BŠK patoģenēzē, tam iesaistoties audzēja un tā mikrovides transformācijas procesos.
3. Agresīvu BŠK formu prevalence saistās ar zemu D vitamīna līmeni populācijā.

Darba novitāte

Šajā pētījumā pirmo reizi apkopoti galvas un kakla rajona ādas primāras un recidivējošas BŠK pacientu gan klīniskie, gan dermatoskopiskie un morfoloģiskie dati, kā arī veikta audzēja recidivēšanas kontrole pēcoperācijas periodā divu gadu garumā. Turklāt visiem galvenajiem BŠK morfoloģiskajiem tipiem imūnhistoķīmiski tika izvērtēti audzēja 1) vietējai agresivitātei, 2) invazitātei un 3) recidivēšanai nozīmīgi marķieri, tostarp IV tipa kolagēns, laminīns, alfa-gludo muskuļu aktīns (*α*-GMA), podoplanīns (PDPN) un *Sonic Hedgehog* (SHh) proteīns.

Papildus pētījumā iekļautajiem pacientiem tika analizēts D vitamīna līmenis asins serumā, pirmo reizi vienlaikus nosakot D vitamīna saistošā proteīna (DVP) ekspresiju audzēja audos. Lai noteiktu iegūto rezultātu galvenās apakškopas, pirmo reizi tika izmantota mašīnmācīšanās hierarhiskās klasterizācijas metode.

Mērķa populācija

No 2016. gada 1. septembra līdz 2019. gada 1. septembrim pētījumā tika iekļauti septiņdesmit deviņi pacienti, kuriem Rīgas Stradiņa universitātē, Stomatoloģijas institūtā, Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas nodaļā, un Latvijas Onkoloģijas centrā tika veikta galvas un kakla BŠK diagnosticēšana un ārstēšana. Kopumā tika reģistrētas 46 sievietes un 33 vīrieši. Pacientu vecuma diapazons bija 32–95 gadi. Pēc operācijas pacienti tika novēroti 24 mēnešus recidīva agrīnai atklāšanai un ārstēšanai. Tika iegūti un pētīti pacientu klīniskie dati, veikta jaunveidojumu klīniskā un dermatoskopiskā analīze, noteikta to anatomiskā lokalizācija.

Materiāli tehniskais nodrošinājums

Pētījumā lietoti materiāli tehniskie līdzekļi, izmantojot Rīgas Stradiņa universitātes AAI Starpkatedru elektronmikroskopijas laboratorijas, Rīgas Stradiņa universitātes doktora studiju un *Roche Latvia* granta sniegtās iespējas.

Personīgais ieguldījums

Promocijas darba autore veica: pētījuma plānošanu, literatūras ievākšanu un tās analīzi, pacientu klīnisko un dermatoskopisko datu ievākšanu un analīzi, imūnhistoķīmisko marķieru izvēli, pamatojoties uz literatūras analīzi par izpētes tēmu, pēcoperācijas periodā pacientu kontroli, imūnhistoķīmisko reakciju rezultātu mikroskopisko analīzi audu paraugos, audu griezumam analīzi elektronu mikroskopā, darbā izmantoto attēlu veidošanu, iegūšanu un to apstrādi. Kopā ar darba vadītāju *Dr. med.* docenti Annu Ivanovu ieguva audzēja materiālu, asistējot pacientu ķirurģisko operāciju laikā.

Ētiskie aspekti

Pētījuma veikšanai saņemta Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauja 2016. gada 8. septembrī (skat. 4. pielikumu).

1. Literatūras apskats

1.1. Bazālo šūnu karcinomas epidemioloģija

BŠK ir visizplatītākais ļaundabīgais ādas audzējs, kas attīstās no epidermas bazālā slāņa šūnām, un tā saslimstība ar katru gadu pieaug visā pasaulē (Sung et al., 2021; Rubin et al., 2005; Carruci et al., 2008). BŠK veido līdz 80 % no reģistrētajiem nemelanocitārā tipa audzējiem. Eiropas populācijā audzējs galvenokārt skar personas ar I un II ādas fototipu, kam ir 30 % BŠK attīstības risks dzīves laikā (Muzic et al., 2017; Abbas et al., 2016; Nolan et al., 2020). Līdz pat 80 % gadījumu BŠK attīstās galvas un kakla ādas rajonā (Ghafouri-Fard et al., 2010; Goh et al., 2010). Visā pasaulē tiek ziņots par lielāku BŠK sastopamību ekvatoriālajos nekā polārajos platumā grādos un apgabalos ar ievērojamām kaukāziešu populācijām (Situm et al., 2008; Bijlsma et al., 2006; Lehmann, 2009). Papildus vides, darba un citiem riska faktoriem, piemēram, Ficpatrika (*Fitzpatrick*) skalas I ādas tipa klātbūtnei, ādas karcinomai ģimenes anamnēzē un imūnsupresijai, ir norādīta ultravioletā starojuma (UV) izraisīto mutāciju nozīme BŠK attīstībā (Situm et al., 2008).

Pēc literatūras datiem un mūsu novērojumiem, BŠK skarto pacientu vecums ir novirzījies no 60–70 uz 40 un pat 30 gadiem, turklāt jaunākajiem BŠK pacientiem prevalē agresīvas audzēja formas (Situm et al., 2008; Carruci et al., 2008). Pēc starptautiskajiem aprēķiniem, ar BŠK saistītā mirstība ir diezgan zema – 1 gadījums uz 100 tūkstošiem (Muzic et al., 2017; Abbas et al., 2016). Audzēju raksturo lēna progresēšana un reta attālināto metastāžu izplatība vienlaikus ar bieži lokāli invazīvu un destruktīvu augšanu, ko Jakobs (*Jacob*) pirmo reizi aprakstīja 1827. gadā (Mackiewicz-Wysocka et al., 2013). Pēdējos gados ir atzīmēts to pacientu skaita pieaugums, kuriem attīstās vairākas BŠK (Khalesi et al., 2013). To izskaidro vai nu ar ozona slāņa iznīcināšanu un ilgāku ultravioletā starojuma iedarbību, vai kopējo vēža izplatības pieaugumu (Khalesi et al., 2013; Laikova et al., 2019). BŠK mēdz attīstīties kā vairāki bojājumi un vairāk nekā vienā anatomiskā lokalizācijā, prezentējoties ar identisku vai dažādu morfoloģisko tipu līdzāspastāvēšanu vienā lokalizācijā (Bartoš, 2019).

1.2. Bazālo šūnu karcinomas riska faktori

Noteiktas BŠK etioloģijas nepastāv, kas apgrūtina savlaicīgu profilaksi. Taču ir nozīmīgi BŠK attīstības riska faktori: ilgstoša atrašanās saulē un bieži saules apdegumi, gaišais ādas tips, vīriešu kārtas dzimums, apstarojums, ādas vēži ģimenes anamnēzē, noteiktu grupu medikamentu (tetraciklīnu grupas antibiotikas, bioloģiskie medikamenti, piemēram, metotreksāts) lietošana un imūnās sistēmas nomākšana (McDaniel et al., 2021). Daži iedzimti sindromi (*Gorlin-Goltz*, *Bazeka*, *Rombo* sindroms) izraisa multiplu BŠK veidošanos. Gorlina-

Golca sindroms ir autosomāli dominējoša slimība, kurā 100 % gadījumu audzējā tiek konstatēta PTCH1 (*Protein patched homolog 1 gene*) gēna mutācija, un pacientiem papildus multipliem BŠK var konstatēt raksturīgu fenotipu: platu deguna sakni, papildu krokas uz plaukstām, cistiskas izmaiņas žokļos, skeleta sistēmas malformācijas (Joshi et al., 2012). Bazeka sindroms ir iedzimts, tas tiek pārmantots pēc dominējošā principa saistībā ar X hromosomu. Papildus multiplu BŠK attīstībai tiek atzīmēta atrofodermija, hipotrihoze, hipohidroze un matu folikulu atrofija (Sereflican et al., 2017). Līdztekus multipliem BŠK Rombo sindromu raksturo hipertrihoze, vermikulāra atrofodermija, trihoepiteliomas un perifēra vazodilatācija (van Steensel et al., 2001).

Kā viens no galvenajiem faktoriem, kas iniciē BŠK attīstību, tiek aplūkota UV nozīme (Situm et al., 2008; Tampa et al., 2020). UV rada kumulatīvus bojājumus un palielina ādas vēža risku, jo UV izraisīti intracelulāri DNS bojājumi var veicināt mutācijas un turpmāku ļaundabīgu ādas audzēju attīstību (Lee et al., 2020). Jau 1992. gadā Starptautiskā Vēža izpētes aģentūra noteica UV starojumu kā iespējamo kancerogēnu, bet 2009. gadā – kā I klases kancerogēnu, kas spēj izraisīt ādas bazālo un pigmentšūnu audzējus (Tenge et al., 2021). UV starojumu raksturo viļņu garums 100–400 nm. Bioloģiskā aktivitāte ir pretēja viļņu garumam – jo īsāks viļņa garums, jo lielāka bioloģiskā aktivitāte, tāpēc UVB (ultravioletais B starojums – vidēja garuma vilnis) starojums ir ievērojami aktīvāks par UVA (ultravioletais A starojums – gara diapazona vilnis) starojumu (minimālā eritēmas deva mērāma UVA – J/cm², bet UVB – mJ/cm²) (Tenge et al., 2021). Katram UV starojuma spektram ir savs mērķa hromatofors. UVB staru hromatofors ir šūnas kodola DNS. UV fotoniem absorbējoties uz DNS molekulas, viens no svarīgākajiem cietējiem ir p53 gēns, kas atbild par programmētu šūnas nāvi – apoptozi. UV izraisa ādas antigēnprezentējošo šūnu – Langerhansa šūnu – bojāeju. Ādas imūnās sistēmas nomākšana UV ietekmē ir otrs svarīgākais faktors kancerogēneses attīstībā. Jāatzīmē, ka šis mehānisms attīstās UV staru ietekmē jau suberitēmas stadijā (Lee et al., 2020; Rass et al., 2008). Saules un solārijā iegūto staru ietekmē eritēmas rajonā epidermā veidojas izmainīti, pirmsvēža šūnām līdzīgi keratinocīti. Nepilnvērtīgas šūnas izveides gadījumā ādai trūkst mehānisma šo šūnu atpazīšanai un savlaicīgai iznīcināšanai. UVB starojuma 80 % tiek absorbēti epidermas virspusējā slāņā šūnās, un tikai 20 % nokļūst līdz bazālā slāņa šūnām. UVA starojuma 30–50 % enerģijas absorbējas dermas kārpiņu slānī (Lee et al., 2020; Tenge et al., 2021). UVA spēj radīt arī brīvos radikāļus, izraisot šūnas kodola DNS bojājumu. Pierādīts, ka UVB izraisa molekulārās izmaiņas, sekmējot atipisku fotoproduktu, mutagēnu – ciklobutāna pirimidīna dimēru – rašanos. Genotoksiskā UVA starojuma darbība notiek caur oksidatīvo bojājumu (Tenge et al., 2021; Rass et al., 2008). Uzkrājoties p53 gēna mutācijām, novērojama

klonāla šūnu ekspansija. BŠK gadījumā 85 % mutāciju saistās ar gēniem, kas kodē molekulāra signālceļa SHh olbaltumvielas.

Mutācijām, kas aktivizē *Hedgehog* gēnus, tostarp *protein patched homolog 1 gene* (PTCH1), *Sonic Hedgehog* (SHh) un *Smoothened* (SMO), ir būtiska nozīme BŠK kancerogēnēzē (Situm et al., 2008; Tampa et al., 2020; Bijlsma et al., 2006; Lehmann et al., 2009; Moisejenko-Golubovica et al., 2020). PTCH1 gēns kodē SHh proteīna receptoru, un tā mutācijas izraisa pārmērīgu “izgludināta” transmembrānas proteīna (*smoothened*, SMO) izveidi, kas savukārt izraisa ar gliomu saistīta onkogēna (CPP) transkripcijas ceļa aktivizāciju (Carballo et al., 2018). BŠK šūnās tiek novērots ļoti daudz dažādu somatisko mutāciju, daudz vairāk nekā citos ļaundabīgos audzēju veidos. Lielākajai daļai šo mutāciju ir ultravioletā starojuma (UV) izraisīta bojājuma pazīmes (citozīna bāzes aizstāšana ar timidīnu). Tāpat 58–69 % sporādiskas (neiedzimtas) BŠK gadījumā audzējā tiek bojāts PTCH1 gēns, kas atrodas 9q22.3 hromosomā, savukārt 44–65 % gadījumu mutācijas tiek konstatētas TP53 gēnā, kas atrodas 17q13.1 hromosomā (Tsuji et al., 2005).

Vienlaikus UV tiek atzīta par organismam nepieciešamā D vitamīna avotu. Vairāki pasaules literatūras dati pierāda šī vitamīna būtisko funkciju tādu ļaundabīgu ādas audzēju kā BŠK, plakanšūnu karcinomas un melanomas profilaksē, uzsverot D vitamīna receptora (DVR) audzēju nomācošo funkciju ādā (Harris et al., 2001). Attiecībā uz diagnostiskiem rādītājiem kā ASV, tā arī citās attīstītajās valstīs 25(OH)D vitamīna noteikšana klīniskajā laboratorijā ir joprojām visbiežāk izmantojamais izmeklējumu tests (Staples et al., 2006). Saistība starp D vitamīna līmeni un ādas vēža risku ir pārbaudīta vairākos pētījumos (Situm et al., 2008). Dažādu pētījumu rezultāti liecina, ka cilvēkiem ar augstu D vitamīna līmeni ir mazāka iespēja saslimt ar nemelanomas ādas vēzi nekā cilvēkiem ar zemu līmeni, tomēr šie dati ir diezgan pretrunīgi (Bijlsma et al., 2006).

Uzkrātie dati liecina, ka D vitamīns antagonizē SHh signālceļu un aizsargā pret BŠK (Dong et al., 2022; Liu et al., 2020; Rass et al., 2008). Saskaņā ar vēl vienu Bijlsmas un kolēģu (2006) novērojumu, nehidroksilēta D₃ vitamīna bioloģiskā funkcija ir kavēt SHh signāla pārraidi (Bijlsma et al., 2006; Telfer et al., 2008). Daudzos zinātniskos pētījumos ir konstatēts, ka SHh signālceļa gēnos notiek mutācijas BŠK attīstības laikā, un eksperimenti ar dzīvnieku modeļiem audzēja ģenēzes laikā ir parādījuši SHh ceļa ģenētisko izmaiņu funkcionālo nozīmi (Rass et al., 2008; Mosterd et al., 2008). Saskaņā ar Makarovas un kolēģu (2017) pētījuma rezultātiem UV var veicināt BŠK veidošanos, kā arī radīt audzēja nomācošu D₃ vitamīnu (Boulinguez et al., 2004; Li et al., 2020; Lara et al., 2017; Fidelis et al., 2021). Pēc Džina Y. Tanga (*Jean Y. Tang*) no Stenfordas universitātes teiktā, mūsdienās medicīnas zinātne ir pierādījusi, ka D vitamīna deficīts ir saistīts ar paaugstinātu autoimūnu slimību, kaulu lūzumu,

vēža, sirds un asinsvadu slimību un daudzu citu cēloņu mirstības risku. Profesionāļu vidū pieaug bažas, ka saules aizsarglīdzekļi, ko dermatologi ir ieteikuši, lai mazinātu saslimstību ar ādas vēzi, var veicināt zemu D vitamīna līmeni, kam var būt negatīva ietekme uz organismu (Boitor et al., 2017; Asakura et al., 2020).

Ģeogrāfiskā faktora dēļ Baltijas reģionā dzīvojošiem cilvēkiem, tajā skaitā Latvijas iedzīvotājiem, iespējams, ir zems ar hronisku ultravioleto starojumu saistīts BŠK attīstības risks, tomēr šie jautājumi līdz šim nav pietiekami izpētīti. Tāpat maz ir zināms par saules starojuma nozīmi vairāk un mazāk agresīvu BŠK attīstībā.

1.3. Bazālo šūnu karcinomas klīniskā aina

Klīniski un morfoloģiski BŠK var izpausties kā virspusēja, mezglaina jeb nodulāra, infiltratīva, pigmentēta un jaukta, kā arī kā šo formu apakštipi (Koyuncuer, 2014). Nodulārās un virspusējās bazaliomas aug lēni un pamatā pieskaitāmas zema riska BŠK. Lai arī jebkurš bazaliomu paveids var plašā zonā sagraut apkārtējos audus vai pat metastazēties distāli, šāds scenārijs nav tipisks nodulārām un virspusējām bazaliomām. Infiltrējošās, sklerotizējošās un mikronodulārās bazaliomas ir visagresīvākās. Tāpēc ir svarīgi pirms ārstēšanas metodes izvēles pareizi izvērtēt klīnisko un histoloģisko audzēja formu, lai mazinātu recidivēšanas risku. Katru BŠK formu raksturo noteiktas klīniskās un morfoloģiskās pazīmes.

Virspusējā BŠK izpaužas kā dažāda lieluma eritematozs plankums ar norobežotām malām, kas parasti ir perlamutra krāsā, kā arī ar virsmas eroziju, bez tendences invazīvai augšanai (no dažiem milimetriem līdz vairākiem centimetriem), kas parasti nereaģē uz pretiekaisuma terapiju. Šī forma veido aptuveni 10–30 % no visām BŠK (Dourmishev et al., 2013). Diferenciālā diagnoze ietver Bovenā (*Bowena*) slimību, aktīnisko keratozi, psoriāzi vai ekzēmu (Chen et al., 2006).

Nodulāra jeb mezglaina BŠK veido aptuveni 60–80 % no visām BŠK un lokalizējas visbiežāk galvas un kakla ādas rajonā (Dourmishev et al., 2013). Klīniski tā izpaužas ar palielinātiem, eksofitiem pārļu formas mezgliņiem, izteiktām teleangiektāzijām veidojuma virsmā un perifērijā (Cohen, 2022). Tipiska lokalizācija ir sejas un galvas āda. Bieži vien elementa perifērijā vizualizē valnīti, kas sastāv no mazām “pērlēm”.

Jāatzīmē, ka nodulāra BŠK var noritēt arī ar izčūlojumu audzēja virsmā vai atgādināt cistisko BŠK (Cameron et al., 2019). Teleangiektāziju dēļ tā bieži var līdzināties hemangiomai vai melanomai, it īpaši pigmentētas BŠK gadījumā. Bojājumi ar lieliem izmēriem un centrālu nekrozi definējami kā *ulcus rodens*. BŠK ar izčūlojumu – *ulcus rodens* – jau no paša parādīšanās brīža ir apaļas čūlas izskats, kas izplatās gan pa ādas virsmu, gan dziļumā, un tā

neveido mezglus (Cameron et al., 2019; Chen et al., 2006). Tās malas ir skaidri norobežotas, tām ir neregulāra forma ar iekaisuma pazīmēm. Diferenciālā diagnozē jāiekļauj traumatizēta dzimumzīme un amelanotiska melanoma (Dourmishev et al., 2013).

Mikronodulāra BŠK parādās kā plakans vai ar nelielu pacēlumu virspusējs plankums, kas paplašina savas robežas laterāli un horizontāli (Prieto-Granada et al., 2015). Mikronodulāras BŠK izčūlošanu novēro reti, un parasti tām ir bālgani dzeltena krāsa. Jaunveidojumi ir plakani, ar šķietami skaidrām kontūrām un blīvi, veicot palpāciju (Cohen, 2022; Cozzi et al., 2022). Visbiežāk lokalizējas uz sejas un muguras ādas.

Pigmentētas BŠK pazīmes var atrast jebkuram klīniskā audzēja variantam. Pigmenta krāsa variē no tumši zilās līdz melnai, jo bazālo šūnu ligzdņas ir pārpildītas ar melanīnu un melanofāgiem (Abudu et al., 2019). Melanocīti atrodas starp audzēja ligzdām, bet melanofāgi atrodas stromā. Diferenciālā diagnoze ir jāveic ar ļaundabīgo melanomu (Abudu et al., 2019; Cohen, 2022).

Infiltratīva BŠK visbiežāk lokalizējas ķermeņa augšējā daļā vai uz sejas. Reti novēro parestēziju vai jutīgumu, kas nozīmē audzēja perineirālo invāziju, jo īpaši, ja audzējs ir lokalizēts uz sejas (Pampena et al., 2021; Cozzi et al., 2022). Šo klīnisko variantu bieži novērtē par zemu, kad tiek lemts par ekscīzijas robežām. Klīniski tā ir bālgana, kompakta.

Sklerotizējoša BŠK klīniski prezentējas kā infiltrēts balts rētai līdzīgs plankums ar nedaudz spīdošu virsmu un izplūstošām robežām (Pampena et al., 2021; Camela et al., 2023). Veidojuma centrā var konstatēt punktētas hiperpigmentācijas zonas, dažāda lieluma erozijas, atrofiskas izmaiņas, dishromiju (Camela et al., 2023).

Pinkus fibroepitelioma ir audzējs, kas parasti izpaužas kā rozā vai eritematozs virs ādas pacelts mezgliņš, kas var līdzināties seborejas keratozei vai akrohordonam (Damani et al., 2022). Visbiežāk atrašanās vieta ir uz muguras ādas, jo īpaši sievietēm. Diferenciālā diagnoze ietver intradermālu nēvusu, aktīniskās keratozes, keratoakantomas, seborejas keratozes, plakanšūnu karcinomu (Reggiani et al., 2013).

Audzēja formu, kas saistīta ar plakanšūnu diferenciāciju, sauc par metatipisku BŠK. Šīs formas kombinācijā apvienotas gan BŠK, gan plakanšūnu karcinomas pazīmes (Madej-Czerwonka et al., 2022; Camela et al., 2023). Klīniski metatipiskā tipa BŠK parādās kā izolēts mezgliņš vai plankums ar virsmas izčūlojumu, kas pārklāts ar hemorāģisku kreveli (Camela et al., 2023).

Pie multiplu BŠK atrades, īpaši jauniem pacientiem, ir jāizslēdz Gorlina-Golca sindroms (Bartoš et al., 2019). Šis sindroms ir vienādi bieži sastopams gan vīriešiem, gan sievietēm. Līdztekus vairākiem BŠK elementiem pacientam tiek diagnosticēti palmoplantārie

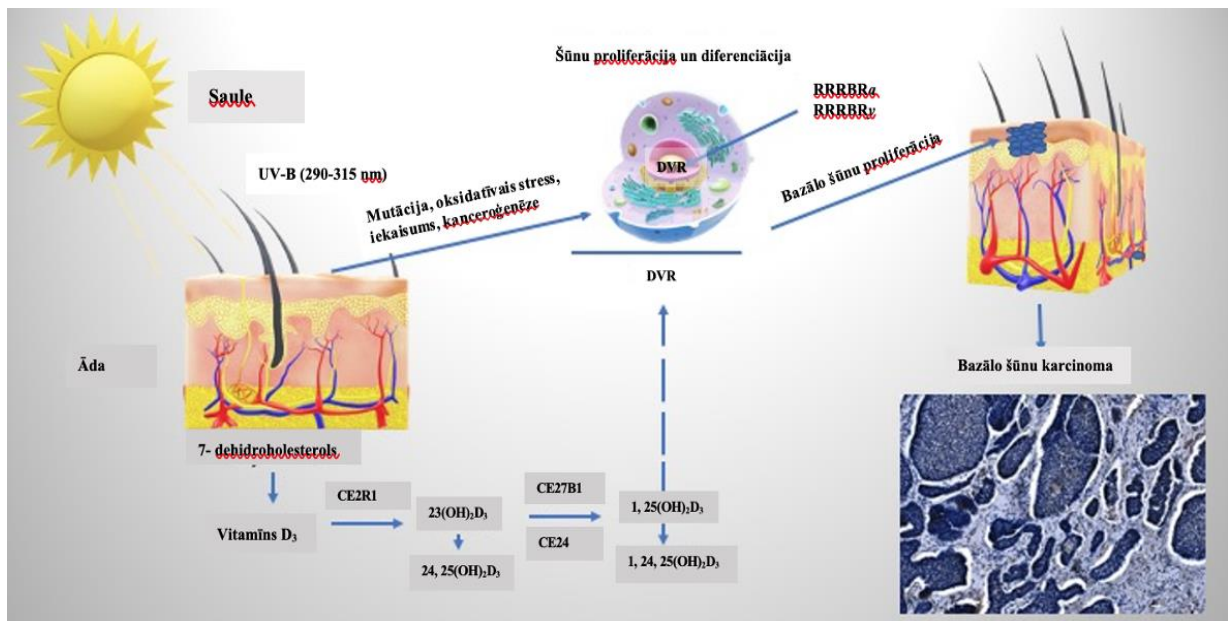
iespiedumi, odontogēnas žokļa cistas un citi audzēji, piemēram, meduloblastoma (Bresler et al., 2016). Šādā gadījumā BŠK formas var atšķirties vienam pacientam atkarībā no lokalizācijas.

1.4. Bazālo šūnu karcinomas patoģenēze

BŠK attīstībā nozīmīga ir gan ārvides faktoru ietekme, gan pacienta organisma īpašības. SHh morfogēns ir būtisks dažādu šūnu procesu regulatori embriogēnes un pieaugušā dzīves laikā. Audzēja attīstības gadījumā aberanta SHh signālceļa aktivācija notiek vai nu signālceļa molekulu mutācijas dēļ (t. i., neatkarīgi no liganda), vai SHh pastiprinātas ekspresijas dēļ (atkarīgi no liganda) (Evangelista et al., 2006; Karhadkar et al., 2004; Sanchez et al., 2004; Berman et al., 2003). SHh ligandi saistās ar transmembrānas receptoru PTCH1, kurš regulē *Hedgehog* kompleksa aktivitāti. Lai gan SHh signālceļš parasti tiek aktivēts pēc liganda saistīšanās ar receptoru, ir pētīti arī vairāki mehānismi, kas raksturo CPP proteīna aktivitātes palielināšanos liganda iztrūkuma gadījumos (Hanna et al., 2016). Visizplatītākās mutācijas ir PTCH1 inaktivējošās mutācijas vai SMO aktivizējošās mutācijas (Kim et al., 2019; Caro et al., 2010). BŠK gadījumā mutācijas PTCH1 ekspresijā novērš reakciju uz šūnas cikla kontrolpunktu (*checkpoint*) ciklīnu B1 un veicina CPP aktivāciju (Hanna et al., 2016; Celebi et al., 2016). Nelielai daļai BŠK ir konstatēta arī SHNP funkcijas zuduma mutācija, kas ir negatīvs SHh signālceļa regulators. Tādēļ lokāli progresējošiem vai metastātiskiem audzējiem vai pacientiem ar ģenētisku noslieci uz BŠK sistēmiska ārstēšana ar SHh signālceļa inhibitoriem var būt pamatota. Citas izplatītas mutācijas ir UV radīti specifiski defekti p53 audzēja supresora gēnā, kas noteikti gandrīz pusei BŠK (Bonilla et al., 2016).

1.5. D vitamīna nozīme bazālo šūnu karcinomas patoģenēzē

D vitamīna nozīme klasiskā izpratnē ir saistīta ar kalcija un fosfora metabolisma regulēšanu un līdz ar to arī kaulu augšanu un pārbūvi (Lehmann, 2009). Mūsdienās D vitamīns ir atzīts par hormonāli aktīvu lipīdos šķīstošu vitamīnu ar daudzām funkcijām, kas saistītas ar cilvēka organisma fizioloģisko procesu sarežģīto regulēšanu (Bijlsma et al., 2006; Lehmann, 2009). Cilvēku un dzīvnieku ādā D₃ vitamīna (holekalciferola) sintēze notiek no 7-dehidroholesterola (7-DHH) ultravioleto B staru ar viļņa garumu no 290 līdz 315 nm ietekmē (1.1. attēls).



1.1. attēls. D vitamīna metabolisms un sintēze

UVB staru ietekmē D_3 vitamīna sintēzes process notiek keratinocītos, kas satur CE. Tie ir nepieciešami D_3 vitamīna prekursora, 7-dehidroholesterola fotoķīmiskai pārvēršanai aktīvajā formā (kalcitriols $1, 25(OH)_2D_3$). D vitamīna hidroksiātināšanu aktivitātes ir saistītas ar kodolreceptoru ligandu saistošā domēna DVR iesaistīšanos. Turklāt D_3 vitamīns ir iesaistīts gan veselu, gan ar BŠK ietekmētu keratinocītu bioloģisko funkciju un gēnu ekspresijas regulēšanā, ko veicina RRRBR α un γ kodolreceptoru klātbūtnē.

Saīsinājumi: UVB, ultravioletais B; DVR, D vitamīna receptors; RRRBR α un γ , ar retīnskābi saistītie reti sastopamie receptori α un γ ; BŠK, bazālo šūnu karcinoma.

Neliels daudzums D_3 vitamīna nonāk organismā arī ar pārtiku, piemēram, zivju eļļu, sviestu, olām un pienu. Vienlaikus D_2 vitamīnu (ergokalciferolu) var iegūt tikai no augu izcelsmes pārtikas produktiem, piemēram, rauga, maizes, sēnēm un dažiem dārzeņiem. Tā kā abi vitamīni ir bioloģiski inerti, tie tiek pārveidoti aknās un nierēs (Moisejenko-Golubovica et al., 2020; Sun et al., 2020; Morgado-Águila et al., 2021). Jaunāko publikāciju autori ziņo par D_3 vitamīna (D_3) hidroksi (OH) metabolītu ķīmiskās sintēzes ceļu daudzveidību (Brzeminski et al., 2022).

Mūsdienās D vitamīns tiek klasificēts kā hormons, kura funkcijas ietver spēju radīt un modulēt bioloģiskās reakcijas audu mērķšūnās, regulējot gēnu transkripciju (Brzeminski et al., 2022; Warwick et al., 2021). D vitamīnam ir šūnu receptori un nesējproteīns, D vitamīnu saistošais proteīns (DVP). Cirkulējošā DVP uzņemšanu veicina endocitozes process vairākos epitēlijšūnu tipos (Šimoliūnas et al., 2019). D vitamīna receptori pieder receptoru grupai, kas raksturo steroīdu-retinoīdu-vairogdziedzera hormonu receptoru lokalizāciju šūnas kodolā. Lipofilā hormona molekulas iekļūst caur plazmatisko membrānu, šķērso šūnas citoplazmu un saistās ar noteiktām DNS vietām šūnas kodolā, kur modulē mērķa gēnu ekspresiju. Citu autoru rezultāti liecina, arī retīnskābes receptoram radniecīgie bāreņreceptori (*retinoic acid receptor-related orphan receptors*) RRRBR α un RRRBR γ funkcionē kā receptori endogēni ražotam

nekalciemiskajam 20-hidroksi- un 20,23-dihidroksivitamīnam D (Mostafa et al., 2015; Slominski et al., 2017).

Raksturojot D vitamīna darbību, jāatzīmē tā klasiskā funkcija, kas ir saistīta ar kalcija un fosfora metabolisma regulēšanu, un neklasiskā, kas iekļauj šūnu proliferācijas un angiogēnēzes nomākšanu, tādējādi demonstrējot antiapoptotisku un pretaudzēju iedarbību, insulīna sekrēcijas kontroli un katelicidīnu intracelulārās sintēzes aktivizēšanu (Warwick et al., 2021; Asakura et al., 2020). Saistība starp D vitamīna līmeni un ādas vēža attīstības risku ir analizēta gan mūsu, gan citu autoru pētījumos (Mahamat-Saleh et al., 2020; Moisejenko-Golubovica et al., 2021). Uzkrātie dati liecina, ka D vitamīna spēja nomākt SHh signālceļa aktivāciju izskaidro tā aizsargājošo darbību BŠK gadījumā (Asakura et al., 2020; Mahamat-Saleh et al., 2020). Viens no aprakstītajiem D₃ vitamīna darbības mehānismiem ir 1,25(OH)₂D izraisīta DVR transkripcijas aktivācija ar rezultējošu keratinocītu diferenciācijas uzlabošanos un šūnu proliferācijas samazināšanos (Moisejenko-Golubovica et al., 2021; Mahamat-Saleh et al., 2020). Keratinocītos ir gan 1- α -, gan 25-hidroksilāze, tāpēc tie var lokāli ražot kalcitriolu (Martin-Gorgojo et al., 2021). Nav zināms, vai seruma 25(OH)D līmeņa izmaiņas normas robežās izraisa kalcitriola līmeņa maiņu. Tāpēc joprojām nav skaidrs, vai izmaiņas normālā seruma 25(OH)D līmenī izraisa izmaiņas šūnu kalcitriola līmenī, DVR aktivāciju vai ģenētiskās aktivitātes transformāciju (Mahamat-Saleh et al., 2020; Martin-Gorgojo et al., 2021).

Nehidroksilēta D₃ vitamīna bioloģiskā iedarbība ierosina SHh signālu nomākšanu (Jeon et al., 2018; Amrein et al., 2020). Ir padziļināti pētīta SHh, Wnt/ β -katenīna un hialuronāna/CD44 signālceļu loma D vitamīna regulēšanā un to nozīme šūnu proliferācijā vai / un diferenciācijā (Mahamat-Saleh et al., 2020). Uzkrātie dati liecina, ka ar SHh gēnu saistītās mutācijas veicina BŠK kancerogēnēzi (Jeon et al., 2018; Samuel et al., 2008; Amrein et al., 2020; Ince et al., 2019). Ir arī norādīta divpusēja UV ietekme uz BŠK kancerogēnēzi, gan stimulējošu, pastiprinot mutaģenēzi, gan inhibējošu, aktivizējot D₃ vitamīnu (Samuel et al., 2008).

Ņemot vērā gan D vitamīna sintēzes īpatnības ādā, kam nepieciešams intensīvs ultravioletais B starojums, gan nepietiekamu D vitamīnu saturošu dzīvnieku izcelsmes produktu patēriņu, D vitamīna deficīta problēma ir ieguvusi globālu nozīmi. D vitamīna deficīta riska grupā ietilpst zīdaiņi, grūtnieces, vecāka gadagājuma cilvēki, cilvēki, kas pakļauti ierobežotai saules iedarbībai, kā arī pacienti ar aptaukošanos un slimībām, kas saistītas ar tauku malabsorbciju (Morgado-Águila et al., 2021; Mahamat-Saleh et al., 2020).

1.6. Bazālo šūnu karcinomas starptautiskā klīniskā klasifikācija

BŠK stadijas noteikšanai jāizmanto pašreizējā 8. versija Amerikas Apvienotās vēža komitejas (AAVK) / Starptautiskās vēža kontroles savienība (SVKS) starptautiskās audzēja stadijas klasifikācijai (TNM) (Amin et al., 2017; Brierley et al., 2019) (1.1. tabula). BŠK gadījumā audzēja stadijas noteikšanas procedūrā histopatoloģiskais apstiprinājums ir obligāts. Limfmezglu stāvokļa novērtējums stadijas noteikšanai tiek veikts, izmantojot klīnisko pārbaudi un instrumentālos izmeklējumus.

Ādas vēža klasifikācija atšķiras atkarībā no anatomiskā reģiona. Pašlaik ādas bazālo šūnu vēzis tiek klasificēts atsevišķi 1) galvas un kakla rajonā, 2) plakstiņu ādā un 3) visos citos anatomiskajos reģionos.

Klīnikā tiek izmantota BŠK ādas formas TNM klasifikācija, kas balstās uz primārā audzēja pazīmju, limfmezglu un metastāžu izvērtēšanu (Keohane et al., 2018; Brierley et al., 2019). Recidīva risks, kā tas atspoguļots 1.2. tabulā, lielā mērā nosaka tālākās terapijas un dinamiskās novērošanas taktikas izvēli, tādēļ tas jānovērtē tūdaļ pēc BŠK diagnozes morfoloģiskā apstiprinājuma, kuru nosaka pēc Starptautiskās morfoloģiskās klasifikācijas (Vornicescu et al., 2021).

1.1. tabula

Bazālo šūnu karcinomas iedalījums stadijās

Stadija	TNM
0	T _{is} N ₀ M ₀
I	T ₁ N ₀ M ₀
II	T ₂ N ₀ M ₀
III	T ₃ N ₀ M ₀ , T ₁ N ₁ M ₀ , T ₂ N ₁ M ₀ , T ₃ N ₁ M ₀
IV	T ₁ N ₂ M ₀ , T ₂ N ₂ M ₀ , T ₃ N ₂ M ₀ , T _{jebkurš} N ₃ M ₀ , T ₄ N _{jebkurš} M ₀ , T _{jebkurš} N _{jebkurš} M ₁

T – primārs audzējs, N – metastāzes reģionālos limfmezglos, M – attālas metastāzes.

1.2. tabula

Recidīva riska vērtēšanas kritēriji

Pazīme	Zems risks	Augsts risks
Lokalizācija un izmērs	<ul style="list-style-type: none"> Sejas centrālā daļa, plakstiņi, uzacis, periorbitālais apvidus, deguns, lūpas, zods, žoklis, ausis un apvidus ap ausīm, deniņi, ģenitāliju apvidus, plaukstu un pēdas; < 6 mm vaigi, piere, skalps, kakls un apakšstilbu priekšējā virsma < 10 mm rumpis un ekstremitātes (izņemot plaukstu, pēdas, potītes un apakšstilbu priekšējo virsmu, nagus un potītes) < 20 mm 	<ul style="list-style-type: none"> Sejas centrālā daļa, plakstiņi, uzacis, periorbitālais apvidus, deguns, lūpas, zods, žoklis, ausis un apvidus ap ausīm, deniņi, ģenitāliju apvidus, plaukstu un pēdas; ≥ 6 mm vaigi, piere, skalps, kakls un apakšstilbu priekšējā virsma ≥ 10 mm rumpis un ekstremitātes (izņemot plaukstu, pēdas, potītes un apakšstilbu priekšējo virsmu, nagus un potītes) ≥ 20 mm

Pazīme	Zems risks	Augsts risks
Veidojuma robežas	Skaidri izteiktas	Vāji izteiktas
Statuss	Primārs	Recidīvs
Imūnsupresija	Nav	Ir
Iepriekšējā apstarošana šajā zonā	Nav bijusi	Ir bijusi
Morfoloģija	Mezglaina, virspusēja forma	Infiltrējoša, sklerotizējoša, jaukta forma
Perineirāla iesaiste (mikroskopiski)	Nav	Ir

1.7. Bazālo šūnu karcinomas morfoloģiskā aina un starptautiskā klasifikācija

BŠK mikroskopiskā struktūra ir tikpat daudzveidīga kā makroskopiskā. Audzēja epiteliālo izcelsmi noteica E. Krompehers (1903), identificējot solīdās jeb nodulārās, adenoidās, cistiskās, hialinizētās, parakeratotiskās un miksomatozās ādas BŠK formas. Savukārt V. Lēvers (1948, 1961) identificēja nediferencētas un diferencētas ādas BŠK formas.

Pēc Skrivenera (Scrivener et al., 2002) datiem, ādas BŠK raksturo vienveidīgas, mazas ovālas formas nediferencētas šūnas ar lieliem kodoliem, kas aizņem gandrīz visu šūnas tilpumu, atstājot šauru citoplazmas malu. Šūnas ir izvietotas ļoti blīvi vai nedaudz brīvi, veidojot dažāda izmēra un formas ligzdotas struktūras. BŠK šūnas bieži novietojas perpendikulāri bazālajai membrānai (BM). BM veidojošo struktūru zudums ap atsevišķām audzēja šūnu ligzdām notiek, pārejot no lēnas neinvazīvas uz agresīvas augšanas BŠK (Garcia et al., 2009). Šie autori ir uzsvēruši, ka BŠK audzēju virspusējos un nodulārajos variantos ligzdas ieskauj nepārtraukta BM, kas sastāv no IV un V tipa kolagēna un laminīna, savukārt infiltratīvajiem un morfeja (*morfea*) formas variantiem nav BM un ir izteikta stromas desmoplāzija. Turklāt iepriekš veikto pētījumu rezultāti liecina, ka kolagēna un laminīna ekspresija BM atšķiras primārajā un recidivējošā BŠK (Marasa et al., 2008). Daļai solīdo kompleksu vienmēr ir saistība ar epidermu. Audzēja saistaudu stromā bieži notiek mukoīda deģenerācija, stroma dažreiz ir infiltrēta ar imūnās sistēmas šūnām (Vantuchova et al., 2006; Scrivener et al., 2002). Ievērojami sasniegumi BŠK izpratnē ir iegūti, pētot audzēja mikrovides (AM) arhitektūru. Tā ietver: i) daudzveidīgas šūnas, kas var būt gan pastāvīgas, kā, piemēram, fibroblasta tipa šūnas, gan šūnas, kuru izcelsme saistīta ar asins šūnām un kurām piemīt fagocitārās un imūnās funkcijas; ii) ekstracelulārās matrices molekulas un matrici noārdošos enzīmus un iii) cauraugošos asinsvadus (Peltanova et al., 2019). Jāatzīmē, ka ar aktīnu bagātā fenotipa attīstība stromas šūnās tika demonstrēta agresīvos BŠK variantos – mikronodulārajos un morfeja tipa, salīdzinot ar nodulārajiem (Cristian et al., 2001). Imūnhistoķīmisko pētījumu rezultāti liecina par stromas alfa-gludo muskuļu aktīna (*α*-GMA) ekspresijas palielināšanos agresīvos BŠK (Mercuri et al., 2014;

Bozdogan et al., 2002; Piloni et al., 2009; Adgeboyega et al., 2010; Lau et al., 2018; Sălan et al., 2018). Jāmin, ka pētīti arī BŠK un tās stromas šūnu autokrīnās un parakrīnās saziņas ceļi un to nozīme audzēju iniciēšanā un progresēšanā (Roma-Rodrigues et al., 2019).

Kā minēts iepriekš, ādas BŠK atkarībā no klīniskajām un morfoloģiskajām iezīmēm tiek sadalīta diferencētās un nediferencētās formās.

Diferencētas BŠK formas ietver audzējus ar ādas piedēkļu diferenciācijas pazīmēm (Carrasquillo et al., 2021): adenoīda BŠK ar diferenciāciju ādas piedēkļu – sviedru un tauku dziedzeru – struktūru virzienā; BŠK ar piloīdu diferenciāciju – ar mata folikula struktūru diferenciāciju; keratotiskā (epidermoīdā) bazalioma ar izteiktām pārragošanās pazīmēm; jaukta BŠK un basospinocelulārā karcinoma. Savukārt nediferencētās BŠK formas ietver virspusējo multicentrisku formu; sklerozējošu (morfeja tipam līdzīgu) formu; divus nodulārās BŠK formas variantus – pigmentētu un cistisku (Chung, 2012).

Starp diferencētām BŠK visizplatītākā forma ir adenoīdā tipa bazalioma ar dziedzeru diferenciāciju (Tambe et al., 2013). Šādu BŠK formu raksturo mezgli un mezgliņi ar bazaloīdu šūnu izkārtojumu; reizēm audzējā redzamas pigmenta melanīna nogulsnešanās pazīmes. Cauruļveidīgi epitēlijšūnu pavedieni bieži atgādina mežģiņu rakstus. Raksturīgi arī ar mucīnu piepildīti dažāda izmēra dobumi (Liersch, Schaller, 2014; Saxena et al., 2016; Murkey et al., 2017; Megha et al., 2018; Sethi et al., 2021).

BŠK ar tauku dziedzeru diferenciāciju nav izplatīta, tomēr šī audzēja forma bieži skar galvas un kakla rajona ādu (Save et al., 2018). Audzēja histopatoloģija ietver BŠK klasiskās pazīmes – audzēja šūnu mezglus ar bazaloīdu izkārtojumu, audu fiksācijas retrakcijas plaisas uz robežas ar stromu, neregulāras kontūras. Audzēja mezglos atrodas šūnu saliņas ar maziem tauku pilieniem to citoplazmā. Šo šūnu struktūra ir līdzīga sebocītu struktūrai. Imūnhistoķīmiski šīs BŠK mezglu šūnas uzrāda epiteliālā membrānu antigēna pozitivitāti, tomēr pastāv arī diferenciālās diagnostikas grūtības. Izmantojot imūnhistoķīmijas metodi, ir analizēta arī citu marķieru, piemēram, bcl-2 un podoplanīna (PDPN), izmantošanas lietderība (Shash et al., 2020).

BŠK ar matu folikuliem līdzīgām diferenciācijas pazīmēm tiek sauktas par bazaliomām ar piloīdu diferenciāciju (Carrasquillo et al., 2021). Klīniski šī BŠK forma neuzrāda agresīvu gaitu, izčūlojumus un infiltratīvo augšanu. Nobriedušo matu folikulu izveide šai BŠK formai nav raksturīga. Solīdos, dažreiz masīvos perēkļos nosaka pārragotas struktūras “sīpolu” formā un ragveida cistas. Šādas BŠK formas sauc arī par keratotiskām un parakeratotiskām (Misago et al., 2004). Vienlaikus jāatzīmē, ka šī BŠK forma ir samērā maz pētīta. Citu autoru pētījumos demonstrēts, ka, nosakot androgēno receptoru kā marķieri, imūnhistoķīmijas reakcijā var nošķirt šo BŠK formu no trihoepiteliomas (Carrasquillo et al., 2021). Jāpiebilst, ka nesenos

pētījumos ziņots par BŠK ar matu folikulu diferenciāciju pēc staru terapijas (Cardoso et al., 2022). Tomēr pastāv arī uzskats, ka trihoepitelioma un bazalioma ar plakanšūnu diferenciāciju ir dažādas BŠK histoloģiskās formas. BŠK ar plakanšūnu diferenciāciju var ietvert piloīdās struktūras, bet tā atšķiras no trihoepiteliomas ar lielu šūnu klātbūtni, kas līdzīgas epidermas dzeloņainā slāņa šūnām. Tās savieno labi attīstītas desmosomas. Dažās no šīm šūnām ir atrodami keratohialīna graudiņi (Webb et al., 2015). Vietās ar plakanšūnu diferenciāciju centrāli tiek konstatētas cistas ar raga slāņa zvīņām. Diferencējot šīs divas BŠK formas, ir jāizslēdz gadījumi ar cistu un ragveida masu klātbūtni, bet jāatstāj piloīdās struktūras un nenobriedušus matu folikulus ar sākotnējām stiebru veidošanās pazīmēm. Kopumā lietderīgāk būtu apvienot šīs divas formas, lai izvairītos no neskaidras terminoloģijas un nomenklatūras.

Virspusējs multicentriskais BŠK veids bieži attīstās uz ķermeņa, sejas un kakla rajona ādas. Audzēja šūnas ir mazas, ar lieliem, monomorfiem kodoliem, bieži novēro mitozes, reizēm daudzkodolainas šūnas. Šūnas veido apaļi ovālas solīdas audzēja struktūras (Chung, 2012; Vantuchova et al., 2006). Audzēja stromā tiek novērota imūnšūnu un aktīva fibroblastu reakcija.

Morfeja (*morphea*) tipa BŠK rodas solīdas bazaliomas morfoģenēzes rezultātā, šis veids diezgan bieži izcūlo. Šī ir vāji diferencēta forma ar ievērojamu dominējošo stromālo komponentu, visbiežāk lokalizējas sejas un kakla rajona ādā (East et al., 2016; Scrivener et al., 2002). Audzēja stroma bieži ir ne tikai sklerozēta, bet arī hialinizēta. Epitēlija pavedieni ir sauri, īsi vai vidēja garuma, izvietojas ķēdēs plašos stromas apgabalos, vietām savstarpēji anastomozējas. Šī BŠK forma dziļi iestiepjas dermā līdz pat hipodermai, kas palielina ļaundabīga audzēja recidivēšanas risku.

Fibroepiteliālās BŠK formas morfoloģiskā iezīme ir audzēja struktūras daudzveidība. Audzēju raksturo trabekulāras, alveolāras, retāk solīdas struktūras (Sellheyer et al., 2012). Reizēm histopatoloģiska atrade ir audzēja saliņas ar bazaloīda tipa šūnām. Tajā pašā laikā histologa praksē ir ievērojami vairāk ādas BŠK morfoloģisko variantu.

No visiem uzskaitītajiem histoloģisko formu veidiem visizplatītākā ir solīda mezglainā jeb nodulārā BŠK. Mikroskopiski to raksturo lieli audzēja mezgli (Mackiewicz-Wysocka et al., 2013). Dažos solīdos audzējos parādās dažāda izmēra cistiski dobumi, kas dod pamatu runāt par nodulāras BŠK cistisko formu. Iespējams, šī parādība ir saistīta ar audzēja distrofiskiem procesiem, kas liecina par audzēja vaskularizācijas atpalikšanu no tā proliferācijas ātruma. Bez mezglainas cistiskās BŠK formas reizēm var diagnosticēt keratotiskās formas esību ar izteiktas keratinizācijas pazīmēm mezgla centrālajā daļā, kā arī adenoīda tipa audzēja mezglus ar “porām” (Niculet et al., 2022). Solīdi laukumi prezentē mazu, nediferencētu šūnu apgabalus. Šūnas atrodas cieši blakus cita citai ar lieliem hiperhromiem kodoliem, kas aizņem gandrīz visu

šūnas citoplazmu, atstājot šauru, ne vienmēr konturētu citoplazmas malu. Noapaļotas vai neregulāras formas audzēja mezgla robežu raksturo augstas prizmatiskas bazālās šūnas, kas veido palisādi. Parasti audzēja mezgla perifērijā var noteikt plaisas, kas radušās audu retrakcijas dēļ. Dažreiz solīdo audzēju mezglu centrā kopā ar galveno mazo šūnu pamatmasu tiek reģistrēts neliels skaits noapaļotu vārpstveida un zvaigžņotas formas šūnu, kuras atdala stroma. Visbiežāk audzēja stroma ir miksoīda vai mukoīda tipa, reizēm keloīda tipa. Tajā ir kolagēnās šķiedras, retāk amiloīda fibrillas. Audzēja stroma var būt arī nedaudz tūskaina. Galvenā audzēja parenhīmas daļa atrodas dažādās dermas daļās, un daļa audzēja mezglu ir saistīti ar epidermu (Mackiewicz-Wysocka et al., 2013; Bartoš et al., 2016).

Interesantākā un retāk sastopamā BŠK histoloģiskā forma ir saliktā jeb jaukta tipa bazalioma, kurā novēro bazālā un dzeloņaina tipa šūnu proliferāciju, kas ir līdzīga plakansūnu karcinomai (Bartoš et al., 2016).

Visizplatītākie BŠK histopatoloģiskie apakštipi ir nodulāra jeb mezglaina, superficiāla, mikronodulāra, infiltratīva, adenoīda, bazoskvamoza forma, turklāt pirmie divi apakštipi ir dominējoši (Mercurt et al., 2014). Citi pētījumi par audzēja sastopamību ir parādījuši, ka nodulārais apakštips veido 40–60 % BŠK, virspusējais un pigmentētais BŠK apakštips veido attiecīgi 15–30 % un 1–2 % (Daya-Grosjean et al., 2005). BŠK progresēšana ir lēna, un tā reti metastazējas audzēja nomāktās apasiņošanas dēļ (Mercurt et al., 2014; Fernanda et al., 2017). Tomēr šis audzējs bieži uzrāda plašu destruktīvu augšanu (Omland et al., 2016). Literatūrā aprakstītie BŠK recidivēšanas rādītāji ir ļoti dažādi – no 10 līdz 67 % (Fernanda et al., Griffiths et al., 2005; Ríos-Buceta et al., 2007), savukārt reziduālo audzēju prevalence svārstās no 7 % līdz 45 % (Ríos-Buceta et al., 2007). Ir vērts atzīmēt, ka aprakstīti gadījumi, kad BŠK ne tikai spontāni progresē, bet arī regresē un izzūd (Franchimont et al., 1982; Griffiths et al., 2005; Swetter et al., 2003). Ir norādīts, ka, neskatoties uz pietiekamu progresu BŠK diagnostikā un ārstēšanā, recidivējoši, agresīvi un metastātiski audzēja varianti joprojām rada nopietnu izaicinājumu veselības aprūpes sistēmai (Lupu et al., 2016).

Ņemot vērā šādas lielas morfoloģiskās BŠK variācijas un to nozīmi kā prognostiskam faktoram, ir ļoti svarīga pareiza audzēja tipa interpretācija atbilstoši Starptautiskai histoloģiskajai klasifikācijai (The 2022 edition of ICD-10-CM C44.91), kas atainota 1.3. tabulā.

**Bazālo šūnu karcinomas Starptautiskā histoloģiskā klasifikācija
(The 2022 edition of ICD-10-CM C44.91)**

Mezglaina jeb nodulāra bazālo šūnu karcinoma (<i>nodular (solid) basal cell carcinoma</i>)	8097/3
Virspusēja bazālo šūnu karcinoma (<i>superficial basal cell carcinoma</i>)	8091/3
Mikronodulāra bazālo šūnu karcinoma (<i>micronodular basal cell carcinoma</i>)	8090/3
Infiltratīva bazālo šūnu karcinoma (<i>infiltrating basal cell carcinoma</i>)	8092/3
Sklerozējoša / morfeja tipam līdzīga bazālo šūnu karcinoma	8092/3
Bazālo šūnu karcinoma ar plakanšūnu diferenciāciju (<i>basosquamous carcinoma</i>)	8094/3
Bazālo šūnu karcinoma ar keratotisku diferenciāciju (<i>keratotic basal cell carcinoma</i>)	8090/3
Bazālo šūnu karcinoma ar adneksoidu diferenciāciju (<i>basal cell carcinoma with adnexal differentiation</i>)	8098/3
Fibroepiteliāla bazālo šūnu karcinoma (<i>pinkus fibroepitelioma, fibroepithelial basal cell carcinoma</i>)	8093/3

Latvijā tiek izmantota modificēta bazālo šūnu audzēju klasifikācija: primārā bazālo šūnu karcinoma M8090/3, multicentriskā bazālo šūnu karcinoma M8091/3, morfeja (*morphea*) tipa M8092/3 bazālo šūnu karcinoma, fibroepiteliālā M8093/3 bazālo plakanšūnu karcinoma M8094/3, metatipiskā karcinoma M8095/3.

1.8. Instrumentālo metožu nozīme bazālo šūnu karcinomas izmeklēšanā

BŠK diagnostiku bieži sarežģī fakts, ka klīniski ādas bojājums var imitēt citus labdabīgus un ļaundabīgus veidojumus. Jebkuras ādas patoloģijas diagnoze pamatojas uz šādiem kritērijiem (Peris et al., 2019):

- 1) anamnēzes dati;
- 2) fiziskās apskates (klīniskās izmeklēšanas) dati, dermatoskopiskās izmeklēšanas dati;
- 3) biopsijas materiāla vai dažos gadījumos citoloģiska audzēja materiāla histopatoloģiskās izpētes dati.

Diagnoze pamatojas uz pacienta sūdzībām un simptomiem, un to apstiprina dermatoskopiski, citoloģiski vai histoloģiski, veicot bojājuma nospieduma citoloģijas vai biopsijas analīzi. Latvijā lielākoties lieto audzēja citoloģijas un biopsijas izpēti.

Biopsijas laikā iespējams iegūt informāciju par audzēja invāzijas plašumu un dziļumu. Veidojumam, kurš rada aizdomas par BŠK, jāveic rūpīga diagnostika, lai lemtu par ekscīzijas vai citu ārstēšanas taktiku. Ādas veidojumu diagnostiku parasti veic dermatologi vai ķirurgi. Tāpat ļoti rūpīgi apskatāma āda citās ķermeņa daļās un veicama reģionālo limfmezglu palpācija, ja ir aizdomas par infiltratīvu vai bazoskvamozo karcinomu.

Pacienti ar primāru metastātisku BŠK ļoti rūpīgi jāiztaujā par iespējamiem aizdomīgiem ādas veidojumiem anamnēzē un jebkādu ādas veidojumu likvidāciju ārstniecisku vai kosmētisku iemeslu dēļ.

Jo savlaicīgāk BŠK tiek diagnosticēta, jo lielāka pacienta iespēja būt izārstētam ar labu kosmētisku efektu, kas ir ļoti svarīgi, ņemot vērā to, ka audzējs biežāk skar sejas ādu. Galvenā pazīme ir eritematozs plankums, kas nedzīst. Papildus uz tā var veidoties krevele, kas noiet un veidojas no jauna (Schwartzberg et al., 2005; Peris et al., 2019). Nodulāras BŠK parādās uz sejas, auss, galvas matainajā daļā un citur kā spīdīgs perlamutra krāsas mezgliņš ar izteiktām teleangiektāzijām (Nelson et al., 2016).

1.8.1. Bazālo šūnu karcinomas instrumentālā diagnostika

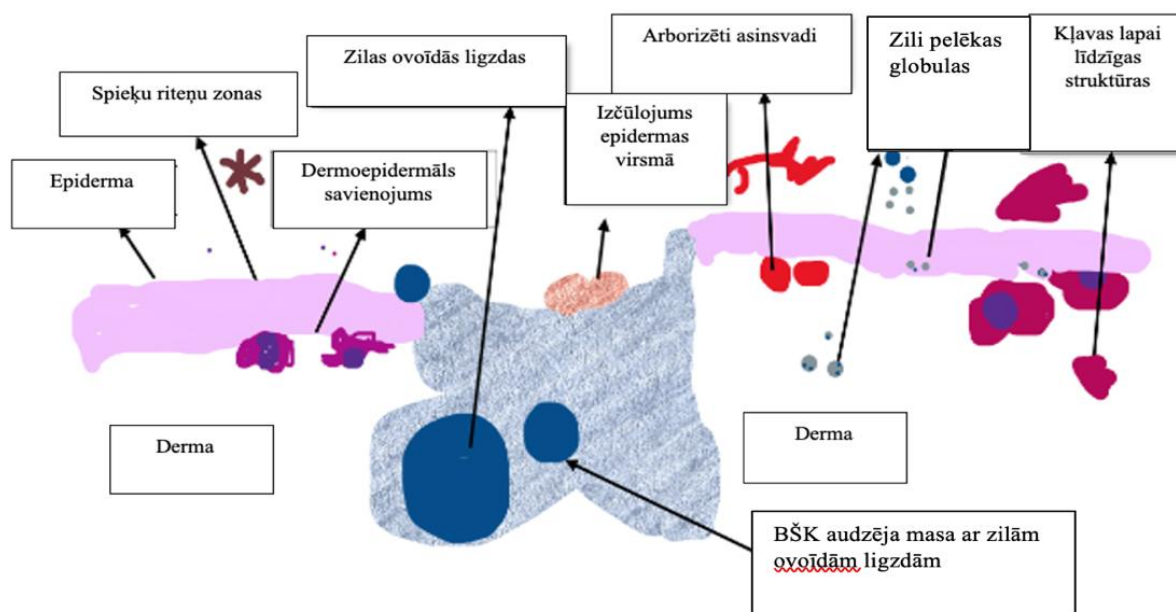
Dermatoskopija (epiluminiscentā mikroskopija) ir *in vivo* metode, kas ļauj veikt ādas veidojumu diferenciālo diagnostiku un agrīni noteikt ādas audzējus – BŠK, plakanšūnu karcinomu un melanomu, kā arī diferencēt tos no citām ādas slimībām (Lallas et al., 2015). Izmeklējums tiek veikts, balstoties uz daudzsoļu algoritmiem, un tie ir piemēroti ārstiem iesācējiem dermatoskopijas nozarē.

Dermatoskopija ir efektīva un vienkārša metode ādas vēža atklāšanai augsta riska pacientiem, kā arī pacientiem, kuriem nav sūdzību, jo ādas audzēji ilgi var palikt nepamanīti. Ādas vēža attīstības augsta riska pacientiem tiek pieskaitīti indivīdi ar ādas apdegumiem anamnēzē, multipliem pigmentētiem veidojumiem un pacienti ar iedzimtiem pigmentveidojumiem, kā arī ar diagnosticētiem audzējiem ģimenes anamnēzē.

Mūsdienās tiek lietots dermatoskopijas variants, kas derīgs gan nēvusu kartografēšanai (*mole mapping*), gan visa ķermeņa fotografēšanai, ko veic ar īpašām iekārtām – dermatoskopiem (piem., *MoleMax HD*, *Fotofinder*). Tie ļauj apvienot klīnisko informāciju ar dermatoskopisko un sekot veidojumu izmaiņām laikā (Trigoni et al., 2012).

Klīniski BŠK izpaužas atšķirīgi, un tās diferenciāldiagnoze atšķiras no nēvusa, ādas plakanšūnu karcinomas un melanomas. Lai gan histopatoloģiskā izmeklēšana joprojām ir standarta diagnostikas procedūra, tiek ieteikts izmantot uzlabotus diagnostikas instrumentus, tostarp dermatoskopiju, jo tā ir ērtāka un ātrāka diagnostiskā metode (Verduzco-Martinez et al., 2013). Dermatoskopija kļūst būtiska, izvēloties ārstēšanas metodi un novērtējot audzēja īpašības, piemēram, lokalizāciju, izmēru, sagaidāmo histopatoloģisko apakštīpu, reziduālo audzēja audu esamību, recidīva risku, robežaudus ķirurģiskās ārstēšanas laikā (El-Sayed et al., 2020; Lallas et al., 2013; Emiroglu et al., 2015; Popadić, 2014).

Dermatoskopiskie BŠK diagnostiskie kritēriji ietver arborizējošo asinsvadu klātbūtni; īsas, smalkas teleangiektāzijas; kļavas lapām līdzīgas struktūras; lielas, zilganpelēkas olveida ligzdas; baltas svītras; izčūlojumu; vairākas nelielas erozijas; spīdīgus, baltus laukumus; fokusētus punktus; pienaini rozīgus līdz sarkanīgus laukumus; riteņu spieķu zonas un vairākus zili pelēkus punktiņus un lodītes (Popadić, 2014; Puig et al., 2012; Lallas et al., 2013; Wozniak-Rito et al., 2018). Biežākās struktūras parādītas shematiski izveidotajā 1.2. attēlā.



1.2. attēls. BŠK galvenie dermatoskopiskie kritēriji

Shēma ataino galvenos BŠK dermatoskopiskus kritērijus, kas veido pamatu šī audzēja klīniskajai diagnostikai.

Latvijā ir pieejama arī konfokālā lāzerskenējošā mikroskopija, kas ļauj *in vivo* iegūt natīvu ādas rajona attēlu un noteikt izmaiņas šūnu līmenī. Tāpat kā, veicot datortomogrāfiju, tiek izdalīti atsevišķi horizontāli slāņi dažādos ādas līmeņos (Peppelman et al., 2016). Šī metode reizēm var aizstāt biopsijas nepieciešamību.

Optiskās koherences tomogrāfija uzrāda daudzsoļus rezultātus un sniedz ādas audzēja dziļās robežas novērtējumu, bet šīs tehnoloģijas diferencēšanas spēja pirmsvēža stāvokļiem no ļaundabīgiem procesiem izrādījās mazāk efektīva (Holmes et al., 2018).

Fluorescences spektroskopija izrādījās efektīva, pamatojoties uz bioķīmisko audu sastāva analīzi. Šī metode ļauj agrīni atklāt ļaundabīgu audzēju, bet tā robežas novērtējuma un diferenciālās diagnozes starp ļaundabīgu un labdabīgu veidojumu rezultāti ir pretrunīgi (Andreeva et al., 2021). Strukturālās audu īpašības var noteikt, izmantojot difūzās atstarošanas spektrometrijas metodi, specifiskums un jutība ar šo metodi attiecīgi ir 72–92 % un 64–92 % robežās. Līdz ar šo metožu parādīšanos ādas vēža diagnostika ir agrīnāka un precīzāka, bet galīgo diagnozi var noteikt tikai pēc tam, kad veikta histoloģiskā izmeklēšana.

1.8.2. Bazālo šūnu karcinomas attēldiagnostikas metodes

Krūškurvja rentgenizmeklēšana, ultrasonogrāfija, datortomogrāfija, kodolmagnētiskā rezonanse vai pozitronu emisijas tomogrāfija indicētu distālo metastāžu noteikšanai multiplas BŠK sindroma gadījumā, piemēram, Gorlina-Golca (*Gorlin-Goltz*) sindroma gadījumā, kā arī BŠK ar plakanšūnu metaplāziju un dziļu audu destrūkciju (Gupta et al., 2020). Šajā gadījumā BŠK diagnostika lielākoties aprobežojas ar ultrasonogrāfiju skartās zonas limfmezgliem. Smadzeņu datortomogrāfija vai kodolmagnētiskā rezonanse veicama pacientiem ar metastātisku BŠK un jebkādiem simptomiem, kas norāda uz centrālās nervu sistēmas iesaisti patoloģiskajā procesā. Šis izmeklējums iekļaujams arī sākotnējā izmeklēšanas plānā pacientiem ar galvas matainās daļas BŠK III un IV stadijā.

1.8.3. Bazālo šūnu karcinomas biopsija un indikācijas to veikšanai

Biopsijas veikšana BŠK gadījumā ir ārkārtīgi strīdīgs jautājums, no otras puses, tā pieļaujama ādas audzēju gadījumā, ja bez tās nevar noteikt pareizu diagnozi (Haws et al., 2012). Tomēr jebkurā ādas vēža gadījumā priekšroka ir pilnīgai ekscīzijas biopsijai.

Aizdomīgu ādas veidojumu biopsija jāveic pareizi. Tiem nedrīkst veikt kriodestrukciju, elektroekscīziju, kiretāžu vai apstrādāt ar destruktīviem lāzeriem. Nepareiza materiāla paņemšana vai ārstēšana bez pierādītas diagnozes var sekmēt agresīvu audzēja invazīvu augšanu, transformāciju un metastazēšanu. Ja ir iespējams, ekscīzijas biopsija jāveic ar vismaz 2–4 mm atkāpi perifēriski veselos audos un ar 4 mm atkāpi dziļumā taukaudos. BŠK gadījumā nav nepieciešams veikt ekscīziju līdz piegulošajai fascijai, kā tas rekomendēts melanomas gadījumā. Taču, ja klīniski, dermatoskopiski vai citoloģiski ir aizdomas par agresīvu BŠK, veidojumu ir rekomendēts ekscidēt pēc melanomas ķirurģiskās ārstēšanas vadlīnijām. Tā reizē būs diagnostiska un terapeitiska manipulācija (Wolberink et al., 2013; Aldana et al., 2019). Ja pastāv šaubas par veidojuma dabu vai arī pilna apmēra ekscīzijas biopsija nav iespējama, var veikt pilna dziļuma incīzijas vai *punch* biopsiju.

Incīzijas biopsija pieļaujama lieliem veidojumiem uz sejas, plaukstām vai pēdām, taču audu parauga dziļumam ir būtiska nozīme BŠK stadijas precizēšanai (Quazi et al., 2020). Nav pierādīts, ka incīzijas biopsija un lokālā anestēzija veicinātu jebkāda ādas audzēja disemināciju un agresīvāku uzvedību, taču jāņem vērā, ka biopsiju parasti veic visbiezākajā vai vistumšākajā pigmentveidojuma daļā, kā, piemēram, pigmentēto BŠK gadījumā.

Perforācijas jeb *punch* biopsija piemērojama ļoti mazu veidojumu pilnīgai izņemšanai un materiāla iegūšanai no liela veidojuma aizdomīgākajām vietām (Aldana et al., 2019). Šajā gadījumā biopsijas materiālu analizē patologs ar pieredzi ādas audzēju diagnostikā. Patologa

slēdzienā atbilstoši AAVK klasifikācijai jāiekļauj klīniski morfoloģiskais apakštips, audzēja izmēri, audzēja klīnisko robežu raksturojums, kā arī anatomiskā lokalizācija (Amin et al., 2017).

1.9. Bazālo šūnu karcinomas ārstēšana

Pēdējos 50 gados ādas audzēju ārstēšana ir ļoti mainījies sakarā ar padziļinātiem pētījumiem onkoloģijā. Viens no svarīgākajiem aspektiem sekmīgai ārstēšanai ir agrīna primārā audzēja ekscīzija 4–6 nedēļu laikā kopš diagnosticēšanas brīža un limfmezglu (sargmezgla) ultrasonogrāfiskā izmeklēšana, ja tāda ir nepieciešama (Peters et al., 2020). Precīza slimības stadijas un BŠK tipa noteikšana, ievērojot visas patologa norādes, ir būtiska terapijas tālākajai plānošanai.

Ārstēšanas plāns visiem pacientiem pēc nepieciešamības apspriežams multidisciplinārā ārstu konsīlijā ar ķirurga, mutes, sejas un žokļu ķirurga, onkologa ķīmijterapeita, radiologa terapeita, patologa, dermatologa un / vai citu speciālistu dalību. Terapijas pamatā ir veidojuma ekscīzija ar atkāpi veselu audu robežās, limfmezglu (sargmezglu) ultrasonogrāfija vai biopsija, ja tāda ir nepieciešama, un adjuvanta terapija atkarībā no slimības stadijas (Casey et al., 2021; Fecher, 2013).

Metastātiskā BŠK uzskatāma par neizārstējamu slimību, taču ar molekulāru mērķterapiju, imūnterapiju, fotodinamisku terapiju un ķīmijterapiju iespējams ļoti būtisks dzīvildzes pagarinājums un pacientu dzīves kvalitātes uzlabojums. Pacientiem ar BŠK anamnēzē turpmāk veicama ļoti rūpīga kontrole, lai agrīni novērstu iespējamu slimības recidīvu vai jauna audzēja attīstību (Fecher, 2013).

Ārstēšanās laikā var parādīties lietotās lokālās, ķirurģiskās, staru un ķīmijterapijas vēlīnās izpausmes – BŠK recidīvs, deformējošu rētaudu veidošanās, neirokognitīvs deficīts, kaulu destrukcija, staru dermatīts, sekundāro audzēju attīstība. BŠK pacientiem ir obligāta stingra radioloģiska kontrole. Atkarībā no recidīva riska un metastazēšanās iespējamības var modificēt novērošanas režīmu. Slimības gaitas prognozēšanai vērā ņemami vairāki faktori: anatomiskie (audzēja lokalizācija, tā invāzijas pakāpe, blakus struktūru iesaistīšanās), histoloģiskie (audzēja anaplāzijas pakāpe, sarkomatozu komponentu esamība), klīniskie (limfmezglu iesaiste).

1.9.1. Bazālo šūnu karcinomas ķirurģiskā ārstēšana

Mūsdienās ir iespējams ārstēt BŠK ar 5-fluoruracilu, lietojot imikvimodu, CO₂ lāzeru, kiretāžu, krioterapiju, fotodinamisko terapiju, staru terapiju un ķirurģijas metodes, ieskaitot mikrogrāfisko ķirurģiju (Goldenberg et al., 2013; Clark et al., 2014; Villani et al., 2022).

Latvijā ķirurģiskā ārstēšana tiek izmantota kā rutīnas metode radikālai ādas audzēju ārstēšanai. Ilgstoši tika lietota plaša ekscīzija ar lielu atkāpi veselo audu robežās, bet pēdējos gados, pamatojoties uz randomizēto pētījumu ieteikumiem, atkāpe veselos audos ir krietni samazinājusies par labu orgānu saudzējošām operācijām (Mutimer et al., 2021). Pierādīts, ka BŠK turpmāko gaitu pēc primārā perēkļa ekscīzijas nenosaka ekscīzijas plašums, bet tā ir atkarīga no audzēja invāzijas dziļuma ādā un tā morfoloģijas. Audzēju ekscidē kopā ar blakus esošo veselo audu daļu ar noteiktu atkāpi tajos (Mutimer et al., 2021).

Atkarībā no audzēja stadijas un audzēja izmēra, konstatējot agresīvas bazaliomas ar plašu destrukcijas virsmu un lielu dziļumu, ekscidē arī zemādas audus ar muskuļu šķiedrām un / vai fasciju šķiedrām. Ja attīstās reziduāls audzējs vai griezuma līnijās atrastas vēža šūnas, reekscīzija veicama plašākā apmērā, lai nodrošinātu pilnīgu audzēja izņemšanu veselu audu robežās. Nepieciešamības gadījumā brūci slēdz ar ādas lēveri vai izmantojot citu plastiskās ķirurģijas metodes.

Operācijas efektivitāte ir atkarīga no ķirurga pieredzes un dažādiem citiem faktoriem – audzēja lokalizācijas, pirmreizējā audzēja izplatības, tā slimības gaitas, invāzijas dziļuma vai infiltrācijas, reģionālo metastāžu esamības un izplatības, iepriekš veiktās operatīvās darbības un staru terapijas, kā arī audzēja histoloģiskās formas. Tāpēc pirms operācijas svarīgi noteikt prognostiskos faktorus un metastazēšanas risku. Ap 40 % pacientu, kam bija ārstēta BŠK anamnēzē, piecu gadu laikā tika novērots slimības recidīvs citā lokalizācijā, savukārt 21–41 % recidīvs tika diagnosticēts iepriekšējās BŠK ekscīzijas rajonā ar parādīšanos jau divu gadu laikā pēc primārās audzēja ekscīzijas (Blixt et al., 2013; Costantino et al., 2006; de Silva et al., 1985; Silverman et al., 1992).

Recidivēšanās prognozē svarīga nozīme ir iepriekš lietotai terapijai. Ārvalstīs galvas un kakla rajona bazaliomām plaši izmanto mikrogrāfisko ķirurģiju, taču Latvijā to nelieto lielo izmaksu un apmācītu speciālistu trūkuma dēļ. Šī metode ļauj maksimāli saglabāt veselus audus ap bojāto rajonu un pilnīgi izgriezt audzēju (Mosterd et al., 2008). Efektivitātes ziņā mikrogrāfiskā ķirurģija ir labāka par ķirurģisku ekscīziju veselu audu robežās ar noteiktu atkāpi (Narayanan et al., 2014). Bolingezs (Boulinguez et al., 2004) ziņoja, ka 24 % gadījumu nepilnīgi izņemti audzēja audi, lietojot BŠK ķirurģisku ekscīziju veselu audu robežās, kļuvuši

agresīvāki un recidivē. Savukārt audzēja pilnīgas ekscīzijas gadījumā ar tīrām rezekcijas līnijām BŠK recidīvs ir vērojams tikai 10 % gadījumu (Walker et al., 2006).

Mikrogrāfiskās ķirurģijas gadījumā ar tūlītēju audu izpēti mikroskopā ārstēšanas efektivitāte pieaug no 93,5 % līdz 100 % (Leibovitch et al., 2005; Malhotra et al., 2004). Vērtējot ķirurģiskās manipulācijas galvas un kakla rajonā, jāatzīmē arī estētiskais efekts (Petit et al., 2000; Smith et al., 2011). Pēc izmēra mazām, nodulārām un pigmentētām BŠK, pēc literatūras datiem, rekomendējamā atkāpe ir 4–5 mm, kas 95 % gadījumu garantē recidīva iztrūkumu piecu gadu laikā, savukārt pie 3 mm atkāpes – tikai 85 %. BŠK, kas lielāka par 2 cm, sklerotizējoša tipa, vai audzēja recidīva gadījumā ir jāoperē ar 10–15 mm lielu atkāpi veselu audu robežās, kas, ņemot vērā anatomiskās un estētiskās īpatnības, ir grūti izpildāms galvas un kakla rajonā (Wilson et al., 2004; Kimyai-Asadi et al., 2007; Griffiths et al., 2007). Ja attālums no audzēja malas līdz griezuma līnijai ir minimāls (4 mm), pētījumos ir konstatēta līdz 5 % reziduālu audzēju attīstība (Quazi et al., 2020; Mutimer et al., 2021). Ir pierādīts, ka agresīvi augošu audzēju gadījumā (infiltratīva s. morfeja tipa vai mikronodulāra forma) bieži ir veikta nepilna ekscīzija – vidēji trīs reizes biežāk nekā virspusējās vai nodulāras formas gadījumā (Miszczyk et al., 2017; Luz et al., 2015). Ja primāriem infiltratīviem audzējiem ir veikta ekscīzija ar 3 mm atkāpi, konstatēts, ka tīras rezekcijas līnijas ir bijušas tikai 66 % pacientu, 5 mm atkāpes gadījumā – 82 % pacientu, bet tikai 13–15 mm atkāpes gadījumā tīras rezekcijas līnijas bijušas vairāk nekā 95 % pacientu (Ramdas et al., 2018; Quazi et al., 2020; Mutimer et al., 2021). Operācijas efektivitātes rādītājs ir 82 %, atkāpjoties 5 mm sklerotizējošas BŠK ķirurģiskās ekscīzijas laikā (Ramdas et al., 2018; Cole et al., 2019; Miszczyk et al., 2017; Luz et al., 2015). Turklāt BŠK operācijas galvas un kakla rajonā bieži pavada turpmākas plastiskās ķirurģiskās operācijas, rotēta lēvera lietojums un lielas izmaksas.

Izvēloties ķirurģisku vai citu terapijas metodi, pamatā ir jānovērtē tās iespēja mazināt lokāla recidīva risku. Lielākā daļa metožu ir piemērojama maziem veidojumiem (nodulārās, pigmentētās, virspusējās BŠK) zema riska zonās. Lielām, recidivējošām, izčūlojušām vai infiltrējoši augošām BŠK pastāv lielāks recidīva risks, tādēļ arī terapija būs daudz agresīvāka un var radīt veselības risku, kā arī nopietnu estētisku defektu.

1.9.2. Bazālo šūnu karcinomas staru terapija

Apstarošana piemērota BŠK pacientiem, kuriem nav iespējams veikt ķirurģisku ārstēšanu, kā arī paliatīvos nolūkos pacientiem ar plašiem neoperējamiem veidojumiem. Tā ir otrā biežākā terapijas metode pēc ķirurģiskas ekscīzijas (Cognetta et al., 2012). Metode ir kontrindicēta pacientiem ar *xeroderma pigmentosum*, sistēmiskām saistaudu slimībām

(sklerodermija) un bazālo šūnu nēvusu (Gorlina-Golca sindromu), jo tā var veicināt jaunu audzēju attīstību apstarošanas zonā. Piecgadu izārstēšanas biežums BŠK pacientiem, kuriem tika lietota staru terapija, ir > 90 % (Nestor et al., 2019).

Šai metodei parasti ir sliktāks kosmētiskais efekts un arī brūce dzīst lēnāk. Kā biežākās komplikācijas minams staru dermatīts, sāpes un iekaisums starojuma zonā, nieze, alopēcija galvas matainajā daļā, depigmentācija, teleangiektāzijas, ādas atrofija vai pat staru izraisīta nekroze (Skiveren et al., 2012). To nedrīkst lietot tuvu acu zonai, ļoti piesardzīgiem jābūt deguna un auss rajonā, jo var izraisīt skrimšļa sabrukumu. Staru terapija var palielināt sekundāras BŠK, citu nemelanomas ādas audzēju un sarkomu risku (Watt et al., 2012). Radiologi veic apstarošanu dažādos režīmos, kā, piemēram, audzējam, kas ir mazāks par 2 cm diametrā, ordinē 45 Gy 15 frakcijās 3 nedēļu laikā, bet audzējiem, kas lielāki par 2 cm diametrā, attiecīgi 54 Gy 18 frakcijās 3,3 nedēļās (Cognetta et al., 2012; Skiveren et al., 2012). BŠK apstarošanā biežāk tiek izmantota tuvfokusa rentģenoterapija, bet, ja audzēja biezums ir lielāks par 1 cm, tad distances staru terapija ar ātriem elektroniem vai fotoniem lineārā paātrinātājā. Metode ir dārgāka par parasto ķirurģisko ekscīziju, turklāt prasa īpašu aprīkojumu (Nestor et al., 2019). Apstarošanu veic tikai sertificēts radiologs terapeits.

Randomizēts kontrolēts pētījums parādīja, ka, salīdzinot ķirurģisku ekscīziju ar apstarošanu 347 pacientiem ar sejas BŠK < 4 cm diametrā, ķirurģiskās operācijas efekts pēc četriem gadiem bija ticami labāks nekā pēc apstarošanas (Avril et al., 1997).

1.9.3. Bazālo šūnu karcinomas lokāla medikamentozā terapija

Fluoruracils

Fluoruracilu (5-fluoruracils) lieto virspusējas BŠK ārstēšanai, ja citas metodes nav piemērotas (multipli veidojumi, grūti pieejamas lokalizācijas) (Naik et al., 2016). Lietojot šo medikamentu, 5 % krēmu nelielā daudzumā uzklāj bojātajām vietām divas reizes dienā. Terapijas ilgums ir no 6 līdz 12 nedēļām. Kontrindikācijas šai topiskajai terapijai ir kaulu smadzeņu nomākums, infekcijas, malnutrīcija, grūtniecība, dihidropirimidīna dehidrogenāzes nepietiekamība.

Imikvimods

Imikvimodu (*Imiquimod*) lieto primāru virspusēji augošu (morfoloģiski pierādītu) BŠK ārstēšanai pacientiem ar imūnsistēmas nomākumu, audzēju, ne lielāku par 2 cm diametrā, ārstēšanai ja nav iespējams lietot ķirurģisko ārstēšanas metodi vai arī pacients atsakās no operācijas (Singal et al., 2016). Imikvimods ir *Toll* receptora-7 agonists, kas inducē citokīnu

izdali, tā iedarbojoties uz BŠK šūnām. 2004. gadā ASV Pārtikas un zāļu pārvalde (ASV PZP) to rekomendēja lokālai terapijai virspusēju BŠK ārstēšanai pacientiem ar nomāktu imunitāti, kā arī veidojumiem, kas nav lielāki par 2 cm un atrodas uz rumpja, kakla vai ekstremitātēm, izņemot plaukstu un pēdas ādu (Bubna, 2015). Pētījumos novērots, ka BŠK prognozējamais piecgadu izārstēšanas biežums, vērtējot ar Kaplāna Meijera metodi, bija 86 % (Vidal et al., 2007). BŠK pacientiem 5 % krēmu nelielā daudzumā klāj uz bojātā ādas rajona ar atkāpi 1 cm pa perimetru piecas reizes nedēļā, pēc aplikācijas to nenotīrot un nenomazgājot vismaz astoņas stundas. Ārstēšanas kurss parasti ir sešas nedēļas.

Fotodinamiskā terapija

Metodes pamatā ir gaismas inducēta audzēja šūnu bojāeja iepriekš fotosensibilizētā vietā. Tai ir ļoti labs kosmētiskais efekts, taču izārstēšanas potenciāls ir ievērojami zemāks (70–90 %) nekā citām BŠK ārstēšanas metodēm (Collier et al., 2020). Audu fotosensitivizēšanai pamatā lieto divus savienojumus – 5-aminolevulīnskābi (5-ALS) un metilaminolevulinātu (MAL). Latvijā šī metode vairs netiek izmantota lielo izmaksu dēļ (Matei et al., 2013).

Tomēr jāatzīmē, ka Britu Dermatologu asociācija uzskata, ka topiskā MAL un 5-ALS fotodinamiskā terapija ir efektīva metode virspusējas BŠK ārstēšanai, tai piešķirot rekomendāciju pakāpi (Morton et al., 2008). Metode lietota arī plašāk izplatītu nodulāru audzēju gadījumos vai audzēju lokalizācijās, kur ir apgrūtināta ķirurģiska ekscīzija, piemēram, acs plakstiņš vai degungals.

1.9.4. Bazālo šūnu karcinomas sistēmiskā terapija

Ķīmijterapija

Līdzšinējie pētījumi par lokāli izplatītas vai metastātiskas bazaliomas terapiju ar metotreksātu, bleomicīnu, vinkristīnu, 5-fluoruracils, ciklofosfamīdu, daktinomicīnu vai toijomicīnu pārliecinošu efektivitāti neuzrādīja (Basset-Seguin et al., 2018). Pacientiem ar metastātisku vai recidivējošu bazaliomu, kam ķirurģija vai apstarošana vairs nav piemērojama, rekomendē mērķterapiju (Poggi et al., 2013).

Mērķterapija

Jaunākās paaudzes terapijas pamatā ir mērķterapija, kas iedarbojas selektīvāk. Tie ir medikamenti, kas iznīcina vēža šūnas, bloķējot to augšanu. Kombinētās shēmas dod lielāku efektivitātes procentu, tāpēc onkoloģiskie pacienti, saņemot mūsdienīgu terapiju, var dzīvot ilgāk un ar labāku kvalitāti (Poggi et al., 2013).

SHh signālceļam ir izšķiroša nozīme audzēja šūnu attīstībā un augšanā. Cilvēkiem SHh visaktīvākais ir embrionālā periodā, bet *Hedgehog* proteīni iesaistīti arī dažādu ļaundabīgo audzēju ģenēzē (Caro et al., 2010). Mutācijas šos procesus nodrošinošos gēnos pacientiem ar BŠK atrodamas 90 % gadījumu (Evangelista et al., 2006). Pamatojoties uz viena starptautiska daudzcentru nerandomizēta II fāzes klīniskā pētījuma rezultātiem, ASV PZP atļāva vismodegibu (*vismodegib*) lietot izplatītas (lokālas un distālas) BŠK ārstēšanai, jo pozitīvais guvums tika novērots 94 % pacientu ar metastātisku un 81 % – ar lokāli izplatītu BŠK (Tong et al., 2022). Vismodegibu lieto pa 150 mg perorāli. Ja parādās mokošas blaknes (muskuļu krampji, alopēcija, pieņemšanās svarā vai nogurums), terapiju var uz laiku pārtraukt un pēc tam atkal atsākt (Poggi et al., 2013). Tā kā zemākas devas nav pētījumos pārbaudītas, tad devu samazināšana pagaidām netiek rekomendēta.

2. Materiāli un metodes

2.1. Mērķpopulācija un bazālo šūnu karcinomas pacientu atlases kritēriji

Šis pētījums tika plānots un veikts kā prospektīvs pētījums laikā. Pētījumā tika rekrutēti 79 pacienti ar aizdomām par galvas un kakla BŠK, kas prospektīvi ārstēti Rīgas Stradiņa universitātes Stomatoloģijas institūtā, Mutes, sejas un žokļu ķirurģijas nodaļā, un Latvijas Onkoloģijas centrā no 2016. gada septembra līdz 2019. gada septembrim. Pētāmo pacientu grupas vecuma diapazons bija no 32 līdz 95 gadiem. Pacientu ādas tipi tika novērtēti saskaņā ar Ficpatrika klasifikācijas skalu (Fitzpatrick, 1988). No visiem BŠK pacientiem 46 bija sievietes un 33 vīrieši. Klīniskie dati ietvēra informāciju par pacientu dzimumu un vecumu, klīnisko ainu, dermatoskopiskās izmeklēšanas rezultātiem, D vitamīna līmeni asins serumā. Audzēja raksturojums ietvēra informāciju par BŠK ādas bojājuma ilgumu, veidu apskates laikā, anatomisko lokalizāciju un audzēja izmēru. BŠK pacientiem ar D vitamīna deficītu tika nozīmēta D vitamīna terapija atkarībā no tā deficīta smaguma pakāpes. Slimības recidīvs tika novērots divu gadu laikā pēcoperācijas novērošanas periodā.

Svarīgākie pacientu iekļaušanas kritēriji bija dermatoskopiski un histoloģiski apstiprināta primāra vai recidivējoša ādas BŠK ar noteiktu audzēja morfoloģisko variantu. Šajā pētījumā tika izmantotas tikai pilnībā izgrieztas primāras un recidivējošas BŠK ar 10 mm atkāpi veselos audos. Sešdesmit viens gadījums no 79 (77,2 %) bija primārie audzēji, savukārt 18 (22,8 %) – recidivējošas BŠK. Divdesmit deviņiem pacientiem histoloģiski tika diagnosticēta jauktā tipa BŠK, no tiem 18 vīriešiem un 11 sievietēm. Recidivējoša BŠK septiņos (38,9 %) gadījumos attīstījās no ķirurģiski izņemtiem primārajiem audzējiem, kas iegūti konkrētā pētījuma ietvaros. Pacienti ar recidīvu sešu mēnešu līdz divu gadu laikā tika pakļauti atkārtotai ārstēšanai. Vienpadsmit (61,1 %) pacientiem pēc mazāk invazīvu ārstēšanas metožu izmantošanas attīstījās BŠK recidīvs. Šīs izmantotās un reģistrētās mazāk invazīvās ārstēšanas metodes bija attiecīgi krioterapija – 6, CO₂ lāzerterapija – 3, lokālais imūnās atbildes modifikators – imikvimoda krēms – 2 gadījumi. Astoņiem pacientiem tika diagnosticēta nodulāra tipa BŠK, vienam – virspusēja, diviem – bazoskvamozā karcinoma.

Pētījumu apstiprināja Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komiteja (lēmums Nr. 11/08.09.2016.), kā arī tika saņemta rakstiska informēta piekrišana no visiem pētījumā iekļautajiem pacientiem. Audzēja audu paraugi tika iegūti, ievērojot Helsinku deklarācijas principus.

Visos gadījumos, kad tika apstiprināta BŠK, tās dažādie veidi tika izdalīti atbilstoši starptautiskajai klasifikācijai. Jaunākajā Pasaules Veselības Organizācijas (PVO) ādas audzēju klasifikācijā paredzēts, ka BŠK tiek iedalīta divos veidos, pamatojoties uz sarežģīto gaitu,

recidīva attīstības risku un ieteicamo turpmāko ārstēšanu: 1. zemāka riska audzēji – nodulārs, virspusējs, pigmentēts un infundibulocistisks (BŠK variants ar papildu diferenciaciju), fibroepiteliāls; 2. augstāka riska audzēji – bazoskvamozā karcinoma, sklerozējoša / morfeja, infiltrējoša, BŠK ar sarkomatoīdu diferenciaciju un mikronodulāra (Elder et al., 2018).

2.2. Laboratoriska D vitamīna līmeņa noteikšana asins serumā

Asins paraugi D vitamīna līmeņa noteikšanai tika prospektīvi paņemti no visiem BŠK pacientiem un nodoti sertificētajai E. Gulbja laboratorijai (LATAK akreditācija ISO 15189). Kopējais D vitamīna līmenis asins serumā tika noteikts, izmantojot hemiluminiscences metodi ar *Cobas 800* analizatora palīdzību (*Roche*, Šveice) (Garnett et al., 2019; Vandikas et al., 2022; Enko et al., 2014).

2.3. Dermatoskopiskā bazālo šūnu karcinomas diagnostika, tās novērtēšanas kritēriji

Dermatoskopiskā izmeklēšana tika veikta ar manuālo rokas dermatoskopu (*3Gen DermLite DL3N ar Pigmentboost; Olympus, ASV*), izmantojot 30 mm × 10 objektīvu pirms audzēja masas ekscīzijas. Lai vizualizētu BŠK bojājumus, tika izmantotas gan kontakta, gan bezkontakta metodes polarizētās gaismas režīmā. BŠK bojājuma dermatoskopiskās prezentācijas digitālā fotografēšana tika veikta, izmantojot *Samsung Galaxy S9+* (*Samsung Electronics, Koreja, Seula*) mobilo kameru. BŠK diagnoze tika noteikta pēc vairāku autoru rekomendācijām (Trigoni et al., 2012; Wozniak-Rito et al., 2018; Lupu et al., 2019; Popadić, 2014; Puig et al., 2012; Lallas et al., 2013), pamatojoties uz šādiem dermatoskopiskiem kritērijiem: arborizēti asinsvadi un īsas, smalkas teleangiektāzijas, kļavas lapām līdzīgas struktūras, zili pelēkas lodītes, zilas olveida ligzdas, riteņu spieķu struktūras, erozijas, izčūlojums. Turklāt, apstiprinot BŠK klātbūtni, promocijas darba autore ieviesusi vēl šādus kritērijus: veidojuma caurspīdīgums, balti laukumi un pienaini rozīgs vai sarkans fons (Moisejenko-Golubovica et al., 2021). Fona atšķirības starp balti sarkanām krāsām, kas novērotas bojājumu vietās, pēc Enakes ieteikuma, noteiktas kā balti sarkanas bezstruktūras zonas (Enache et al., 2019).

Datu apstrādei tika izmantots diagnosticēto dermatoskopisko pazīmju puskvantitatīvs novērtējums (Argenziano, 2007; Zalaudek, 2010; de Vita et al., 2012; Okuboyejo et al., 2018). Dermatoskopijas laikā izmaiņas tika klasificētas šādi: vāja – $\leq 25\%$, mērena – 26–70% un izteikta vizualizācija – $> 70\%$.

2.4. Histopatoloģijas metodes

BŠK audu gabaliņi tika fiksēti formalinā, tad skaloti, atūdeņoti pieaugošas koncentrācijas etilspirtā un ieguldīti parafinā. No parafina blokos ielietā audzēja audu materiāla ar mikrotomu pagatavoti 4–5 μm biezi griezumumi un pārnesti uz *HistoBond+* priekšmetstikliņiem (*Marienfeld, Lauda-Königshofen, Vācija*). Pēc tam griezumumi tika žāvēti istabas temperatūrā, deparafinēti, rehidrēti un krāsoti ar hematoksilīnu un eozīnu, lai apstiprinātu BŠK diagnozi. Audzēja histopatoloģiju novērtēja, ievērojot Pasaules Veselības organizācijas BŠK klasifikācijas sistēmu.

2.5. Imūnhistoķīmiskās metodes

Imūnhistoķīmiskās reakcijas tika veiktas, izmantojot deparafinizētus un tradicionāli apstrādātus parafina griezumus. Endogēnās peroksidāzes bloķēšanas process tika veikts 0,3 % (v/v) H₂O₂ saturošā metilspirta šķīdumā, griezumus izturot 20 minūtes. Siltuma izraisīta antigēna epitopa demaskēšana un pastiprināšana veikta, griezumus ievietojot 10 mM nātrija citrāta buferšķīdumā uz 15 minūtēm 100 grādos mikroviļņu krāsnī. Audu antigēni tika noteikti, izmantojot primāro antivielu paneli: monoklonālo peles antivielu pret cilvēka α-gludo muskuļu aktīnu (*Abcam, Kembridža, MA, ASV, klons 1A4, 1:200*), kura iezīmē šūnas, kas ekspresē gludo miocītu fenotipu (Wu et al., 2018); monoklonālo peles antivielu pret cilvēka podaplanīnu (*Abcam, Kembridža, MA, ASV, klons PDPN/1433, 1:200*), kas ekspresējas reaktīvajās mezotēlijā šūnās un limfvadu endotēlijā šūnās un regulē šūnu migrāciju un audzēja invāziju *in vivo* un *in vitro* (Kimura et al., 2005; Wicki et al., 2006); monoklonālo peles antivielu pret cilvēka IV tipa kolagēnu (*Dako Denmark A/S, Glostrup, Dānija, klons CIV 22, 1:25*), kas iezīmē bazālās membrānas *lamina densa* (Lammers et al., 2011); monoklonālo peles antivielu pret cilvēka laminīnu (*Dako Denmark A/S, Glostrup, Dānija, klons 4C7, 1:20*), kas reaģē ar epidermas bazālās membrānas laminīnu saimes glikoproteīniem (Wondimu et al., 2013); poliklonālo truša antivielu pret cilvēka DVP (*Bioss Antibodies, MA, ASV, 1:300*), kas nosaka endogēnos DVP proteīnus (Simpson et al., 2015); un monoklonālo truša antivielu pret cilvēka *Sonic Hedgehog* (*Abcam, Kembridža, MA, ASV, klons EP1190Y, 1:200*), kas atpazīst cilvēka SHh proteīna pilna garuma molekulu un c-produkta apakšvienību (McCann et al., 2011; Kaminagakura et al., 2013).

Inkubācija ar primārajām antivielām tika veikta, 4 °C griezumus turot 12 stundas un ievērojot ražotāja ieteikumus. Primāro antivielu amplifikācija un reakcijas produktu vizualizācija tika veikta, izmantojot *HiDef Detection HRP Polymer* sistēmu (*CellMarque, Rocklin, CA, ASV*). Pēc primārās inkubācijas un skalošanas fosfātu buferšķīdumā griezumumi tika

inkubēti ar HRP polimēru (*labeled polymer*-HRP) 30 minūtes istabas temperatūrā un ar HiDef *Detection*TM *Amplifier* 10 minūtes istabas temperatūrā, tad atkārtoti skaloti ar fosfātu šķīdumu un inkubēti ar HiDef *Detection*TM *HRP Polymer Detector* 10 minūtes istabas temperatūrā. Pēc tam veikta skalošana ar tris(hidroksimetil)aminometāna bufera šķīdumu. Visbeidzot audu antigēni tika vizualizēti ar 3, 30 diaminobenzidīna (DAB) tetrahidrohlorīda komplektu (*UltraMarque*TM *HRP Detection system, Cell Marque, Rocklin, CA, ASV*), to uzklājot uz 5 minūtēm. Noslēgumā griezumā tika krāsoti ar Meijera (*Mayer*) hematoksilīnu, skaloti, dehidrēti, ieslēgti ieslēgšanas vidē *Roti*[®] *Histokitt* (*Carl Roth, Karlsruhe, Vācija*) un pārklāti ar segstikliņu. *α*-GMA imūnmarķēšana tika noteikta šūnu citoplazmā kā brūns krāsojums. Pozitīvs PDPN tika noteikts kā brūns krāsojums limfvadu endotēlija šūnās. IV tipa kolagēna un laminīna imūnkrāsošana tika noteikta epitēlija BM un uzrādīja lineāru (nepārtrauktu un pārtrauktu) zīmējumu. Pozitīvu SHh imūnreakciju raksturoja brūns membrānas vai membrānas / citoplazmas krāsojums, savukārt DVP – citoplazmas krāsojums. Primārās antivielas aizstāšana ar tris(hidroksimetil)aminometāna šķīdumu tika izmantota negatīvās imūnhistoķīmiskajās (IHĶ) kontrolēs.

Griezumā tika fotografēti ar Leica gaismas mikroskopu (*LEICA, LEITZ DMRB, Wetzlar, Vācija*), izmantojot digitālo kameru DFC 450C, un ar skeneru *Glissando Slide Scanner* (*Objective Imaging Ltd., Kembridža, Apvienotā Karaliste*) ar 0,5 μm/pikseļa izšķirtspēju, lietojot 20× objektīvu, ar 0,275 μm/pikseļa izšķirtspēju, lietojot 40× objektīvu.

Imūnkrāsojuma novērtējums tika veikts puskvantitatīvi, 20 nejauši izvēlētos parauga redzes laukos katrā no paraugiem (palielinājums 400×), kas attēlo interesējošā reģiona audzēja un stromas īpatnības. IV tipa kolagēna un laminīna ekspresijas novērtējumā tika izmantota šāda klasifikācija: noteikta ekspresijas neesamība vai arī plašas pārtrauktas imūnreaktīvās zonas (zems imūn ekspresijas līmenis), noteiktas dažas pārtrauktas imūnreaktīvās zonas (vidējs imūn ekspresijas līmenis), noteikta nepārtraukta lineāra ekspresija (augsts imūn ekspresijas līmenis), ievērojot autoru ieteikumus (Agarwal et al., 2013). Savukārt SHh, PDPN un audzēja *α*-GMA imūn ekspresija tika puskvantitatīvi novērtēta kā (–) negatīva, ja netika noteiktas pozitīvi iekrāsotas šūnas; (+) vāja, ja ≤ 10 %; (+ +) mērena, ja 11–50 %; (+ + +) izteikta, ja > 51 % struktūru uzrādīja pozitīvo krāsojumu. Stromas *α*-GMA imūnreaktivitāte tika novērtēta kā (–) negatīva, ja tika konstatēta tikai asinsvadu sienīgas iekrāsošanās (*α*-GMA); (+) vāja, ja tikai daži miofibroblasti uzrādīja pozitīvitāti ap audzēja šūnām; (+ +) mērena, ja < 50 % *α*-GMA pozitīvo šūnu ieskauj audzēja saliņu, un (+ + +) spēcīga, ja > 50 % *α*-GMA pozitīvo šūnu spēcīgi ieskauj audzēja saliņu, kā aprakstīts iepriekš (Bozdogan et al., 2002). Šajā novērtējumā netika ņemta vērā šo proteīnu ekspresija tauku, sviedru dziedzeros un asinsvadu sienīgas.

2.6. Caurstarojošās elektronmikroskopijas metode

Lai labāk izpētītu audzēja šūnu ultrastrukturālās īpatnības, recidivējošām BŠK veidojot invazīvu konusu, tika izmantota caurstarojošā (transmisijas) elektronmikroskopija (EM). BŠK operācijas audu paraugi tika sasmalcināti 1 mm³ gabaliņos un fiksēti 2,5 % glutaraldehīdā, turēti ledusskapī 4 °C temperatūrā 2–4 stundas, skaloti trīs reizes mainītā fosfāta buferī (pH = 7,4) ar saharozi 4 °C temperatūrā kopā 30 minūtes, pēfiksēti 1 % osmija tetroksīdā, atkārtoti skaloti trīs reizes mainītā fosfāta buferī (pH = 7,4) bez saharozes 4 °C temperatūrā kopā 30 minūtes, dehidrēti, izmantojot gradētu spirtu sēriju, spirtu mainot 2–3 reizes ik pēc piecām minūtēm 4 °C temperatūrā, un atstāti uz nakti 2 % uranilacetāta 70° spirta šķīdumā tumšā vietā. Nākamajā dienā BŠK materiāls pakāpeniski tika piesātināts ar epoksīda sveķu maisījumu, kuru sastāvā ir epoksīdu saturoša vide (*epoxy embedding medium*), epoksīda sveķu maisījuma cietinātājs (*epoxy embedding medium hardener DDSA 2-dodecenylsuccinic anhydrite*), metilnadskābes anhidrīts (*methylnadic anhydrite*) (*Sigma-Aldrich, Buchs, Šveice*) un acetons, noslēgumā audzēja materiālu atstājot istabas temperatūrā epoksīda sveķu maisījumā. Ieguldīšanas procesa laikā BŠK materiāls tika ievietots epoksīda sveķu maisījumā ar katalizatoru (*epoxy embedding medium accelerator DPM-30 (2,4,6-Tris (dimethylaminomethyl) phenol)*) polietilēna kapsulās un ievietots polimerizācijai termostatā 60 °C temperatūrā uz 48 stundām.

Lai precizētu audzēja un tā stromas analīzes rajonu un sekotu BŠK Moha ķirurģijas atzinumiem (Tehrani et al., 2013), no epoksīda sveķos ieguldītā audu materiāla, izmantojot ultramikrotomu (LKB, Y2088, Zviedrija), tika izgatavoti 1–2 mkm biezi griezumī jeb pusplānie griezumī. Audu griezumī tika novietoti uz priekšmetstikliņiem, žāvēti, tad krāsoti ar 1 % toluidīnzilā šķīdumu (pH = 9,0), skaloti ar destilētu ūdeni, nožāvēti, pārklāti ar segstikliņu un analizēti gaismas mikroskopā palielinājumā no ×100 līdz ×400.

Pēc 1–2 mkm pusplāno BŠK audu griezumu novērtēšanas un atlases gaismas mikroskopā no epoksīda sveķos ieguldītā audu materiāla, izmantojot ultramikrotomu (LKB, Y2088, Zviedrija), tika izgatavoti 60–80 nm biezi jeb ultraplānie griezumī. Tie tika novietoti uz vara sietiņiem un kontrastēti ar 2 % uranilacetātu (*Polysciences, Inc, Warrington, P.A., ASV*) 20 minūtes un svina citrātu (*Merck, Darmstadt, Vācija*) 5 minūtes. BŠK audu analīze veikta caurstarojošā elektronmikroskopā (JEM 1011, JEOL, Japāna), mainot palielinājumu no ×1000 līdz ×10000 un nepieciešamības gadījumā izvēloties lielāku palielinājumu līdz ×50000. Promocijas darba mērķiem derīgo audzēja un tā stromas rajonu griezumī tika analizēti un fotografēti ar firmas *Kodak* fotofilmiņām (SO-163, *Kodak, Rochester, N.Y., ASV*). Pēc

fotofilmiņu attīstīšanas tās tika skenētas, izmantojot skenētāju (*Epson Perfection V700 Photo*, *Seiko Epson Corp.*, Japāna) elektronogrammu iegūšanai.

2.7. Statistiskā datu analīze

Statistiskā datu analīze tika veikta, lai novērtētu dermatoskopijas un imūnhistoķīmijas rezultātus, izmantojot SPSS 24.0, 26.0 versijas, *Prism 9* programmatūru *macOS* (*GraphPad Software, LLC, ASV*) un *JMP Pro 16* (*SAS, ASV*).

Lai pārbaudītu, vai savāktie skaitliskie dati ir normāli sadalīti, tika izmantots Kolmogorova–Smirnova normalitātes tests. Kvantitatīvie dati tika izteikti kā vidējie \pm standartnovirze, savukārt kategoriskie parametri tika izteikti kā biežums un procenti. Spīrmena un Pīrsona ranga korelācijas koeficienti tika izmantoti, lai novērtētu sakarības starp šajā pētījumā analizēto antigēnu imūnekspressijas rezultātiem, asins seruma D vitamīna līmeni un audzēja izmēru, kā arī saistību starp dzimumu un audzēja veidu. T-tests tika izmantots divu neatkarīgu izlašu vidējo salīdzināšanai, lai pārbaudītu BŠK un seruma D vitamīna līmeņa saistību starp dzimumu un dažādām prognostiskajām grupām (primārā un recidivējošā, zema riska un augsta riska BŠK).

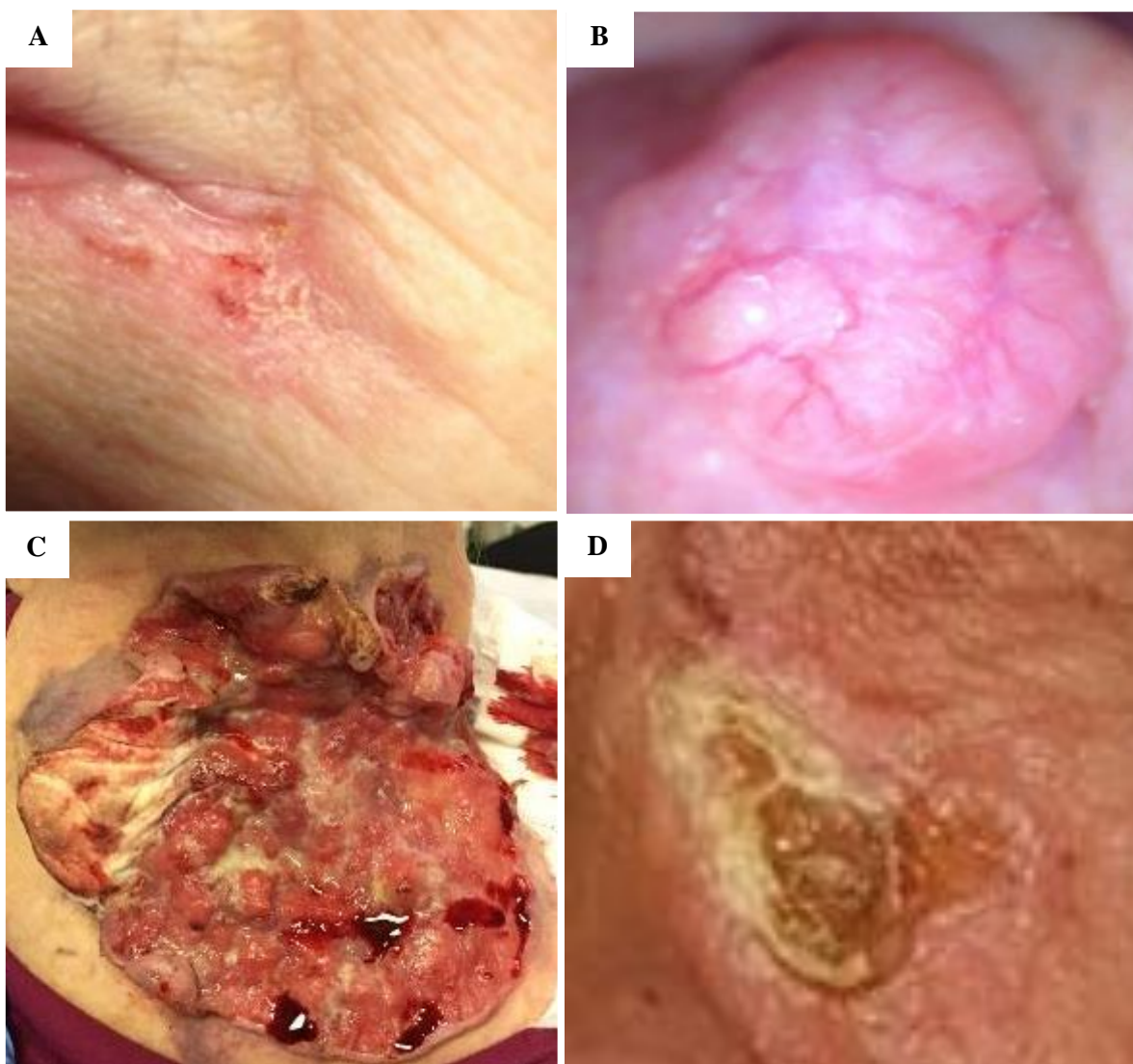
Lai noteiktu iegūto rezultātu galvenās apakškopas, tika izmantota daudzfaktoru analīze un hierarhiskā klasterizācijas metode. Korelācija starp antigēna ekspresiju un BŠK histopatoloģisko tipu tika pētīta ar Hī-kvadrāta testu. Fišera tests tika izmantots, lai novērtētu attiecības starp dermatoskopisko atradi un audzēja apakštipu. Krāmera V tests tika izmantots, lai novērtētu dermatoskopisko struktūru saistības ar BŠK tipiem. Pāru grupu salīdzināšanas gadījumā tika izmantots Vilkoksona saskaņoto pāru parakstīto rangū tests ar Bonferroni korekciju; p vērtības $< 0,05$ tika uzskatītas par nozīmīgām. Diagrammas tika izveidotas, izmantojot *Prism 9 macOS* (*LLC, San Diego, ASV*) un *JMP Pro 16* (*SAS, Kerija, ASV*) programmatūru.

3. Rezultāti

3.1. BŠK pacientu klīniskās izmeklēšanas analīzes rezultāti

Kopumā šajā pētījumā tika izmantota septiņdesmit deviņu pacientu grupa, kam diagnosticēta BŠK. No visiem pacientiem, kuriem bija BŠK, 58 % bija sievietes un 42 % vīrieši. Sieviešu vidējais vecums bija 70 gadi ($SD \pm 15$) un vīriešu – 64 gadi ($SD \pm 17$). Klīniski ādas fototipi tika novērtēti, izmantojot I–III Ficpatrika (*Fitzpatrick*) klasifikācijas skalu. Pacienti ar IV–VI fototipu netika reģistrēti. No 79 pētījumā iekļautajiem pacientiem tikai diviem pacientiem (2,5 %) tika konstatēts I tips, 59 (74,7 %) – II tips un 18 (22,8 %) – III tips. Viens vīrietis un viena sieviete uzrādīja I fototipa esību. Vīrietim bija blondi mati un zilas acis, sievietei – vasarraibumi un rudi mati. Abu pacientu āda saulē vienmēr apdeg. Izņemot BŠK, vīrietim uz sejas un pleciem bija vairāki aktīniskās keratozes ādas bojājumi. Vairākumam sieviešu – 34 no 46 – un 25 no 33 vīriešiem tika noteikts II fototips, bet pārējiem – III fototips. Pacientiem ar II fototipu bija gaiša āda, gaiši mati un zilas vai pelēkzilas acis, āda bija viegli apdegusi pēc ilgākas saules iedarbības. Savukārt pacientiem ar III fototipu bija gaiši līdz gaiši brūna ādas krāsa, biezi, tumši mati un dažāda acu krāsa.

Klīniski mūsu praksē BŠK visbiežāk izpaužas kā lēni augošs ādas krāsas mezgls vai eritematozs plankums ar eroziju vai izcūlojumu virsmā (3.1.A, B attēls). Primārie BŠK lielākoties bija neliela izmēra, taču periodiski tika diagnosticēti ātri augoši agresīvie audzēji ar plašu destruktīvas zonu (3.1.C attēls). Recidivējošie BŠK pētījuma ietvaros diagnosticēti kā epidermas izcūlojums ar biezu kreveli virsmā (3.1.D attēls).



3.1. attēls. Bazālo šūnu karcinomas klīniskā izpausme

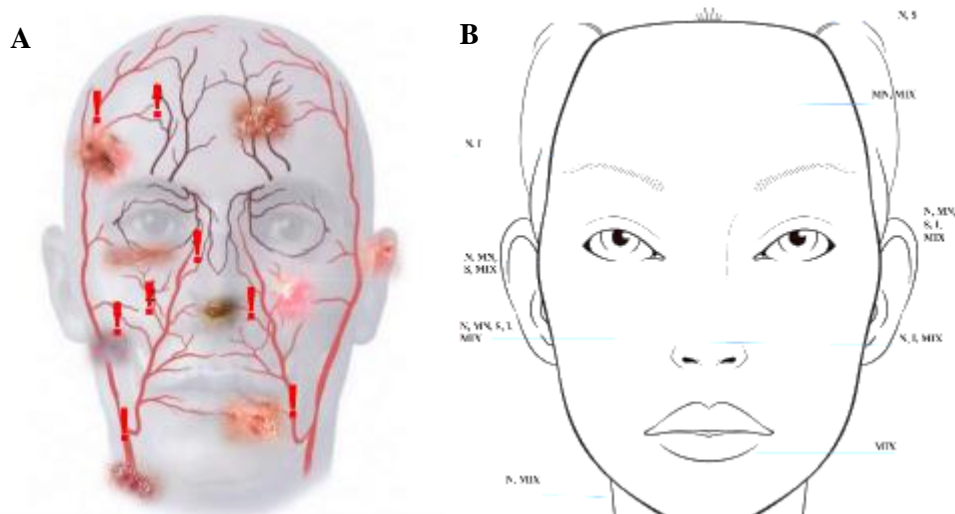
(A) Eritematozs plankums ar virsmas erozijām apakšlūpas rajonā. (B) Ādas krāsas mezgls nazolabiālās krokās ar asinsvadu zīmējumu virsmā. (C) Kakla un pleca rajona primāra agresīva BŠK ar plašu ulcerācijas zonu. (D) Vaiga rajona recidivējoša BŠK ar izčūlojumu epidermā un biezu kreveli virsmā.

3.2. BŠK histopatoloģisko tipu biežuma un anatomiskās lokalizācijas analīze

No 79 pacientiem 15 (19 %) tika diagnosticēts mezglains jeb nodulārs audzēja histopatoloģiskais apakštips, 18 (23 %) – virspusējs, 10 (12 %) – infiltratīvs, 7 (9 %) – mikronodulārs apakštips un 29 (37 %) – jaukts apakštips. Visbiežāk sastopamās jauktu BŠK kombinācijas ietvēra mezglaini infiltratīvo, virspusēji mezglainu un mezglaini mikronodulāro apakštipu. Starp histoloģiskajiem apakštipiem netika konstatētas statistiskas atšķirības dzimumu sadalījumā ($p = 0,102$).

BŠK visbiežāk lokalizējas labi apasiņotās galvas un kakla vietās, un pētījumā iezīmējās bīstamākās zonas noteiktiem agresīviem BŠK apakštipiem, tādas kā deguns un nazolabiālo kroku rajons *a. facialis* apasiņošanas zonā, centrālais vaigu rajons *a. transversa* un

a. infraorbitalis apasiņošanas zonā, kur audzējam tika nodrošināta laba asinsapgāde ar nepieciešamo vielu piegādi tā labvēlīgākai attīstībai (3.2. attēls).



3.2. attēls. Bazālo šūnu karcinomu sadalījums galvas un kakla lokalizācijā

(A) Galvas un kakla apasiņošanas shēma ar biežākām BŠK lokalizācijām parāda, ka audzējs biežāk attīstās lielo artēriju un to atzarojumu apasiņošanas rajonā. (B) Biežākās BŠK lokalizācijas galvas un kakla rajonā pēc histoloģiskā audzēja apakštipa.

Saīsinājumi: N – mezglains, MN – mikronodulārs, S – virspusējs, I – infiltratīvs, MIX – jaukts apakštips.

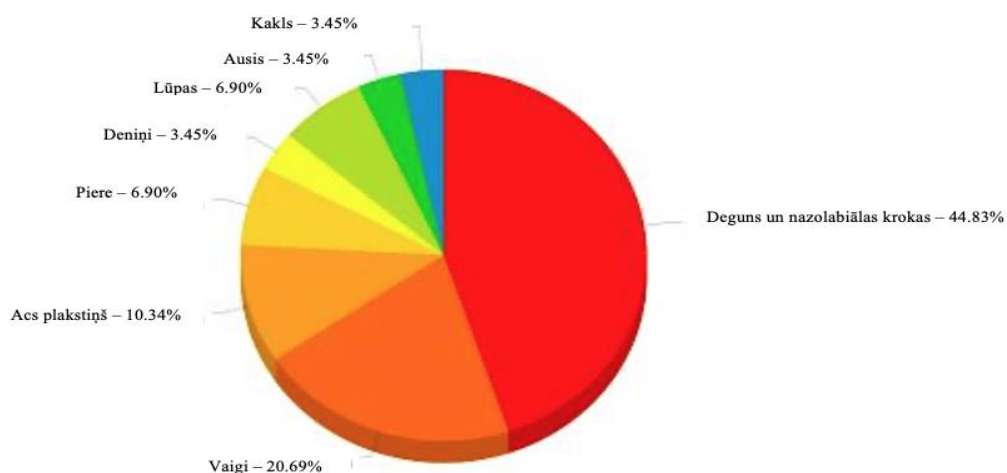
BŠK sadalījums pēc anatomiskās atrašanās vietas un histoloģiskā apakštipa ir apkopots arī 3.1. tabulā. Audzēja anatomiskās lokalizācijas analīze apstiprināja, ka deguns un vaigs bija dominējošie reģioni, kur attīstījās gan primārie, gan recidivējošie audzēji, kas veidoja attiecīgi 36,7 un 29,1 %. Nodulāras (primārajos audzējos) un jauktas BŠK (primārajos un recidivējošos audzējos) biežāk atradās deguna ādā, salīdzinot ar citiem galvas un kakla reģioniem, kas veido attiecīgi 42,9 %, 31,6 % un 70 %. Mikronodulārā BŠK apakštipa anatomiskā atrašanās vieta: deguns, 2 (29 %); vaigs, 2 (29 %); plakstiņš, 3 (17 %); galvas āda, 1 (5,5 %); auss, 1 (5,5 %). Recidivējošas BŠK attīstījās tikai deguna ādā, savukārt primāro audzēju lokalizācija novērota šādās anatomiskās zonās: vaigā 3 (38 %), uz deguna 2 (25 %), uz deniņiem 2 (25 %) un uz auss 1 (12 %). Recidivējošu audzēju otrajā vietā pēc lokalizācijas bija piecas BŠK uz vaiga, trīs uz plakstiņiem un viena uz auss. Mūsu pētījumā trešais visbiežāk bojātais reģions bija plakstiņš (10,1 %).

**Primāro un recidivējošo bazālo šūnu karcinomu sadalījums
pēc histoloģiskā apakštīpa un anatomiskās atrašanās vietas**

Apraksts par paraugu / diagnoze			Anatomiskā lokalizācija								Kopā	
			Deguns	Deniņi	Vaigi	Plakstiņš	Galvas āda	Lūpas	Ausis	Kakls		Piere
Primārie	Tips	N	6	1	2	1	2	0	1	1	0	14
		MN	2	0	2	1	0	0	1	0	1	7
		I	2	2	3	0	0	0	1	0	0	8
		S	4	0	7	1	1	0	0	0	0	13
		MIX	6	1	4	2	0	2	1	1	2	19
	Kopā	20	4	18	5	3	2	4	2	3	61	
Recidivējošie	Tips	N	0	–	1	0	–	–	0	–	–	1
		I	2	–	0	0	–	–	0	–	–	2
		S	0	–	2	2	–	–	1	–	–	5
		MIX	7	–	2	1	–	–	0	–	–	10
	Kopā	9	–	5	3	–	–	1	–	–	18	
Kopā	Tips	N	6	1	3	1	2	0	1	1	0	15
		MN	2	0	2	1	0	0	1	0	1	7
		I	4	2	3	0	0	0	1	0	0	10
		S	4	0	9	3	1	0	1	0	0	18
		MIX	13	1	6	3	0	2	1	1	2	29
	Kopā	29	4	23	8	3	2	5	2	3	79	

N – mezglainais apakštīps; MN – mikronodulārais apakštīps; I – infiltratīvais apakštīps; S – virspusējais apakštīps; MIX – jauktais apakštīps.

Jaukta tipa BŠK anatomiski atradās rajonos, kas grafiski atainots 3.3. attēlā: viena uz deniņiem (3,45 %), divas (6,90 %) uz pieres, sešas (20,69 %) uz vaigiem, 13 (44,83 %) uz deguna un nazolabiālo kroku rajonā, viena (3,45 %) uz auss, viena (3,45 %) uz kakla, trīs (10,34 %) uz plakstiņiem un divas (6,90 %) uz lūpām.



3.3. attēls. Jaukta tipa bazālo šūnu karcinomas biežums un lokalizācija

Histopatoloģiski agresīva jaukta tipa BŠK vairumā gadījumu tika lokalizēta uz deguna un nazolabiālo kroku rajonā kā mezglaini infiltratīvs vai solīdi adenoīds audzējs. Jaukto audzēju izmēri bija ļoti dažādi – no 0,2 mm līdz 2,5 cm, bet reizēm līdz 4 cm (3.2. tabula).

3.2. tabula

Jaukta tipa bazālo šūnu karcinomas sadalījums pēc anatomiskās lokalizācijas un izmēra

Lokalizācija	Gadījumu skaits	Gadījumu skaits %	Min. izmērs	Max izmērs	Vidējais novērtējums
Deguns	13	44,83 %	0,3 cm	4 cm	1,1 cm
Vaigi	6	20,69 %	0,2 cm	3,2 cm	1,85 cm
Deniņi	1	3,45 %	0,5 cm	0,5 cm	0,5 cm
Piere	2	6,90 %	0,3 cm	0,7 cm	0,5 cm
Plakstiņi	3	10,34 %	0,2 cm	0,6 cm	0,4 cm
Lūpas	2	6,90 %	0,3 cm	1,3 cm	0,8 cm
Auris	1	3,45 %	0,8 cm	0,8 cm	0,8 cm
Kakls	1	3,45 %	2,8 cm	2,8 cm	2,8 cm
Kopējais gadījumu skaits	29	100 %	–	–	–

Min. – minimālais; max – maksimālais.

3.3. Dermatoskopiskās izmeklēšanas rezultāti

Dermatoskopiski BŠK diagnostiskās struktūras ietvēra arborizētus asinsvadus; īsas, smalkas teleangiektāzijas; kļavas lapām līdzīgas struktūras; lielas, zilganpelēkas olveida ligzdas; baltas svītras; izčūlojumu; vairākas nelielas erozijas; spīdīgus, baltus laukumus; fokusētus punktus; pienaini rozā līdz sarkanīgus laukumus; riteņa spieķu struktūras un vairākus

zili pelēkus punktiņus un lodītes, kā tas tika ieteikts iepriekš veiktajos pētījumos (Popadić, 2014; Puig et al., 2012; Lallas et al., 2013; Wozniak-Rito et al., 2018). Biežāko diagnostisko struktūru sadalījums pēc gadījumu skaita un procentuāli attēlots 3.3. un 3.4. tabulā.

3.3. tabula

Biežāko dermatoskopisko struktūru sadalījums pēc gadījumu skaita

Struktūras	Nevizualizējamās struktūras	Vizualizācija < 25 %	Vizualizācija 26–70 %	Vizualizācija > 70 %	Kopā
Arborizēti asinsvadi	24	11	13	31	79
Īsas, smalkas teleangiektāzijas	30	8	16	25	79
Zilganpelēkas olveida ligzdas	33	12	11	23	79
Multipli zili pelēki punkti	33	11	17	18	79
Fokusēti punkti	52	6	4	17	79
Kļavas lapām līdzīgas struktūras	55	6	8	10	79
Rīteņa spieķu struktūras	56	8	8	7	79
Koncentriskās struktūras	60	10	4	5	79
Izčūlojums	68	4	2	5	79
Erozijas	57	4	13	5	79
Spīdīgi, balti laukumi	66	4	6	3	79
Baltas svītras jeb saišķi	76	0	0	3	79
Pienaini rozā līdz sarkanīgi laukumi	76	0	1	2	79

3.4. tabula

Biežāko dermatoskopisko struktūru procentuāls sadalījums

Struktūras	Nevizualizējamās struktūras	Vizualizācija < 25 %	Vizualizācija 26–70 %	Vizualizācija > 70 %	Kopā
Arborizēti asinsvadi	30,4	13,9	16,5	39,2	100,0
Īsas, smalkas teleangiektāzijas	38,0	10,1	20,3	31,6	100,0
Zilganpelēkas olveida ligzdas	41,8	15,2	13,9	29,1	100,0
Multipli zili pelēki punkti	41,8	13,9	21,5	22,8	100,0
Fokusēti punkti	65,8	7,6	5,1	21,5	100,0
Kļavas lapām līdzīgas struktūras	69,6	7,6	10,1	12,7	100,0
Rīteņa spieķu struktūras	70,9	10,1	10,1	8,9	100,0
Koncentriskās struktūras	75,9	12,7	5,1	6,3	100,0

3.4. tabulas turpinājums

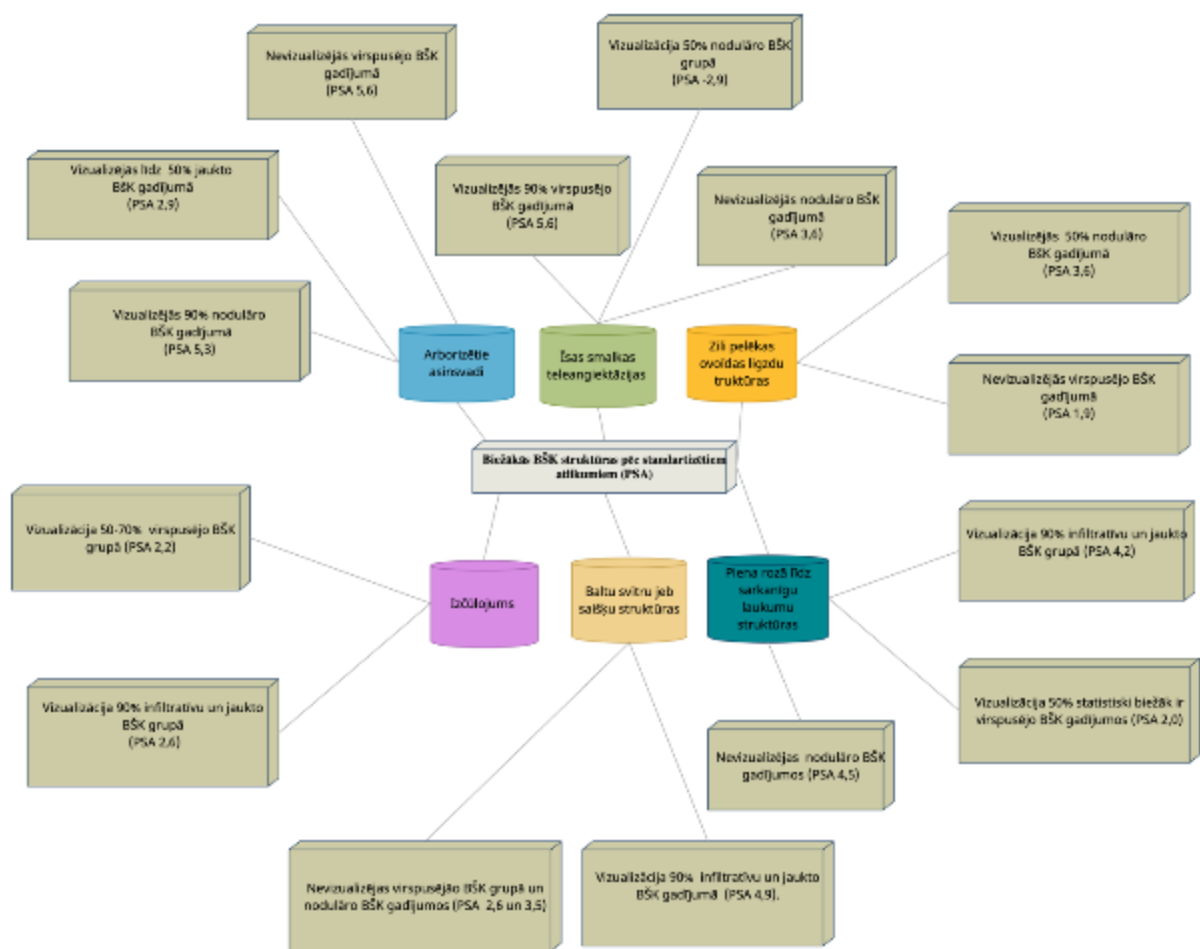
Struktūras	Nevizualizējamas struktūras	Vizualizācija < 25 %	Vizualizācija 26–70 %	Vizualizācija > 70 %	Kopā
Izčūlojums	86,1	5,1	2,5	6,3	100,0
Erozijas	72,2	5,1	16,5	6,3	100,0
Spīdīgi, balti laukumi	83,5	5,1	7,6	3,8	100,0
Baltas svītras jeb saišķi	96,2	0,0	0,0	3,8	100,0
Pienaini rozā līdz sarkanīgi laukumi	96,2	0,0	1,3	2,5	100,0

Izmantojot Fišera tiešo testu (3.5. tabula), noteikts, ka statistiski nozīmīgas atšķirības pastāvēja starp noteiktām dermatoskopiski diagnosticētajām struktūrām, tādām kā arborizēti asinsvadi, īsas, smalkas teleangiektāzijas, zili pelēkas olveida struktūras, fokusēti punkti, izčūlojums, erozijas, baltas svītras jeb saišķi. Tika analizēts arī struktūru sadalījums abās grupās un to atšķirības starp primārām un recidivējošām BŠK. Promocijas darbā diagnostiskas struktūras tika analizētas arī procentuāli, balstoties uz dermatoskopiskas vizualizācijas iespējām (3.4. attēls).

3.5. tabula

Statistiskās atšķirības starp dermatoskopiskajiem kritērijiem

Struktūras	p vērtība
Arborizēti asinsvadi	< 0,001
Īsas, smalkas teleangiektāzijas	< 0,001
Zilganpelēkas olveida ligzdas	0,001
Multipli zili pelēki punkti	0,882
Fokusēti punkti	0,018
Kļavas lapām līdzīgas struktūras	0,605
Riteņa spieķu struktūras	0,103
Koncentriskās struktūras	0,834
Izčūlojums	0,030
Erozijas	0,009
Spīdīgi, balti laukumi	0,276
Baltas svītras jeb saišķi	< 0,001
Pienaini rozā līdz sarkanīgi laukumi	< 0,001



3.4. attēls. Dermatoskopisko struktūru vizualizācija bazālo šūnu karcinomas apakštipos

Atspoguļo dermatoskopisko struktūru vizualizācijas biežumu BŠK tipos, tās iedalot trijās grupās:

1. Nevizualizējamas struktūras; 2. Vizualizācija 50–70 %; 3. Vizualizācija 71–90 %.

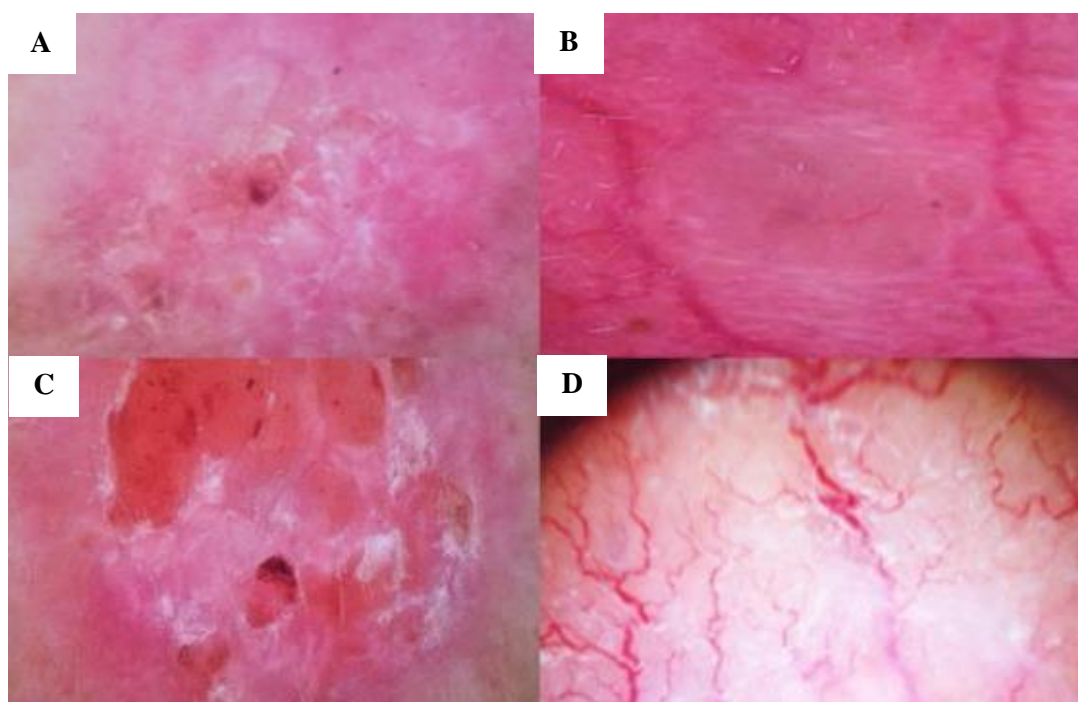
Lai noteiktu saistības starp grupām un struktūru vizualizācijas pakāpi, lietots Krāmēra V tests. Saistības pierādītas kā ļoti ciešas, jo Krāmēra V vērtības bija augstas (visas no 0,3 un augstāk); tās attēlotas 3.6. tabulā.

3.6. tabula

Krāmēra V vērtības aprēķināšanas rezultāti

Struktūras	Krāmēra V vērtība
Arborizēti asinsvadi	0,583
Īsas, smalkas teleangiektāzijas	0,389
Zilganpelēkas olveida ligzdas	0,347
Fokusēti punkti	0,319
Izcūlojums	0,304
Erozijas	0,313
Spīdīgi, balti laukumi	0,440
Baltas svītras jeb saišķi	0,430

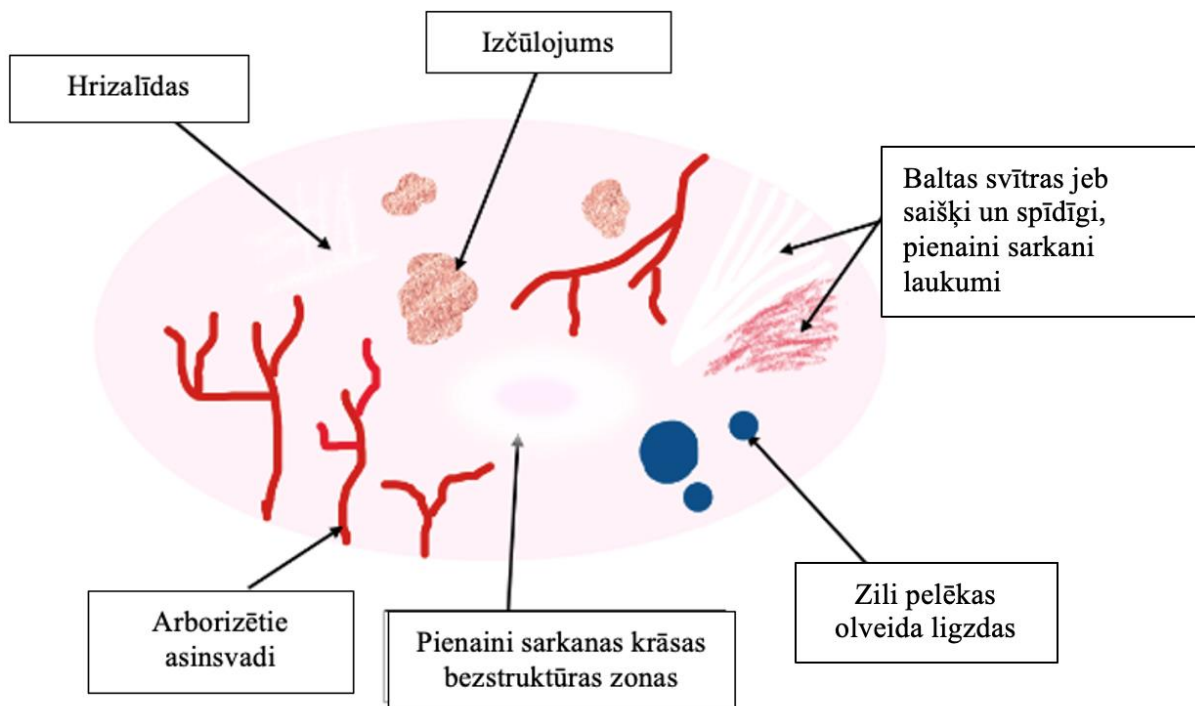
Virspusējam BŠK apakštipam dermatoskopiskie diagnostikas kritēriji ietvēra īsu, smalku teleangiektāziju un komatveida asinsvadus, erozijas, rozā viendabīgu apgabalu un zili pelēkas olveida ligzdas (3.5.A attēls). Nodulāri un mikronodulāri BŠK tipi tika diagnosticēti ar mezglu, kas nedaudz pacelts virs ādas bojājuma centrālās daļas, prezentēts ar arborizētiem asinsvadiem, izcūlojumu, zili pelēkām olveida ligzdām un mezgla caurspīdīgumu (3.5.B, C attēls). Infiltratīvā BŠK parasti tika vizualizēta ar arborizētiem asinsvadiem, īsām, smalkām teleangiektāzijām, spīdīgiem, baltiem bezstruktūras apgabaliem, čūlām un baltām svītrām (3.5.D attēls).



3.5. attēls. **Dermatoskopiskās atrades dažādos bazālo šūnu karcinomu veidos**

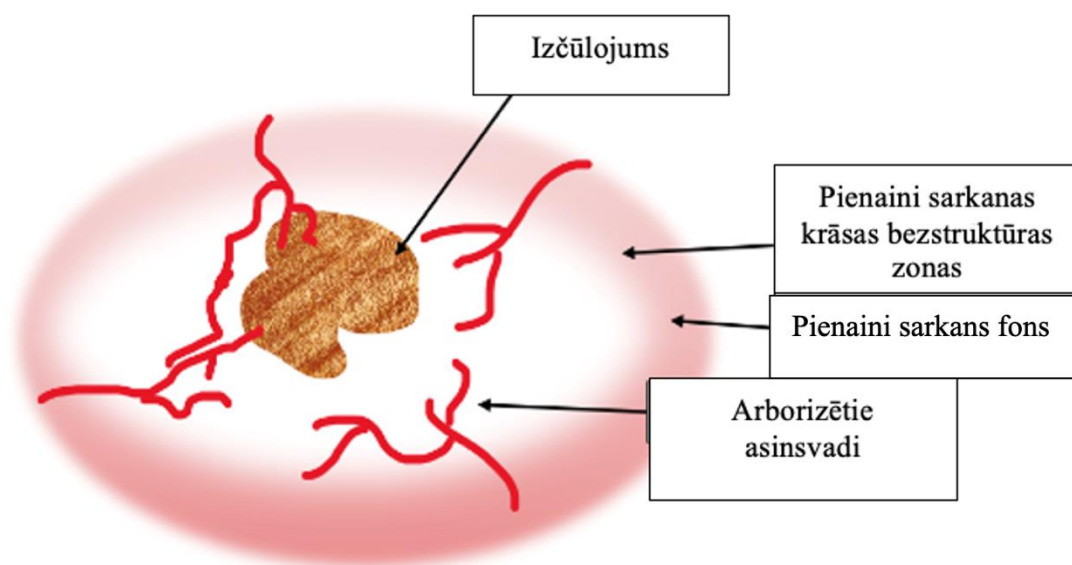
(A) Pienaini rozā bezstruktūras zonas, viendabīgi rozā apgabali, īsas, plānas teleangiektāzijas un erozija audzēja centrālajā daļā virspusējas BŠK gadījumā. (B) Caurspīdīgs mezgliņš, kas pacelts virs ādas, prezentē asinsvadus mezglainā BŠK. (C) Mezglains audzēja izskats ar robežu, kas pacelta virs ādas bojājuma centrālās daļas, arborizējošām, īsām, plānām teleangiektāzijām, pienaini rozā bezstruktūras zonām, čūlām un eroziju mikronodulāras BŠK gadījumā. (D) Arborizējoši asinsvadi, īsas, plānas teleangiektāzijas uz spīdīgi baltiem un pienaini sarkanām bezstruktūras apgabaliem infiltratīvas un jauktas BŠK gadījumā.

Jauktas BŠK diagnoze tika balstīta uz histopatoloģiskiem novērojumiem un noteiktu dermatoskopisku īpašību klātbūtni, kas ietvēra tādas BŠK standarta pazīmes kā asinsvadu veidošanās, izcūlojums, pienaini sarkanas krāsas bezstruktūras zonas un retāk sastopamas pazīmes, piemēram, keratīna masas virspusēja zvīņošana un baltas svītras jeb saišķi. Infiltratīvā un jaukta tipa BŠK pieder agresīvām audzēja formām, tāpēc bija īpaši svarīgi tās atpazīt pirms ārstēšanas metodes izvēles. Lai atvieglotu šo audzēja tipa diagnostiku, pētījuma laikā tika izstrādātas tā sauktās diagnostiskās atslēgas ar visbiežāk sastopamajām struktūrām, kuras mēs diagnosticējam mūsu pacientiem (3.6. un 3.7. attēls).



3.6. attēls. Shēma, kurā attēlotas jauktā tipa bazālo šūnu karcinomas dermoskopiskās izmeklēšanas diagnostikas “atslēgas”

Mezglains audzēja izskats ar robežu, kas pacelta virs ādas bojājuma centrālās daļas, arborizējošām un īsām, plānām teleangiektāzijām, pienaini rozā un pienaini sarkanām bezstruktūras zonām, čūlām un eroziju mikronodulāras BŠK gadījumā.

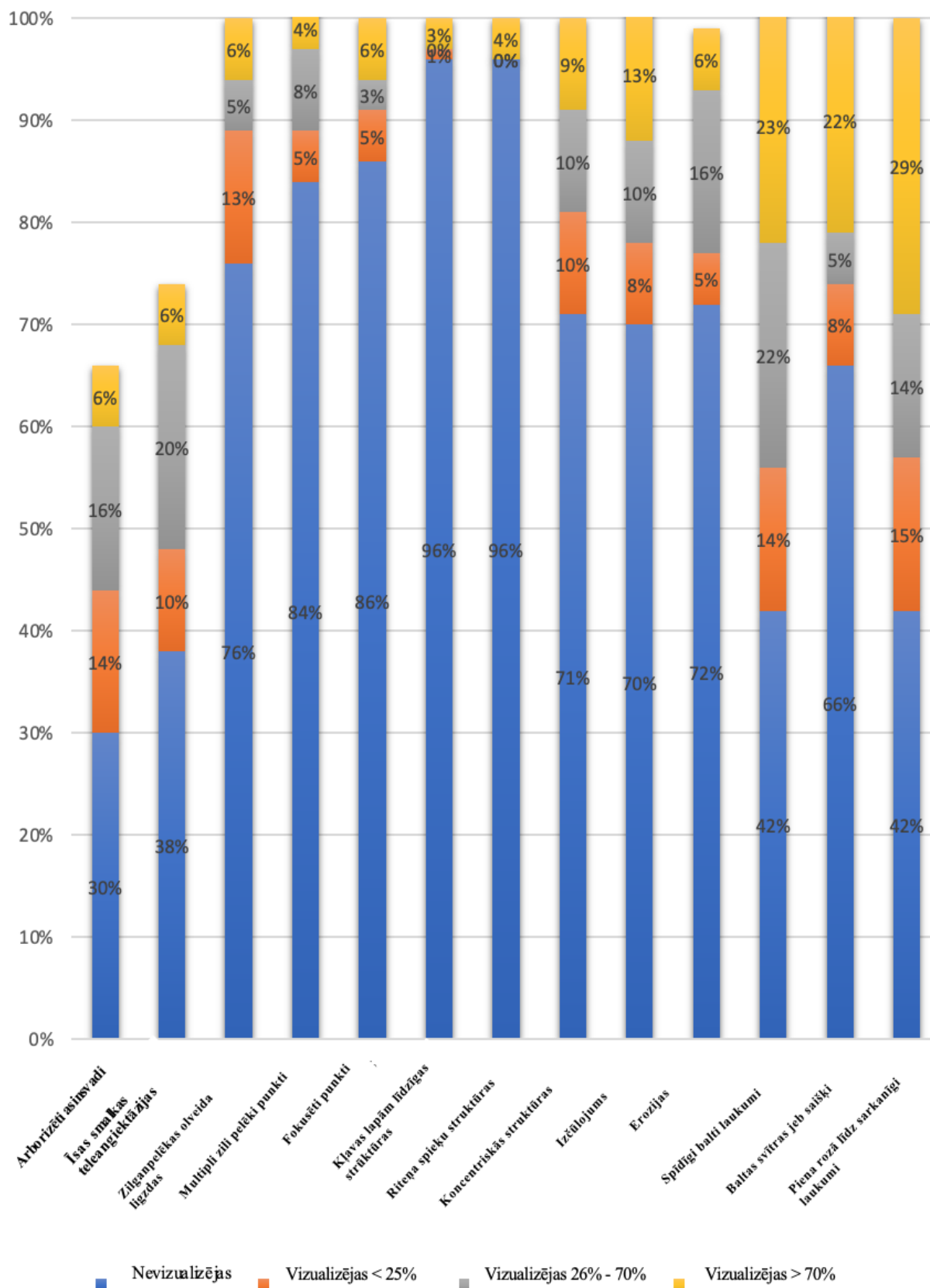


3.7. attēls. Shēma, kurā attēlotas infiltratīvi sklerozējošā bazālo šūnu karcinomas tipa diagnostikas “atslēgas”, kas nosakāmas dermoskopiski

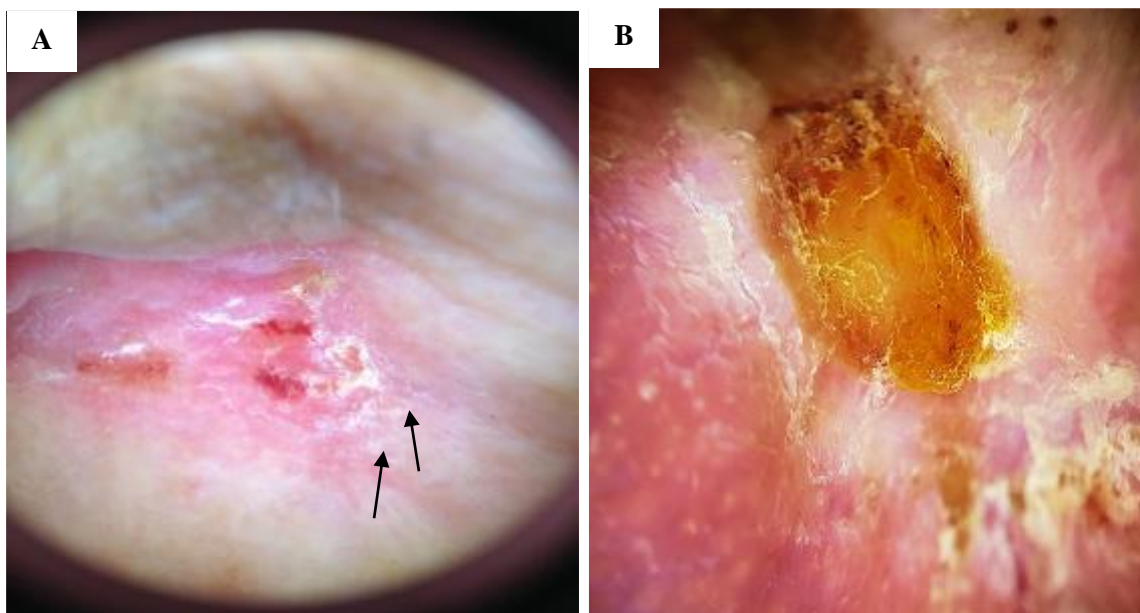
Visizplatītākais jauktas BŠK asinsvadu veids bija arborizēti asinsvadi un īsas, smalkas teleangiektāzijas, kas galvenokārt tika konstatētas maza izmēra BŠK. Arī spīdīgi, balti laukumi (divdesmit pacienti, 60,6 %), baltas svītras (divdesmit divi pacienti, 66,7 %), pienaini rozā līdz sarkans fons (divdesmit septiņi pacienti, 81,8 %), čūlas (trīspadsmit pacienti, 39,4 %) un vairākas nelielas erozijas (vienpadsmit pacienti, 33,3 %) bieži tika konstatētas dermoskopiski.

Savukārt pigmentētas struktūras tika izdalītas kā zili pelēkas lodītes un punkti (pieci pacienti, 15,1 %), zili pelēkas olveida ligzdas (četri pacienti, 12,1 %) un fokusa punkti (divi pacienti, 6 %). Ar pigmentu saistītas BŠK pazīmes parasti tika prezentētas kā kļavu lapām līdzīgi laukumi (divi pacienti, 6,1 %) un riteņu spieķiem līdzīgas struktūras (viens pacients, 3,0 %). Dermatoskopisko atražu sastopamības biežums jauktā BŠK ir apkopots 3.8. attēlā.

Statistiski nozīmīgas atšķirības jaukta BŠK tipa gadījumā tika noteiktas starp asinsvadu veidošanās biežumu, īsām, smalkām teleangiektāzijām, baltām svītrām un pienaini rozā līdz sarkanām zonām ($p < 0,001$), savukārt jaukta BŠK tipa dermatoskopiskā aina attēlota 3.9. attēlā.



3.8. attēls. Noteiktu dermatoskopisko kritēriju prezentācija jauktā bazālo šūnu karcinomā

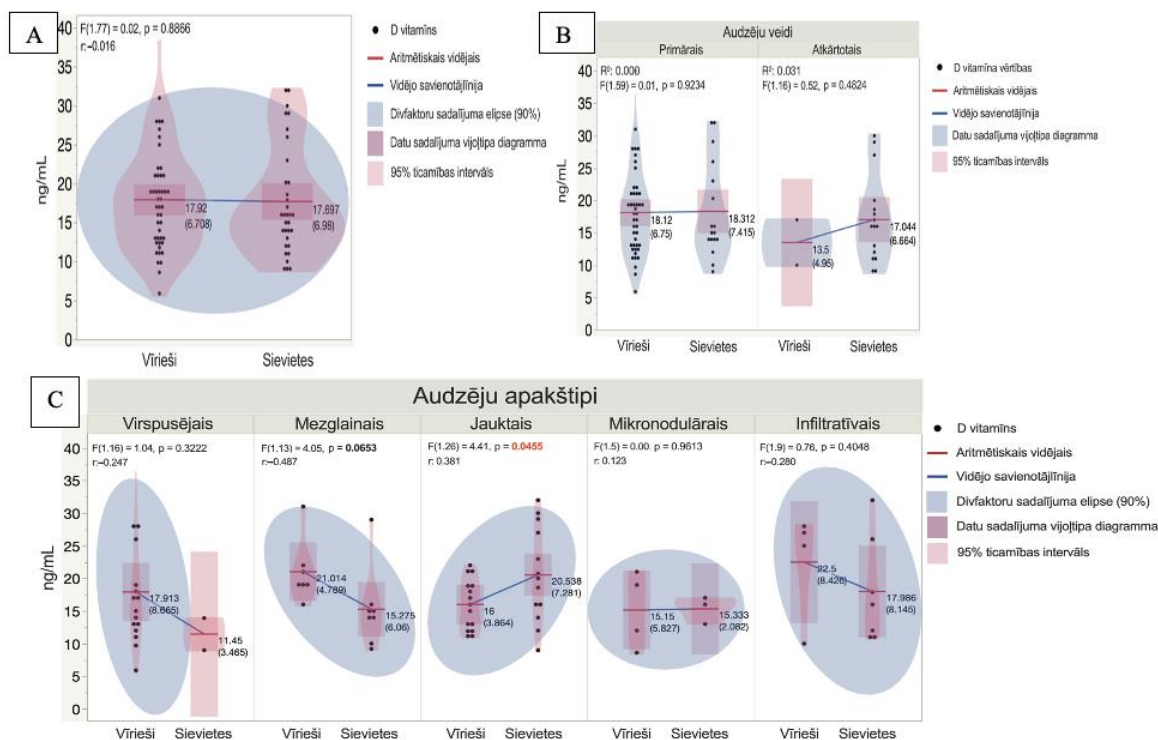


3.9. attēls. Dermatoskopiskās atrades jaukta tipa bazālo šūnu karcinomā

(A) Viendabīgi spīdīgi bezstruktūras laukumi ar pienaini rozā fonu; virspusēja īsa, smalka teleangiektāzija un daži smalki arborizējoši asinsvadi. Audzēja virsma ar vairākām nelielām erozijām un dermatoskopiski skaidri nenosakāmām robežām primārā jauktā tipa BŠK gadījumā, kas histopatoloģiski tika atzīts par virspusējā un infiltratīvā tipa kombināciju. Filamentveida un pavedieniem līdzīgas tievas josliņas, kas pārsniedz audzēja vizuālās robežas, demonstrējot BŠK augstu recidivēšanas risku un agresivitāti (melnas bultiņas).
 (B) Viendabīgi balts līdz pat rozā krāsas fons un čūlas audzēja vidū raksturo recidivējošas jauktas BŠK.

3.4. D vitamīna līmeņa noteikšana un analīze asins serumā

Pārbaudot D vitamīna līmeni asins serumā, noteikts, ka sievietēm tas bija diapazonā no 5,9 līdz 40,0 ng/mL, savukārt vīriešiem attiecīgi no 9 līdz 32 ng/mL (3.10.A attēls). Sievietēm D vitamīna līmeņa vidējā vērtība bija 17,9 ng/mL (SD ± 6,7 ng/mL), savukārt vīriešiem vidējā vērtība bija 17,7 ng/mL (SD ± 7,0 ng/mL), tomēr šīs atšķirības nebija statistiski nozīmīgas. Tikai četriem pacientiem pētījuma grupā bija pietiekams D vitamīna līmenis asins serumā, proti, virs 30,0 ng/mL. Pacientiem, kuriem bija attīstījušās primārās BŠK, statistiski nozīmīgas atšķirības seruma D vitamīna līmeņos starp vīriešiem un sievietēm netika konstatētas (3.10.B attēls). Vienlaikus divām sievietēm, kurām diagnosticēti recidivējoši BŠK audzēji, vidējā D vitamīna līmeņa vērtība bija 13,5 ng/mL (SD ± 5,0 ng/mL), savukārt 16 vīriešiem vidējā vērtība bija 17,0 ng/mL (SD ± 6,7 ng/mL), tomēr šīs atšķirības nebija statistiski nozīmīgas. D vitamīna līmenis asins serumā bija ievērojami zemāks sievietēm ar jauktiem BŠK tipiem, salīdzinot ar vīriešiem ($p < 0,05$). Vienlaikus, salīdzinot abu dzimumu pacientus ar dažāda veida BŠK, asins seruma D vitamīna līmenis neatšķīrās (3.10.C attēls).

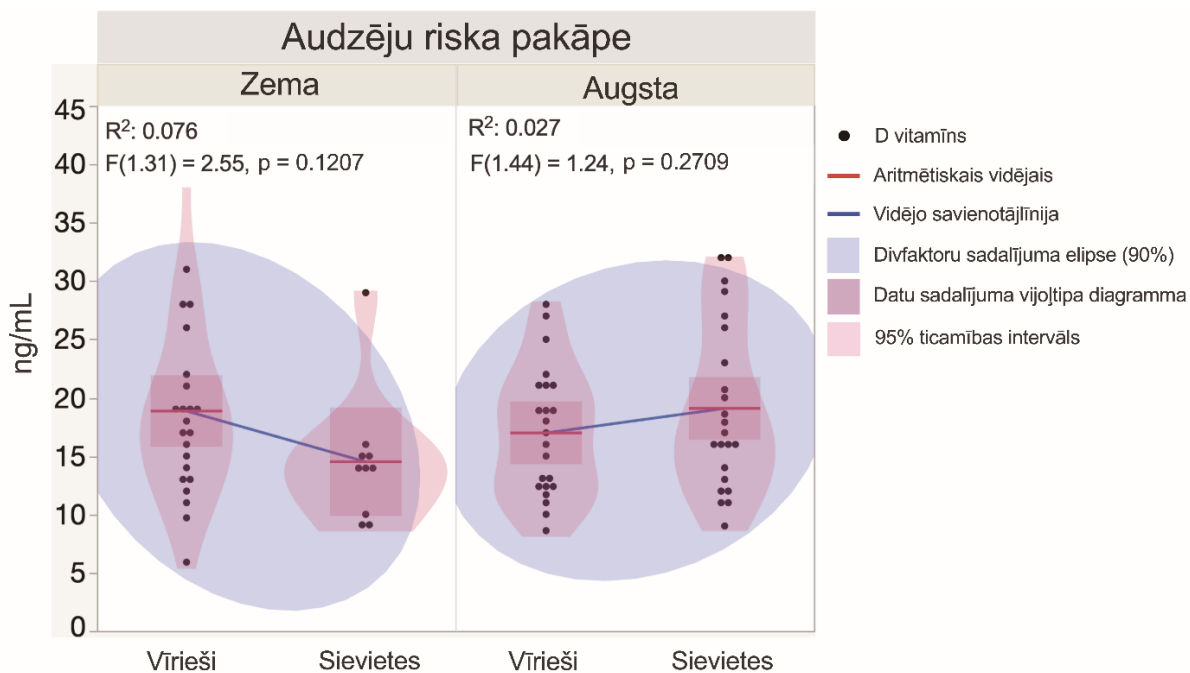


3.10. attēls. D vitamīna līmeņa novērtējums serumā pētījuma grupā

(A) D vitamīna līmeņa novērtējums asins serumā pētījumā iekļautajiem vīriešiem un sievietēm. Katrs punkts apzīmē vienu mērījumu. (B) D vitamīna līmeņa serumā novērtējums vīriešiem un sievietēm ar primāriem un recidivējošiem BŠK tipiem. Katrs punkts apzīmē vienu mērījumu. (C) D vitamīna līmeņa novērtējums asins serumā vīriešiem un sievietēm ar dažāda veida BŠK. Katrs punkts apzīmē vienu mērījumu. Salīdzinot dažādus BŠK veidus, kas diagnosticēti abiem dzimumiem, statistiski nozīmīgas atšķirības serumā D vitamīna līmeņos netika novērotas, izņemot jauktas BŠK, kas diagnosticētas sievietēm ar ievērojami zemāku D vitamīna līmeni serumā, salīdzinot ar vīriešiem ($p = 0,0456$).
Saisinājumi: (B) 1 – primāras BŠK; 2 – recidivējošas BŠK; (C) 1 – virspusēji BŠK audzēji; 2 – nodulāri BŠK audzēji; 3 – jaukti BŠK audzēji; 4 – mikronodulāras BŠK; 5 – infiltratīvas BŠK.

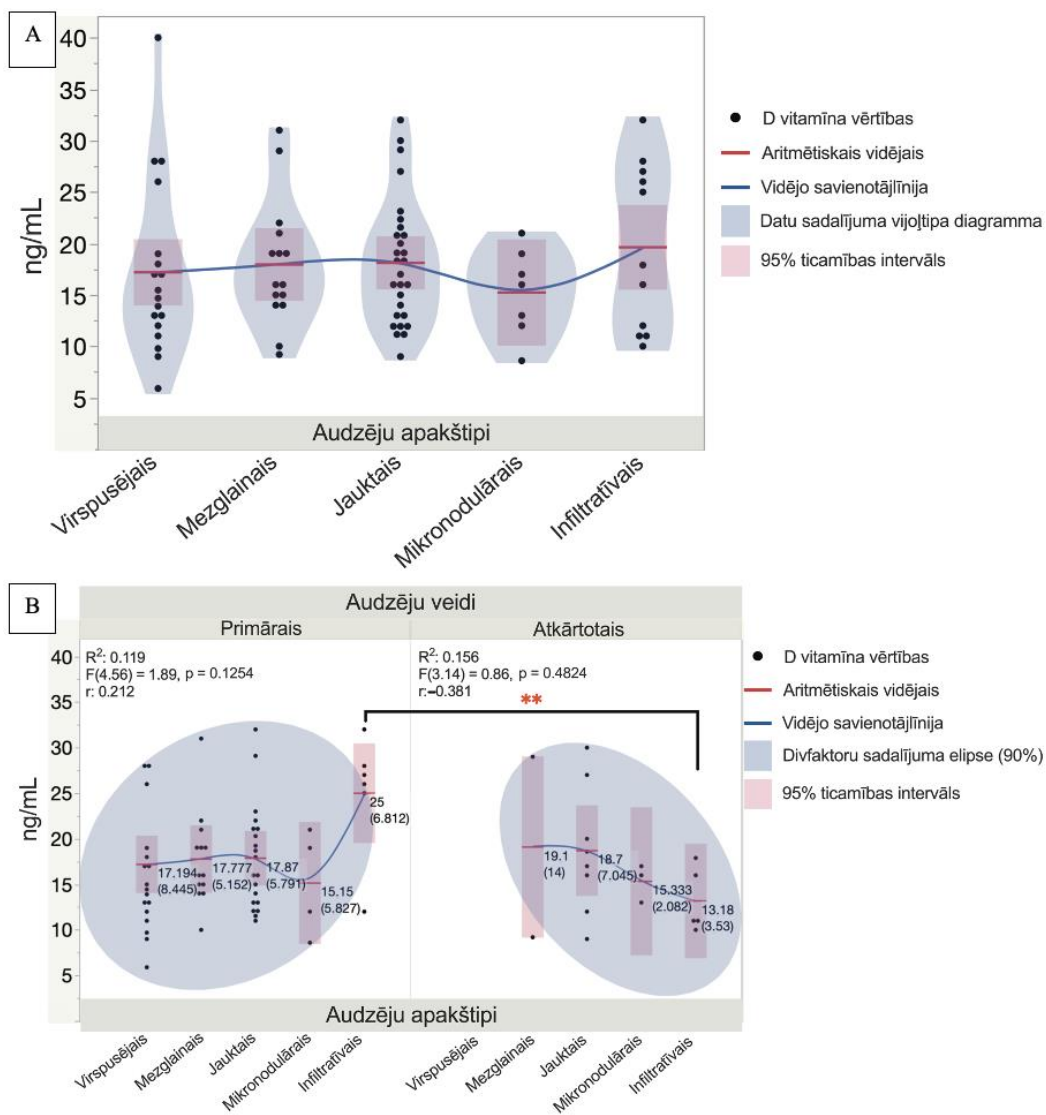
3.5. D vitamīna līmenis saistībā ar dažādiem bazālo šūnu karcinomas tipiem

Lai labāk izprastu BŠK novērotā asins seruma D vitamīna līmeņa pārmaiņas, rezultāti tika atsevišķi analizēti attiecībā uz primārajiem un recidivējošiem, kā arī zema riska (virspusēji un nodulāri) un augsta riska (mikronodulāri, infiltratīvi un jaukti) audzējiem. Salīdzinot zema riska un augsta riska BŠK, kas diagnosticētas abiem dzimumiem, statistiski nozīmīgas atšķirības asins seruma D vitamīna līmeņos netika novērotas (3.11. attēls). Tāpat statistiski nozīmīgas atšķirības netika konstatētas, salīdzinot asins seruma D vitamīna līmeņa noteikšanas rezultātus pacientiem ar dažāda veida primārām un recidivējošām BŠK (3.12.A, B attēls).



3.11. attēls. **D vitamīna līmeņa serumā novērtējums vīriešiem un sievietēm ar zema un augsta riska bazālo šūnu karcinomu**

Katrs punkts apzīmē vienu mērījumu. **Saīsinājumi:** 1 – zema riska BŠK; 2 – augsta riska BŠK.



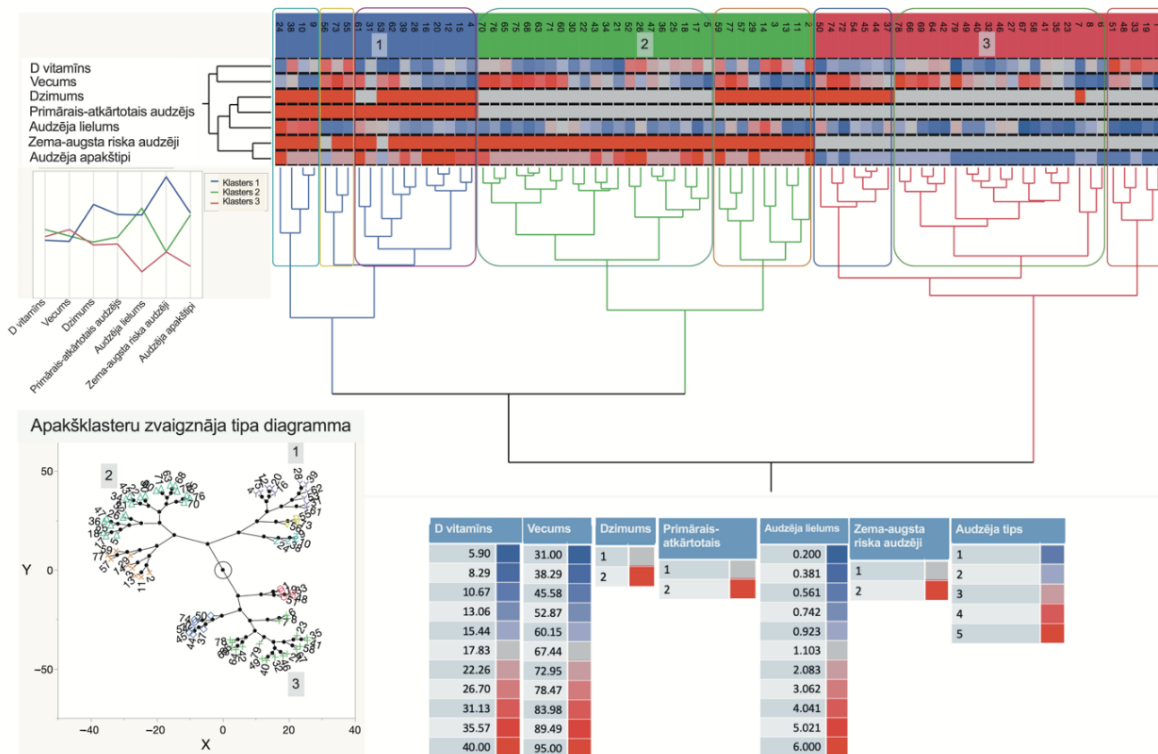
3.12. attēls. **D vitamīna līmeņa serumā novērtējums pacientiem ar dažāda veida bazālo šūnu karcinomu**

(A) Diagrammas, kas attēlo D vitamīna līmeņa noteikšanas rezultātus serumā pacientiem ar dažāda veida BŠK. Katrs punkts apzīmē vienu mērījumu. (B) Elipses diagramma, kas attēlo D vitamīna līmeņa novērtējuma rezultātus serumā ar primārām un recidivējošām BŠK. Katrs punkts apzīmē vienu mērījumu.

Saīsinājumi: (B) 1 – primāras BŠK; 2 – recidivējošas BŠK.

Izmantojot hierarhiskās klasterizācijas metodi, dati tika sadalīti trijās galvenajās kopās; šie rezultāti atainoti 3.13. attēlā demonstrētajā dendrogrammā. Zilo kopu raksturoja vīrieši ar zemu D vitamīna līmeni asins serumā un lielām, galvenokārt augsta riska un recidivējošām BŠK. Savukārt zaļo kopu pārstāvēja gan vīrieši, gan sievietes ar ļoti atšķirīgu D vitamīna līmeni asins serumā un maza izmēra primārām, tomēr augsta riska BŠK. Visbeidzot sarkano kopu veidoja vīrieši un sievietes ar atšķirīgu D vitamīna līmeni asins serumā un maza izmēra primārām un mazāk agresīvām BŠK. Turklāt kopumā negatīva saistība starp audzēja lielumu un D vitamīna līmeni serumā tika pierādīta, izmantojot korelācijas analīzi (3.14.A, B attēls).

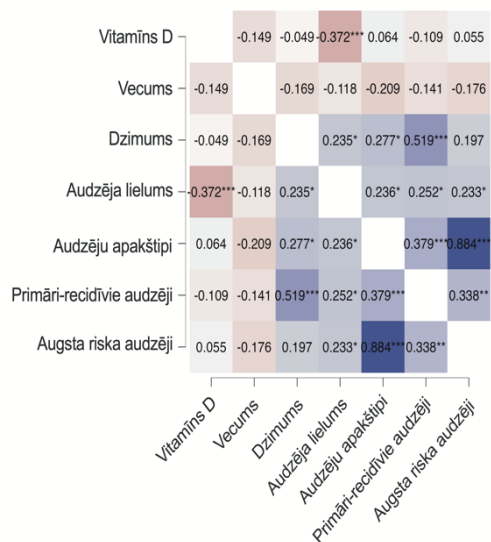
Hierarhiskā klasteru diagramma



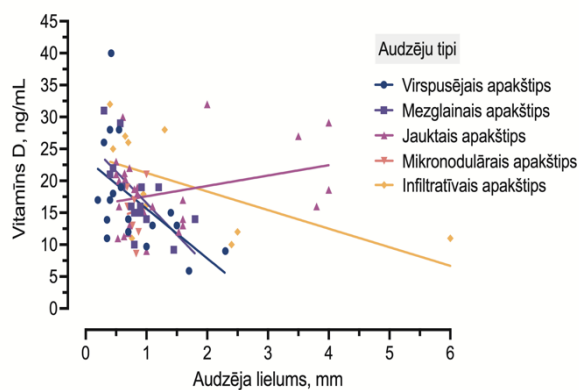
3.13. attēls. **Datu hierarhiskā klasterizācija un galvenās datu kopas**

Izmantojot hierarhisku klasterizāciju, 79 pacientu dati tika prezentēti trijās galvenajās datu kopās ar 2–3 apakšklasteriem. **Saisinājumi:** dzimums: 1 – sievietes, 2 – vīrieši; primāras vs. recidivējošas BŠK: 1 – primāra BŠK, 2 – recidivējoša BŠK; zema un augsta riska BŠK: 1 – zema riska BŠK, 2 – augsta riska BŠK; BŠK veidi: 1 – virspusējās BŠK, 2 – nodulāras BŠK, 3 – jauktas BŠK, 4 – mikronodulāras BŠK, 5 – infiltratīvas BŠK.

A



B



	Audzēja lielums vs. Virspusējais apakštīps	Audzēja lielums vs. Mezglainais apakštīps	Audzēja lielums vs. Jauktais apakštīps	Audzēja lielums vs. Mikronodulārais apakštīps	Audzēja lielums vs. Infiltratīvais apakštīps
Splīmena korel. koeficients, r	-0.5600	-0.7531	0.03099	-0.1071	-0.6560
95% ticamības intervāls	-0.8190 to -0.1114	-0.9159 to -0.3779	-0.3562 to 0.4091		-0.9050 to -0.07226
P vērtība					
P (abpusēja)	0.0156	0.0017	0.8756	0.8397	0.0323
P vērtības novērtējums	*	**	ns	ns	*

3.14. attēls. **Pētīto mainīgo lielumu korelogramma**

(A) Negatīvā saistība ($r = -0,372$) starp audzēja lielumu un D vitamīna līmeni serumā ir atzīmēta ar tumši sarkanu krāsu. (B) Dažādos BŠK veidos tika novērota korelācija starp audzēja lielumu un D vitamīna līmeni asins serumā.

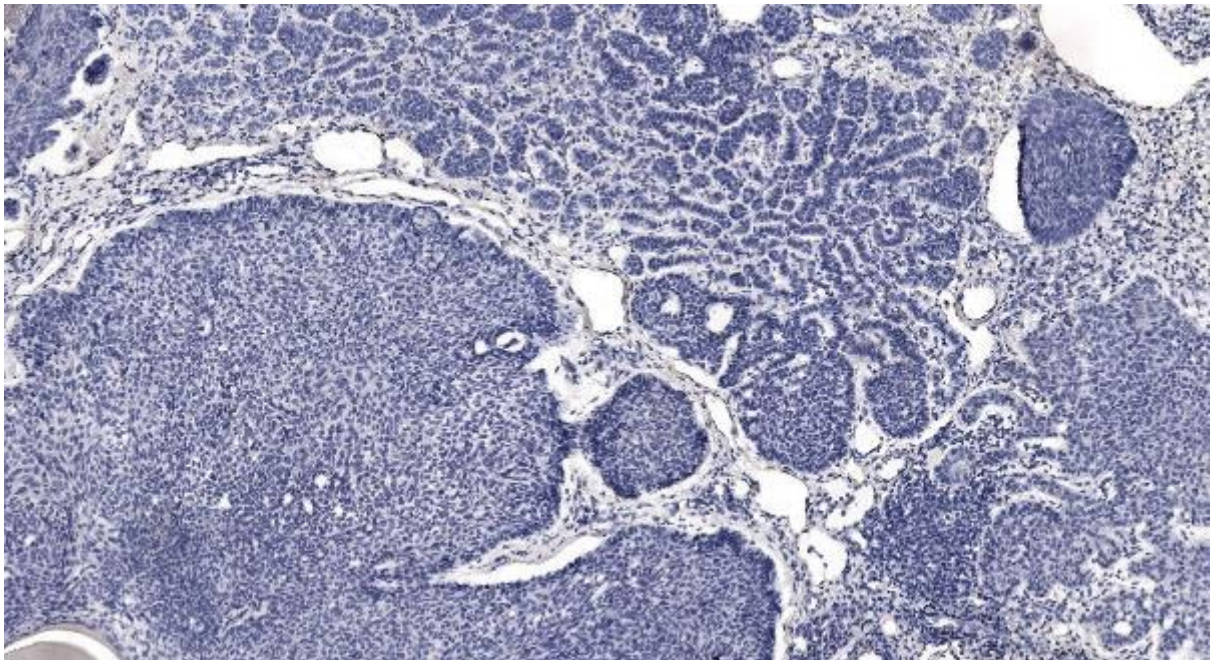
3.6. BŠK audu paraugu histopatoloģija, audzēja marķieru ekspresijas imūnhistoķīmiskā analīze

BŠK šūnu sakopojumi bieži veidoja ligzdas un pavedienus. Audzēja šūnas bija polimorfas, mitozes tika novērotas reti. BŠK mezglus raksturoja perifēra palisadēšanās, artefakta spraugas parādīšanās. Starp audzēja elementiem parasti novēroja miksoīdu stromu.

Virspusējās BŠK gadījumā tika noteiktas neoplastisku šūnu bazaloīdas ligzdas dermoepidermālajā rajonā. Nodulārais tips izskatās kā liela izmēra neoplastisku šūnu mezgli ar raksturīgu šūnu palisadēšanos perifērijā, spraugas izveidi starp mezgla perifēriju un stromu, nekrozes perēkļiem un fokālām cistiskām izmaiņām. Savukārt mikronodulārais tips demonstrēja ziedkāpostam līdzīgu izskatu ar mazāku šūnu palisadēšanos un savienojumu ar epidermu. Infiltratīvajā BŠK tika konstatēti nelieli bazaloīdu šūnu sakopojumi vai pavedieni, kas izaug stromā, iestiepjas starp muskuļu šķiedrām un aug invazīvi perineirāli. Infiltratīva augšana bieži uzrādīja izteiktu stromas kolagenizāciju. Jauktas augšanas BŠK parasti prezentēja noapaļotu un neregulāru audzēja šūnu ligzdu kontūru un šauru pavedienu piejaukumu, kas iestiepjas stromā. Turklāt agresīvajai augšanai bija raksturīga mitotisko figūru un apoptotisko šūnu atlieku klātbūtne.

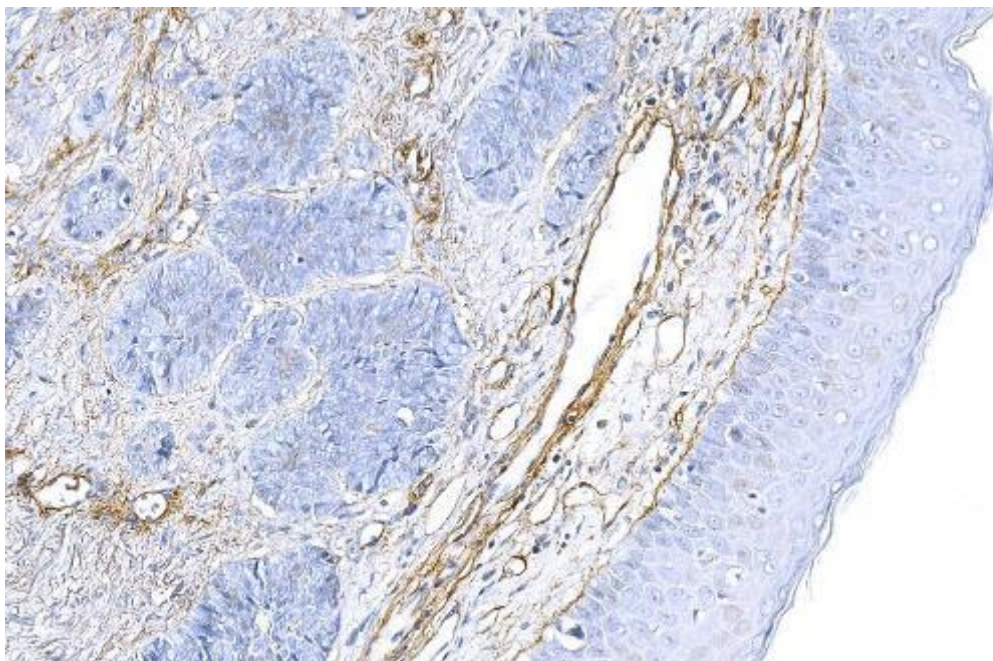
3.6.1. IV tipa kolagēna un laminīna ekspresijas imūnhistoķīmiskā analīze

BŠK marķieru imūnhistoķīmiskā analīze tika uzsākta, nosakot bazālās membrānas (BM) veidojošo molekulu – IV tipa kolagēna un laminīna ekspresiju. Šīs ir galvenās molekulas, kas, izveidojot barjeru, ierobežo audzēja šūnu izplatīšanos. Iezīmējot audzēju masas perifēro kontūru ar antilaminīna (3.15. attēls) un antikolagēna (3.16. attēls) antivielām, noteikts lineārs, bet ļoti atšķirīgs iekrāsošanās veids – gan nepārtraukts, gan pārtraukts, kas apliecināja šo molekulu klātbūtni BM. Infiltratīvajās BŠK bieži tika noteikts pārtraukts vai pat neesošs imūnreakcijas veids. IV tipa kolagēna un laminīna ekspresijas līmeņi bija sadalīti, sākot no zema līdz vidēji augstam un augstam – attiecīgi 60,3, 35,6, 4,1 % un 71,1, 25,2, 3,6 % kolagēnam un laminīnam.



3.15. attēls. Vāja laminīna ekspresija, kas parāda bazālo aspektu gar dažāda izmēra un formas jaukta recidivējoša audzēja mezglu un mikromezglu, ap audzēja mikromezgliem tā gandrīz nav pamanāma

Laminīna imūnhistokīmija, ×200.

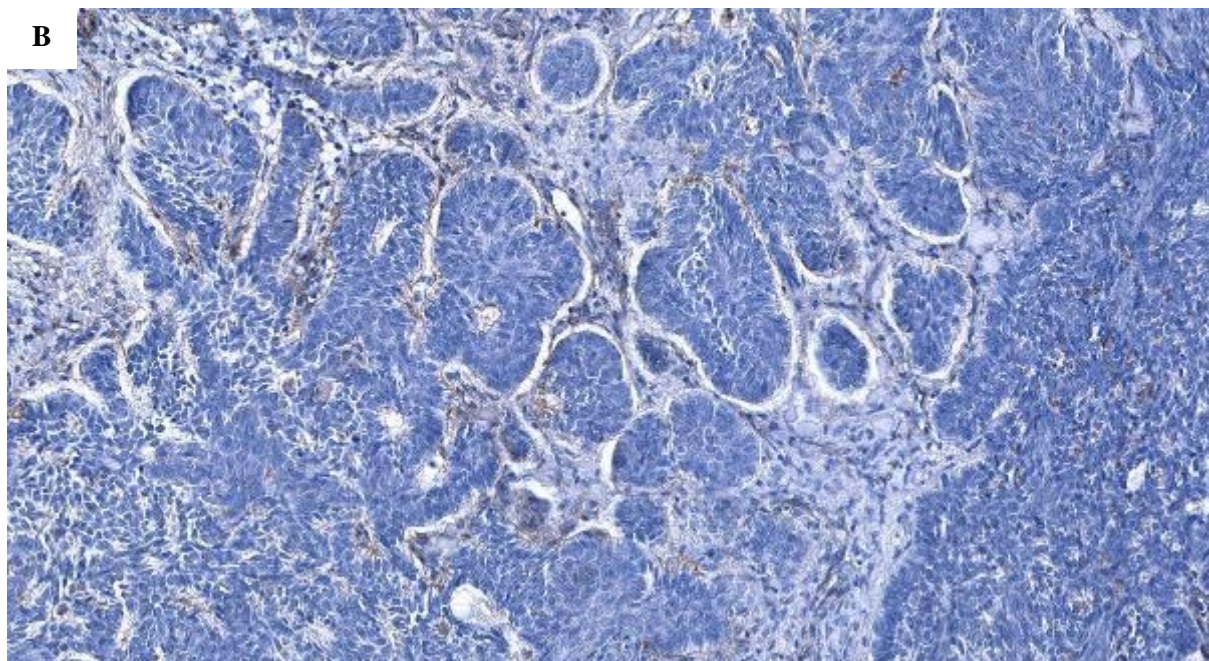
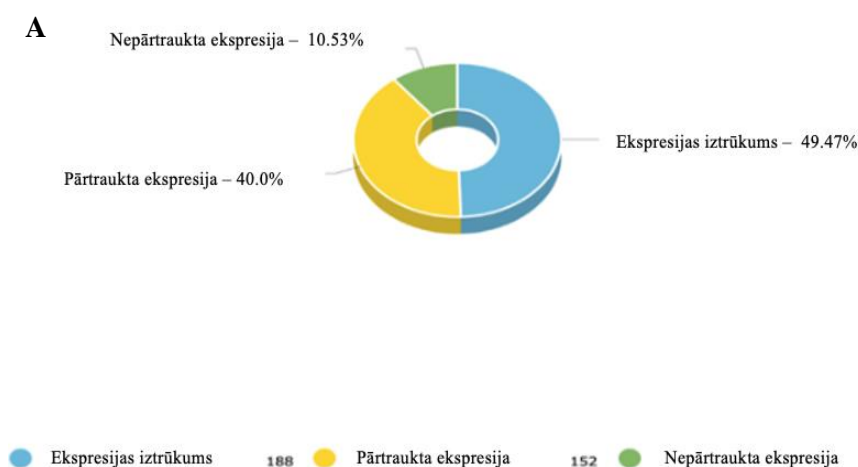


3.16. attēls. Lineārs un gan nepārtraukts, gan pārtraukts kolagēna molekulu imūnkrāsojums, ekspresija brūnā krāsā vērojama virsmas epitēlija BM un stipri nomākta gar audzēja mezgliņu bazālo aspektu, kā arī asinsvadu sienīnās jauktas recidivējošas BŠK gadījumā

IV tipa kolagēna imūnhistokīmija, ×250.

Jauktā tipa BŠK IV tipa kolagēna imūnekspressija bija ļoti dažāda, demonstrējot nepārtrauktu, pārtrauktu un pat pilnīgi iztrūkstošu ekspresiju (3.17.A attēls). Noteikts, ka jauktajai BŠK 49,47 % konstatēja IV tipa kolagēna ekspresijas neesamību, 40 % pārtrauktu imūnkrāsošanu un tikai 10,53 % nepārtrauktu BM imūnkrāsošanu. Jāatzīmē, ka infiltratīvajos

BŠK variantos kolagēna ekspresija nebija sastopama līdz 96 % audzēju. Kolagēna tipa imūnkrašošana tika identificēta kā lineārs rotājums gar audzēja ligzdas bazālo aspektu (3.17.B attēls).



3.17. attēls. **IV tipa kolagēna ekspresija jauktā tipa bazālo šūnu karcinomā**

Panelis (A) parāda kolagēna ekspresijas daudzveidību un tās imūnhistoķīmiskās noteikšanas rezultātu novērtējumu ar statistikas metodi. Panelis (B) lineāra tipa imūnreakcija, kas atspoguļo IV tipa kolagēna lokalizāciju BM *lamina densa* ar nepārtrauktu, bet, aptverot mazus mezgliņus, ar pārtrauktu iezīmējumu vai pat to iztrūkumu. IV tipa kolagēna imūnhistoķīmija, ×200.

3.6.2. *a*-GMA, PDPN un SHh ekspresijas imūnhistoķīmiskā analīze

a-GMA un SHh imūnhistoķīmiskās ekspresijas rezultāti, kas aprēķināti primāriem un recidivējošiem audzējiem un stromai, ir apkopoti 3.7. tabulā, savukārt dažādos pētītajos BŠK histopatoloģiskajos apakštipos – 3.8. tabulā.

***a*-GMA un SHh ekspresijas līmeņu sadalījums primārajās un recidivējošās BŠK**

Diagnoze	Antigēns						
	<i>a</i> -GMA				SHh		
	Lokalizācija	Vāja	Mērena	Izteikta	Vāja	Mērena	Izteikta
Primāra BŠK	Audzējs	627 (58,0 %)	274 (25,3 %)	181 (16,7 %)	347 (33,2 %)	344 (32,9 %)	355 (33,9 %)
Recidivējoša BŠK		195 (60,2 %)	52 (16,0 %)	77 (23,8 %)	96 (30,8 %)	101 (32,5 %)	114 (36,7 %)
Primāra BŠK	Stroma	914 (75,2 %)	216 (17,8 %)	85 (7,0 %)	929 (76,1 %)	223 (18,3 %)	68 (5,6 %)
Recidivējoša BŠK		243 (67,5 %)	60 (16,7 %)	57 (15,8 %)	259 (72,0 %)	67 (18,6 %)	34 (9,4 %)

***a*-GMA un SHh ekspresijas līmeņu sadalījums dažādos BŠK histopatoloģiskajos apakštipos**

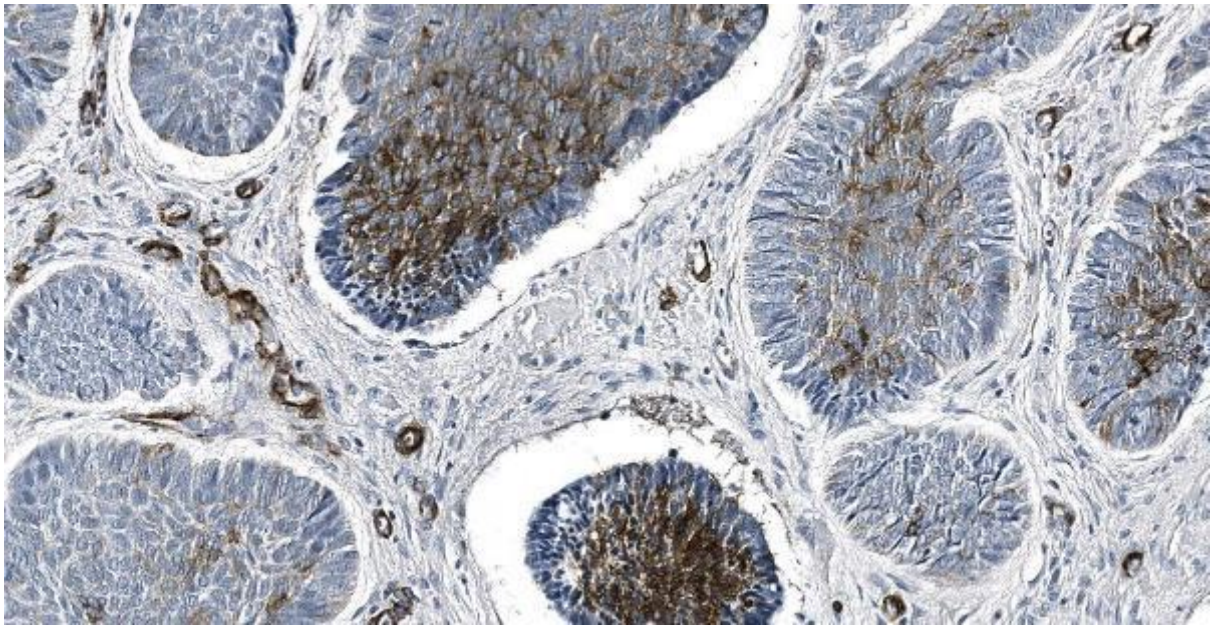
Histopatoloģiskais BŠK tips	Antigēns						
	<i>a</i> -GMA				SHh		
	Lokalizācija	Vāja	Mērena	Izteikta	Vāja	Mērena	Izteikta
Nodulāra BŠK	Audzējs	132 (51,2 %)	69 (26,7 %)	57 (22,1 %)	127 (47,2 %)	86 (32,0 %)	56 (20,8 %)
	Stroma	221 (75,0 %)	55 (18,6 %)	19 (6,4 %)	262 (87,3 %)	36 (12,0 %)	2 (0,7 %)
Mikronodulāra BŠK	Audzējs	75 (59,5 %)	33 (26,2 %)	18 (14,3 %)	53 (41,4 %)	37 (28,9 %)	38 (29,7 %)
	Stroma	100 (71,4 %)	28 (20,0 %)	12 (8,6 %)	103 (73,6 %)	28 (20,0 %)	9 (6,4 %)
Infiltratīva BŠK	Audzējs	92 (49,5 %)	48 (25,8 %)	46 (24,7 %)	39 (22,5 %)	56 (32,4 %)	78 (45,1 %)
	Stroma	120 (60,0 %)	45 (22,5 %)	35 (17,5 %)	135 (67,5 %)	53 (26,5 %)	12 (6,0 %)
Virspusēja BŠK	Audzējs	210 (79,5 %)	43 (16,3 %)	11 (4,2 %)	52 (23,8 %)	83 (38,1 %)	83 (38,1 %)
	Stroma	289 (80,3 %)	55 (15,3 %)	16 (4,4 %)	265 (73,6 %)	61 (16,9 %)	34 (9,4 %)
Jaukta BŠK	Audzējs	313 (54,7 %)	133 (23,3 %)	126 (22,0 %)	172 (30,2 %)	183 (32,2 %)	214 (37,6 %)
	Stroma	427 (73,6 %)	93 (16,0 %)	60 (10,4 %)	423 (72,9 %)	112 (19,3 %)	45 (7,8 %)

Audzēja *a*-GMA līmeņu izteiksme tika sadalīta no vājas līdz mērenai un izteiktai. Vienlaikus mēs apstiprinājām vājo stromas *a*-GMA ekspresijas līmeņu samazināšanos recidivējošā BŠK, salīdzinot ar primāro BŠK, kam sekoja divas reizes augstāki un izteiktāki stromas *a*-GMA ekspresijas līmeņi, kas noteikti recidivējošā BŠK. Salīdzinot *a*-GMA ekspresijas līmeņus pētītajās primārajās un recidivējošās BŠK, mēs noteicam statistiski nozīmīgas atšķirības gan audzēja, gan stromas sadalījumos (attiecīgi $\chi^2 = 16\ 191$; $df = 2$; $p < 0,0001$ un $\chi^2 = 26\ 510$; $df = 2$; $p < 0,0001$).

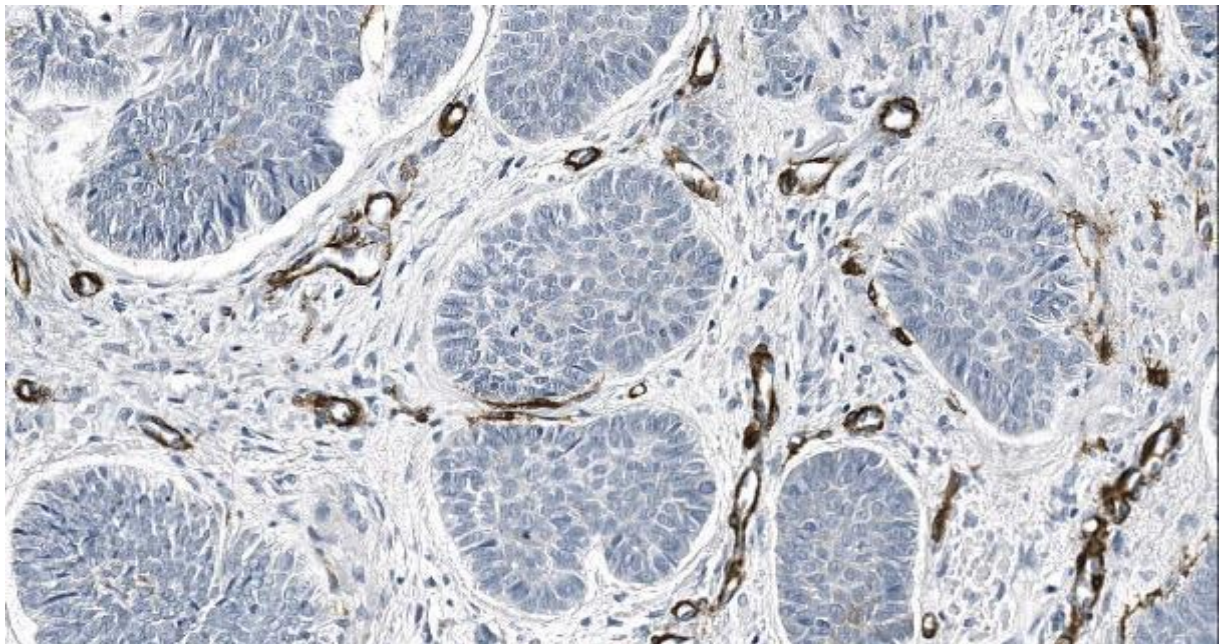
Salīdzinot ar *a*-GMA, audzēja SHh ekspresijas līmeņi bija gandrīz vienādi sadalīti un mainījās no vāja līdz vidēji izteiktam un izteiktam primārajās un recidivējošās BŠK (3.7. tabula). Tāpat kā *a*-GMA novērtējumā, mēs konstatējām izteikta stromas SHh ekspresijas līmeņa paaugstināšanos recidivējošām BŠK. Salīdzinot SHh ekspresijas līmeņus pētītajās primārajās un recidivējošās BŠK, mēs noteicām statistiski nozīmīgas atšķirības, kas bija stromas, bet ne audzēja sadalījumā (attiecīgi $\chi^2 = 7,121$; $df = 2$; $p = 0,028$ un $\chi^2 = 0,915$; $df = 2$; $p = 0,633$).

BŠK audzēja un stromas audos novērtētie SHh līmeņi atšķīrās, salīdzinot ar *a*-GMA līmeņiem. Mēreni un izteikti audzēja SHh ekspresijas līmeņi raksturoja infiltratīvos, virspusējos, jauktos un mikronodulāros apakštipus (3.8. tabula). Vienlaikus stromas SHh līmenis bija trīs reizes zemāks, bet divas reizes augstāks attiecīgi infiltratīvajam un virspusējam apakštipam, salīdzinot ar *a*-GMA līmeni. Salīdzinot SHh ekspresiju pētītajos BŠK apakštipos, mēs atklājām, ka nodulārajā apakštipā noteiktā audzēja ekspresija būtiski atšķīrās, salīdzinot ar visiem citiem apakštipiem, izņemot mikronodulāro – infiltratīvo ($p < 0,0001$), virspusējo ($p < 0,0001$) un jaukto ($p < 0,0001$). Stromas ekspresija, kas noteikta nodulārajā apakštipā, būtiski atšķīrās, salīdzinot ar visiem pārējiem apakštipiem – infiltratīvo ($p < 0,0001$), mikronodulāro ($p = 0,009$), virspusējo ($p < 0,0001$) un jaukto ($p < 0,0001$).

Jāatzīmē, ka viena ceturtdaļa neoplastisko šūnu paraugu, kas demonstrēja infiltratīvo BŠK apakštipu, demonstrēja izteiktu *a*-GMA ekspresiju, savukārt mezglainajā un jauktajā apakštipā tā bija viena piektā daļa audzēja paraugu. Vienlaikus gandrīz viena piektā daļa infiltratīvā apakštipa prezentēja izteiktu stromas *a*-GMA ekspresiju, savukārt jauktajā un mikronodulārajā BŠK apakštipā līdzīgu ekspresiju demonstrēja viena desmitā daļa audzēja paraugu. Virspusējā apakštipā ļoti maz audzēju masas un stromas šūnas demonstrēja izteiktu *a*-GMA ekspresiju. Turklāt, novērtējot *a*-GMA ekspresiju dažādos BŠK histopatoloģiskajos apakštipos, mēs noteicām, ka mezglainā BŠK uzrādīja vāju vai mērenu un reti izteiktu *a*-GMA imūnpozitivitāti audzēja mezglos un pavedienos (3.18. attēls) paralēli ļoti vājai stromas reaktivitātei (3.19. attēls).

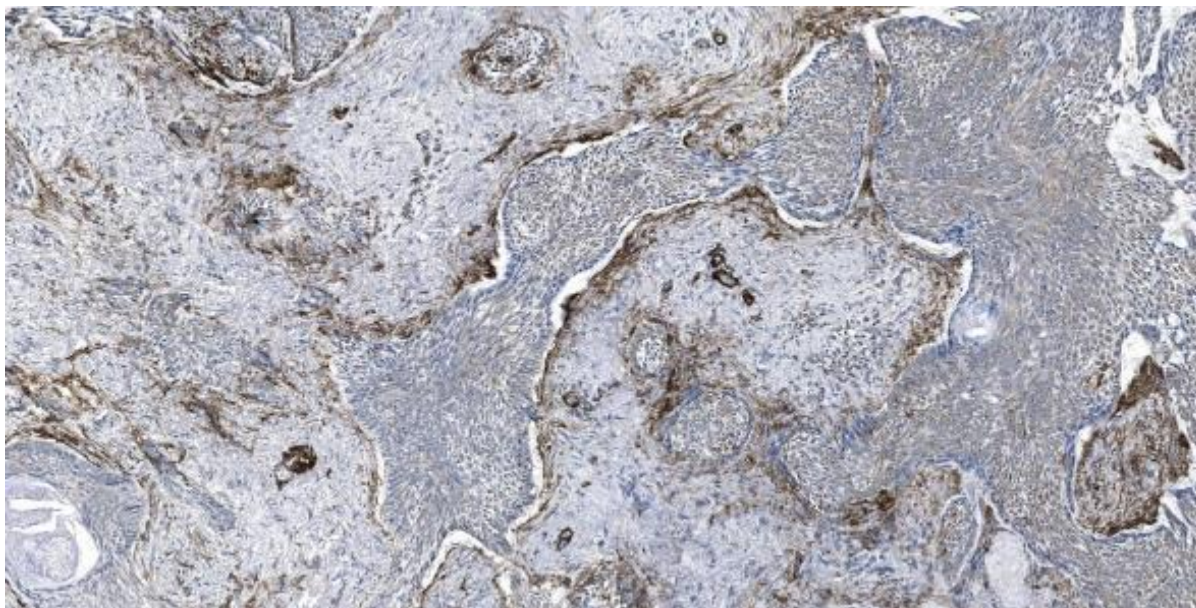


3.18. attēls. Primārās bazālo šūnu karcinomas solidie mezgli uzrāda diezgan difūzu, vāju vai mērenu *a*-GMA pozitivitāti, bet attēla apakšdaļā – spēcīgāku un kompaktāku imūnpozitivitāti. Asinsvadu sieniņas *a*-GMA pozitivitāte parādās miksoīdā stromā, kas ieskauj mezglus
a-GMA imūnhistoķīmija, ×250.

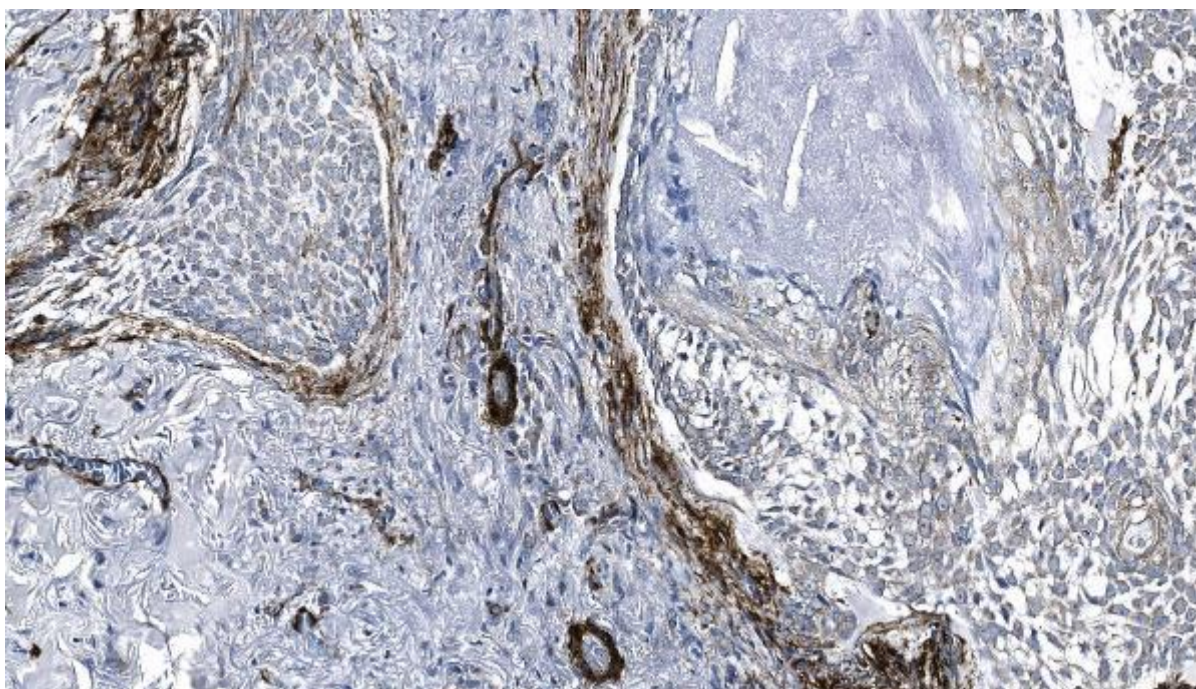


3.19. attēls. *a*-GMA ekspresijas gan audzējā, gan stromā gandrīz iztrūkst; *a*-GMA pozitivitāte noteikta tikai stromas asinsvadu sieniņās
a-GMA imūnhistoķīmija, ×250.

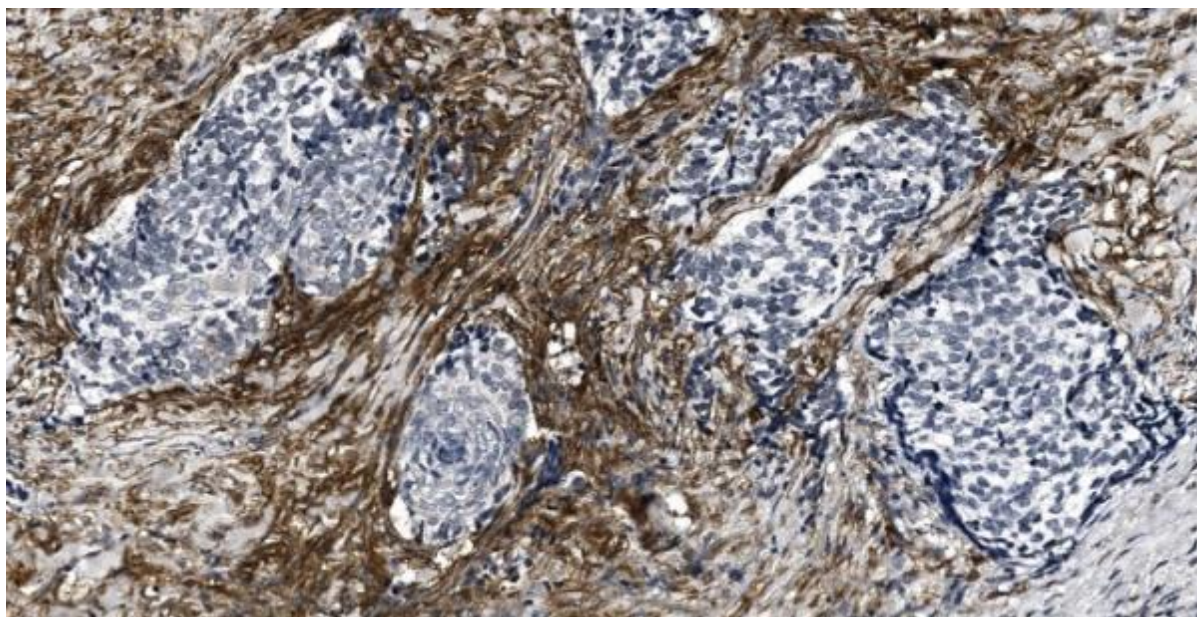
Turpretim mikronodulārais, jauktais un infiltratīvais BŠK apakštips bieži uzrādīja izteiktu, spēcīgu *a*-GMA stromas ekspresiju, kas tika prezentēta vai nu kā difūza, vai peritumorāla (3.20. attēls), kas spēcīgi dekorēja audzēja masas pamatni (3.21. attēls). Difūzās ekspresijas gadījumā dažiem jauktiem audzējiem bija ar aktīvu bagāta stroma, kas aptvēra *a*-GMA negatīvās audzēja nodulārās masas un pavedienus (3.22. attēls).



3.20. attēls. Jauktas recidivējošas bazālo šūnu karcinomas attēls, kas parāda stromas peritumorālo un asinsvadu α -GMA ekspresiju miksoīdā stromā
 α -GMA imūnhistoķīmija, $\times 100$.



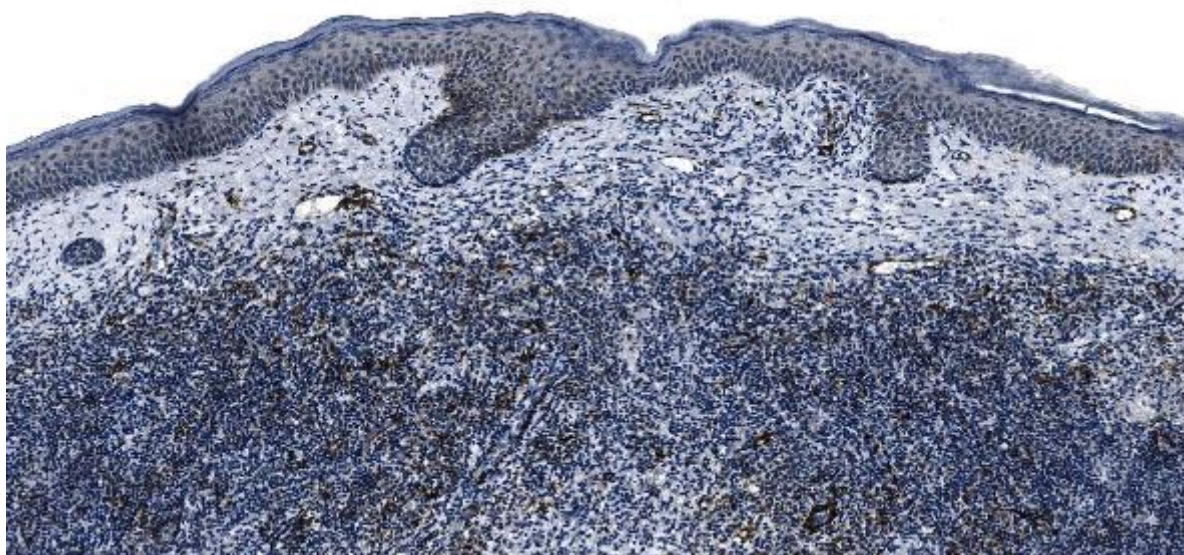
3.21. attēls. Izteikta α -GMA stromālā peritumorālā ekspresija jauktā recidivējošā bazālo šūnu karcinomā; α -GMA pozitivitāte asinsvadu sienās
 α -GMA imūnhistoķīmija, $\times 200$.



3.22. attēls. *a*-GMA negatīvās audzēja ligzdas un jauktas recidivējošas BŠK pavedienus ieskauj ar aktīvu bagāta stroma

a-GMA imūnhistoķīmija, ×200.

Virspusējam apakštipam bija vāja *a*-GMA ekspresija gan audzējā, gan stromā, turklāt pēdējā bieži samazinājās zonās ar iekaisuma infiltrāciju (3.23. attēls).



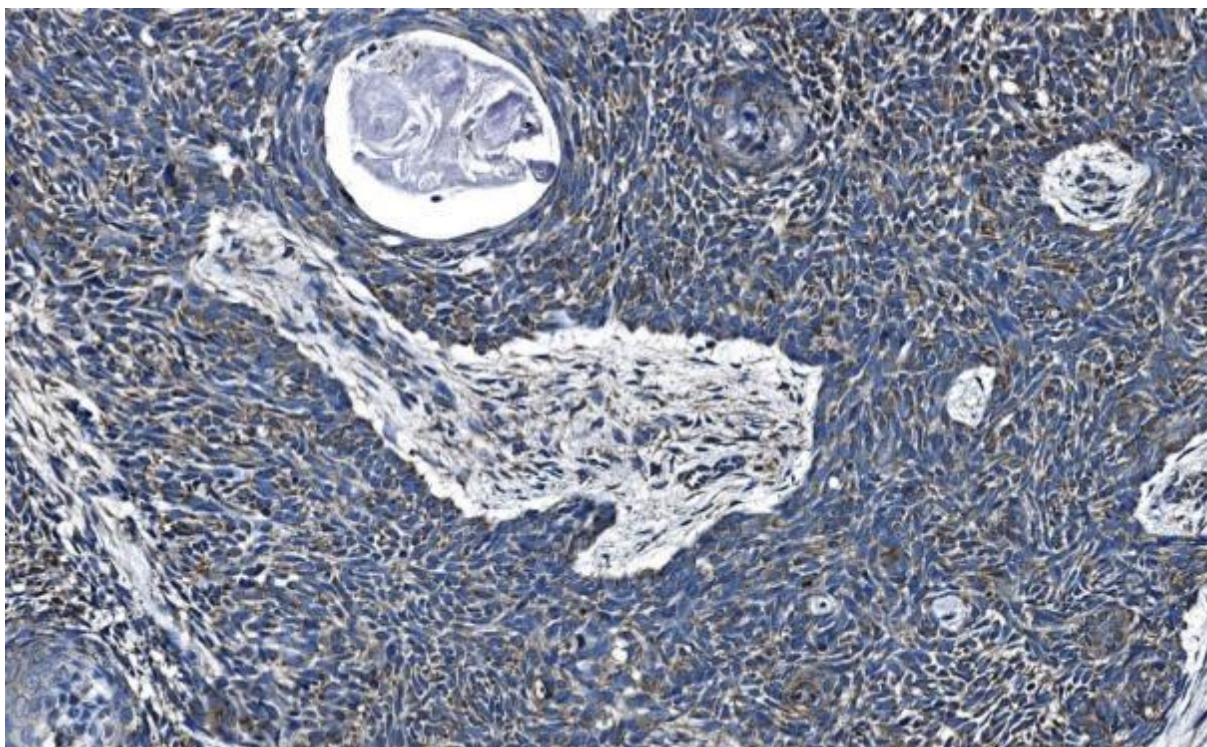
3.23. attēls. Vāja *a*-GMA audzēja ekspresija, kas novērota primārajā virspusējā bazālo šūnu karcinomā; stroma ir infiltrēta ar iekaisuma šūnām, *a*-GMA pozitīvāte asinsvadu sienās

a-GMA imūnhistoķīmija, ×100.

Salīdzinot *a*-GMA ekspresiju BŠK apakštipos, noteicām, ka audzēja ekspresija, kas ir virspusējā apakštipā, būtiski atšķiras, salīdzinot ar visiem pārējiem apakštipiem – nodulārajiem ($p < 0,0001$), mikronodulārajiem ($p = 0,003$), infiltratīvajiem ($p < 0,0001$) un jaukto

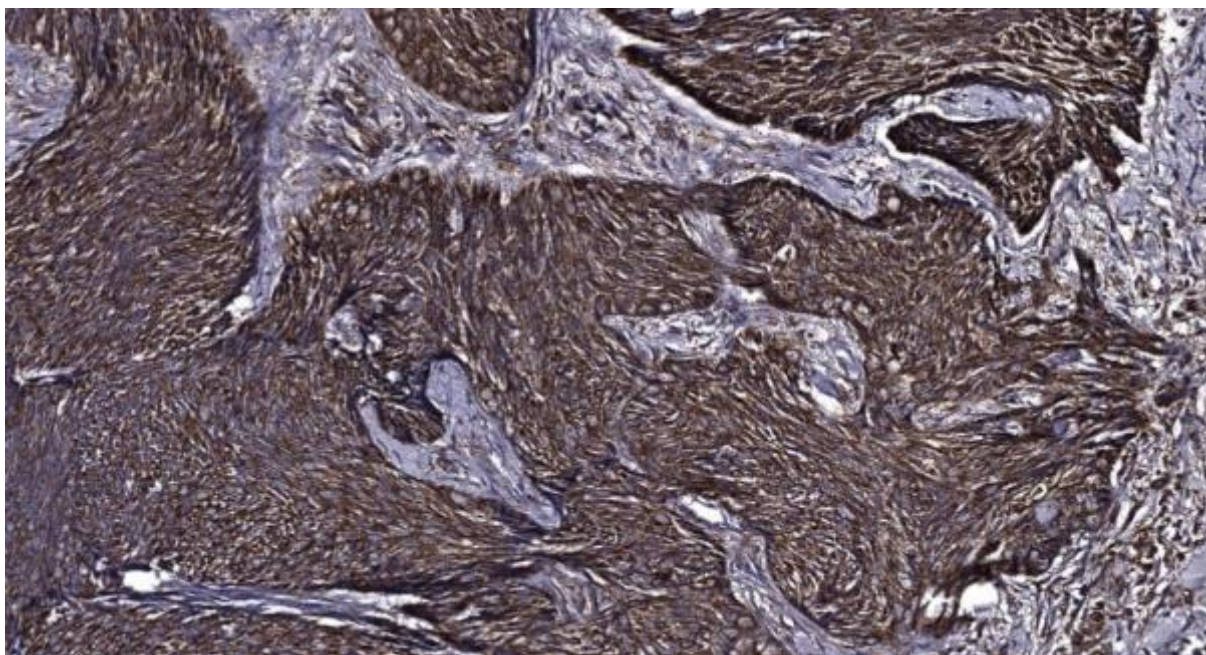
($p < 0,0001$). Tāpat arī infiltratīvajā apakštipā stromas ekspresija būtiski atšķīrās, salīdzinot ar visiem pārējiem apakštipiem – nodulāro ($p < 0,0001$), mikronodulāro ($p = 0,036$), virspusējo ($p < 0,0001$) un jaukto ($p < 0,001$).

Tāpat kā α -GMA ekspresija, nodulāras audzēju masas un stroma pārsvarā uzrādīja vāju SHh imūnpozitivitāti (3.24. attēls). Jāatzīmē, ka gandrīz puse infiltratīvo BŠK uzrādīja spēcīgu SHh ekspresiju neoplastiskajos izaugumos un pavedienos (3.25. attēls). Līdzīga imūnreakcija tika noteikta kādai trešdaļai jaukto, mikronodulāro un virspusējo BŠK, bet pārējās – mērenu vai spēcīgu SHh ekspresiju. SHh stromas ekspresija bija mērena vai izteikta (3.26. un 3.27. attēls).



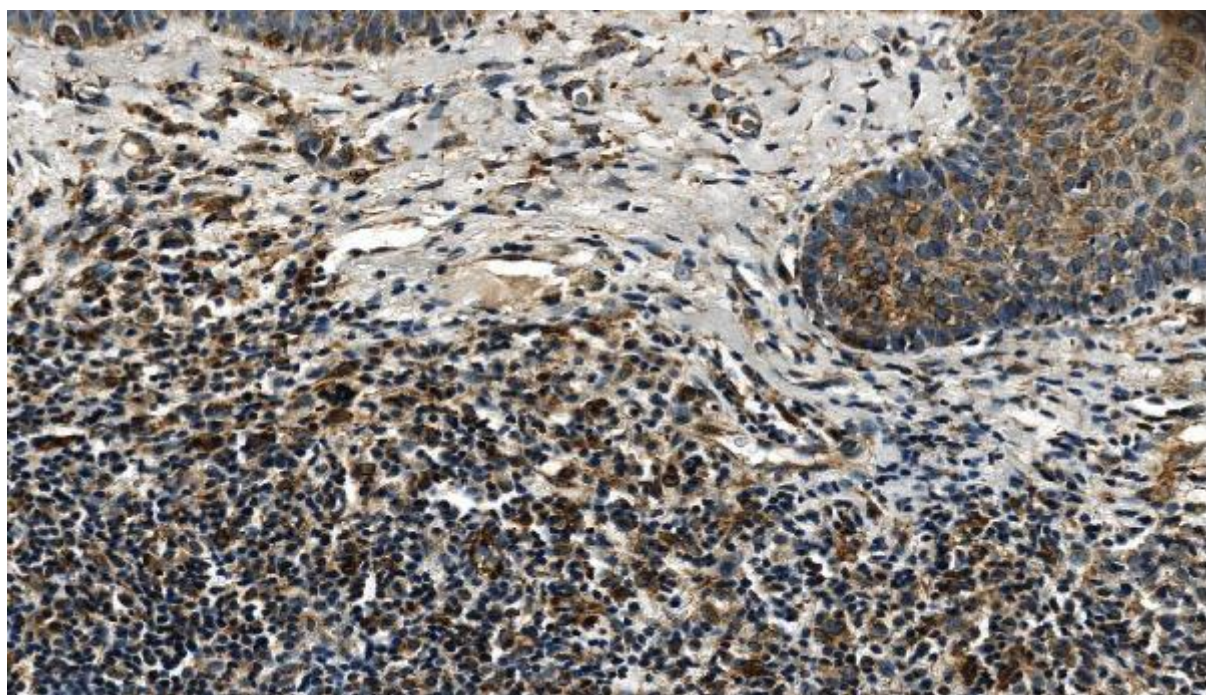
3.24. attēls. **Nodulāras bazālo šūnu karcinomas masas un audzēja stroma ar vāju SHh ekspresiju**

SHh imūnhistoķīmija, $\times 250$.



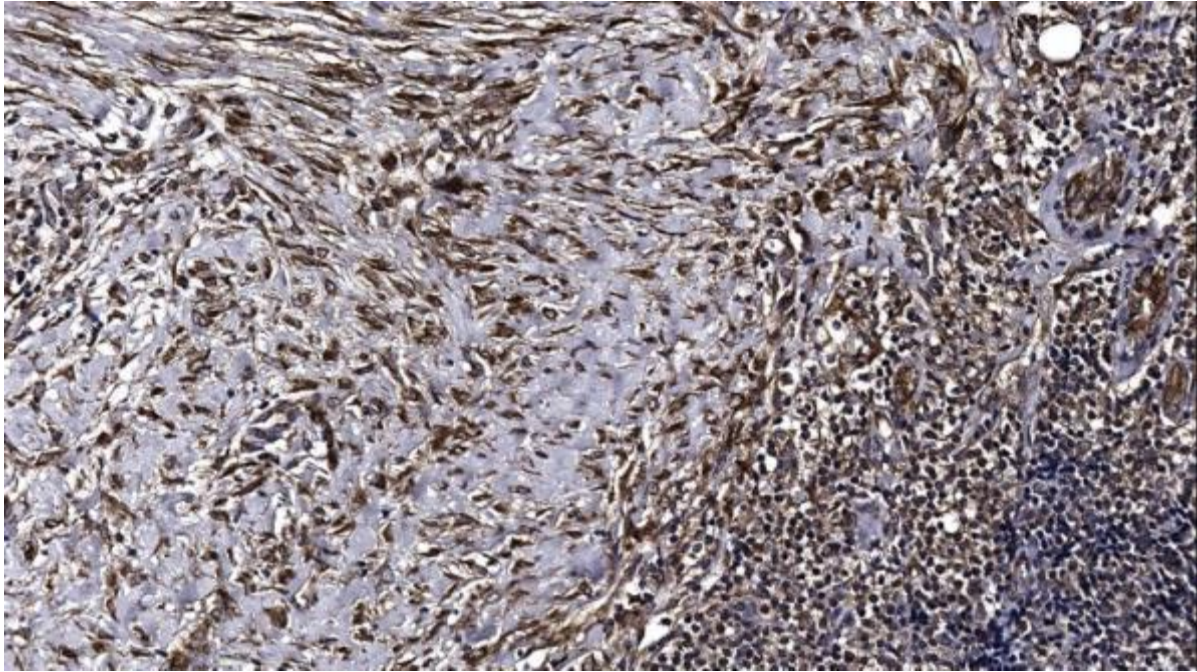
3.25. attēls. Jauktā primārā bazālo šūnu karcinoma parāda neregulārus audzēja pavedienus ar izteiktu SHh ekspresiju; audzēja stromā arī ekspresē SHh

SHh imūnhistokīmija, $\times 200$.



3.26. attēls. SHh ekspresija audzējā kopā ar vāju vai mērenu ekspresiju stromā, kas novērota primārajā virspusējā bazālo šūnu karcinomā; izteikta stromas infiltrācija

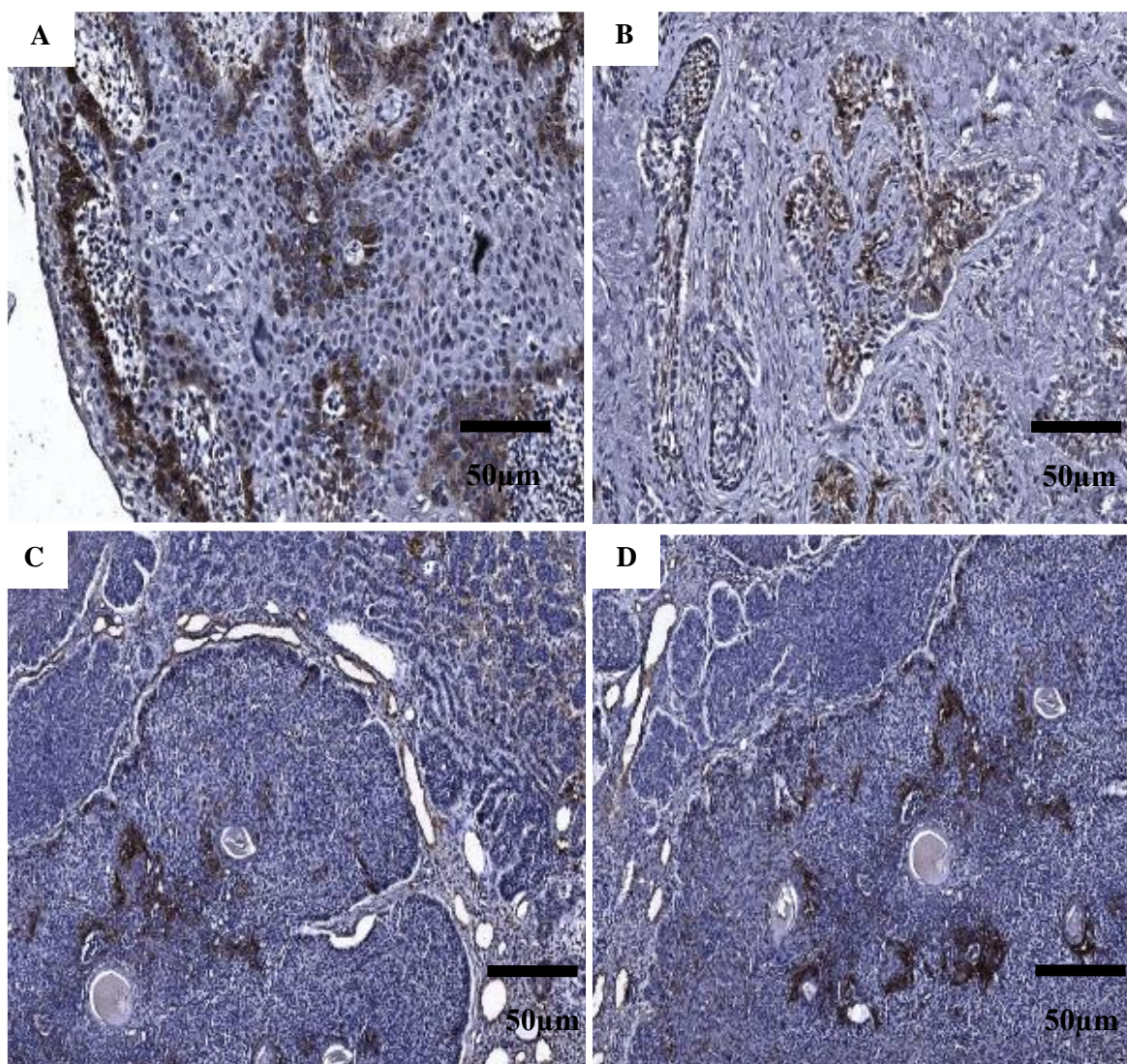
SHh imūnhistokīmija, $\times 250$.



3.27. attēls. **Difūza, regulāra, mērena līdz izteikta stromas SHh ekspresija primārajā virspusējā bazālo šūnu karcinomā**

SHh imūnhistokīmija, ×200.

Analizējot podoplanīna (PDPN) marķiera ekspresiju BŠK, tika noteikts, ka daži audzēji neekspresēja vai vāji ekspresēja PDPN (3.28.B, C, D attēls). Savukārt citi BŠK ekspresēja PDPN bazālajā daļā (3.28.A attēls).



3.28. attēls. Podoplanīna ekspresija audzējā un stromā

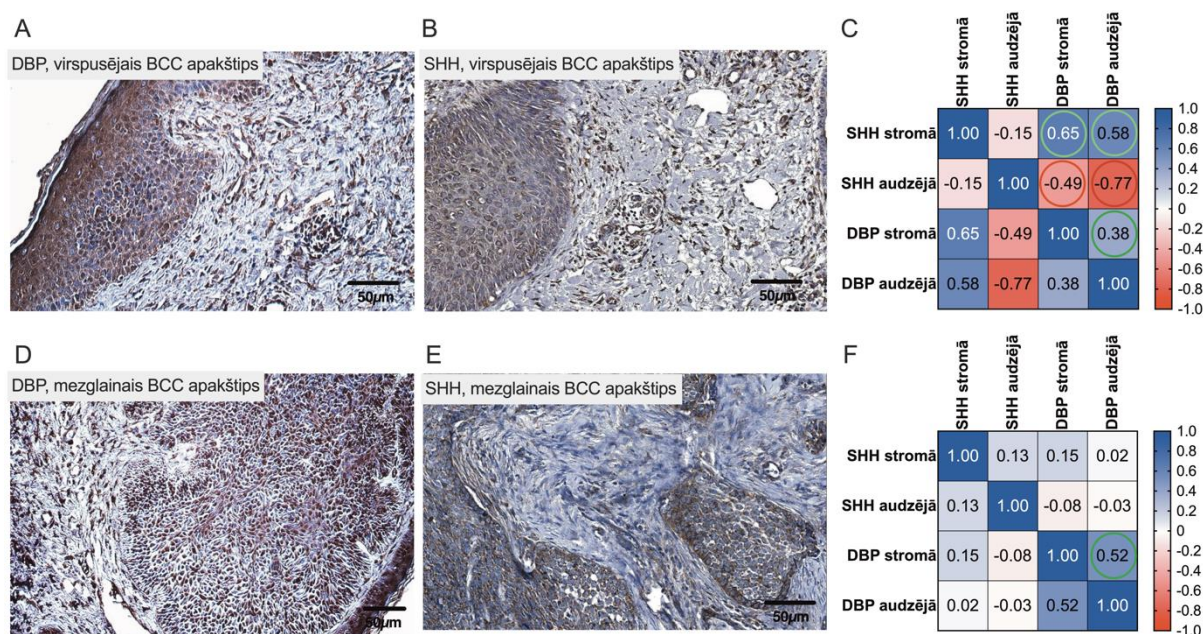
(A) Neregulāras formas audzēja mezgli, kas iesaistīti primārā BŠK gadījumā. Vairākas audzēja šūnas bazālajā daļā ekspresē PDPN, $\times 200$. (B) Audzēja šūnu pavedieni jauktas recidivējošās BŠK gadījumā uzrāda PDPN imūnpozitivitāti, savukārt daži – tās iztrūkumu, $\times 200$. (C, D) Jaukta tipa BŠK raksturo gan lieli mezgli, gan mikronodulārā struktūra. Noteikta izteikta perēkļveida PDPN ekspresija, kā arī mazāk izteikta gar audzēja bazālo membrānu; mikronodulārās struktūras ļoti vāji ekspresē PDPN, $\times 100$.

3.6.3. DVP un SHh korelatīvā imūnhistoķīmiskā analīze zema un augsta riska BŠK

Lai labāk izprastu D vitamīna potenciālo aizsargājošo darbību BŠK attīstības gadījumā, DVP ekspresija tika imūnhistoķīmiski noteikta zema un augsta riska audzējos un korelēta ar SHh ekspresiju tajos. DVP un SHh marķieru korelācijas analīze tika veikta atsevišķi dažādiem BŠK tipiem. Ādas DVP un SHh ekspresiju novērtējumi, kas novēroti zema un augsta riska BŠK, izmantojot imūnhistoķīmijas metodes un korelācijas analīzi, ir attēloti un apkopoti 3.29. un 3.30. attēlā. Virspusējā BŠK galvenokārt tika noteikta mērena abu audu marķieru ekspresija (3.29.A un B attēls). Turklāt virspusējā BŠK tika konstatēta spēcīga negatīva korelācija starp SHh un DVP ekspresiju gan audzējā ($r = -0,77$), gan stromā ($r = -0,49$) (3.29.C attēls).

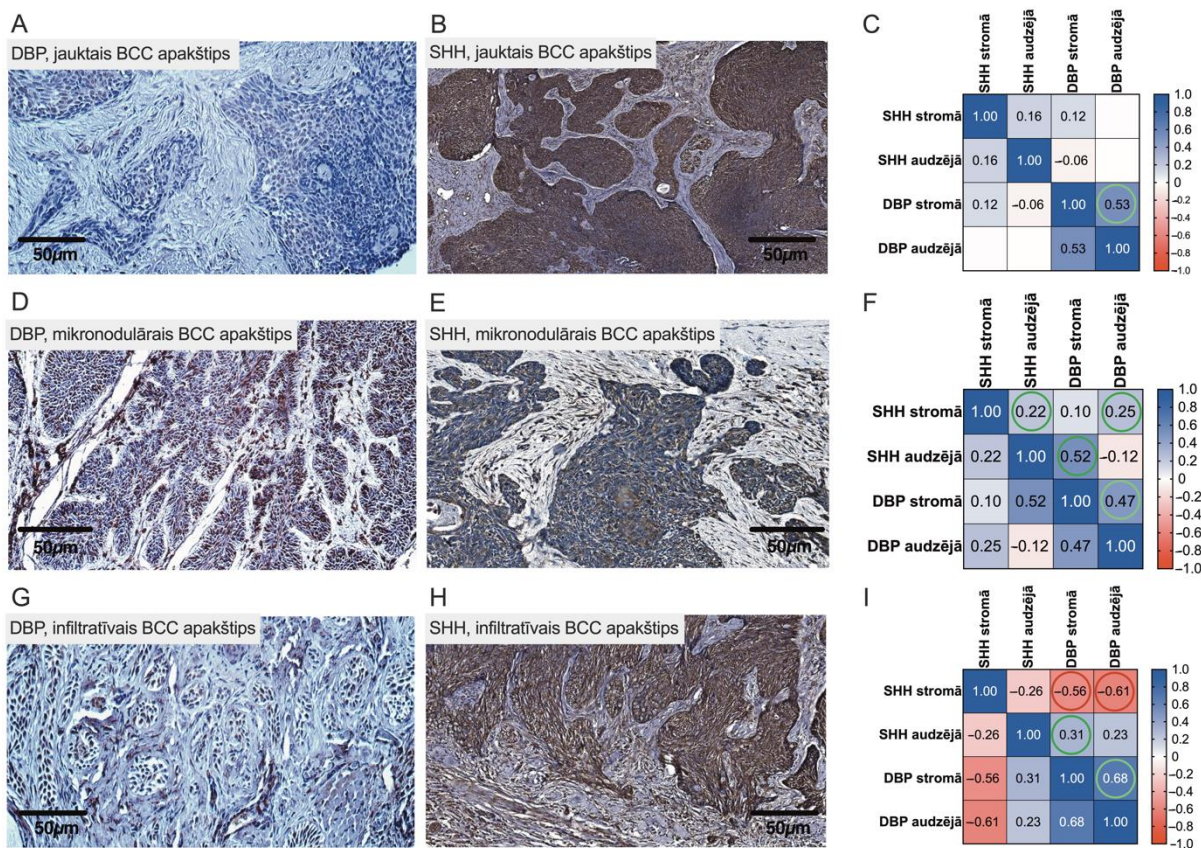
Jāatzīmē, ka vāja DVP ekspresija parasti tika demonstrēta audzēja mezglu perifērajās šūnās ar trūcīgu citoplazmu, kas demonstrēja tipisku palisadēšanos. Turpretim diferencētās audzēja šūnās tika konstatēta mērena vai spēcīga DVP ekspresija (3.29.D attēls). Vienlaikus vāja SHh ekspresija tika demonstrēta mezglainās BŠK struktūrās (3.29.E attēls). Mezglainajā BŠK DVP marķierim tika noteikta korelācija starp paša audzēja un stromas ekspresiju (3.29.F attēls).

Kopumā izteiktāka SHh ekspresija tika novērota audzēja šūnās ar zemu DVP ekspresiju, un otrādi (3.30.A un B, D un E, G un H attēls). Gan infiltratīvajās, gan jauktajās BŠK tika konstatēta augsta SHh ekspresija audzēja pavedienos, kā arī mazās neregulārās audzēja šūnu grupiņās pavedieni, kas iestiepjas stromā (3.30.B un H attēls). Raksturīgi, ka augsta riska infiltratīvās BŠK, bieži ar trūcīgu citoplazmu, bija ar vāji izteiktu DVP (3.30.G attēls). Novērtējot augsta riska BŠK, tika noteiktas korelācijas starp abiem – DVP un SHh – marķieriem audzējā un stromā (3.30.C un F attēls). Infiltratīvajā BŠK tika konstatēta negatīva korelācija starp DVP un SHh stromālo ekspresiju ($r = -0,56$) (3.30.I attēls).



3.29. attēls. Ādas DVP un SHh ekspresijas novērtējums zema riska bazālo šūnu karcinomās, izmantojot imūnhistokīmijas metodi

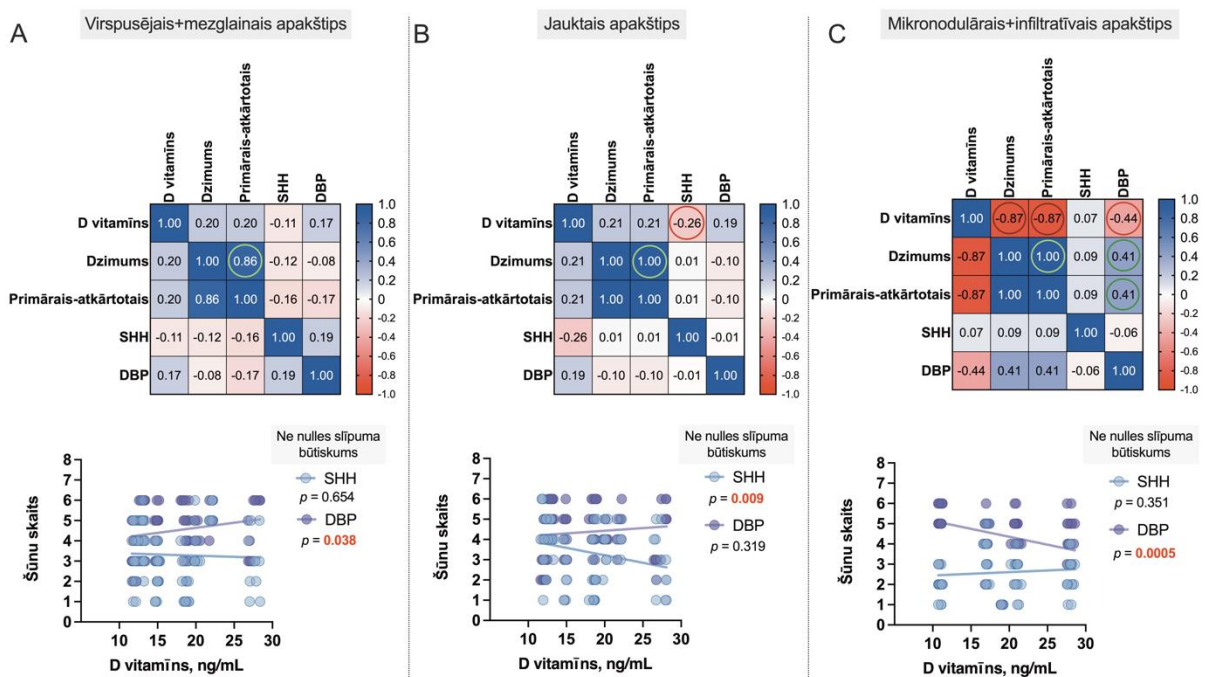
Bazālo šūnu karcinomu paraugu attēli, kas demonstrē audzēja (*) un tā stromas (□) struktūras, iezīmētas ar anti-DVP (A un D) un anti-SHh (B un E) antivielām. Mērogs: 50 μm. Korelogrammas, kas izceļ asociācijas starp DVP un SHh ekspresiju virsupusējās (C) un mezglainās (F) BŠK. Spēcīgas negatīvas korelācijas starp SHh un DVP ir apzīmētas ar sarkanu krāsu (C).



3.30. attēls. Ādas DVP un SHh ekspresijas novērtējums augsta riska bazālo šūnu karcinomās, izmantojot imūnhistoķīmijas metodes

BŠK paraugu attēli, kas demonstrē audzēja un tā stromas struktūras, iezīmētas ar anti-DVP (**A, D, G**) un anti-SHh (**B, E, H**) antivielām. Mērogs: 50 μm. Korelogrammas, kas izceļ asociācijas starp DVP un SHh ekspresiju jauktās (**C**), mikronodulārajās (**F**) un infiltratīvajās (**I**) BŠK. Negatīvās korelācijas starp SHh un DVP ir atzīmētas ar sarkanu krāsu (**I**).

Visbeidzot, lai labāk novērtētu sarežģītās asociācijas starp asins seruma D vitamīna līmeni, kas konstatētas Latvijas pacientu grupā ar dažāda veida BŠK un DVP, un SHh ādas audu ekspresiju, ko apstiprināja IHĶ lietošana šīm personām, tika veikta Spīrmēna korelācijas analīze (3.31.A–C attēls). Līdzīgi rezultātiem, kas iegūti un interpretēti, aprakstot dendrogrammu (3.13. attēls), šajā novērtējumā vīriešu dzimuma pacientiem D vitamīna līmenis asins serumā bija zemāks nekā sievietēm, kā arī attīstījās augsta riska ($r = -0,87$) un recidivējošie ($r = -0,87$) BŠK audzēji.



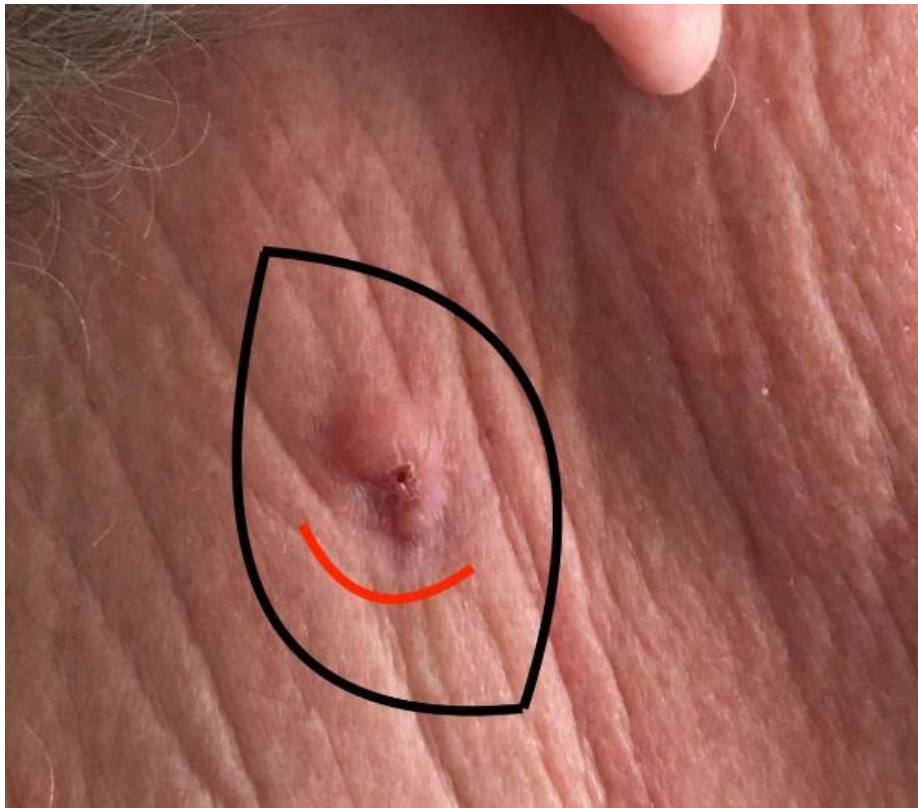
3.31. attēls. Pētīto mainīgo lielumu korelogrammas

Korelogrammas attēlo sarežģītās asociācijas starp asins seruma D vitamīna līmeni, kas noteikts 79 pacientiem ar dažādiem BŠK veidiem, un DVP un SHH ādas audu ekspresiju, ko apstiprina IHĶ lietošana šīm personām. Katrs punkts apzīmē vienu mērījumu. Ekspresijas līmeņi tiek novērtēti kā BŠK audzēja un tā stromas audu indeksu summa. Šajos grafikos korelācijas koeficienti ir iekrāsoti atbilstoši vērtībai. Pozitīvās korelācijas ir parādītas zilā krāsā, bet negatīvās korelācijas ir sarkanā krāsā. Krāsu intensitāte ir proporcionāla korelācijas koeficientiem.

3.7. Bazālo šūnu karcinomas ķirurģiskā ārstēšana

Pētījuma ietvaros promocijas darba autore piedalījās vairākās operācijās, kurās bija nepieciešama rekonstruktīvās ķirurģijas speciālista klātbūtne, jo konvencionālā ekscīzijas biopsijas lietošana vairs nebija iespējama. Jāsaka, lielākoties tā bija nepieciešama jaukta tipa BŠK un agresīvi noritošajā audzēja gadījumos. Tas, cik liels operācijas apjoms un cik daudzu speciālistu iesaiste nepieciešama, liek secināt, ka BŠK audzēju bez padziļinātas dermatoskopiskās diagnostikas un histoloģiskās audzēja tipa precizēšanas nedrīkst ārstēt mazinvasīvi, lai nepieļautu BŠK recidīvu.

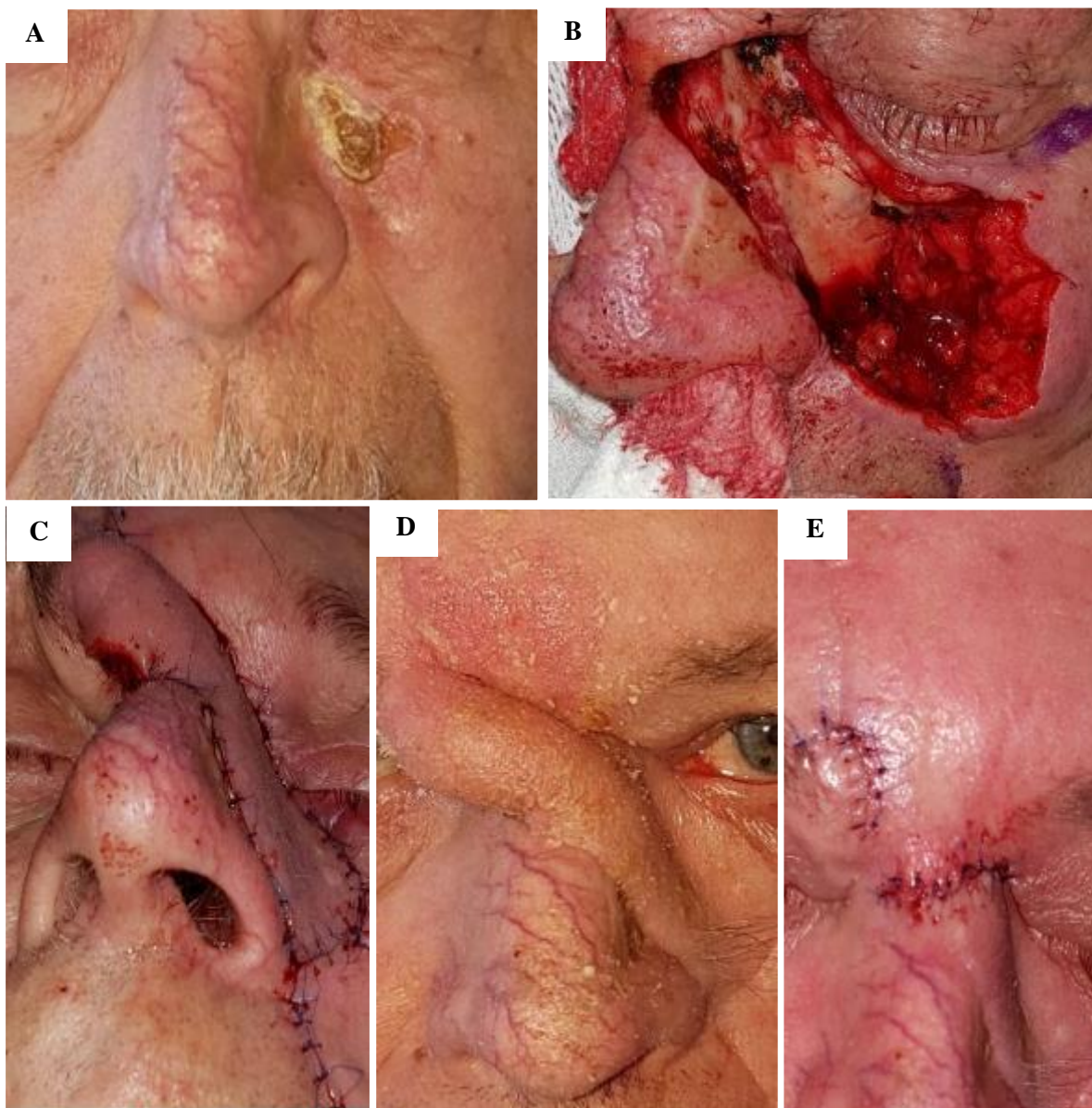
Laikus diagnosticētas nelielas BŠK tiek izoperētas bez liela kosmētiska defekta, lietojot vienkāršu elipsveida ekscīziju ar atkāpi veselajos audos. Novērots, ka kakla ādas BŠK (3.32. attēls) ārstēšanai izmēra dēļ iespējams lietot vienkāršotu (bez plastikas) ķirurģiskās ārstēšanas veidu ar elipsveida griezienu (melna līnija). Tomēr, lai gan audzējs ir nodulārs un labi norobežots, tam apakšpolā var novērot audu ievilkumu (virs sarkanās līnijas), kas jāņem vērā atkāpes gadījumā, un vēlams noteikt dermatoskopiskās, nevis tikai klīniskās, veidojuma robežas, lai izvairītos no audzēja recidīva.



3.32. attēls. **Ķirurģiskās ekscīzijas elipsveida griezuma tehnika**

Pacients operēts *Dr. med. A. Ivanovas* vadībā, asistējot *dr. J. Moisejenko-Golubovičai* pētījuma ietvaros.

Sarežģītos gadījumos, kad rodas aizdomas par audzēja vairākkārtējo recidivēšanos vai strauji augošu agresīva tipa BŠK, nepieciešama multidisciplināra komanda, piesaistot mikroķirurgus, lai veiktu audu rekonstrukciju (3.33.A, B, C, D, E attēls). Taču šīs operācijas prasa ilgu rehabilitācijas periodu, lielas izmaksas un estētiskais rezultāts var negatīvi ietekmēt cilvēka dzīves kvalitāti.



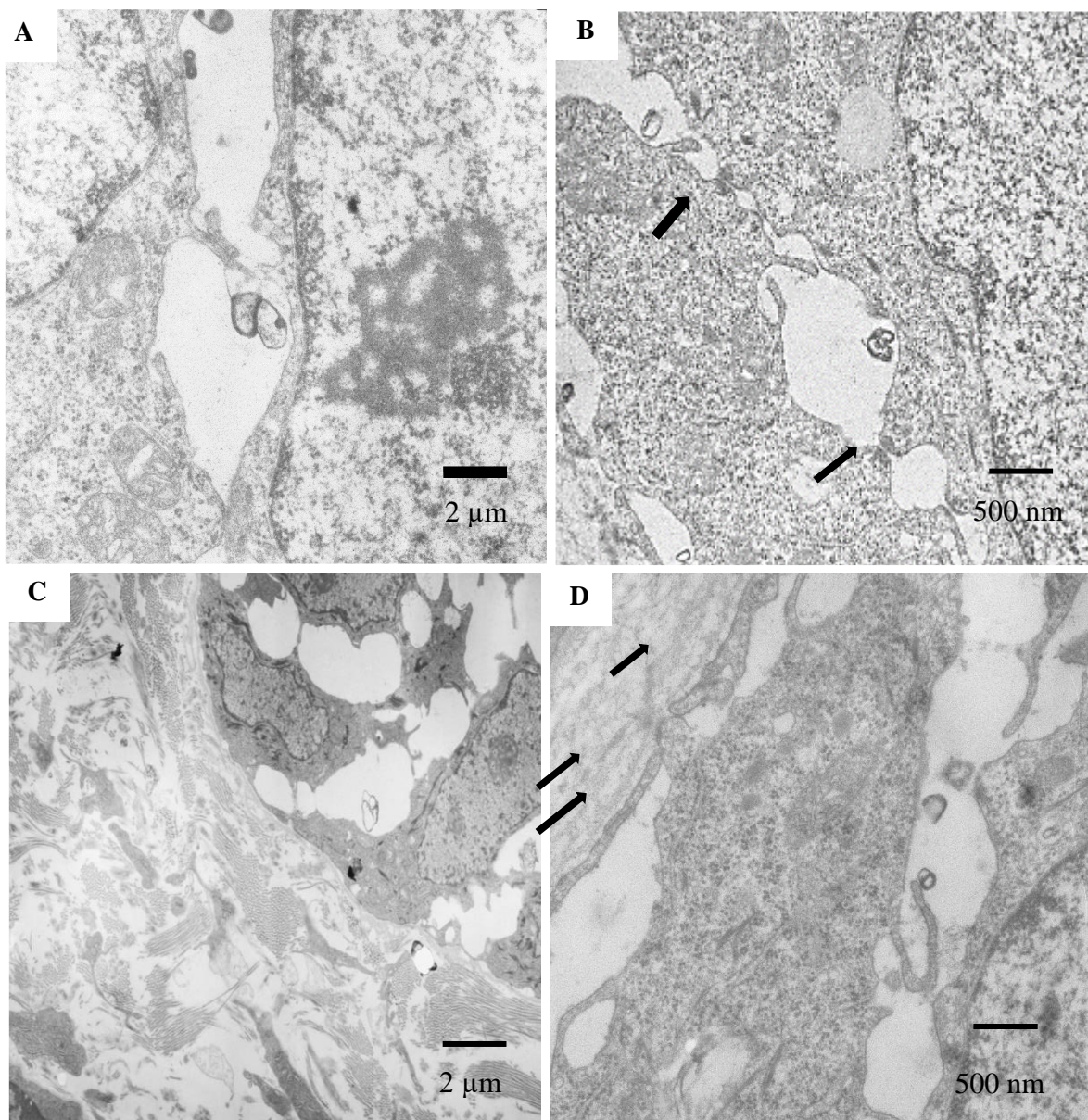
3.33. attēls. Recidivējošas bazālo šūnu karcinomas operatīvās ārstēšanas etapi

Anamnēzē no 2004. gada veikta viena ķirurģiskā ārstēšana Latvijas Onkoloģijas centrā pieredzējušu ķirurgu vadībā un divi staru terapijas kursi (pēdējais 2012. gadā). Lokāls recidīvs 2016. gadā (4. recidīva epizode). Ņemot vērā agresīvas recidivējošas BŠK uzvedību, tika izmantota plaša operatīva ārstēšana ar rekonstruktīvām metodēm. Operācija norisinājās divos etapos, piedaloties *Dr. med. A. Ivanovai*, *Dr. med. K. Pastaram*, *Dr. med. J. Zariņam*, dr. J. Moisejenko-Golubovičai pirmajā etapā un otrajā etapā *Dr. med. K. Pastaram*, *Dr. med. J. Zariņam*. Histoloģiski apstiprināta solīdas uzbūves BŠK pēcoperācijas periodā, taču, pētot padziļināti, pētījuma gaitā audzējs kvalificēts kā solīdi adenoīda tipa BŠK.

Neskatoties uz tik plašām atkāpēm, izmantotiem lēveriem un histoloģisku slēdzienu par tūrām rezekcijas līnijām, tika novēroti septiņu recidīva gadījumi divu gadu laikā pēc pilnas ķirurģiskās ekscīzijas. Jāatzīmē, ka mēs vēl joprojām ikdienas praksē saskaramies ar audzēja lokālu recidivēšanu, tādēļ jebkurš BŠK galvas un kakla rajonā jāuztver kā potenciāli agresīvs audzējs. Pacientiem ar diagnosticētu ādas vēzi atkarībā no tā veida rekomendēta obligāta un regulāra dermatoskopiskā veidojumu kontrole.

3.8. BŠK uzbūves ultrastrukturālā analīze

Visbeidzot, lai labāk novērtētu audzēja arhitektūru šūnu līmenī, tā tika analizēta, izmantojot EM. BŠK šūnas raksturoja neregulāra forma, starpšūnu telpas bija izteikti paplašinātas. Tika noteikts arī šūnu savienojumu zudums, saglabāti tikai primitīvi savienojumi (3.34.A, B, C attēls). Audzēja šūnas citoplazmā tonofilamenti tika novēroti reti, un to kūlīši bija mazi. Šūnu citoplazmā novēroti arī atsevišķi neliela izmēra mitohondriji ar gaišām un nedaudz vakuolizētām kristām, brīvās ribosomas. Šūnas kodola forma bija ieapaļa, reizēm neregulāra, bieži tika noteikti kodoliņi. BM izmaiņas ietvēra multilamināciju, šķelšanos un integritātes zudumu ar *lamina densa* pārtraukumu parādīšanos (3.34.D attēls).



3.34. attēls. **Audzēju šūnu un stromas ultrastruktūras izmaiņas jauktas bazālo šūnas karcinomas gadījumā**

(A, B) Divu audzēja šūnu fragmenti, redzamas paplašinātas starpšūnu telpas; saglabāti tikai primitīvi šūnu kontakti (bultiņas). Citoplazmā nelieli mitohondriji, brīvās ribosomas, atsevišķi tonofilamenti, $\times 15\,000$. (C) Audzēja bazālā daļa, kuru ieskauj kolagēnās šķiedras saturoša stroma, $\times 4000$. (D) Bazālās membrānas *lamina densa* uzrāda nevienmīgu izskatu un multilamināciju (bultiņas), $\times 15\,000$.

4. Diskusija

Šajā pētījumā mēs (1) novērtējām 79 primāro un recidivējošo BŠK rašanos un izplatību, kas attīstījušās galvas un kakla rajonā; (2) veicām pacientu klīnisko un dermatoskopisko kontroli, analizējot biežākās pazīmes un lokalizācijas atkarībā no BŠK tipa; (3) noteicām D vitamīna līmeni asins serumā visiem šajā pētījumā iesaistītajiem BŠK pacientiem; (4) veicām imūnhistoķīmisko analīzi galvenajām BM sastāvdaļām – IV tipa kolagēnam un laminīnam, kas norobežo audzēju un aptur tā izplatīšanos; (5) analizējām *α*-GMA, PDPN, DVP un SHh ādas audu ekspresiju, kas konstatēta lielākajā daļā audzēja un apkārtējās stromas dažādu apakštipu BŠK, atspoguļojot šīs neoplazmas bioloģijas sarežģītību.

Mūsu pētījuma rezultāti ir jāaplūko, ņemot vērā dažus ierobežojumus. Par potenciālu ierobežojumu var uzskatīt mērenu pētījuma kohortas izlases lielumu. Slimības recidīvs tika novērots tikai divu gadu novērošanas periodā. Vienlaikus iegūto rezultātu un izdarīto secinājumu atbilstību pastiprina šī pētījuma perspektīvais raksturs. Lai izmērītu kopējo D vitamīna līmeni serumā BŠK pacientiem, tika izmantots tikai parasts hemiluminescences imūntests. Visbeidzot BŠK audu lielums, kas iegūts ar ķirurģisku izgriešanu galvas un kakla rajonā, bija cieši saistīts ar ārstēšanas nepieciešamību, tāpēc tas izskaidro dažas grūtības, kas saistītas ar veikto histopatoloģisko un imūnhistoķīmisko analīžu skaitu.

Iepriekš tika pierādīts augsts BŠK biežums, tas veido aptuveni 80 % no visiem nemelanocitāriem ādas vēža gadījumiem un parasti parādās galvas un kakla rajonā, daļās, kas pakļautas saulei (Rubin et al., 2005; Carucci et al., 2008; Fernanda et al., 2017). Vienlaikus absolūtais BŠK sastopamības biežums nav noteikts, jo nemelanocitārie ādas audzēji parasti tiek izslēgti no vēža reģistra statistikas (Rubin et al., 2005). Turklāt laika gaitā ir mainījusies izpratne par galvas un kakla BŠK histopatoloģiskajām īpašībām un to nozīmi šīs slimības prognozēšanā. Jauni pētījumi padziļina mūsu zināšanas gan par BŠK bioloģiju kopumā, gan jo īpaši par audzēja mikrovides (AM) uzvedības īpatnībām.

Daudzos aplūkotajos pētījumos vīrieši tika skarti biežāk nekā sievietes, turpretim ziņotais vecums bija lielāks par 60 gadiem pirmajā slimības reprezentācijā (Holtmann et al., 2018; Vaca-Aguilera et al., 2019). Mēs atklājām, ka dzimumu sadalījums ir līdzīgs Mavardi un līdzautoru darba rezultātiem (Mawardī et al., 2016) un parāda sieviešu pārsvaru, savukārt vecums diagnozes noteikšanas brīdī bija līdzīgs, salīdzinot šo pētījumu ar iepriekšējiem. Novērtējot ādas fototipu pacientiem, kas iekļauti konkrētajā pētījumā, mēs atklājām, ka visizplatītākais bija II ādas fototips. Tas raksturīgs Baltijas reģionā dzīvojošajiem iedzīvotājiem. Vienlaikus tiek atzīts, ka personām ar I–III ādas fototipu ir lielāks ādas vēža attīstības risks (Wright et al., 2011).

Šajā pētījumā mēs esam pierādījuši, ka BŠK var izraisīt nopietnus bojājumus tās lokālas recidivēšanas dēļ un sejas vidusdaļa ir jutīgāka attiecībā uz audzēja attīstību. Degunu, vaigu un plakstiņu apgabalus, kas hroniski pakļauti saules gaismai, biežāk nekā BŠK citās predilekcijas vietās ietekmēja gan primārie, gan recidivējošie audzēji. Pēc mūsu rezultātiem, lielākā daļa jaukta tipa BŠK ir lokalizēti deguna un nazolabiālajā ādas zonā, turklāt lielākajai daļai šo audzēju ir lielāks izmērs nekā citu apakštipu audzējiem. Šie rezultāti atbilst tiem, ko demonstrēja Mavardi un līdzautori (Mawardi et al., 2016), kad tika pētīta lokāla, bet ne attāla BŠK recidivēšana un agresivitāte. Šajā kontekstā nepieciešamība pēc visaptverošas novērošanas, kā arī pilnīgas audzēja eksīzijas metodoloģijas pareizības un Mosa mikrogrāfiskās ķirurģijas piemērošanas pirmajā ķirurģiskās ārstēšanas reizē ir galvenais jautājums, kas samazinātu recidīva iespējamību (Sin et al., 2016; Troeltzsch et al., 2016).

Analizējot dermatoskopiskās un histopatoloģiskās korelācijas, kļūst skaidrs, ka audzēja agresīvais potenciāls netiek iegūts tikai ar audzēja palielināšanos laika gaitā. Pētījumā tika diagnosticēti pēc izmēra ļoti mazi audzēji, kas histoloģiski bija apstiprināti kā visnotaļ agresīvi. Mūsu pētījums apstiprināja un mūsu dati saskan ar citu autoru minēto, ka jāņem vērā agresīvo audzēju lokalizācija, jo tie bieži atrodas rajonos, kurus šķērso liela izmēra artērijas (Lammers et al., 2011). Parasti BŠK diagnozi nosaka ar histopatoloģisku izmeklēšanu pēc aizdomīgas masas izņemšanas. Taču pēdējos gados ādas audzēju diagnostika tiek pilnveidota, izmantojot neinvazīvu un lētu *in vivo* dermatoskopiskās izmeklēšanas metodi. Šī modernā un ērtā izmeklēšanas metode ļauj instrumentāli raksturot audzēja īpašības, tādējādi veicinot tā diagnozes precizitāti.

Biežākā jaukta BŠK dermatoskopiskā atrade ir arborizētu asinsvadu un īsu, smalku teleangiektāziju klātbūtne. Biežāk nekā citas atrades tika novēroti arī spīdīgi, balti laukumi, baltas svītras, hrizalīdas, bezstruktūras zonas no pienaini rozā līdz sarkanam fonam, izčūlojums un vairākas nelielas erozijas. Iepriekš minētie dermatoskopiskie kritēriji, kurus mēs atzinām par piemērotiem kritērijiem, izpētot agresīvu BŠK, korelē ar citu autoru rezultātiem un atbilst peritumorālajam iekaisumam, kas bieži sastopams agresīvām BŠK formām (El-Sayed et al., 2020; Zalaudek et al., 2010). Atklājot dermatoskopiski aizdomīgus bojājumus, speciālistam tie jāārstē kā audzējs ar paaugstinātu recidīva risku.

Tāpat saskaņā ar šī pētījuma rezultātiem 94,9 % Latvijas pacientu ar primāru un recidivējošu galvas un kakla BŠK tika konstatēts D vitamīna deficīts. Kopumā 5,1 % no izmeklētajiem pacientiem bija pietiekams D vitamīna līmenis 30,0–40,0 ng/mL. Šie dati saskan ar Latvijas Osteoporozes un kaulu metabolo slimību asociācijas, Rīgas Stradiņa universitātes un Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas speciālistu 2015. gadā Latvijā veiktā D vitamīna deficīta pētījuma rezultātiem (Bouillon et al., 2020; Mukane et al., 2015). Iepriekš

minētā pētījuma rezultāti un izdarītie secinājumi ir uzsvēruši D vitamīna deficīta esību 82 % pētījuma dalībnieku. Līdzīgi rezultāti nāk no kaimiņvalstīm, kuras ziņo par D vitamīna deficītu, veicot plašu Zviedrijas kohortas pētījumu, apstiprinot vidējo aprēķināto D vitamīna līmeni 19,9 ng/mL (Samuel et al., 2008), kas ir nedaudz augstāks nekā noteikts Latvijas BŠK kohortā. Savukārt Lietuvas kolēģi apstiprināja sezonāla D vitamīna deficīta esamību 67 % retrospektīvi izmeklēto ambulatoro nodaļu subjektu (Elder et al., 2018). Turklāt, pēc pētījuma rezultātiem, ko veica nacionālie veselības institūti, izmantojot izstrādātos protokolus, lai standartizētu esošās 25(OH)D vērtības no nacionālajiem veselības / uztura apsekojumiem Starptautiskās D vitamīna standartizācijas programmas ietvaros, D vitamīna deficīts, kas noteikts 55 844 eiropiešiem, ir 40,4 % (Garnett et al., 2019). Šos datus apstiprina arī cits liels kohortas pētījums, kas liecina, ka D vitamīna deficīts ir sastopams < 20 % iedzīvotāju Ziemeļeiropā, 30–60 % Rietumeiropā, Dienvideiropā un Austrumeiropā un līdz 80 % Tuvajos Austrumos. Eiropas valstīs izteikts deficīts (< 12 ng/mL) ir konstatēts > 10 % iedzīvotāju (Vandikas et al., 2022). Pamatojoties uz attiecīgās literatūras analīzi un pašreizējo pētījumu rezultātiem, var droši teikt, ka Eiropā kopumā un īpaši Baltijas reģionā D vitamīna līmenis asins serumā ir raksturojams kā katastrofāli zems.

Pateicoties unikālajai iezīmei, kas saistīta ar D₃ vitamīna veidošanos ādā, aktivizējoties saules UVB stariem, D vitamīns tiek saukts par saules vitamīnu (Kallay et al., 2002). Atkāpes no optimālā D vitamīna līmeņa ir saistītas ar BŠK attīstības risku (Bikle et al., 2020; Rozmus et al., 2020). Pierādījumu kopums liecina, ka D vitamīns inhibē SHh signālceļu, tāpēc tam ir aizsargājoša loma audzēja augšanas apturēšanā (Chun et al., 2019). D vitamīns var ietekmēt ādas vēža šūnas, mijiedarbojoties ar imūnsistēmas šūnām, jo calcitriols inhibē 1. tipa (Th1) *T helpera* šūnas un palielina 2. tipa (Th2) un regulējošo T šūnu atbildes reakciju, kas samazina imūno uzraudzību ādas vēža gadījumā (Cashman et al., 2016; Lips et al., 2019). Savukārt pastiprinās iedzimtā imunitāte un *Toll* līdzīgu receptoru indukcija, kas, iespējams, uzlabo pretvēža reakcijas (Ross et al., 2011). Saskaņā ar citiem novērojumiem D₃ specifiski saistās ar SMO un tādējādi inhibē CPP proteīnu aktivitāti fibroblastos *in vitro*, kas liecina, ka PTCH1 proteīns nomāc SHh signālus, transportējot D₃ vitamīnu uz SMO proteīnu (Lips et al., 2019; Ross et al., 2011; Bouillon et al., 2022; McDonnell et al., 2018). Jāatzīmē, ka SHh ceļa inhibitori ne tikai nomāc BŠK progresēšanu, bet arī veicina iegūtās imūnās atbildes. D vitamīns un tā metabolīti ir saistīti ar specifisku nesējproteīnu DVP, kas pieder albumīnu proteīnu saimei un nodrošina D vitamīna un taukskābju uzglabāšanu / transportu, kā arī veicina citus fizioloģiskos procesus (Enko et al., 2014; Simpson et al., 2015). Tiek uzskatīts, ka zems DVP līmenis serumā plaušu vēža gadījumā ir *exitus letalis* predisponējošais faktors un seruma DVP normāla līmeņa saglabāšana tiek atzīta par nozīmīgu neatkarīgu faktoru, kas saistīts ar labākiem dzīvildzes

rādītājiem operētiem plaušu vēža pacientiem (Akiba et al., 2018). Turklāt tiek parādīta nozīmīga saistība starp metastātisku krūts vēzi un D vitamīna līmeni (Summerhays et al., 2020; Bleizgys et al., 2018). Zems D vitamīna līmenis, kas noteikts pacientēm menopauzes laikā, korelē ar progresējošas neoplastiskas slimības klātbūtni, lielākiem audzēju izmēriem un to pakāpi (Cashman et al., 2016). Turklāt 25(OH)D deficīts tiek konstatēts gadījumos, kad diagnosticēti audzēji ar lokāli destruktīvu un metastātisku gaitu, audzēji ar limfmezglu iesaistīšanos un audzēji ar augstāku proliferācijas aktivitāti.

Mūsu pētījumā savāktie un analizētie dati par D vitamīnu tika iedalīti trijās galvenajās grupās, kas tika izveidotas, izmantojot hierarhiskās klasterizācijas metodi. Pirmo pārstāvēja vīrieši ar zemu D vitamīna līmeni asins serumā un lieliem, galvenokārt augsta riska un recidivējošiem BŠK audzējiem. Tāpēc var droši apgalvot, ka vīriešu dzimums un zems D vitamīna līmenis asinīs ir riska faktori agresīvu BŠK veidu attīstībai. Otro grupu pārstāvēja gan vīrieši, gan sievietes ar ļoti atšķirīgu D vitamīna līmeni asins serumā un maza izmēra primāriem, tomēr augsta riska BŠK audzējiem. Trešo grupu pārstāvēja vīrieši un sievietes ar atšķirīgu D vitamīna līmeni serumā un maza izmēra primāriem un mazāk agresīviem BŠK audzējiem. Līdz šim uzkrātās zināšanas par D vitamīna nozīmi cilvēka organismā un tā līmeņa saistību ar onkoloģiskās patoloģijas attīstību un norisi liecina, ka nepietiekama D vitamīna līmeņa korekcija var būt aktuāla vēža profilaksē un kompleksā ārstēšanā.

Citu autoru pētījumos tiek analizēti gan audzēja proliferācijas marķieri, gan tie, kas būtu nozīmīgi BŠK un ĀPK diferenciāldiagnostikā (Alhumaidi, 2012; Ramezani et al., 2020). Savukārt mūsu darbā tika padziļināti pētīta BŠK vietējā agresivitāte un invazivitāte, tam izmantojot attiecīgus imūnhistoķīmijas marķierus. Iepriekš veiktajos pētījumos tiek demonstrēts, ka IV tipa kolagēna izzušana BM *lamina densa* ir nozīmīga audzēja šūnu invāzijai (Fang et al., 2014), un IV tipa kolagēna ekspresijas izmaiņas, kā arī infiltratīva audzēja augšana tiek analizēta agresīvos urīnpūšļa audzējos (Miyake et al., 2017). Tiek uzskatīts, ka kolagēna izmaiņas izraisa biomehāniskus signālus, kurus uztver gan audzēja, gan stromas šūnas, tādējādi izraisot bioloģisko notikumu kaskādi (Fang et al., 2014). Šajā pētījumā mēs parādījām BM integritātes izmaiņas un IV tipa kolagēna izzušanu, kā rezultātā palielinājās audzēja invazivitāte jauktā un infiltratīvā BŠK. Mūsu dati par BM struktūru un kolagēna un laminīna ekspresiju tajā ir saskaņā ar tiem, kas ir atrodami pieejamajā literatūrā (Quatresooz et al., 2003; Gozdziaska et al., 2016; Khlebnikova et al., 2020). IV tipa kolagēna un laminīna ekspresijas līmenis svārstījās no zema līdz mērenam un augstam, tomēr divām trešdaļām BŠK paraugu bija zems. Pētīto BM molekulu IHĶ ekspresija bija pārtraukta vai tās nebija BŠK apgabalos, kas uzrādīja agresīvu augšanu. Šie mūsu rezultāti saskan ar citu autoru datiem (Marasa et al., 2008; Peterson et al., 2015).

Papildus BM molekulu analīzei tika novērtēta PDPN marķiera ekspresija un analizētas BŠK ultrastrukturālās īpatnības invāzijas frontē. Pētījumi, kas demonstrējuši ar audzēju saistītu gēnu ekspresiju plakanšūnu karcinomas gadījumā, ir pierādījuši PDPN nozīmi normālā un ļaundabīgā epidermas homeostāzē (Acton, 2012; Baars et al., 2015) un uzsvēruši šī marķiera nozīmi audzēja šūnu migrācijas veicināšanā (Wicki et Christofori, 2007). Šajā pētījumā mēs parādījām neregulāras formas invazīvus audzēja pavedienus, izteikti iezīmētus ar anti-PDPN antivielu, kas atspoguļo BŠK vietējās agresivitātes pazīmes. Vienlaikus lielas un vienmērīgi iezīmētas audzēju mezglu masas parādīja vājāku PDPN ekspresiju un pat tās neesamību. Šīs atšķirības PDPN marķiera ekspresijā var atspoguļot audzēja vietējās agresivitātes īpatnības un palīdzēt prognozēt BŠK gaitu (Wojciechowska-Zdrojowy et al., 2016). Mūsu pētījumā PDPN ekspresijas palielināšanos, kura tika novērota audzēja invāzijas frontē gaismas mikroskopijas līmenī, padziļināti analizējām, veicot arī šī rajona ultrastrukturālo novērtējumu elektronu mikroskopā. Ar tā palīdzību mēs demonstrējām šūnas citoplazmas tonofilamentu samazināšanos, šūnu savienojumu vienkāršošanos un izzušanu, kā arī BM pārtraukumu rašanos. Šajā pētījumā ir noteikts, ka izmaiņas BM integritātē un augstāku PDPN ekspresiju audzēja invāzijas frontē pārsvarā uzrāda agresīvas BŠK formas, tādas kā infiltratīva, mikronodulāra un jauktā.

Iepriekš veiktie pētījumi ir norādījuši uz audzēja novērtēšanas nepieciešamību, pamatojoties uz izpratni par AM bioloģiju un funkcijām (Lesack et al., 2012). Turklāt AM izpētes lietderība, izmantojot imūnhistoķīmijas metodi, ir pierādīta nesen aprakstītajos pētījumos par BŠK agresivitāti (Simin et al., 2019). Ar *a*-GMA bagātā fenotipa šūnu attīstība stromas komponentā agresīvos BŠK variantos – mikronodulārajos un morfeja (*morphoea*) tipa – tika analizēta arī citu autoru pētījumos (Mercuri et al., 2014; Adgeboyega et al., 2010). Mūsu imūnhistoķīmiskās atrades saistībā ar *a*-GMA marķieri apstiprina šos pierādījumus un būtiski tos papildina, analizē iekļaujot gan visus primārās BŠK tipus, gan BŠK recidīvus. Turklāt Rumānijas pētnieku iegūtie rezultāti par augšlūpas BŠK liecina par *a*-GMA reaktivitātes novērtējuma lietderību arī invāzijas frontē (Sălan et al., 2018). Jāatzīmē, ka ļoti maz pētījumos tiek ziņots par *a*-GMA marķiera vērtējumiem, raksturojot audzēja un stromas komponentus, īpaši dažādu BŠK apakštipu vai primāro un recidivējošo audzēju gadījumos (Bozdogan et al., 2002). Savukārt mūsu pētījums, kas balstīts uz rūpīgu analizēto marķieru statistisko novērtēšanu, sniedza daudz nozīmīgu informāciju par šo marķieru lietderību, tostarp par izteiktas stromas *a*-GMA ekspresijas parādīšanos BŠK recidīvos. Aberanta SHh signālceļa aktivācija ir BŠK patoģenēzes pazīme (Chmiel et al., 2022; Deng et al., 2022). Tas izskaidro mūsu mērķi analizēt šo marķieri BŠK audos. Iepriekš veiktie pētījumi liecina, ka SHh var sekmēt stromā esošo fibroblastu pārvēršanu miofibroblastos, izraisot kolagēna uzkrāšanos un

ādas sabiezēšanu pelēm (Horn et al., 2012). Šī atrade izskaidro arī *a*-GMA ekspresijas palielināšanos BŠK stromā. Turklāt tika pierādīta ar SHh signālceļa saistīta parakrīnā mehānisma nozīme AM (Hanna et al., 2016; Katoh, 2019). Dati par šī signālceļa izmaiņām primārajā un recidivējošā BŠK ir ierobežoti. Šajā pētījumā mēs esam novērtējuši SHh primārajā un recidivējošā audzējā, kā arī piecos dažādos BŠK apakštipos, izmantojot imūnhistoķīmijas un bioinformātikas metodes. Mēs pierādījām izteiktas SHh ekspresijas paaugstināšanos gan audzēja, gan stromas komponentā. Turklāt šī izteiktā SHh ekspresija tika demonstrēta agresīvos variantos – infiltratīvajos, jauktajos un mikronodulārajos, kas saskan ar *Casas* un kolēģu demonstrētajiem rezultātiem (Casas et al., 2017).

Vienlaikus jāatzīmē, ka starp BŠK apakštipiem, kas iepriekš tika uzskatīti par agresīviem variantiem, mēs atklājām SHh ekspresijas izmaiņas paralēli *a*-GMA ekspresijas pazemināšanai audzēja virspusējā apakštipā, kas tika uzskatīts par neagresīvu. Tas liek domāt, ka SHh piedalās normālā un ar malignu šūnu augšanu ietekmētā epidermas homeostāzē, bet šīs pārmaiņas nav pilnībā izprastas. Visbeidzot mēs varam secināt, ka primāro un recidivējošu ādas vēža formu morfoloģisko un imūnhistoķīmisko īpašību novērtējums un iespējamās audzēja īpašību izmaiņas ir svarīgas prognostisko faktoru noteikšanai un adekvātas slimības ārstēšanas metodes izvēlei. SHh saistās ar PTCH1 receptoru, kas darbojas kopā ar SMO, lai sekmētu mērķa molekulu transkripcijas procesu. Tāpēc ar SHh saistīto vēža, tostarp BŠK, mērķa terapijai nākotnē varētu būt daudz plašāks klīniskais lietojums (Katoh, 2019; Jacobsen et al., 2017; Tolani et al., 2018; Carpenter et al., 2018). Turpināta šo procesu izpēte, iespējams, atklās jaunus BŠK un AM regulēšanas mehānismus, kuru ietekme ir ārpus SHh signālceļa kontroles.

Šajā pētījumā D vitamīna līmenis asins serumā tika pētīts Latvijas pacientu grupā ar primāru un recidivējošu galvas un kakla BŠK un korelēts ar ādas audu SHh un DVP imūnhistoķīmiskā novērtējuma rezultātiem. Pētījumā tika noteikta korelācija starp audzēja lielumu un D vitamīna līmeni asins serumā, un šis novērojums saskan ar citu pētījumu datiem (Kim et al., 2019). Turklāt tika pierādīta saistība starp augstu DVP un zemu SHh audu ekspresiju, kas konstatēta mazākos audzējos ar labvēlīgu gaitu, piemēram, virspusēju un mezglainu BŠK. Svarīgi ir tas, ka zema DVP ekspresija un augsta SHh ekspresija tika novērota jauktos un infiltratīvos BŠK, kas ļauj izteikt pieņēmumu par D vitamīna aizsargājošās iedarbības deficītu pacientiem ar augsta riska audzējiem un tendenci uz recidīvu pēc ārstēšanas. Vienlaikus kļūst skaidrs, ka saikne starp saules gaismas iedarbību un BŠK nav vienkārša, jo augsts intermitējošas UV līmenis, šķiet, ir vairāk saistīts ar audzēja attīstību uzņēmīgiem indivīdiem, nevis ar ilgstošu iedarbību, kā tas redzams laika gaitā ārā strādājošiem. Attiecīgās literatūras analīze liecina, ka 25(OH)D metabolisms līdz 1,25(OH)₂D, iespējams, notiek vairākās audu šūnās, tostarp keratinocītos, kas ekspresē DVR un satur specifisku enzīmu

CE27B1 (Thanasitthichai et al., 2019). Turklāt dažas epitēlijšūnas, tostarp piena dziedzeru un nieru kanāliņu šūnas, ekspresē megalīnu un kubilīnu, kas veicina 25(OH)D₃-DVP uzņemšanu un piesaisti DVR (Atoum et al., 2017; Estebanez et al., 2018). Intracelulāri 25(OH)D₃-DVP saistās ar citozola aktīnu, veidojot kompleksu, un šai saistīšanai nav nepieciešami D vitamīna ligandi (Akiba et al., 2018). DVP audu ekspresija, visticamāk, ir saistīta ar labvēlīgām prognostiskām īpašībām, piemēram, mazu audzēja izmēru un zemu invazivitāti. Tas atbilst pierādījumiem, ka DVP pozitīvi audzēji ir saistīti ar samazinātu metastāžu risku un mirstību no dažādiem vēža veidiem. Pētījumu rezultāti, kas korelē ar mūsu pētījuma rezultātiem, liecina par ievērojami zemu DVP imūnhistoķīmisko krāsojumu progresējošu audzēju gadījumā (Tang et al., 2012). Hierarhiskās klasterizācijas analīzes izmantošana ir parādījusi, ka uzņēmīgiem vīriešu kārtas indivīdiem ar zemu D vitamīna līmeni asinīs ir agresīvas un recidivējošas BŠK attīstības risks.

BŠK histopatoloģijas neviendabīgumu ir pierādījuši citi autori un mēs (Bartoš et al., 2016). Turklāt liels jauktu BŠK īpatsvars, kam bieži ir agresīva augšana un kam nepieciešama ķirurģiska izgriešana ar robežu kontroli, tika demonstrēts un analizēts gan citu autoru, gan šajā pētījumā (Wu et al., 2014). Histomorfoloģiski infiltratīvām, morfeja tipa, mikronodulārām un virspusējām BŠK ir noteiktas dažas kopīgas agresivitātes pazīmes – pastiprināta šūnu nekroze, neoplastisku šūnu un stromas šūnu proliferācija, stromas ievilkšana, dziļāka audzēja invāzija un vājāka tā ierobežošana (Stanoszek et al., 2017). Neskatoties uz augsto BŠK sastopamību, ir ļoti maz pētījumu, kuros aprakstītas dažādu audzēja apakštipu īpatnības un iespējamās atšķirības. Ir dažādas BŠK ārstēšanas metodes, sākot no minimāli invazīvām metodēm līdz ķirurģiskai terapijai, kurā audzēja histopatoloģiskās atrades ir viens no noteicošajiem faktoriem atbilstošas ārstēšanas metodes izvēlē (Drucker et al., 2018). BŠK diagnostikā un ārstēšanā iesaistītajiem speciālistiem ir jāapzinās veiksmīga un droša pacientu ārstēšana bieža recidīva dēļ pat pilnīgas primārās ķirurģiskas audzēja izņemšanas gadījumā (Paoli et al., 2019).

Secinājumi

1. Septiņdesmit deviņu galvas un kakla ādas BŠK pacientu grupā 46 bija sievietes un 33 vīrieši, vidējais vecums attiecīgi 70 un 64 gadi. Klīniski prevalēja II un III ādas fototips pēc Ficpatrika (*Fitzpatrick*) skalas atšķirībā no Eiropas, kur dominē I un II ādas fototips. Gan primārās, gan recidivējošās BŠK visbiežāk attīstījās saules iedarbībai pakļautās sejas daļās – degunā un vaigos, kas saskan ar pasaules tendencēm. It īpaši būtiska ir deguna rajona BŠK recidivēšanās divu gadu laikā, kas liecina par precīzas ķirurģiskas izgriešanas un histopatoloģiskās izvērtēšanas nepieciešamību, īpaši jaukta BŠK morfoloģiskā tipa gadījumā. BŠK visbiežāk izpaužas kā lēni augošs ādas krāsas mezgls vai eritematozs plankums ar eroziju vai izčūlojumu.
2. Pamatojoties uz dermatoskopisko izmeklējumu rezultātiem, var paredzēt augsta riska BŠK attīstību. Arborizēto asinsvadu, īso un smalko teleangiektāziju, spīdīgo, balto bezstrukturālo apgabalu, čūlu un balto svītru jeb saišķu, kas dermatoskopiski iziet ārpus veidojuma klīniskajām robežām, esība norāda uz agresīvu gaitu BŠK. Turklāt tas liecina par dermatoskopiskas izmeklēšanas nepieciešamību ekscīzijas robežu novērtēšanai pirmsoperācijas periodā.
3. Morfoloģiskā audzēja dažādība tika noteikta pētījuma pacientu kohortā; augsta riska BŠK ir infiltratīvo, mikronodulāro un jaukto tipu audzēji, savukārt nodulāra un virspusējā BŠK ir audzēji ar zemu recidīva risku. Divu vai vairāku dažādu histopatoloģisko BŠK tipu kopēja pastāvēšana vienā anatomiskajā reģionā ir ļoti reta. Bazālās membrānas integritātes zudums, ko apstiprina imūnhistoķīmiskās reakcijas ar antilaminīna un IV kolagēna antivielām un audzēja ultrastrukturālo īpašību izpēte, biežāk novērots infiltratīvajos un mikronodulārajos BŠK; tiem ir arī raksturīga palielināta peritumorāla un stromāla α -GMA ekspresija. Podoplanīna ekspresijas palielināšanās audzēja bazālajā slānī liecina par neoplastisko šūnu invazivitāti. SHh ir būtisks faktors, kas regulē audzēja šūnu uzvedību un stromālo transformāciju, iespējams, gan autokrīno, gan parakrīno mehānismu ceļā. Augsta riska BŠK raksturo paaugstināta SHh ekspresija un audzēja invāzija stromā, kad ir jāapsver mērķterapijas izmantošana.
4. D vitamīna deficīts tika konstatēts Latvijas BŠK pacientu kohortā. Pētot D vitamīna līmeni asins serumā, starp dzimumiem, primāro un atkārtotās BŠK gadījumos, kā arī starp audzēja morfoloģiskajiem veidiem, netika atrasti statistiski ticami atšķirīgi. Augstāks D vitamīna līmenis asins serumā korelē ar mazāku neoplazmu parādīšanos un labvēlīgāku slimības prognozi. Mazākiem un mazāk agresīviem audzējiem, piemēram, virspusējiem un

nodulārajām BŠK, saistība starp augstu DVP un zemu SHh audu ekspresiju norāda uz saikni starp D vitamīnu, tā vielmaiņas proteīniem (piemēram, DVP) un SHh signālceļu.

5. Analizējot Latvijas BŠK pacientu kohortu, tika identificēti trīs klasteri: 1) galvenokārt vīrieši ar zemu D vitamīna līmeni, kuriem ir lielas augsta riska recidivējošās BŠK; 2) abu dzimumu pārstāvji ar mainīgiem D vitamīna līmeņiem un mazām primārām BŠK, tomēr ar augstu risku; 3) abu dzimumu pārstāvji ar dažādiem D vitamīna līmeņiem un mazām primārām BŠK, kas arī ir mazāk agresīvas. Šie rezultāti uzsver pašu audzēju heterogenitāti un sarežģītību un to saistību ar D vitamīnu.

Praktiskās rekomendācijas

1. Pacientiem ar ādas BŠK var rekomendēt veikt dermatoskopisku veidojuma novērtēšanu diagnostiskos nolūkos.
2. Pacientiem ar ādas BŠK anamnēzē rekomendēts veikt dermatoskopiju pēcoperācijas periodā vienreiz sešos mēnešos, lai laikus atklātu audzēja recidīvu, īpaši, ja histoloģiski bija diagnosticēts BŠK audzējs ar noslieci uz agresīvu augšanu.
3. Pacientiem ar ādas BŠK rekomendēts noteikt slimības recidīva faktoros, pamatojoties uz iegūtajiem klīniskajiem, dermatoskopijas un imūnhistoķīmijas rezultātiem.
4. Ņemot vērā ādas BŠK sarežģīto morfoloģisko uzbūvi un tās bioloģiskās īpašības, kā ārstēšanas metode pamatā būtu lietojama ķirurģiskā ārstēšana. Mazinvazīvu ārstēšanu (imikvimods, krioterapija u. c.) var izmantot histoloģiski apstiprinātai virspusēja tipa BŠK bez infiltratīvas augšanas pazīmēm.
5. Histopatoloģijas nodaļām būtu jāveic sērijveida parauga griešana, šī pieeja nodrošinātu diagnozes precizitāti, īpaši jaukta un agresīva BŠK tipa gadījumā.

Publikācijas un prezentācijas par pētījuma tēmu

Zinātniskie raksti:

1. Moisejenko-Golubovica, J., Volkov, O., Ivanova, A., Groma, V. 2020. Analysis of the occurrence and distribution of primary and recurrent basal cell carcinoma of head and neck coupled to the assessment of tumor microenvironment and Sonic hedgehog signaling. *Romanian journal of morphology and embryology*, 61(3), 821–831.
2. Moisejenko-Golubovica, J., Volkovs, O., Ivanova, A., Petrošina, E., Groma, V. 2021. What We Need to Learn When Exploring the Mixed Basal Cell Carcinoma of Head and Neck. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. *Section B, Natural Sciences*, 75, 75–85.
3. Moisejenko-Goluboviča, J., Groma, V., Svirskis, Š., Ivanova, A. 2022. Serum Vitamin D Levels Explored in the Latvian Cohort of Patients with Basal Cell Carcinoma Linked to the Sonic Hedgehog and Vitamin D Binding Protein Cutaneous Tissue Indices. *Nutrients*, 14(16), 3359.

Tēzes un prezentācijas starptautiskās konferencēs:

1. Moisejenko -Golubovica, J., Ivanova, A., Groma, V. 2016. Features of the pathogenesis and development of locoregional recurrence of basal cell carcinoma on the neck and face area. Russian Congress of Molecular oncology. Vol. 4, No. 1, Suppl., p. 65 – 2nd Russian Congress of Molecular oncology: Programme and abstract book.
2. Moisejenko-Golubovica, J., Groma, V., Ivanova, A. 2017. Kolagēna un laminīna ekspresijas atšķirības bazālajā membrānā bazālo šūnu karcinomu gadījumā galvas un kakla rajonā. III Pēterburgas starptautiskais onkoloģijas forums “Baltās naktis”, Nr. 1728, 214.
3. Moisejenko-Golubovica, J., Groma, V., Ivanova, A. 2017. Surgical multistage treatment for aggressive and neglected basal cell carcinoma. 9th Baltic Congress of Maxillofacial and Plastic Surgeons, p. 47: Programme and abstract book.
4. Moisejenko-Golubovica, J., Groma, V., Ivanova, A., Karl, R. 2017. An immunohistochemical study of laminin and collagen IV in basal cell carcinoma. 13th Congress of the EADO, JEADV, 31 (Suppl. 3), 3–100, p. 87 (P124).
5. Moisejenko-Golubovica, J., Ivanova, A., Zarins, J., Groma, V. 2017. Case report: coexistence of solid and adenoid basal cell carcinoma at the same anatomical site. 13th Congress of the EADO, JEADV, 31 (Suppl. 3), 3–100, p. 87 (P125).
6. Moisejenko-Golubovica, J., Volkov, O., Ivanova, A., Groma, V. 2018. Results of immunohistochemical analysis of Sonic Hedgehog, a key factor in the pathogenesis of basal cell carcinoma. Russian Congress of Molecular oncology. Vol. 5, No. 4, Suppl. 1, p. 50 – 4th Russian Congress of Molecular oncology: Programme and abstract book.

Tēzes un prezentācijas vietēja mēroga konferencēs Latvijā:

1. Moisejenko-Golubovica, J., Groma, V., Ivanova, A., Zabludovska, K. 2017. Peculiarities of the pathogenesis and locoregional recurrence in case of head and neck basalioma. RSU Scientific Conference, 133: programme and abstract.
2. Moisejenko-Golubovica, J., Groma, V., Ivanova, A., Volkovs, O., Skuja, S. 2017. Kolagēna un laminīna ekspresijas atšķirības bazālajā membrānā mutes dobuma plakanšūnu vēža un bazaliomas gadījumā. RSU zinātniskā konference, programma un tēžu grāmata, 196.
3. Moisejenko-Golubovica, J., Ivanova, A., Muceniece, J. 2019. Basal cell nevus syndrome – diagnosis and treatment. RSU Scientific Conference, programme and abstract.

4. Moisejenko-Golubovica, J., Groma, V., Ivanova, A., Zabludovska, K. 2019. Combined forms of basal cell carcinoma in the head and neck region. RSU Scientific Conference, programme and abstract.
5. Moisejenko-Goluboviča, J., Volkov, O., Ivanova, A., Groma. V. 2020. The 62nd International Scientific Conference of Daugavpils University, 55, Daugavpils, Latvia.

Literatūras saraksts

1. Abbas, M., Kalia, S. 2016. Trends in Non-Melanoma Skin Cancer (Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma) in Canada: A Descriptive Analysis of Available Data. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 20, 166–175.
2. Abudu, B., Cohen, P. R. 2019. Pigmented Basal Cell Carcinoma Masquerading as a Melanoma. *Cureus*, 11(4), e4369.
3. Acton, S. E., Astarita, J. L., Malhotra, D., Lukacs-Kornek, V., Franz, B., Hess, P. R., Jakus, Z., Kuligowski, M., Fletcher, A. L., Elpek, K. G., Bellemare-Pelletier, A., Sceats, L., Reynoso, E. D., Gonzalez, S. F., Graham, D. B., Chang, J., Peters, A., Woodruff, M., Kim, Y. A., Swat, W., Turley, S. J. 2012. Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity*, 37(2), 276–289.
4. Adgeboyega, P. A., Rodriguez, S., McLarty, J. 2010. Stromal expression of actin is a marker of aggressiveness in basal cell carcinoma. *Hum Pathol.*, 41(8):1128–1137.
5. Agarwal, P., Ballabh, R. 2013. Expression of type IV collagen in different histological grades of oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *J Cancer Res Ther.*, 9(2):272–275.
6. Aldana, P. C., Yfantis, H. G., John, P. R. 2019. Perianal Basal Cell Carcinoma Successfully Managed with Excisional Biopsy. *Case reports in dermatological medicine*, 6268354.
7. Alhumaidi A. 2012. Practical immunohistochemistry of epithelial skin tumor. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.*, 78:698-708.
8. Akiba, T., Morikawa, T., Odaka, M. et al. 2018. Vitamin D Supplementation and Survival of Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Cancer Res.*, 24, 4089–4097.
9. Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., Winchester, D. P. 2017. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(2), 93–99.
10. Amrein, K., Scherkl, M., Hoffmann, M. et al. 2020. Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 74, 1498–1513.
11. Andreeva, V., Aksamentova, E., Muhachev, A., Solovey, A., Litvinov, I., Gusarov, A., Shevtsova, N. N., Kushkin, D., Litvinova, K. 2021. Preoperative AI-Driven Fluorescence Diagnosis of Non-Melanoma Skin Cancer. *Diagnostics* (Basel, Switzerland), 12(1), 72.
12. Argenziano, G., Zalaudek, I. 2007. Recent advances in dermoscopic diagnostic technologies. *Eur. Oncol. Dis.*, 1(2), 104–106.
13. Asakura, K., Etoh, N., Imamura, H., Michikawa, T., Nakamura, T., Takeda, Y., Mori, S., Nishiwaki, Y. 2020. Vitamin D Status in Japanese Adults: Relationship of Serum 25-Hydroxyvitamin D with Simultaneously Measured Dietary Vitamin D Intake and Ultraviolet Ray Exposure. *Nutrients*, 12, 743.
14. Atoum, M., Alzoughool, F. 2018. Vitamin D and Breast Cancer: Latest Evidence and Future Steps. *Breast Cancer (Auckl)*. Breast cancer: basic and clinical research, 11, 1178223417749816.
15. Avril, M. F., Auperin, A., Margulis, A., Gerbaulet, A., Duvillard, P., Benhamou, E., Guillaume, J. C., Chalon, R., Petit, J. Y., Sancho-Garnier, H., Prade, M., Bouzy, J., Chassagne, D. 1997. Basal cell carcinoma of the face: surgery or radiotherapy? Results of a randomized study. *British journal of cancer*, 76(1), 100–106.
16. Baars, S., Bauer, C., Szabowski, S., Hartenstein, B. & Angel, P. 2015. Epithelial deletion of podoplanin is dispensable for re-epithelialization of skin wounds. *Exp Dermatol.*, 24(10), 785–787.

17. Bartoš, V. 2019. Development of Multiple-Lesion Basal Cell Carcinoma of the Skin: A Comprehensive Review. *Sisli Etfal Hastanesi tip bulteni*, 53(4), 323–328.
18. Bartoš, V., Kullová, M. 2016. Basal cell carcinoma of the skin with mixed histomorphology: a comparative study. Bazocelulárny karcinóm kože so zmiešaným histomorfologickým obrazom: porovnávacie štúdiá. *Ceskoslovenska patologie*, 52(4), 222–226.
19. Basset-Seguín, N. 2018. Traitement médical des carcinomes basocellulaires avancés: Medical treatment of advanced basal cell carcinoma. *Annales de dermatologie et de venerologie*, 145 Suppl 5, VS36–VS41.
20. Bauer, A., Haufe, E., Heinrich, L. et al. 2020. Basal cell carcinoma risk and solar UV exposure in occupationally relevant anatomic sites: do histological subtype, tumor localization and Fitzpatrick phototype play a role? A population-based case-control study. *J Occup Med Toxicol.*, 15, 28.
21. Berman, D. M., Kardhadkar, S. S. 2003. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *J Nature*, 425(6960):846–851.
22. Bijlsma, M. F., Spek, C. A., Zivkovic, D., van de Water, S., Rezaee, F., Peppelenbosch, M. P. 2006. Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol.*, 4, e232.
23. Bikle, D. D. 2020. The Vitamin D Receptor as Tumor Suppressor in Skin. *Adv. Exp Med. Biol.*, 1268, 285–306.
24. Bleizgys, A., Kurovskij, J. 2018. Vitamin D Levels of Out-Patients in Lithuania: Deficiency and Hypervitaminosis. *Medicina (Kaunas)*, 54, 25.
25. Blixt, E., Nelsen, D., Stratman, E. 2013. Recurrence rates of aggressive histologic types of basal cell carcinoma after treatment with electrodesiccation and curettage alone. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery*, 39(5), 719–725.
26. Boitor, R., Kong, K., Shipp, D., Varma, S., Koloydenko, A., Kulkarni, K., Elsheikh, S., Schut, T. B., Caspers, P., Puppels, G., van der Wolf, M., Sokolova, E., Nijsten, T., Salence, B., Williams, H., Notingher, I. 2017. Automated multimodal spectral histopathology for quantitative diagnosis of residual tumour during basal cell carcinoma surgery. *Biomedical optics express*, 8(12), 5749–5766.
27. Bouillon, R., Schuit, F., Antonio, L., Rastinejad, F. 2020. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 910.
28. Boulinguez, S., Grison-Tabone, C., Lamant, L. et al. 2004. Histological evolution of recurrent basal cell carcinoma and therapeutic implications for incompletely excised lesions. *Br J Dermatol.*, 151, 3, 623–626.
29. Bozdogan, O., Erkek, E., Atasoy, P., Kocak, M., Birol, A., Caydere, M. 2002. Bcl-2-related Proteins, α -Smooth Muscle Actin and Amyloid Deposits in Aggressive and non-Aggressive Basal Cell Carcinomas. *Acta Derm Venereol.*, 82:423–427.
30. Bresler, S. C., Padwa, B. L., Granter, S. R. 2016. Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome (Gorlin Syndrome). *Head and neck pathology*, 10(2), 119–124.
31. Brierley, J., O'Sullivan, B., Asamura, H. et al. 2019. Global Consultation on Cancer Staging: promoting consistent understanding and use. *Nat Rev Clin Oncol.*, 16, 763–771.
32. Brzeminski, P., Fabisiak, A., Slominski, R. M., Kim, T. K., Janjetovic, Z., Podgorska, E., Song, Y., Saleem, M., Reddy, S. B., Qayyum, S., Song, Y., Tuckey, R. C., Atigadda, V., Jetten, A. M., Sicinski, R. R., Raman, C., Slominski, A. T. 2022. Chemical synthesis, biological activities, and action on nuclear receptors of 20S(OH)D₃, 20S,25(OH)₂D₃, 20S,23S(OH)₂D₃ and 20S,23R(OH)₂D₃. *Bioorg. Chem.*, 121, 105660.
33. Bubna, A. K. 2015. Imiquimod – Its role in the treatment of cutaneous malignancies. *Indian journal of pharmacology*, 47(4), 354–359.

34. Camela, E., Ilut Anca, P., Lallas, K., Papageorgiou, C., Manoli, S. M., Gkentsidi, T., Eftychidou, P., Liopyris, K., Sgouros, D., Apalla, Z., Lallas, A. 2023. Dermoscopic Clues of Histopathologically Aggressive Basal Cell Carcinoma Subtypes. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 59(2), 349.
35. Cameron, M. C., Lee, E., Hibler, B. P., Barker, C. A., Mori, S., Cordova, M., Nehal, K. S., Rossi, A. M. 2019. Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(2), 303–317.
36. Carballo, G. B., Honorato, J. R., de Lopes, G., Spohr, T. 2018. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell communication and signaling: CCS*, 16(1), 11.
37. Cardoso, J. C., Alves, F., Carreira, I. M., Tellechea, O. 2022. Basal Cell Carcinomas After Radiotherapy Show More Frequent Follicular Differentiation Than Tumors From Sun-Exposed Areas: Immunohistochemical Study With a Special Focus on Infundibulocystic Basal Cell Carcinoma. *The American Journal of Dermatopathology*, 44(12):879–885.
38. Caro, I., Low, J. A. 2010. The role of the hedgehog signaling pathway in the development of basal cell carcinoma and opportunities for treatment. *Clin Cancer Res.*, 16(13):3335–3339.
39. Carpenter, R. L., Ray, H. 2019. Safety and Tolerability of Sonic Hedgehog Pathway Inhibitors in Cancer. *Drug Safety*, 42(2):263–279.
40. Carrasquillo, O. Y., Cruzval-O'Reilly, E., Sánchez, J. E., Valentín-Nogueras, S. M. 2021. Differentiation of Basal Cell Carcinoma and Trichoepithelioma: An Immunohistochemical Study. *The American Journal of dermatopathology*, 43(3), 191–197.
41. Carucci, J. A., Leffell, D. J. 2008. Basal Cell Carcinoma. In: Wolff, K., Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrist, B. A., Paller, A. S. and Leffell, D. J. (eds). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. McGraw Hill Medical, New York, 1036–1042.
42. Casey, M. C., Pollock, R., Enright, R. H., O'Neill, J. P., Shine, N., Sullivan, P., Martin, F. T., O'Sullivan, B. 2021. Metastatic and locally aggressive BCC: Current treatment options. *Clinical case reports*, 9(10), e04965.
43. Cashman, K. D., Dowling, K. G., Škrabáková, Z., Gonzalez-Gross, M., Valtueña, J., de Henauw, S., Moreno, L., Damsgaard, C. T., Michaelsen, K. F., Mølgaard, C., Jorde, R., Grimnes, G., Moschonis, G., Mavrogianni, C., Manios, Y., Thamm, M., Mensink, G. B., Rabenberg, M., Busch, M. A., Cox, L., Kiely, M. 2016. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am. J. Clin. Nutr.*, 103, 1033–1044.
44. Casas, B. S., Adolphe, C., Lois, P., Navarrete, N., Solís, N., Bustamante, E., Gac, P., Cabané, P., Gallegos, I., Wainwright, B. J., Palma, V. 2017. Downregulation of the Sonic Hedgehog/Gli pathway transcriptional target Neogenin-1 is associated with basal cell carcinoma aggressiveness. *Oncotarget*, 8(48):84006–84018.
45. Celebi, A. R., Kiratli, H., Soylemeoglu, F. 2016. Evaluation of the 'Hedgehog' signaling pathways in squamous and basal cell carcinomas of the eyelids and conjunctiva. *Oncol Lett.*, 12(1):467–472.
46. Chen, C. C., Chen, C. L. 2006. Clinical and histopathologic findings of superficial basal cell carcinoma: A comparison with other basal cell carcinoma subtypes. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA*, 69(8), 364–371.
47. Chmiel, P., Kłosinska, M., Forma, A., Pelc, Z.; Geca, K., Skórzewska, M. 2022. Novel Approaches in Non-Melanoma Skin Cancers—A Focus on Hedgehog Pathway in Basal Cell Carcinoma (BCC). *Cells*, 11, 3210.
48. Chung, S. 2012. Basal cell carcinoma. *Archives of plastic surgery*, 39(2), 166–170.
49. Clark, C. M., Furniss, M., Mackay-Wiggan, J. M. 2014. Basal cell carcinoma: an evidence-based treatment update. *American journal of clinical dermatology*, 15(3), 197–216.

50. Cole, S. J., Howes, R., Meehan, C., Cole, R. 2019. High-risk basal cell carcinoma excision in primary care: a retrospective observational study of compliance with NICE guidance. *BMJ open*, 8(11), e023299.
51. Coggnetta, A. B., Howard, B. M., Heaton, H. P., Stoddard, E. R., Hong, H. G., Green, W. H. 2012. Superficial x-ray in the treatment of basal and squamous cell carcinomas: a viable option in select patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67(6), 1235–1241.
52. Cohen, P. R. 2022. Cutaneous Basal Cell Carcinoma In Situ: A Case Series. *Cureus*, 14(9), e29479.
53. Collier, N. J., Rhodes, L. E. 2020. Photodynamic Therapy for Basal Cell Carcinoma: The Clinical Context for Future Research Priorities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 5398.
54. Costantino, D., Lowe, L., Brown, D. L. 2006. Basosquamous carcinoma – an under-recognized, high-risk cutaneous neoplasm: case study and review of the literature. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 59(4), 424–428.
55. Cozzi, S., Bardoscia, L., Najafi, M., Botti, A., Blandino, G., Augugliaro, M., Manicone, M., Iori, F., Giaccherini, L., Sardaro, A., Iotti, C., Ciammella, P. 2022. Adenoid Cystic Carcinoma / Basal Cell Carcinoma of the Prostate: Overview and Update on Rare Prostate Cancer Subtypes. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 29(3), 1866–1876.
56. Cristian, M., Moy, R. L., Wagner, R. F., Yen-Moore, A. 2001. A correlation of alpha-smooth muscle actin an invasion in micronodular basal cell carcinoma. *Dermatol Surg.*, 27(5):441–445.
57. Crowson, A. N. 2006. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod. Pathol.*, 19(2), S127–S147.
58. Damani, Z., Haber, R. M. 2022. Fibroepithelioma of Pinkus (FEP). *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 26(2), 216.
59. Daya-Grosjean, L., Couve-Privat, S. 2005. Sonic Hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett.*, 225(2):181–192.
60. Deng, L.J., Jia, M., Luo, S.Y., Li, F.Z., Fang, S. 2022. Expression of Hedgehog Signaling Pathway Proteins in Basal Cell Carcinoma: Clinicopathologic Study. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 15, 2353-2361.
61. De Silva, S. P., Dellon, A. L. 1985. Recurrence rate of positive margin basal cell carcinoma: results of a five-year prospective study. *Journal of Surgical Oncology*, 28(1), 72–74.
62. De Vita, V., di Leo, G., Fabbrocini, G., Liguori, C., Paolillo, A., Sommella, P. 2012. Statistical techniques applied to the automatic diagnosis of dermoscopic images. *ACTA IMEKO*, 1(1), 7–18.
63. Dong, X., Xiaoxiao, C., Hongxuan, W. et al. 2022. Prediction of Diagnostic Gene Biomarkers Associated with Immune Infiltration for Basal Cell Carcinoma, *PREPRINT (Version 1) available at Research Square*.
64. Dourmishev, L. A., Rusinova, D., Botev, I. 2013. Clinical variants, stages, and management of basal cell carcinoma. *Indian dermatology online journal*, 4(1), 12–17.
65. Drucker, A. M., Adam, G. P., Rofeberg, V., Gazula, A., Smith, B., Moustafa, F., Weinstock, M. A., Trikalinos, T. A. 2018. Treatments of Primary Basal Cell Carcinoma of the Skin: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, 169(7), 456–466.
66. East, E., Fullen, D. R., Arps, D., Patel, R. M., Palanisamy, N., Carskadon, S., Harms, P. W. 2016. Morpheaform Basal Cell Carcinomas with Areas of Predominantly Single-Cell Pattern of Infiltration: Diagnostic Utility of p63 and Cytokeratin. *The American Journal of dermatopathology*, 38(10), 744–750.
67. Eibenschutz, L., Caputo, S., Camera, E., Carbone, A., Silipo, V., Migliano, E., Aurizi, C., Cota, C., Frascione, P., Bellei, B. 2021. Evaluation of Hedgehog Pathway Inhibition on Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome Fibroblasts and Basal Cell Carcinoma-Associated Fibroblasts: Are Vismodegib and Sonidegib Useful to Target Cancer-Prone Fibroblasts? *Cancers*, 13, 5858.

68. Elder, D. E., Massi, D., Scolyer, R. A., Willemze, R. 2018. *WHO Classification of Skin Tumours. WHO Classification of Tumours*, 11, 27–33.
69. El-Sayed, S. K., El-Sayed, G. D. A., Kamel, A. M., Al-Tramsy, A. A., Ateia, S. Y. 2020. Efficacy of dermoscopy in the diagnosis of different basal cell carcinoma subtypes. *Egypt J. Dermatol. Venerol.*, 40(1), 15–22.
70. Emiroglu, N., Cengiz, F. P., Kemeriz, F. 2015. The relation between dermoscopy and histopathology of basal cell carcinoma. *A Bras Dermatol.*, 90(3):351–356.
71. Enache, A. O., Pătraşcu, V., Simionescu, C. E. et al. 2019. Dermoscopy Patterns and Histopathological Findings in Nodular Basal Cell Carcinoma-Study on 68 Cases. *Curr Health Sci J.*, 45(1):116–122.
72. Enko, D., Fridrich, L., Rezanka, E., Stolba, R., Ernst, J., Wendler, I., Fabian, D., Hauptlorenz, S., Halwachs-Baumann, G. 2014. 25-hydroxy-Vitamin D status: limitations in comparison and clinical interpretation of serum-levels across different assay methods. *Clin Lab.*, 1541–1550.
73. Estébanez, N., Gómez-Acebo, I., Palazuelos, C. et al. 2018. Vitamin D exposure and Risk of Breast Cancer: a meta-analysis. *Sci Rep.*, 8, 9039.
74. Evangelista, M., Tian, H., Sauvage, F. 2006. The Hedgehog signaling pathway in cancer. Vol. 12, *Clin Cancer Res.*, 20:5924–5928.
75. Fang, M., Yuan, J., Peng, C., Li, Y. 2014. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biol.*, 35(4):2871–2882.
76. Fecher, L. A. 2013. Systemic therapy for inoperable and metastatic basal cell cancer. *Current treatment options in oncology*, 14(2), 237–248.
77. Fernanda, L., Rodriguez, J., Garbers, J., Fabricio de Melo, L. E. 2017. Recurrence rate of basal cell carcinoma with positive histopathological margins and related risk factors. *An Bras Dermatol.*, 92(1):58–62.
78. Fidelis, M. C., Stelini, R. F., Staffa, L. P., Moraes, A. M., Magalhães, R. F. 2021. Basal cell carcinoma with compromised margins: retrospective study of management, evolution, and prognosis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 96(1), 17–26.
79. Fitzpatrick, T. B. 1988. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol.*, 124(6):869–871.
80. Franchimont, C., Pierard, G. E., van Cauwenberge, D., Damseaux, M., Lapiere, C. H. 1982. Episodic progression and regression of basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.*, 106(3):305–310.
81. Garcia, C., Crowson, A. N. 2009. Basosquamous carcinoma. *J Am Acad Dermatol.*, 60(1): 137–143.
82. Garnett, E., Li, J., Rajapakshe, D., Tam, E., Meng, Q. H., Devaraj, S. 2019. Efficacy of two vitamin D immunoassays to detect 25-OH vitamin D2 and D3. *Practical laboratory medicine*, 17, e00130.
83. Ghafouri-Fard, S., Abbasi, A., Moslehi, H., Faramarzi, N., Taba Taba Vakili, S., Mobasheri, M. B., Modarressi, M. H. 2010. Elevated expression levels of testis-specific genes TEX101 and SPATA19 in basal cell carcinoma and their correlation with clinical and pathological features. *Br. J. Dermatol.*, 162, 772–779.
84. Goh, B. K., Ang, P., Wu, Y. J., Goh, C. L. 2006. Characteristics of basal cell carcinoma amongst Asians in Singapore and a comparison between completely and incompletely excised tumors. *Int. J. Dermatol.*, 45, 561–564.
85. Goldenberg, G., Hamid, O. 2013. Nonsurgical treatment options for basal cell carcinoma – focus on advanced disease. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 12(12), 1369–1378.
86. Griffiths, R. W., Suvarna, S. K., Stone, J. 2005. Do basal cell carcinomas recur after complete conventional surgical excision. *Br J Plast Surg*, 58(6):795–805.

87. Gozdzińska, A., Wojas-Pelc, A., Drag, J., Brzewski, P., Jaśkiewicz, J., Pastuszczyk, M. Expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in basal-cell carcinoma. *Mol Biol Rep.*, 43(10):1027–1033.
88. Griffiths, R. W., Suvarna, S. K., Stone, J. 2007. Basal cell carcinoma histological clearance margins: an analysis of 1539 conventionally excised tumours. Wider still and deeper? *J Plast Reconstr Aesthet Surg.*, 60 (1): 41–7.
89. Gupta, P., Bansal, V., Kumar-M, P., Sinha, S. K., Samanta, J., Mandavdhare, H., Sharma, V., Dutta, U., Kochhar, R. 2020. Diagnostic accuracy of Doppler ultrasound, CT and MRI in Budd Chiari syndrome: systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol.*, 93(1109), 20190847.
90. Hanna, A., Shevde, L. 2016. Hedgehog signaling modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Mol Cancer*, 15:24.
91. Harris, R. B., Griffith, K., Moon, T. E. 2001. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancers in southeastern Arizona, 1985-1996. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45, 528–536.
92. Haws, A. L., Rojano, R., Tahan, S. R., Phung, T. L. 2012. Accuracy of biopsy sampling for subtyping basal cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(1), 106–111.
93. Holmes, J., von Braunmühl, T., Berking, C., Sattler, E., Ulrich, M., Reinhold, U., Kurzen, H., Dirschka, T., Kellner, C., Schuh, S., Welzel, J. 2018. Optical coherence tomography of basal cell carcinoma: influence of location, subtype, observer variability and image quality on diagnostic performance. *Br J Dermatol.*, 178(5), 1102–1110.
94. Holtmann, H., Fuhrmann, V., Sander, K., Sproll, C., Kübler, N. R., Singh, D. D., Lommen, J. 2018. Histopathological and patient-related characteristics of basal cell carcinomas of the head and neck influencing therapeutic management. *Dermatol Reports*, 10(2):7674.
95. Horn, A., Palumbo, K., Cordazzo, C., Dees, C., Akhmetshina, A., Tomcik, M., Zerr, P., Avouac, J., Gusinde, J., Zwerina, J., Roudaut, H., Traiffort, E., Ruat, M., Distler, O., Schett, G., Distler, H. W. 2012. Hedgehog Signaling Controls Fibroblast Activation and Tissue Fibrosis in Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*, 64(8):2724–2733.
96. Ince, B., Yildirim, M., Dadaci, M. 2019. Assessing the Effect of Vitamin D Replacement on Basal Cell Carcinoma Occurrence and Recurrence Rates in Patients with Vitamin D Deficiency. *Hormones & cancer*, 10, 145–149.
97. Jacobsen, A. A., Strasswimmer, B. A., Strasswimmer, J. 2016. Spontaneous resolution of advanced basal cell carcinoma after short-pulse treatment with hedgehog pathway inhibitor. *JAAD Case Rep.*, 2(4):360–361.
98. Jeon, S. M., Shin, E. A. 2018. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp. Mol. Med.*, 50, 1–14.
99. Joshi, P. S., Deshmukh, V., Golgire, S. 2012. Gorlin-Goltz syndrome. *Dental research journal*, 9(1), 100–106.
100. Kállay, E., Bareis, P., Bajna, E., Kriwanek, S., Bonner, E., Toyokuni, S., Cross, H. S. 2002. Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 40(8), 1191–1196.
101. Kaminagakura, E., Almeida, J. D., Carvalho, Y. R., Franco, R. C., Soares, F. A., Rocha, R. M., Kowalski, L. P. 2013. Keratocyst of the buccal mucosa: case report and immunohistochemical comparative study with sporadic intraosseous keratocystic odontogenic tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.*, 116(5): e387–e392.
102. Karhadkar, S. S., Berman, D. M. 2004. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *J Nature*, 432(7015):324–331.

103. Katoh, M. 2019. Genomic testing, tumor microenvironment and targeted therapy of Hedgehog-related human cancers. *Clinical Science*, 133(8):953–970.
104. Keohane, S. G., Proby, C. M., Newlands, C., Motley, R. J., Nasr, I., Mohd Mustapa, M. F. 2018. British Association of Dermatologists (Squamous and Basal Cell Carcinoma Guideline Development Groups), Slater, D. N., Royal College of Pathologists (Skin Cancer Lead). The new 8th edition of TNM staging and its implications for skin cancer: a review by the British Association of Dermatologists and the Royal College of Pathologists, U.K. *Br J Dermatol.*, 179(4), 824–828.
105. Khalesi, M., Whiteman, D. C., Doi, S. A., Clark, J., Kimlin, M. G., Neale, R. E. 2013. Cutaneous markers of photo-damage and risk of Basal cell carcinoma of the skin: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 22, 1483–1489.
106. Khlebnikova, A. N., Belova, L. A., Gurevich, L. E., Selezneva, E. V., Sedova, T. G. 2020. Specifics of type IV collagen expression in basal cell skin carcinoma. *Almanac of Clin. Med.*, 48. (In Russian).
107. Kim, H. S., Kim, Y. S., Lee, C., Shin, M. S., Kim, J. W., Jang, B. G. 2019. Expression profile of sonic hedgehog signaling-related molecules in basal cell carcinoma. *PloS one*, 14, e0225511.
108. Kimura, N., Kimura, I. 2005. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathology international*, 55(2), 83–86.
109. Kimyai-Asadi, A., Katz, T., Goldberg, L. H. et al. 200. Margin involvement after the excision of melanoma in situ: the need for complete en face examination of the surgical margins. *Dermatol Surg.*, 33 (12):1434–9.
110. Koyuncuer, A. 2014. Histopathological evaluation of non-melanoma skin cancer. *World J Surg Oncol.*, 12: 159.
111. Krompecher, E. 1903. *Der Basalzellenkrebs*. Gustav Fischer, Jena.
112. Laikova, K. V., Oberemok, V. V., Krasnodubets, A. M., Gal'chinsky, N. V., Useinov, R. Z., Novikov, I. A., Temirova, Z. Z., Gorlov, M. V., Shved, N. A., Kumeiko, V. V., Makalish, T. P., Bessalova, E. Y., Fomochkina, I. I., Esin, A. S., Volkov, M. E., Kubyshkin, A. V. 2019. Advances in the Understanding of Skin Cancer: Ultraviolet Radiation, Mutations, and Antisense Oligonucleotides as Anticancer Drugs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(8), 1516.
113. Lallas, A., Apalla, Z., Ioannides, D., Argenziano, G., Castagnetti, F., Moscarella, E., Longo, C., Palmieri, T., Ramundo, D., Zalaudek, I. 2015. Dermoscopy in the diagnosis and management of basal cell carcinoma. *Future oncology (London, England)*, 11(22), 2975–2984.
114. Lammers, G., Verhaegen, P., Ulrich, M., Schalkwijk, J., Middelkoop, E., Weiland, D., Daamen, W. 2011. An Overview of Methods for the In Vivo Evaluation of Tissue-Engineered Skin Constructs. *Tissue Eng Part B Rev.*, 17(1):33–55.
115. Lara, F., Santamaría, J. R., Garbers, L. E. 2017. Recurrence rate of basal cell carcinoma with positive histopathological margins and related risk factors. *Anais brasileiros de dermatologia*, 92(1), 58–62.
116. Lau, J., Guminski, A., Gill, A., Veivers, D. 2018. Metastatic basal cell carcinoma: a review of six cases. *Aust J Otolaryngol.*, 2018, 1: 20.
117. Lee, J. W., Ratnakumar, K., Hung, K. F., Rokunohe, D., Kawasumi, M. 2020. Deciphering UV-induced DNA Damage Responses to Prevent and Treat Skin Cancer. *Photochemistry and photobiology*, 96, 478–499.
118. Lehmann, B. 2009. Role of the vitamin D3 pathway in healthy and diseased skin-facts, contradictions, and hypotheses. *Exp. Dermatol.*, 18, 97–108.
119. Leibovitch, I., Huilgol, S. C., Selva, D., Richards, S., Paver, R. 2005. Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia II. Outcome at 5-year follow-up. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(3), 452–457.

120. Lesack, K., Naugler, C. 2012. Morphometric characteristics of basal cell carcinoma peritumoral stroma varies among basal cell carcinoma subtypes. *BMC Dermatol.*, 12:1.
121. Lever, W. F. 1948. Pemphigus; a Histopathologic Study. *Arch. Dermat.*, 108.
122. Lever, W. F. 1961. *Histopathology of the Skin.* (3rd edit.), J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
123. Li, C. L., Chen, Y. C., Yang, K. C. et al. 2020. Different histopathologic profiles and outcomes between sun-exposed BCC and non-sun-exposed BCC. *Sci Rep.*, 10, 7387.
124. Liersch, J., Schaller, J. 2014. Das Basalzellkarzinom und seine seltenen Formvarianten [Basal cell carcinoma and rare form variants]. *Der Pathologe*, 35(5), 433–442.
125. Lips, P., Cashman, K. D., Lamberg-Allardt, C. et al. 2019. Current vitamin D status in European and Middle East countries and strategies to prevent vitamin D deficiency: a position statement of the European Calcified Tissue Society. *Eur. J. Endocrinol.*, 180, P23–P54.
126. Liu, Y., Liu, H., Bian, Q. 2020. Identification of Potential Biomarkers Associated with Basal Cell Carcinoma. *BioMed research international*, 2073690.
127. Lupu, M., Caruntu, C., Ghita, M. A. 2016. Gene Expression and Proteome Analysis as Sources of Biomarkers in Basal Cell Carcinoma. *Dis Markers*, 9831237.
128. Luz, F. B., Ferron, C., Cardoso, G. P. 2015. Surgical treatment of basal cell carcinoma: an algorithm based on the literature. *Anais brasileiros de dermatologia*, 90(3), 377–383.
129. Mackiewicz-Wysocka, M., Bowszyc-Dmochowska, M., Strzelecka-Węklar, D., Dańczak-Pazdrowska, A., Adamski, Z. 2013. Basal cell carcinoma – diagnosis. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, 17, 337–342.
130. Madej-Czerwonka, B., Korga-Plewko, A. 2022. Metatypical basal cell carcinoma: from the primary tumour to a generalized metastatic process – description of diagnostics and combination therapy of an extremely rare skin cancer. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 29(1), 152–156.
131. Mahamat-Saleh, Y., Aune, D., Schlesinger, S. 2020. 25-Hydroxyvitamin D status, vitamin D intake, and skin cancer risk: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Sci. Rep.*, 10, 13151.
132. Malhotra, R., Huilgol, S. C., Huynh, N. T., Selva, D. 2004. The Australian Mohs database, part II: periocular basal cell carcinoma outcome at 5-year follow-up. *Ophthalmology*, 111(4), 631–636.
133. Marasà, L., Marasa, S., Sciancalepore, G. 2008. Collagen IV, laminin, fibronectin, vitronectin. Comparative study in basal cell carcinoma. Correlation between basement membrane molecules expression and invasive potential. *G Ital Dermatol Venereol.*, 143(3):169–173.
134. Martin-Gorgojo, A., Gilaberte, Y., Nagore, E. 2021. Vitamin D and Skin Cancer: An Epidemiological, Patient-Centered Update and Review. *Nutrients*, 13, 4292.
135. Matei, C., Tampa, M., Poteca, T., Panea-Paunica, G., Georgescu, S. R., Ion, R. M., Popescu, S. M., Giurcaneanu, C. 2013. Photodynamic therapy in the treatment of basal cell carcinoma. *Journal of medicine and life*, 6(1), 50–54.
136. Mawardi, P., Kalim, H., Kalim, K. H., Fitri, L. E., Mintaroem, K., Mudigdo, A., Wasita, B. 2016. Mid-face location of primary basal cell carcinoma related to cancer aggressivity. *Asian Pac J Trop Dis*, 6(8):650–653.
137. McCann, C. K., Growdon, W. B., Kulkarni-Datar, K., Curley, M. D., Friel, A. M., Proctor, J. L., Sheikh, H., Deyneko, I., Ferguson, J. A., Vathipadiekal, V., Birrer, M. J., Borger, D. R., Mohapatra, G., Zukerberg, L. R., Foster, R., Macdougall, J. R., Rueda, B. R. 2011. Inhibition of hedgehog signaling antagonizes serous ovarian cancer growth in a primary xenograft model. *PLoS One*, 6(11): e28077.
138. McDaniel, B., Badri, T., Steele, R. B. 2021. Basal Cell Carcinoma. *In StatPearls. StatPearls Publishing.*

139. McDonnell, S. L., Baggerly, C. A., French, C. B., Baggerly, L. L., Garland, C. F., Gorham, E. D., Hollis, B. W., Trump, D. L., Lappe, J. M. 2018. Breast cancer risk markedly lower with serum 25-hydroxyvitamin D concentrations ≥ 60 vs < 20 ng/ml (150 vs 50 nmol/L): Pooled analysis of two randomized trials and a prospective cohort. *PLoS one*, 13, e0199265.
140. Mercur, R., Ciurea, M. E., Mărgăritescu, C., Popescu, S. M., Crăitoiu, M. M., Cotoi, O. S., Voinescu, D., C. 2014. Expression of p53, D2-40 and α -smooth muscle actin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.*, 55(2):263–272.
141. Miszczyk, J., Charytonowicz, M., Dębski, T., Noszczyk, B. 2017. Incomplete excision of basal cell carcinoma (BCC) in the head and neck region: to wait, or not to wait? *Postepy dermatologii i alergologii*, 34(6), 607–611.
142. Mostafa, W. Z., Hegazy, R. A. 2015. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *J Adv Res.*, 6, 793–804.
143. Misago, N., Satoh, T., Narisawa, Y. 2004. Cornification (keratinization) in Basal cell carcinoma: a histopathological and immunohistochemical study of 16 cases. *The Journal of dermatology*, 31(8), 637–650.
144. Moisejenko-Golubovica, J., Volkovs, O., Ivanova, A., Petrošina, E., Groma, V. 2021. What We Need to Learn When Exploring the Mixed Basal Cell Carcinoma of Head and Neck. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. *Section B, Natural Sciences*, 75, 75–85.
145. Moisejenko-Golubovica, J., Volkovs, O., Ivanova, A., Groma, V. 2020. Analysis of the occurrence and distribution of primary and recurrent basal cell carcinoma of head and neck coupled to the assessment of tumor microenvironment and Sonic hedgehog signaling. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 61, 821–831.
146. Montagna, E., Lopes, O. S. 2017. Molecular basis of basal cell carcinoma. *A Bras Dermatol.*, 92(4):517–520.
147. Morgado-Águila, C., Gil-Fernández, G., Dávila-Villalobos, O. R., Pérez-Rey, J., Rey-Sánchez, P., Rodríguez-Velasco, F. J. 2021. Vitamin D serum levels and non-melanoma skin cancer risk. *PeerJ.*, 9, e12234.
148. Morton, C. A., McKenna, K. E., Rhodes, L. E. British Association of Dermatologists Therapy Guidelines and Audit Subcommittee and the British Photodermatology Group. 2008. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol.*, 159(6), 1245–1266.
149. Mosterd, K., Krekels, G., Nieman, F. et al. 2008. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for primary and recurrent basal-cell carcinoma of the face: a prospective randomised controlled trial with 5-years' follow-up. *Lancet Oncol.*, 9:1149–56.
150. Mukane, M., Rasa, I., Mukans, M. 2015. First epidemiological study about vitamin D status and lifestyle factors in healthy young adults from Latvia: DLAT study (Part 1). *World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases, Abstract book*, P359, 187.
151. Murkey, N., Murkey, P., Kalele, K. P., Patil, K. P. 2017. Adenoid Variant of Basal Cell Carcinoma: A Case Report with a Glance at Biological Behavior of the Tumor. *Indian journal of dermatology*, 62(1), 103–105.
152. Mutimer, C. A., Dicker, A. J. 2021. Marking a surgical margin for excision of a keratinocyte cancer. *Australian journal of general practice*, 50(6), 385–387.
153. Muzic, J. G., Schmitt, A. R., Wright, A. C., Alniemi, D. T., Zubair, A. S., Olazagasti Lourido, J. M., Sosa Seda, I. M., Weaver, A. L. & Baum, C. L. 2017. Incidence and Trends of Basal Cell Carcinoma and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Population-Based Study in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *Mayo Clinic proceedings*, 92(6), 890–898.

154. Miyake, M., Hori, S., Morizawa, Y., Tatsumi, Y., Toritsuka, M., Ohnishi, S., Shimada, K., Furuya, H., Khadka, V. S., Deng, Y., Ohnishi, K., Iida, K., Gotoh, D. et al. 2017. Collagen type IV alpha 1 (COL4A1) and collagen type XIII alpha 1 (COL13A1) produced in cancer cells promote tumor budding at the invasion front in human urothelial carcinoma of the bladder. *Oncotarget.*, 8(22), 36099–36114.
155. Naik, M. P., Mehta, A., Abrol, S., Kumar, S., Gupta, V. S. 2016. Topical 5 % 5-fluorouracil in the treatment of multifocal basal cell carcinoma of the face: A novel chemotherapeutic approach. *Orbit (Amsterdam, Netherlands)*, 35(6), 352–354.
156. Narayanan, K., Hadid, O. H., Barnes, E. A. 2014. Mohs micrographic surgery versus surgical excision for periocular basal cell carcinoma. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2014(12), CD007041.
157. Nelson, S. A., Scope, A., Rishpon, A., Rabinovitz, H. S., Oliviero, M. C., Laman, S. D., Cole, C. M., Chang, Y. H., Swanson, D. L. 2016. Accuracy and confidence in the clinical diagnosis of basal cell cancer using dermoscopy and reflex confocal microscopy. *International journal of dermatology*, 55(12), 1351–1356.
158. Nestor, M. S., Berman, B., Goldberg, D., Cognetta, A. B., Jr, Gold, M., Roth, W., Cockerell, C. J., Glick, B. 2019. Consensus Guidelines on the Use of Superficial Radiation Therapy for Treating Nonmelanoma Skin Cancers and Keloids. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 12(2), 12–18.
159. Niculet, E., Craescu, M., Rebegea, L., Bobeica, C., Nastase, F., Lupasteanu, G., Stan, D. J., Chioncel, V., Anghel, L., Lungu, M., Tatu, A. L. 2022. Basal cell carcinoma: Comprehensive clinical and histopathological aspects, novel imaging tools and therapeutic approaches (Review). *Experimental and therapeutic medicine*, 23(1), 60.
160. Nolan, G. S., Wormald, J., Kiely, A. L., Totty, J. P., Jain, A. 2020. Global incidence of incomplete surgical excision in adult patients with non-melanoma skin cancer: study protocol for a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Systematic reviews*, 9(1), 83.
161. Okuboyejo, D. A., Olugbara, O. O. 2018. A Review of Prevalent Methods for Automatic Skin Lesion Diagnosis. *The Open Dermatol. J.*, 12(1), 14–53.
162. Omland, S. H., Nielsen, P. S., Gjerdrum, L. M., Gniadecki, R. 2016. Immunosuppressive Environment in Basal Cell Carcinoma: The Role of Regulatory T Cells. *Acta Derm Venereol.*, 96(7):917–921.
163. Pampena, R., Parisi, G., Benati, M., Borsari, S., Lai, M., Paolino, G., Cesinaro, A. M., Ciardo, S., Farnetani, F., Bassoli, S., Argenziano, G., Pellacani, G., Longo, C. 2021. Clinical and Dermoscopic Factors for the Identification of Aggressive Histologic Subtypes of Basal Cell Carcinoma. *Frontiers in oncology*, 10, 630458.
164. Peltanova, B., Raudenska, M., Masarik, M. 2019. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Mol Cancer*, 18(1):63.
165. Paoli, J., Gyllencreutz, J. D., Fougelberg, J., Backman, E. J., Modin, M., Polesie, S., Zaar, O. 2019. Nonsurgical Options for the Treatment of Basal Cell Carcinoma. *Dermatol. Pract. Concept.*, 9(2), 75–81.
166. Peppelman, M., Nguyen, K. P., Alkemade, H. A., Maessen-Visch, B., Hendriks, J. C., van Erp, P. E., Adang, E. M., Gerritsen, M. J. 2016. Diagnosis of Basal Cell Carcinoma by Reflectance Confocal Microscopy: Study Design and Protocol of a Randomized Controlled Multicenter Trial. *JMIR research protocols*, 5(2), e114.

167. Peris, K., Fargnoli, M. C., Garbe, C., Kaufmann, R., Bastholt, L., Seguin, N. B., Bataille, V., Marmol, V. D., Dummer, R., Harwood, C. A., Hauschild, A., Höller, C., Haedersdal, M., Malvey, J., Middleton, M. R., Morton, C. A., Nagore, E., Stratigos, A. J., Szeimies, R. M., Tagliaferri, L. 2019. European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology (EADO) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Diagnosis and treatment of basal cell carcinoma: European consensus-based interdisciplinary guidelines. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 118, 10–34.
168. Peters, M., Smith, J. D., Kovatch, K. J., McLean, S., Durham, A. B., Basura, G. 2020. Treatment and Outcomes for Cutaneous Periauricular Basal Cell Carcinoma: A 16-Year Institutional Experience. *OTO open*, 4(4), 2473974X20964735.
169. Petit, J. Y., Avril, M. F., Margulis, A. et al. 2000. Evaluation of cosmetic results of a randomized trial comparing surgery and radiotherapy in the treatment of basal cell carcinoma of the face. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 105(7), 2544–2551.
170. Peterson, S. C., Eberl, M., Vagnozzi, A. N., Belkadi, A., Veniaminova, N. A., Verhaegen, M. E., Bichakjian, C. K., Ward, N. L., Dlugosz, A. A., Wong, S. Y. 2015. Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. *Cell Stem Cell*, 16(4), 400–412.
171. Pilloni, L., Bianco, P., Manieli, C., Senes, G., Coni, P., Atzori, L., Aste, N., Faa, G. 2009. Immunoreactivity for alpha-smooth muscle actin characterizes a potentially aggressive subgroup of little basal cell carcinomas. *Eur J Histochem.*, 53(2):113–116.
172. Poggi, L., Kolesar, J. M. 2013. Vismodegib for the treatment of basal cell skin cancer. *AJHP*, 70(12), 1033–1038.
173. Popadić, M. 2014. Statistical evaluation of dermoscopic features in basal cell carcinomas. *Dermatol. Surg.*, 40(7), 718–724.
174. Prieto-Granada, C., Rodriguez-Waitkus, P. 2015. Basal cell carcinoma: Epidemiology, clinical and histologic features, and basic science overview. *Current problems in cancer*, 39(4), 198–205.
175. Puig, S., Cecilia, N., Malvey, J. 2012. Dermoscopic criteria and basal cell carcinoma. *G Ital. Dermatol. Venereol.*, 147(2), 135–140.
176. Quatresooz, P., Martalo, O., Pie'rard, G. E. 2003. Differential expression of a1 (IV) and a5 (IV) collagen chains in basal-cell carcinoma. *J Cutan Pathol.*, 30(9):548–552.
177. Quazi, S. J., Aslam, N., Saleem, H., Rahman, J., Khan, S. 2020. Surgical Margin of Excision in Basal Cell Carcinoma: A Systematic Review of Literature. *Cureus*, 12(7), e9211.
178. Ramdas, K., van Lee, C., Beck, S., Bindels, P., Noordhoek Hegt, V., Pardo, L., Versnel, S., Nijsten, T., van den Bos, R. 2018. Differences in Rate of Complete Excision of Basal Cell Carcinoma by Dermatologists, Plastic Surgeons and General Practitioners: A Large Cross-Sectional Study. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 234(3–4), 86–91.
179. Ramezani, M., Zavattaro, E., Sadeghi, M. 2020. Immunohistochemistry expression of EMA, CD10, CEA, and Bcl-2 in distinguishing cutaneous basal cell from squamous cell carcinoma: A systematic review. *Gulhane Med J.*, 62:63-71.
180. Rass, K., Reichrath, J. 2008. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol.*, 624:162–78.
181. Reggiani, C., Zalaudek, I., Piana, S., Longo, C., Argenziano, G., Lallas, A., Pellacani, G., Moscarella, E. 2013. Fibroepithelioma of Pinkus: case reports and review of the literature. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 226(3), 207–211.
182. Ríos-Buceta, L. Management of basal cell carcinomas with positive margins. 2007. *Actas Dermosifiliogr.*, 98(10):679–687.
183. Roma-Rodrigues, C., Mendez, R., Baptista, P. V., Fernandes, A. R. 2019. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.*, 20(4):840.

184. Ross, A. C., Manson, J. E., Abrams, S. A., Aloia, J. F., Brannon, P. M., Clinton, S. K., Durazo-Arvizu, R. A., Gallagher, J. C., Gallo, R. I., Jones, G. et al. 2011. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 96, 53–58.
185. Rozmus, D., Ciesielska, A., Płomiński, J., Grzybowski, R., Fiedorowicz, E., Kordulewska, N., Savelkoul, H., Kostyra, E., Cieślińska, A. 2020. Vitamin D Binding Protein (VDBP) and Its Gene Polymorphisms-The Risk of Malignant Tumors and Other Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 7822.
186. Rubin, A. I., Chen, E. H., Ratner, D. 2005. Basal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*, 353(21), 2262–2269.
187. Sălan, A. I., Mărășescu, P. C., Camen, A., Ciucă, E. M., Matei, M., Florescu, A. M., Pădureanu, V., Mărgăritescu, C. 2018. The prognostic value of CXCR4, α -SMA and WASL in upper lip basal cell carcinomas. *Rom J Morphol Embryol.*, 59(3):839–849.
188. Samuel, S., Sitrin, M. D. 2008. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutr. Rev.*, 66, S116–S124.
189. Sanchez, P., Hernández, A. M., Stecca, B., Kahler, A. J., DeGueme, A. M., Barrett, A., Beyna, M., Datta, M. W., Datta, S., Ruiz, I., Altaba, A. 2004. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with Sonic hedgehog-Gli 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci.*, 101(34):2561–12566.
190. Sasaki, K., Sugai, T., Ishida, K., Amano, H., Kimura, H., Sakuraba, M., Kashiwa, K., Kobayashi, S. 2018. Analysis of cancer-associated fibroblasts and the epithelial-mesenchymal transition in cutaneous basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant melanoma. *Hum Pathol.*, 79:1–8.
191. Save, S., Tambe, S., Nayak, C. 2018. Basal cell carcinoma with sebaceous differentiation. *Indian Dermatol Online J.*, 9:273–5.
192. Saxena, K., Manohar, V., Bhakhar, V., Bahl, S. 2016. Adenoid basal cell carcinoma: a rare facet of basal cell carcinoma. *BMJ case reports*, 10.1136/bcr–214166.
193. Schwartzberg, J. B., Elgart, G. W., Romanelli, P., Fangchao, M., Federman, D. G., Kirsner, R. S. 2005. Accuracy and predictors of basal cell carcinoma diagnosis. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery*, 31(5), 534–537.
194. Scrivener, Y., Grosshans, E., Cribier, B. 2002. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol.*, 147:41–7.
195. Skiveren, J., Mikkelsen, M. R., Daugbjerg, H., Wulf, H. C. 2012. Skin reactions and quality of life after x-ray therapy of Basal cell carcinoma. *Journal of skin cancer*, 2012, 825095.
196. Sellheyer, K., Nelson, P., Kutzner, H. 2012. Fibroepithelioma of Pinkus is a true basal cell carcinoma developing in association with a newly identified tumour-specific type of epidermal hyperplasia. *Br J Dermatol.*, 166(1), 88–97.
197. Sereflican, B., Tuman, B., Şereflican, M., Halıcıoğlu, S., Özyalvaçlı, G., Bayrak, S. 2017. Gorlin-Goltz syndrome. *Turk pediatri arsivi.*, 52(3), 173–177.
198. Silverman, M. K., Kopf, A. W., Bart, R. S., Grin, C. M., Levenstein, M. S. 1992. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 3: Surgical excision. *J Dermatol Surg Oncol.*, 18 (6): 471–6.
199. Simin, S. M., Shahriar Meymandi, S., Dabiri, S., Meymand, A., Iranpour, M., Khalili, M., Alijani, S. 2019. Aflatoonian M. Evaluation of Immunohistochemical Findings and Clinical Features Associated with Local Aggressiveness in Basal Cell Carcinoma. *Iran J Pathol.*, 14(3):193–196.
200. Simpson, C. A., Cusano, A. M., Bihuniak, J., Walker, J., Insogna, K. L. 2015. Effect of 25(OH) vitamin D reference method procedure (RMP) alignment on clinical measurements obtained with the IDS-iSYS chemiluminescent-based automated analyzer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 148, 41–46.

201. Sin, C. W., Barua, A., Cook, A. 2016. Recurrence rates of periocular basal cell carcinoma following Mohs micrographic surgery: a retrospective study. *Int J Dermatol*, 55(9):1044–1047.
202. Singal, A., Daulatabad, D., Pandhi, D., Arora, V. K. 2016. Facial Basal Cell Carcinoma Treated with Topical 5 % Imiquimod Cream with Dermoscopic Evaluation. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, 9(2), 122–125.
203. Situm, M., Buljan, M., Bulat, V., Lugović Mihić, L., Bolanca, Z., Simić, D. 2008. The role of UV radiation in the development of basal cell carcinoma. *Collegium antropologicum*, 32, 167–170.
204. Smith, V., Walton, S. 2011. Treatment of facial Basal cell carcinoma: a review. *Journal of skin cancer*, 2011, 380371.
205. SPKC datubāze https://statistika.spkc.gov.lv/pxweb/en/Health/Health__Saslimstiba_Slimibu_Izplatiba__Onkologija/ONKO040_2.px/table/tableViewLayout2/
206. Staples, M. P., Elwood, M., Burton, R. C., Williams, J. L., Marks, R., Giles, G. G. 2006. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *The Medical journal of Australia*, 184, 6–10.
207. Summerhays, E., Eliasson, M., Lundqvist, R. et al. 2020. Time trends of vitamin D concentrations in northern Sweden between 1986 and 2014: a population-based cross-sectional study. *Eur. J. Nutr.*, 59, 3037–3044.
208. Sun, M., Wu, X., Yu, Y., Wang, L., Xie, D., Zhang, Z., Chen, L., Lu, A., Zhang, G., Li, F. 2020. Disorders of Calcium and Phosphorus Metabolism and the Proteomics/Metabolomics-Based Research. *Front Cell Dev. Biol.*, 10, 576110.
209. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
210. Shash, H. A., Almarzouq, S. F., Alghamdi, A. A., Alratroot, J. A. 2020. Basal Cell Carcinoma with Sebaceous Differentiation: A Case Report and Review of Literature. *Plastic and reconstructive surgery*. *Global open*, 8(12), e3234.
211. Swetter, S. M., Boldrick, J. C., Pierre, P., Wong, P., Egbert, B. M. 2003. Effects of biopsy-induced wound healing on residual basal cell and squamous cell carcinomas: rate of tumor regression in excisional specimens. *J Cutan Pathol.*, 30(2):139–146.
212. Šimoliūnas, E., Rinkūnaitė, I., Bukelskienė, Ž., Bukelskienė, V. 2019. Bioavailability of Different Vitamin D Oral Supplements in Laboratory Animal Model. *Medicina (Kaunas)*, 55, 265.
213. Tambe, S. A., Ghate, S. S., Jerajani, H. R. 2013. Adenoid type of Basal cell carcinoma: rare histopathological variant at an unusual location. *Indian journal of dermatology*, 58(2), 159.
214. Tampa, M., Georgescu, S. R., Mitran, C. I., Mitran, M. I., Matei, C., Scheau, C., Constantin, C., Neagu, M. 2020. Recent Advances in Signaling Pathways Comprehension as Carcinogenesis Triggers in Basal Cell Carcinoma. *Journal of clinical medicine*, 9, 3010.
215. Tang, J. Y., Parimi, N., Wu, A., Boscardin, W. J., Shikany, J. M., Chren, M. M., Cummings, S. R., Epstein, E. H. Jr., Bauer, D. C. 2010. Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Group. Inverse association between serum 25(OH) vitamin D levels and non-melanoma skin cancer in elderly men. *Cancer causes & control: CCC*, 21, 387–391.
216. Tang, J. Y., Fu, T., Lau, C., Oh, D. H., Bikle, D. D., Asgari, M. M. 2012. Vitamin D in cutaneous carcinogenesis: Part II. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 67, 817.E1–817.E11.
217. Tehrani, H., May, K., Morris, A., Motley, R. 2013. Does the dual use of toluidine blue and hematoxylin and eosin staining improve basal cell carcinoma detection by Mohs surgery trainees?. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 39(7), 995–1000.
218. Telfer, N. R., Colver, G. B., Morton, C. A. 2008. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.*, 159(1), 35–48.

219. Teng, Y., Yu, Y., Li, S., Huang, Y., Xu, D., Tao, X., Fan, Y. 2021. Ultraviolet Radiation and Basal Cell Carcinoma: An Environmental Perspective. *Frontiers in public health*, 9, 666528.
220. Thanasitthichai, S., Prasitthipayong, A., Boonmark, K., Purisa, W., Guayraksa, K. 2019. Negative Impact of 25-hydroxyvitamin D Deficiency on Breast Cancer Survival. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 20, 3101–3106.
221. Tolani, B., Hoang, N., Acevedo, L., Leprieur, E. G., Li, H., He, B., Jablons, D. M. 2018. Preclinical characterization of therapeutic antibodies targeted at the carboxy-terminus of Sonic hedgehog. *Oncotarget*, 9(18):14311–14323.
222. Tong, J., Mitchell, B., Roth, K., Logan, D., Ernst, S. 2022. Real-World Experience of Vismodegib in Advanced Basal Cell Carcinoma at a Canadian Cancer Center. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 26(2), 143–148.
223. Trigoni, A., Lazaridou, E., Apalla, Z., Vakirlis, E., Chrysomallis, F., Varytimiadis, D., Ioannides, D. 2012. Dermoscopic features in the diagnosis of different types of basal cell carcinoma: a prospective analysis. *Hippokratia*, 16(1), 29–34.
224. Troeltzsch, M., Probst, F. A., Knösel, T., Mast, G., Ehrenfeld, M., Otto, S. 2016. Clinical and pathologic parameters predicting recurrence of facial basal cell carcinoma: a retrospective audit in an advanced care center. *Int J Dermatol.*, 55(11):1281–1288.
225. Tsuji, T., Catusus, L., Prat, J. 2005. Is loss of heterozygosity at 9q22.3 (PTCH gene) and 19p13.3 (STK11 gene) involved in the pathogenesis of ovarian stromal tumors? *Human pathology*, 36(7), 792–796.
226. Vaca-Aguilera, M., Guevara-Gutierrez, E., Barrientos-Garcia, J., Tlacuilo-Parra, A. 2019. Giant basal cell carcinoma: clinical–histological characteristics of 115 cases. *Int J Dermatol.*, 58(12):1430–1434.
227. Van Steensel, M. A., Jaspers, N. G., Steijlen, P. M. 2001. A case of Rombo syndrome. *Br J Dermatol.*, 144(6), 1215–1218.
228. Vandikas, M. S., Landin-Wilhelmsen, K., Gillstedt, M., Osmancevic, A. 2022. Vitamin D-Binding Protein and the Free Hormone Hypothesis for Vitamin D in Bio-Naïve Patients with Psoriasis. *International journal of molecular sciences*, 23, 1302.
229. Vantuchova, Y., Curik, R. 2006. Histological types of basal cell carcinoma. *Scripta Medica (Brno)*, 79:261–70.
230. Verduzco-Martínez, A. P., Quiñones-Venegas, R., Guevara-Gutiérrez, E., Tlacuilo-Parra, A. 2013. Correlation of dermoscopic findings with histopathologic variants of basal cell carcinoma. *Int. J. Dermatol.*, 52(6), 718–721.
231. Verkouteren, J., Ramdas, K., Wakkee, M., Nijsten, T. 2017. Epidemiology of basal cell carcinoma: scholarly review. *Br J Dermatol.*, 177(2), 359–372.
232. Villani, A., Potestio, L., Fabbrocini, G., Scalvenzi, M. 2022. New Emerging Treatment Options for Advanced Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Advances in therapy*, 39(3), 1164–1178.
233. Vidal, D., Matías-Guiu, X., Alomar, A. 2007. Fifty-five basal cell carcinomas treated with topical imiquimod: outcome at 5-year follow-up. *Archives of dermatology*, 143(2), 266–268.
234. Vornicescu, C., Șenilă, S. C., Bejinariu, N. I., Vesa, Ș. C., Boșca, A. B., Chirilă, D. N., Melincovici, C. S., Sorițău, O., Mișu, C. M. 2021. Predictive factors for the recurrence of surgically excised basal cell carcinomas: A retrospective clinical and immunopathological pilot study. *Experimental and therapeutic medicine*, 22(5), 1336.
235. Walker, P., Hill, D. 2006. Surgical treatment of basal cell carcinomas using standard postoperative histological assessment. *Australasian Journal of Dermatology*, 47(1), 1–12.

236. Warwick, T., Schulz, M. H., Günther, S. et al. 2021. A hierarchical regulatory network analysis of the vitamin D induced transcriptome reveals novel regulators and complete VDR dependency in monocytes. *Sci. Rep.*, 11, 6518.
237. Watt, T. C., Inskip, P. D., Stratton, K., Smith, S. A., Kry, S. F., Sigurdson, A. J., Stovall, M., Leisenring, W., Robison, L. L., Mertens, A. C. 2012. Radiation-related risk of basal cell carcinoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(16), 1240–1250.
238. Webb, D. V., Mentrikoski, M. J., Verduin, L., Brill, L. B., Wick, M. R. 2015. Basal cell carcinoma vs basaloid squamous cell carcinoma of the skin: an immunohistochemical reappraisal. *Annals of diagnostic pathology*, 19(2), 70–75.
239. Wicki, A., Christofori, G. 2007. The potential role of podoplanin in tumor invasion. *Br J Cancer*, 96(1), 1–5.
240. Wilson, A. W., Howsam, G., Santhanam, V. et al. 2004. Surgical management of incompletely excised basal cell carcinomas of the head and neck. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42(4), p311–314.
241. Wojciechowska-Zdrojowy, M., Szepietowski, J. C., Matusiak, Ł., Dzięgiel, P., Puła, B. 2016. Expression of Podoplanin in Non-melanoma Skin Cancers and Actinic Keratosis. *Anticancer Res.*, 36(4), 1591–1597.
242. Wolberink, E. A., Pasch, M. C., Zeiler, M., van Erp, P. E., Gerritsen, M. J. 2013. High discordance between punch biopsy and excision in establishing basal cell carcinoma subtype: analysis of 500 cases. *JEADV*, 27(8), 985–989.
243. Wondimu, Z. Omrani, S., Ishikawa, T., Javed, F., Oikawa, Y., Virtanen, I. 2013. A Novel Monoclonal Antibody to Human Laminin $\alpha 5$ Chain Strongly Inhibits Integrin-Mediated Cell Adhesion and Migration on Laminins 511 and 521. *PLoS One*, 8(1): e53648.
244. Wozniak-Rito, A., Zalaudek, I., Rudnicka, L. 2018. Dermoscopy of basal cell carcinoma. *Clin. Exp. Dermatol.*, 43(3), 241–247.
245. Wright, C., Coetzee, G., Ncongwane, K. 2011. Seasonal trends in potential sunburn risk among outdoor workers in South Africa using monitored ambient solar UV radiation levels. *Occupational Health South Africa*, 17(5):22–29.
246. Wu, J., Hong, Y., Wu, T., Wang, J., Chen, X., Wang, Z., Cheng, B., Xi, J. 2018. Stromal epithelial lactate shuttle induced by tumor derived interleukin 1 β promotes cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med.*, 2018, 41(2):687–696.
247. Zalaudek, I., Kreuzsch, J., Giacomel, J., Ferrara, G., Catricalà, C., Argenziano, G. 2010. How to diagnose nonpigmented skin tumors: a review of vascular structures seen with dermoscopy: part I. Melanocytic skin tumors. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 63(3), 361–376.

Pateicības

Vislielākā un vissirsnīgākā pateicība ir manām darba vadītājām profesorei Valērijai Gromai un *Dr. med.* docentei Annai Ivanovai par ieguldīto darbu, padomiem, pacietību un atbalstu promocijas darba izstrādē un sagatavošanā. Ļoti pateicos saviem kolēģiem par mana pētījuma veicināšanu un atbalstu. Paldies RSU AAI Starpkatedru elektronmikroskopijas laboratorijas kolektīvam, īpaši docentei Sandrai Skujai, par padomiem un atbalstu promocijas darba tapšanā. Šimonam Svirskim par palīdzību datu statistiskajā apstrādē un attēlu izveidē. Es pateicos savai ģimenei par pacietību, sapratni un atbalstu promocijas darba tapšanas laikā.

Pielikumi

Pirmā publikācija

Moisejenko-Golubovica, J., Volkov, O., Ivanova, A., Groma, V. 2020. Analysis of the occurrence and distribution of primary and recurrent basal cell carcinoma of head and neck coupled to the assessment of tumor microenvironment and Sonic hedgehog signaling. *Romanian journal of morphology and embryology*, 61(3), 821–831.

Rev. J Morphol Embryol 2020, 61(3):821–831 ISSN (print) 1220–6522, ISSN (online) 2066–8278 doi: 10.47167/RJME.61.3.70

ORIGINAL PAPER



Analysis of the occurrence and distribution of primary and recurrent basal cell carcinoma of head and neck coupled to the assessment of tumor microenvironment and Sonic hedgehog signaling

JELENA MOISEJENKO-GOLUBOVICA¹⁾, OLEG VOLKOV²⁾, ANNA IVANKOVA³⁾, VALERIEA GROMA⁴⁾

¹⁾Department of Doctoral Studies, Riga Stradins University, Riga, Latvia

²⁾Department of Undergraduate Program, Faculty of Medicine, Riga Stradins University, Riga, Latvia

³⁾Department of Maxillofacial Surgery, Institute of Stomatology, Riga Stradins University, Riga, Latvia

⁴⁾Institute of Anatomy and Anthropology, Riga Stradins University, Riga, Latvia

Abstract

Often, basal cell carcinoma (BCC) displays local aggressiveness, and when developed in the head and neck presents with deep tissue invasion and recurrence. Previous studies have pointed out the necessity of systematic assessment of primary and recurrent BCC based on a better understanding of the biology and function of its microenvironment. Although hedgehog dependent tumor cells signaling to the underlying stroma, and vice versa, have been demonstrated to be implicated in the pathogenesis of BCC, little is known about peculiarities of the tumor microenvironment and the above-mentioned signaling in the head and neck. The occurrence and distribution of 79 primary and recurrent BCCs developed in the head and neck region were estimated. The data were coupled with the immunohistochemical assessment of type IV collagen, laminin, alpha-smooth muscle actin (α -SMA), and Sonic hedgehog (Shh). The frequency of the mixed BCCs and the predominance of the nose and cheek region affection by primary and recurrent tumors were demonstrated. Furthermore, the increase of peritumoral and within stromal α -SMA immunoreactivity in the mixed recurrent BCC was confirmed using statistics. We found the increase of strong levels of Shh immunopositivity in the aggressive variants of BCC – infiltrative, mixed, and micronodular. Surprisingly, we confirmed the upregulation of Shh paralleled by the downregulation of α -SMA immunopositivity in the superficial subtype of the tumor. Our results suggest the necessity of further studies assessing the nature of the tumor along with the peculiarities of signaling in BCCs of head and neck.

Keywords: basal cell carcinoma, head and neck, tumor microenvironment, α -SMA, Sonic hedgehog.

Introduction

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common malignant cutaneous neoplasm with an annual incidence increasing worldwide [1]. It develops from cells of the basal epidermal layer and adnexal epithelium [1, 2]. According to the literature and our observations, the age of patients affected by BCC has been shifted from 50 to 40 and even 30 years [1, 2]. The most common histopathological (HP) subtypes of BCC recognized are nodular, mixed, infiltrating, sclerosing, micronodular, superficial, and basosquamous with the first two reported to be predominant [3]. Other studies reporting on the incidence of the tumor have demonstrated that the nodular ulcerative subtype represents 40–60% of BCCs, the superficial type comprises 15–30% and 1–2% is the pigmented BCC [4]. Progression of BCC is slow, and it rarely metastasizes due to its downregulated vascularization [5, 6], however, it often appears locally invasive and shows destructive growth [7]. The recurrence rates of BCC reported by the literature are greatly varying – from 10% up to 67% [6, 8, 9], whereas the distinguished rates of residual tumors vary between 7% and 45% [9]. It is worth noting that BCC has been described not only to spontaneously progress but also regress and disappear [8, 10, 11], and the

potential ability of the residual tumor to regress has been acknowledged previously [8]. It has been pointed out that despite sufficient progress achieved in diagnostics of BCC and progress made in its treatment options, recurrent, aggressive, and metastatic variants of the tumor still pose a significant challenge for the healthcare system [12].

It has been shown that BCC appears intimately connected to its stromal component by use of the basement membrane (BM) molecules, and the interaction between tumor mass and its stroma is essential in the disease pathogenesis. Loss of BM material around individual tumor cell nests occurs with progression from indolent to aggressive growth BCC [13]. These authors have emphasized that in the superficial and nodular variants of BCC tumor nests are surrounded by a continuous BM comprised of type IV and V collagen admixed with laminin, while infiltrative and morpheiform variants show an absent BM and pronounced stromal desmoplasia. Furthermore, previous studies have demonstrated that the immunopositivity of collagen and laminin, the major molecules of the BM, differs in primary and recurrent BCC [14].

Much success has been achieved in the understanding of the architecture of the tumor microenvironment (TME). A multifaceted structure, which includes: (i) heterogeneous

This is an open access article distributed under the terms of a Creative Commons Attribution NonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License, which permits unrestricted use, adaptation, distribution and reproduction in any medium, non-commercially, provided the new creations are licensed under identical terms as the original work and the original work is properly cited.

cellular constituents both residential, often expressing a fibroblast-like appearance and blood-borne, characterized by phagocytic and immune system cell features; (ii) extracellular matrix molecules and matrix-degrading enzymes, and (iii) sprouting vascular networks have been recognized [15]. Furthermore, recent studies of BCC have demonstrated that the cancer-associated fibroblasts (CAF) expressing different cellular phenotypes appear to be important contributors to the formation of TME [16]. It should be noted that the development of the actin-rich phenotype in stromal cells was demonstrated in aggressive variants of BCC – micronodular and morpheiform –, when compared to nodular [17]. The results of other studies have suggested an increase of stromal alpha-smooth muscle actin (α -SMA) immunorexpression in aggressive BCCs [5, 18–22]. Various autocrine and paracrine communications between TEM cells and cancer cells are crucial in the initiation and progression of tumors [23]. Other scientists have shown that modern technologies including those assessing the composition of TME might represent novel predictive and prognostic biomarkers in BCC [12].

Sonic hedgehog (Shh) morphogen is an essential regulator of various cellular processes during embryonic and adult life. The mechanism driven by the ligand and leading to tumor development has been extensively explored for more than a decade. Early in the research, the Shh ligand molecule is shown to be implicated as an autocrine signaling factor [24]. Furthermore, induction of the genes regulating epithelial-mesenchymal transition driving tumors to metastasize has been shown when the activation of the hedgehog pathway by the overexpression of zinc finger transcription factors took place [25, 26]. Previous studies have suggested Shh overexpression leading to pathway activation, tumor proliferation, survival, and/or metastasis [27]. Later, tumor cells were shown to exit a paracrine mechanism secreting Shh and activating the pathway in neighboring stromal cells [28], which were proved to be of myofibroblast lineage. Finally, in inverse paracrine hedgehog activation mode, stromal cells produce the ligand molecules, which bind and activate the signaling pathway in tumor cells [29]. More recent morphological studies have demonstrated the contribution of hedgehog signaling in the pathogenesis of BCC [30]. Since BCC presents with different variants, and tumors developed in the head and neck region often behave more aggressively with deep tissue invasion and recurrence, conduction of studies identifying new prognostic markers of BCC aggressiveness is very much acknowledged.

Aim

The purpose of the present study was to analyze the occurrence and distribution of primary and recurrent BCCs of head and neck; to estimate immunohistochemically constituents of the BM – type IV collagen and laminin – appearing at the tumoral interface; to assess the biology of cancer cells and TME as a whole by studying α -SMA and Shh immunorexpression.

☐ Patients, Materials and Methods

Seventy-nine patients presented with BCC of head and neck treated prospectively in Department of Maxillofacial Surgery, Institute of Stomatology, Riga Stradins University,

and the Oncology Centre of Latvia from September 1, 2016, to September 1, 2019, were enrolled in this study. In total, 46 female and 33 male patients were enrolled. The age range was 32–95 years. The clinical data of patients were obtained concerning duration and type of the lesion at the time of presentation, clinical features, anatomic location, and course of the tumor. The skin types were assessed according to the Fitzpatrick Classification Scale [31]. The disease relapse was monitored over a two-year follow-up period. The study was approved by the Ethics Committee of Riga Stradins University, and written informed consent was obtained from all patients. The tumor tissue samples were taken following the tenets of the Declaration of Helsinki.

Dermoscopy was performed before the tumor mass excision. The diagnosis of BCC was confirmed following recommendations of Trigoni *et al.* (2012) [32], Wozniak-Rito *et al.* (2018) [33], and Lupu *et al.* (2019) [34] when fulfilled classical dermoscopy algorithm – lack of pigment network and the presence of at least one of the following criteria: ulceration, maple-leaf like structure, blue-gray globules, blue-ovoid nests, arborizing vessels, and spoke-wheel structures. Furthermore, we included some additional features recognized as translucency, white areas, and milky pink or red background when diagnosing BCC. Vascular patterns were described as either clustered, diffuse, homogeneous or, sometimes, avascular. Background differences between white-red colors, observed at the lesion sites, are defined as white-red structureless areas as recommended [35].

Only fully excised primary and recurrent BCCs with 10 mm deep indentation into healthy tissue were used in this investigation. Sixty-one of 79 (77.2%) were primary tumors whereas 18 (22.8%) – recurrent BCC. In seven (38.9%) cases, recurrent BCC developed from the surgically removed primary tumors obtained in a frame of the given study. Patients relapsed in six months up to two years were submitted to re-treatment. Eleven (61.1%) patients developed BCC recurrence after the use of less invasive treatment techniques. These less invasive treatment techniques used and recorded were cryotherapy – six cases, CO₂ laser treatment – three cases, topical immune response modifier – Imiquimod cream – two cases, respectively. Eight patients presented with the nodular-type BCC, one – with superficial, and two – with basosquamous carcinoma.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissues were processed and sectioned conventionally, and the sections were mounted on HistoBond+ slides (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany). Consecutive sections were used as negative controls of the immunohistochemical (IHC) reactions, and for Hematoxylin-Eosin (HE) staining to confirm the diagnosis. The histopathology of the tumor was assessed by two independent observers following the *World Health Organization (WHO) Classification System* for BCC.

IHC reactions were performed using dewaxed and then conventionally treated and processed paraffin sections. Heat-induced antigen retrieval was accomplished with the sections placed in 10 mM citrate buffer for 15 minutes in a vapor lock. Tissue antigens were detected using a panel of primary antibodies: mouse anti-human monoclonal

α -SMA, Abcam, Cambridge, MA, USA, clone 1A4, 1:200), which decorates cells expressing the smooth muscular phenotype [36, 37]; mouse anti-human monoclonal collagen IV (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark, clone CIV 22, 1:25), which labels the *lamina densa* of BM [38]; mouse anti-human monoclonal laminin (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark, clone 4C7, 1:20), which reacts with the laminin family glycoproteins of the epidermal BM [39]; rabbit anti-human monoclonal Shh (Abcam, Cambridge, MA, USA, clone EP1190Y, 1:200), which recognizes full length and c-product subunit of human Shh protein [40, 41]. The primary antibodies were applied overnight (4°C) following the manufacturer's recommendations. Amplification of primary antibody and visualization of reaction products was performed applying HiDef Detection Horseradish Peroxidase (HRP) Polymer system (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) – after rinsing in phosphate-buffered saline (PBS) solution, sections were incubated with HiDef Detection™ Amplifier for 10 minutes at room temperature (RT) and HiDef Detection™ HRP Polymer Detector for 10 minutes (RT), respectively. Finally, the antigen sites were visualized with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride kit (DAB + Chromogen and DAB + Substrate buffer, Cell Marque, Rocklin, CA, USA) applied for 5 minutes. Sections were counterstained with Mayer's Hematoxylin, washed, dehydrated, cleared, mounted in Roti® Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and coverslipped. Immunolabeling for α -SMA was identified by brown stain confined to the cell cytoplasm. Positive immunostaining of Shh was characterized by apparent brown either membranous or membranous/cytoplasmic pattern. The pattern of α -SMA and Shh immunoreactivity was separately evaluated in the tumor cells and stroma. Immunostaining for type IV collagen and laminin was confined to the BM and displayed a linear (continuous and discontinuous) pattern.

Sections were photographed by a Leica light microscope (Leica DMRB, Leitz Wetzlar, Germany) using a DFC 450C digital camera and scanned by a Glissando Slide Scanner (Objective Imaging Ltd., Cambridge, UK) 0.5 μ m/pixel resolution with 20 \times objective, 0.275 μ m/pixel resolution with 40 \times objective. Therefore, additional reproducible measurements (Aperio ImageScope ver. 12.2.2.5015 software) of tissue immunomarkers along with their spatial distribution were obtained.

The assessment of immunostaining was performed semiquantitatively in 20 randomly selected visual fields of each sample (magnification 400 \times) representing the tumor and stroma of the regions of interest. Overall patterns of collagen IV and laminin immunoreactivity were evaluated as showing either absent immunoreactivity or extensive discontinuous immunoreactive areas (low levels), discontinuous areas (moderate levels), and continuous immunoreactivity (high levels) following recommendations of Agarwal & Ballabh (2013) [42]. Immunoreactivity of these proteins in sebaceous, sweat glands, and blood vessels' walls were not considered in this evaluation. The amount (the percentage of immunopositive cells) for Shh and tumoral α -SMA immunostaining was estimated semiquantitatively as (-) negative if no positively stained cells were found; (+) weak if $\leq 10\%$; (++) moderate if 11–50%; (+++) strong if $> 51\%$. Stromal α -SMA immunoreactivity was assessed as (-) negative if no staining apart of vascular (for α -SMA) was found; (+) weak if only a few myo-

fibroblasts showed positivity around the tumor islands; (++) moderate if $< 50\%$ of the islands were surrounded by α -SMA-positive cells, and (+++) strong if $> 50\%$ of the islands were diffusely surrounded by α -SMA-positive cells as described previously [18].

Statistical data analysis was performed to assess the immunohistochemistry results and applying Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) ver. 24.0 software. To test whether the collected numerical data are normally distributed, a Kolmogorov–Smirnov normality test was applied. The quantitative data were expressed as means \pm standard deviation (SD), whereas categorical parameters were expressed as frequencies and percentages. *P*-values of < 0.05 were considered significant. The Spearman's rank correlation coefficient was used to estimate the relationships between immunostaining patterns of the antibodies used in this study. The correlation between antigen immunoreactivity, pattern of the tumor (primary, recurrent), and HP type of BCC was studied by χ^2 (chi-squared) statistics.

5 Results

Clinically, the skin types were assessed as I–III, according to the Fitzpatrick Classification Scale. No patients with phototype IV–VI were recorded. Out of 79 subjects enrolled in the study, only two (2.5%) patients were recognized to have type I, 59 (74.7%) – type II, and 18 (22.8%) – type III. One man and one woman presented with type I. The man has blond hair and blue eyes, the woman – freckles and red hair. Both always burn. Apart from BCC, the man demonstrated multiple actinic keratosis lesions on his face and shoulders. More women – 34 out of 59 –, and 25 men presented with type II. Similarly, more women – 11 out of 18 –, and seven men presented with type III. Skin easily burned after longer solar exposure when type II was recorded; these patients present with fair skin, light hair, and blue or gray-blue eyes. Patients with phototype III presented with fair to light brown skin color, often dark hair, and varying eye color.

Dermoscopically, primary BCC presented with arborizing vessels, thin and superficial telangiectasias, ulceration with crust formation, shiny white and milky-pink regions, and sometimes – blue-gray ovoid nests (Figure 1). Shiny white-and-red structureless areas suspected as more fibrotic were further correlated with the HP findings. Short white streaks were common in mixed and recurrent BCC (Figure 2).

Among 79 patients, 15 (19%) presented with the nodular HP subtype of the tumor, 18 (23%) – superficial, 10 (12%) – infiltrative, seven (9%) – micronodular subtype, and 29 (37%) – mixed subtype. The most frequent combinations of the mixed BCCs included nodular-infiltrative, superficial-nodular, and nodular-micronodular subtype. No statistical differences in gender distribution were found among histological subtypes ($p=0.102$). The distribution of BCC by anatomical location and histological subtype is presented in Table 1. Analysis of the anatomical location of the lesion confirmed that the nose and cheek were predominant regions affected by both primary and recurrent tumors constituting 36.7% and 29.1%, respectively. Furthermore, according to our study, the nose area was very susceptible to tumor recurrence – nine of 18 (50%) cases. The second half of recurrent tumors presented with five BCCs on the cheek, three on the eyelid, and one – on the ear. In our study, the third most often lesioned region was the eyelid (10.1%).



Figure 1 – A well-defined, pearl, translucent nodule with a homogeneous milky-pink background and arborized blood vessels; tumor surface with crust over a wound, milium-like cyst, and blue-gray ovoid nest demonstrated dermoscopically in the case of primary nodular basal cell carcinoma.

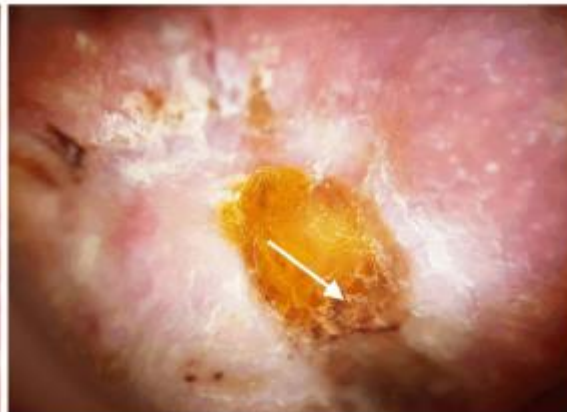


Figure 2 – A homogeneous white-to-pink coloration of the area of interest and ulceration (white arrow) demonstrated dermoscopically in the case of recurrent basal cell carcinoma.

Table 1 – Distribution of primary and recurrent BCCs by histological subtype and anatomical location

Description of sample/diagnosis	Anatomical location									Total	
	Nose	Temple	Cheek	Eyelid	Scalp	Lip	Ear	Neck	Forehead		
Primary	N	6	1	2	1	2	0	1	1	0	14
	MN	2	0	2	1	0	0	1	0	1	7
	I	2	2	3	0	0	0	1	0	0	8
	S	4	0	7	1	1	0	0	0	0	13
	MIX	6	1	4	2	0	2	1	1	2	19
	Total	20	4	18	5	3	2	4	2	3	61
Recurrent	N	0		1	0			0			1
	I	2		0	0			0			2
	S	0		2	2			1			5
	MIX	7		2	1			0			10
	Total	9		5	3			1			18
Total	N	6	1	3	1	2	0	1	1	0	15
	MN	2	0	2	1	0	0	1	0	1	7
	I	4	2	3	0	0	0	1	0	0	10
	S	4	0	9	3	1	0	1	0	0	18
	MIX	13	1	6	3	0	2	1	1	2	29
	Total	29	4	23	8	3	2	5	2	3	79

I: Infiltrative subtype; MIX: Mixed subtype; MN: Micronodular subtype; N: Nodular subtype; S: Superficial subtype

Nodular (in primary tumors) and mixed BCCs (in primary and recurrent tumors) were prevalently located in the nose than other head and neck regions constituting 42.9%, 31.6%, and 70%, respectively. Furthermore, the prevalence of the mixed subtype in nasal recurrent BCC was very high – seven of 10 (70%) cases. In micronodular subtype, the anatomical location was: nose, two (29%); cheek, two (29%); eyelid, one (14%); ear, one (14%), and forehead, one (14%), whereas the specific site of superficial BCC was: cheek, nine (50%); nose, four (22%); eyelid, three (17%); scalp, one (5.5%); and ear, one (5.5%). Infiltrative recurrent BCCs presented exclusively with the nasal location, while primary tumors were distributed as follows – cheek, three (38%); nose, two (25%); temple, two (25%), and ear, one (12%).

Histopathologically, nodular BCC presented as large islands with peripheral palisading of cells, clefting between the collagenous stroma, tumor necrosis, and focal cystic changes. Microscopic presentation of micronodular subtype revealed small tumor nests with less obvious palisading and connection to the epidermis, whereas superficial showed irregular proliferation of the basal cells budding from the epidermis, but infiltrative – cord-like, elongated strands of tumor cells infiltrating between collagen bundles.

Initially, analysis of the IHC results was consistent with the detection of immunoeexpression levels of major molecules of the BM – type IV collagen and laminin – establishing a barrier restricting the dissemination of tumor cells. Contours of tumor masses labeled by the anti-laminin (Figure 3) and anti-collagen IV (Figure 4) antibodies for

the presence of these molecules displayed a linear but greatly varying immunostaining pattern – both continuous and discontinuous. A discontinuous or absent immunostaining pattern was often revealed in the infiltrative BCCs. Levels of type IV collagen and laminin immunorexpression were similarly distributed varying from low to moderate and high – 60.3%, 35.6%, 4.1%, and 71.1%, 25.2%, 3.6% for collagen IV and laminin, respectively.

The results of the IHC expression of α -SMA and Shh estimated for tumoral and stromal compartments of primary and recurrent tumors are summarized in Table 2, whereas – in different HP subtypes of BCCs studied – in Table 3.

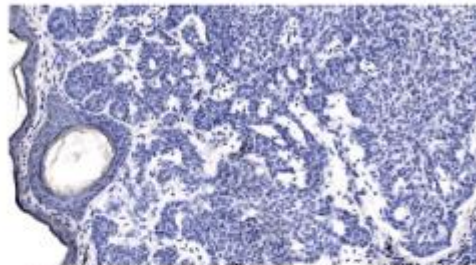


Figure 3 – Weak continuous laminin immunorexpression appearing along the basal aspect of the surface and follicular epithelium, the immunorexpression within the basement membrane delineating differently sized and shaped nodules and micronodules of the mixed recurrent tumor is almost nil. Laminin immunohistochemistry, $\times 200$.

Levels of the tumoral α -SMA immunorexpression were distributed varying from weak to moderate and strong. Simultaneously, we confirmed a decrease in weak stromal α -SMA immunorexpression levels in recurrent BCC when compared to primary BCC, followed by two times higher strong stromal α -SMA immunorexpression levels demonstrated in recurrent BCC (Table 2). Comparing the levels of α -SMA immunorexpression in primary and recurrent BCCs studied, we found statistically significant differences for both tumoral and stromal compartments ($\chi^2=16.191$; $df=2$; $p<0.0001$; and $\chi^2=26.510$; $df=2$; $p<0.0001$), respectively.

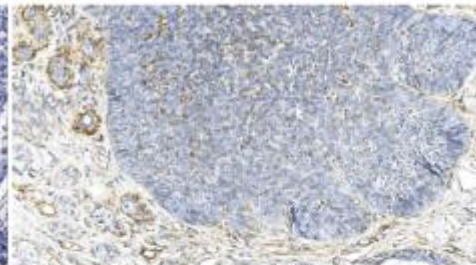


Figure 4 – The linear and both continuous and discontinuous immunostaining decorating the base of the tumor nests and vascular beds of the mixed recurrent tumor. Type IV collagen immunohistochemistry, $\times 250$.

Table 2 – Distribution of α -SMA and Shh immunorexpression levels in primary and recurrent BCCs

Description of sample/diagnosis	Location	Antigens					
		α -SMA			Shh		
		Weak	Moderate	Strong	Weak	Moderate	Strong
Primary BCC	Tumor	627 (50.0%)	274 (25.3%)	181 (16.7%)	347 (33.2%)	344 (32.9%)	355 (33.9%)
Recurrent BCC		195 (60.2%)	52 (16.0%)	77 (23.8%)	96 (30.8%)	101 (32.5%)	114 (36.7%)
Primary BCC	Stroma	914 (75.2%)	216 (17.8%)	85 (7.0%)	929 (76.1%)	223 (18.3%)	68 (5.6%)
Recurrent BCC		243 (67.5%)	60 (16.7%)	57 (15.8%)	259 (72.0%)	67 (18.6%)	34 (9.4%)

α -SMA: Alpha-smooth muscle actin; BCC: Basal cell carcinoma; Shh: Sonic hedgehog. *The shown numerical data represent the number of visual fields estimated and demonstrated either weak or moderate and strong expression of antigen.

When compared to α -SMA, levels of the tumoral Shh immunorexpression were almost equally distributed and varied from weak to moderate and strong for primary and recurrent BCC (Table 2). Similarly to α -SMA assessment, we found an increase in strong stromal Shh immunorexpression levels in recurrent BCC. Comparing the levels of Shh immunorexpression in primary and recurrent BCCs studied, we found statistically significant differences for stromal but not tumoral compartment ($\chi^2=7.121$; $df=2$; $p=0.028$; and $\chi^2=0.915$; $df=2$; $p=0.633$), respectively.

We found that one-fourth of neoplastic cells within the samples demonstrating infiltrative BCC subtype revealed a strong level of α -SMA immunorexpression followed by one-fifth in the nodular, and the mixed subtype (Table 3). Simultaneously, almost one-fifth of the stroma of infiltrative subtype revealed a strong of α -SMA immunorexpression followed by one-tenth in the mixed, and around one-tenth in micronodular subtype. Tumor masses and stroma of the superficial subtype revealed a negligible amount of neoplastic epithelial and stromal cells displaying a strong level of α -SMA immunorexpression. Furthermore, when

assessing the α -SMA immunorexpression displayed in different HP subtypes of BCCs, we found that nodular BCC demonstrated a weak to moderate and rarely a strong level of α -SMA immunorexpression within tumor nests and cords (Figure 5) paralleled by very weak or almost nil stromal reactivity (Figure 6). By contrast, micronodular, mixed and infiltrative subtype of BCC often demonstrated a marked, strong stromal α -SMA immunorexpression presented either as a diffuse or a peritumoral (Figure 7), heavily decorating the base of tumor nests (Figure 8). In the case of diffuse immunorexpression, some mixed tumors presented with actin-rich stroma enveloping α -SMA negative tumors nests and strands (Figure 9).

The superficial subtype presented with a weak α -SMA immunorexpression, both tumoral and stromal, furthermore, the last one often diminished in areas with inflammatory infiltration (Figure 10). Comparing α -SMA immunorexpression in subtypes of BCC, we found that tumoral immunorexpression revealed in the superficial subtype significantly differed when compared to all other subtypes – nodular ($p<0.0001$), micronodular ($p=0.003$), infiltrative

($p < 0.0001$), and mixed ($p < 0.0001$). Similarly, stromal immunoreaction revealed in the infiltrative subtype significantly differed when compared to all other subtypes – nodular ($p < 0.0001$), micronodular ($p = 0.036$), superficial ($p < 0.0001$), and mixed ($p < 0.001$).

Similarly to α -SMA immunoreaction, nodular tumoral masses demonstrated mostly weak Shh immunopositivity accompanied by extremely weak stromal immunoreactivity

(Figure 11). Of note, that almost one half of infiltrative BBCs, followed by more than one-third of superficial and mixed tumors, and about one-third of micronodular displayed a strong Shh immunoreaction within neoplastic buds and strands (Figure 12), whereas the others – moderate to strong Shh immunoreaction (Figure 13). The highest stromal immunoreaction of Shh was found in the superficial subtype of BCC (Figure 14).

Table 3 – Distribution of α -SMA and Shh immunoreaction levels in different histopathological subtypes of BBCs

Histopathological subtype of BCC	Location	Antigens					
		α -SMA			Shh		
		Weak	Moderate	Strong	Weak	Moderate	Strong
Nodular	Tumor	132 (51.2%)	69 (26.7%)	57 (22.1%)	127 (47.2%)	86 (32.0%)	56 (20.8%)
	Stroma	221 (75.0%)	55 (18.6%)	19 (6.4%)	262 (87.3%)	36 (12.0%)	2 (0.7%)
Micronodular	Tumor	75 (59.5%)	33 (26.2%)	18 (14.3%)	53 (41.4%)	37 (28.9%)	38 (29.7%)
	Stroma	100 (71.4%)	28 (20.0%)	12 (8.6%)	103 (73.6%)	28 (20.0%)	9 (6.4%)
Infiltrative	Tumor	92 (49.5%)	48 (25.8%)	46 (24.7%)	39 (22.5%)	56 (32.4%)	78 (45.1%)
	Stroma	120 (60.0%)	45 (22.5%)	35 (17.5%)	135 (67.5%)	53 (26.5%)	12 (6.0%)
Superficial	Tumor	210 (79.5%)	43 (16.3%)	11 (4.2%)	52 (23.8%)	83 (38.1%)	83 (38.1%)
	Stroma	289 (80.3%)	55 (15.3%)	16 (4.4%)	265 (73.6%)	61 (16.9%)	34 (9.4%)
Mixed	Tumor	313 (54.7%)	133 (23.3%)	126 (22.0%)	172 (30.2%)	183 (32.2%)	214 (37.6%)
	Stroma	427 (73.6%)	93 (16.0%)	60 (10.4%)	423 (72.9%)	112 (19.3%)	45 (7.8%)

α -SMA: Alpha-smooth muscle actin; BCC: Basal cell carcinoma; Shh: Sonic hedgehog. *The shown numerical data represent the number of visual fields estimated and demonstrated either weak or moderate and strong expression of antigen.

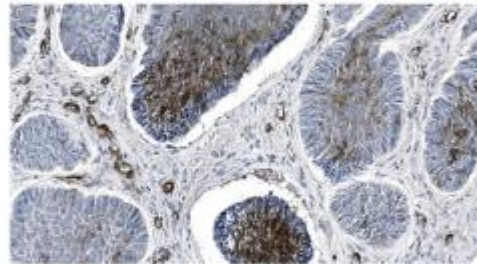


Figure 5 – Solid nodules of primary BCC demonstrate rather diffuse, weak to moderate α -SMA immunopositivity, whereas the lower one – more strong and compact immunopositivity appearing locally. Vascular α -SMA immunopositivity appears in myxoid stroma interspersing the nodules. α -SMA immunohistochemistry, $\times 250$. α -SMA: Alpha-smooth muscle actin; BCC: Basal cell carcinoma.

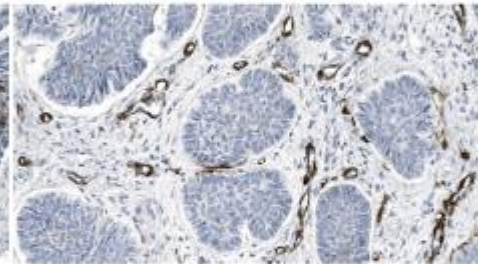


Figure 6 – Immunoreaction of α -SMA, both tumoral and stromal, is almost nil; α -SMA immunopositivity is restricted to vascular appearing in myxoid stroma interspersing the nodules of this primary BCC. α -SMA immunohistochemistry, $\times 250$. α -SMA: Alpha-smooth muscle actin; BCC: Basal cell carcinoma.



Figure 7 – Low power view of mixed recurrent BCC demonstrating stromal peritumoral and vascular α -SMA immunoreaction appearing in the myxoid stroma. α -SMA immunohistochemistry, $\times 100$. α -SMA: Alpha-smooth muscle actin; BCC: Basal cell carcinoma.

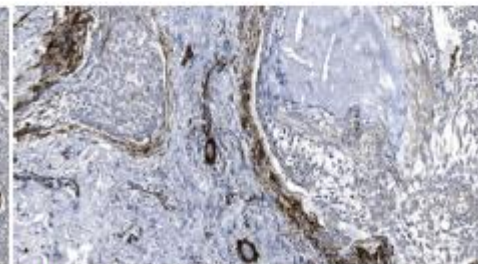


Figure 8 – Strong stromal peritumoral immunoreaction of α -SMA displayed as a heavy decoration at the base of tumor nests and cords observed in mixed recurrent BCC; α -SMA immunopositivity within vascular channels. α -SMA immunohistochemistry, $\times 200$. α -SMA: Alpha-smooth muscle actin; BCC: Basal cell carcinoma.

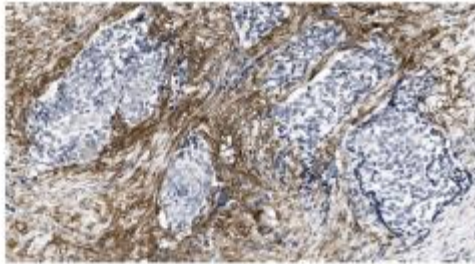


Figure 9 – *α -SMA immunonegative tumor nests and strands of mixed recurrent BCC are surrounded by actin-rich stroma. α -SMA immunohistochemistry, $\times 200$. α -SMA: Alpha-smooth muscle actin; BCC: Basal cell carcinoma.*



Figure 10 – *Weak tumoral immunorexpression of α -SMA observed in primary superficial BCC; stroma is heavily infiltrated with inflammatory cells, and α -SMA immunopositivity is restricted to vascular beds. α -SMA immunohistochemistry, $\times 100$. α -SMA: Alpha-smooth muscle actin; BCC: Basal cell carcinoma.*

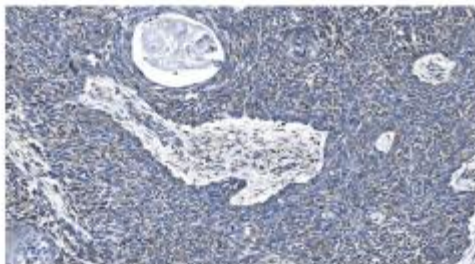


Figure 11 – *Nodular BCC masses displaying a weak immunorexpression of Shh; stromal immunorexpression is almost nil. Shh immunohistochemistry, $\times 250$. BCC: Basal cell carcinoma; Shh: Sonic hedgehog.*

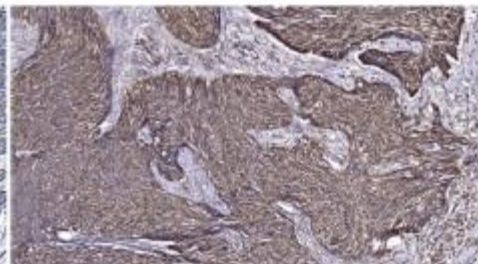


Figure 12 – *Mixed primary BCC demonstrates tumor strands revealing partial stromal invasion and heavily decorated with the anti-Shh antibody; stromal component exhibits Shh immunopositivity as well. Shh immunohistochemistry, $\times 200$. BCC: Basal cell carcinoma; Shh: Sonic hedgehog.*

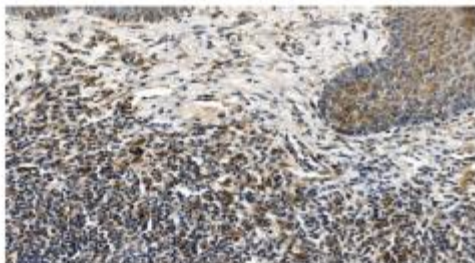


Figure 13 – *Moderate to a strong tumoral immunorexpression of Shh accompanied by weak to moderate stromal immunorexpression observed in primary superficial BCC; marked stromal infiltration. Shh immunohistochemistry, $\times 250$. BCC: Basal cell carcinoma; Shh: Sonic hedgehog.*

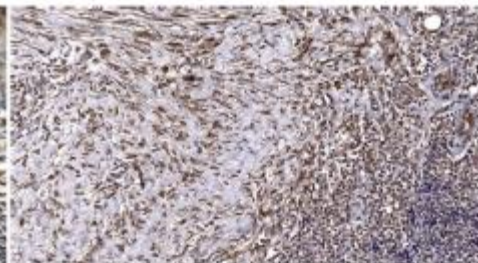


Figure 14 – *Diffuse, rather regular moderate stromal Shh immunorexpression demonstrated in primary superficial BCC. Shh immunohistochemistry, $\times 200$. BCC: Basal cell carcinoma; Shh: Sonic hedgehog.*

The levels of Shh assessed for both BCC compartments differed when compared to α -SMA levels. Moderate and strong levels of the tumoral Shh immunorexpression characterized infiltrative, superficial, mixed, and micronodular subtypes (Table 3). Simultaneously, stromal Shh levels were three times lower but two times higher for infiltrative and superficial subtype, respectively, when compared to α -SMA levels. Comparing Shh immunorexpression in subtypes of BCC studied, we found that

tumoral immunorexpression revealed in the nodular subtype significantly differed when compared to all other subtypes except micronodular – infiltrative ($p < 0.0001$), superficial ($p < 0.0001$), and the mixed ($p < 0.0001$). Stromal immunorexpression revealed in the nodular subtype significantly differed when compared to all other subtypes – infiltrative ($p < 0.0001$), micronodular ($p = 0.009$), superficial ($p < 0.0001$), and mixed ($p < 0.0001$).

☒ Discussions

In the present study, we have (i) assessed the occurrence and distribution of 79 primary and recurrent BCCs developed in the head and neck region; (ii) performed IHC analysis of major constituents of the BM – type IV collagen and laminin – enveloping the tumoral compartment, and (iii) analyzed the immunorexpression of α -SMA and Shh found in the bulk of the tumor and surrounding stroma in different subtypes of BCC, reflecting the complexity of the biology and signaling in this neoplasm.

A high frequency of BCC constituting approximately 80% of all non-melanoma skin cancers, and commonly appearing on the head and neck – body areas exposed to the sun has been demonstrated previously [1, 2, 6]. Simultaneously, the absolute incidence of BCC has not been determined, since non-melanoma skin cancer is usually excluded from cancer-registry statistics [1]. Furthermore, HP characteristics of BCC of the head and neck have changed over time, and new studies deepening our knowledge about the biology of BCC, in general, and behavioral peculiarities of TME, in particular, have been encouraged.

In many studies reviewed, men were affected more often than women, whereas the reported age was over 60 years at the first presentation [1, 43, 44]. We found the gender distribution similar to that reported by Mawardi *et al.* [45] and demonstrating female predominance, whereas the age at the time of diagnosis was similar comparing this study to former ones.

Assessing skin phototype in patients enrolled in the given study, we found type II to be most common. It is characteristic of the inhabitants living in the Baltic region. Simultaneously, subjects with I–III skin phototype are recognized as having a higher risk to develop skin cancer [46].

In the present study, we have demonstrated that BCC might cause severe damage due to its local recurrence, and the mid-face is more susceptible. The nose, the cheek, and the eyelid areas chronically exposed to sunlight were more often affected by both primary and recurrent tumors than BCCs on the other predilection sites. These results are in accordance with those demonstrated by Mawardi *et al.* [45] when local, but not distant recurrence and aggressiveness of BCC were studied. In this context, the need for a comprehensive follow-up along with the correctness of complete tumor excision and application of Mohs micrographic surgery at the first surgical appointment are pivotal issues in reducing the likelihood of recurrence [47, 48].

Heterogeneity of the histopathology of BCC has been evidenced by other authors and us [49]. Furthermore, a high proportion of mixed BCC exhibiting an aggressive growth pattern and requiring surgical excision with margin control was demonstrated by the previous and current study [50]. Histomorphologically, infiltrative, morpheiform, micronodular, and superficial BCC, as surprisingly appeared in the given study, share some common features of aggressiveness – increased cell necrosis, mitotic rate, and stromal cell proliferation, lesser stromal retraction, deeper invasion, and less circumscription of the tumor [51].

Our evidence regarding the entire structure of the BM, as exemplified by collagen IV and laminin immuno-

expression, appears to be similar to that published in the available literature [52, 53]. Similarly to the previous studies, we found that levels of type IV collagen and laminin immunorexpression were varying from low to moderate and high, with about two-thirds presented by low levels. The immunorexpression of the BM molecules studied was discontinuous or absent in BCC areas showing an aggressive pattern of growth.

Previous studies have pointed out the necessity of tumor assessment based on an understanding of the biology and function of TME [54]. Furthermore, the usefulness of estimation of the cellular constituents of TME using the IHC assessment has been demonstrated very recently in studies of local aggressiveness in BCC [55]. The development of the actin-rich phenotype in CAF colonizing stromal compartment in aggressive variants of BCC – micronodular and morpheiform – was demonstrated previously [5, 20], and our IHC findings appear to support this evidence. Furthermore, recent results obtained by Romanian researchers in the case of the upper lip BCC suggest the usefulness of α -SMA immunoreactivity assessment on the invasion front [22]. This is consistent with the results of the present study confirming the increase of peritumoral and entire stromal α -SMA immunoreactivity in mixed recurrent BCC. Unfortunately, very few studies have reported on α -SMA assessments coupled to statistical evaluation of the immunomarker expression demonstrated either in tumoral and stromal compartments found in various subtypes of BCC or the primary and recurrent tumors [18]. Our study based on careful statistical assessments of the immunomarkers studied provided the meaningful evidence – the appearance of strong stromal α -SMA immunorexpression levels demonstrated in the recurrent BCC should be interpreted with caution considering the relapsing nature of the tumor.

Activation of Shh signaling in the TME and its association with tumor growth and metastatic activity has been shown in studies examining the morphogen expression in neoplasms [56, 57]. Previous studies have suggested enhancement of resting fibroblasts stimulation and conversion into myofibroblasts by Shh, leading to the accumulation of collagen and dermal thickening in mice [58]. Furthermore, the frequency of hedgehog-related genetic alterations in BCC has been demonstrated recently, proving the presence of paracrine signaling in the TME harboring CAF [29, 59].

As described above, very limited data about the Shh signaling in primary and recurrent BCC, when the various subtypes of the tumor are compared statistically, have been reported. In this study, we have assessed the levels of Shh in primary and recurrent, and in five different subtypes of BCC by use of immunohistochemistry and statistics. We proved the increase of strong levels of Shh immunorexpression in both – tumoral and stromal – compartments. Furthermore, when specifying the subtypes of BCC analyzed, we found the increase of strong levels of Shh immunorexpression in aggressive variants – infiltrative, mixed, and micronodular. These results agree with the data demonstrated by Casas *et al.* [60]. By contrast, among the other subtypes of BCC, previously considered as aggressive variants, we found upregulation of Shh paralleled by downregulation of α -SMA immunorexpression

in the superficial subtype of the tumor assumed to be nonaggressive. This leads us to propose that Shh participates in normal and affected epidermal homeostasis, but the molecular pathway of the signaling is not completely understood. Finally, we may suggest that the assessment of morphological and IHC characteristics of primary and recurring forms of skin cancer and possible changes in the properties of a tumor is important for determining prognostic factors and choosing an adequate method for treating a disease. Shh binds to the patched receptor, which, in turn, functions in association with smoothed, to activate the transcription of target genes. Therefore, target therapy of hedgehog-related cancers, including BCC, is on its way to a much broader clinical application [59, 61–63]. Continued investigation of these processes will likely reveal new mechanisms of BCC and TME regulation with implications well beyond the control of Shh signaling.

Conclusions

The given study deepens our knowledge regarding clinical, dermoscopic, and morphological assessment of primary and recurrent BCCs of head and neck, and explores the peculiarities of TME and Shh signaling in these tumors. Two-thirds of the patients enrolled in the study presented with skin phototype II. The nose and cheek are predominant regions affected by both primary and recurrent tumors. The proportion of patients with BCC developed in the nose area and relapsed after two years is high; it points out the necessity of precise surgical excision and HP assessment, especially when mixed tumors are considered. BCCs defined as infiltrative, micronodular, and superficial, as surprisingly appeared in the given study, are more aggressive. These often present with discontinuous BM and stromal CAF bearing actin-rich phenotype. The increase of peritumoral and entire stromal α -SMA immunoreactivity in BCC should be interpreted with special caution. Activation of Shh signaling in aggressive variants of BCC contributes, at least partly, to the changes of nature and interactions of the TME constituents.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

Riga Stradins University Department of Doctoral studies and Roche Latvia are acknowledged for reagents and publishing support.

Authors' contribution

Conceptualization, Jelena Moisejenko-Golubovica (J.M.-G.); formal analysis, J.M.-G.; Oleg Volkov (O.V.); data curation, J.M.-G.; O.V.; Valerija Groma (V.G.); writing – original draft preparation, J.M.-G.; Anna Ivanova (A.I.); writing – review and editing, J.M.-G.; V.G.; immunohistochemistry, O.V., V.G.; patients' recruitment and surgery, J.M.-G.; A.I.; dermoscopy, J.M.-G.

References

- [1] Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 2005, 353(21):2262–2269. <https://doi.org/10.1056/NEJM ra044151> PMID: 16306523
- [2] Carucci JA, Leffell DJ. Basal cell carcinoma. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ (eds). *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th edition, McGraw-Hill Medical Publisher, New York, 2008, 1036–1042.
- [3] Koyuncuer A. Histopathological evaluation of non-melanoma skin cancer. *World J Surg Oncol*, 2014, 12:159. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-159> PMID: 24886534 PMCID: PMC4046093
- [4] Daya-Grosjean L, Couvé-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett*, 2005, 225(2):181–192. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.10.003> PMID: 15978322
- [5] Mercuț R, Ciurea ME, Mărgăriteșcu C, Popescu SM, Crăițoiu MM, Cotoi OS, Voinescu DC. Expression of p53, D2-40 and α -smooth muscle actin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*, 2014, 55(2):263–272. PMID: 24969973
- [6] Lara F, Santamaria JR, Garbers LE. Recurrence rate of basal cell carcinoma with positive histopathological margins and related risk factors. *An Bras Dermatol*, 2017, 92(1):58–62. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20174867> PMID: 28225958 PMCID: PMC5312180
- [7] Ormland SH, Nielsen PS, Gjerdrum LMR, Gniadecki R. Immunosuppressive environment in basal cell carcinoma: the role of regulatory T cells. *Acta Derm Venereol*, 2016, 96(7):917–921. <https://doi.org/10.2340/00015555-2440> PMID: 27117439
- [8] Griffiths RW, Suvama SK, Stone J. Do basal cell carcinomas recur after complete conventional surgical excision? *Br J Plast Surg*, 2005, 58(6):795–805. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2005.02.010> PMID: 16086990
- [9] Rios-Buceta L. [Management of basal cell carcinomas with positive margins]. *Actas Dermosifiliogr*, 2007, 98(10):679–687. [https://doi.org/10.1016/S1578-2190\(07\)70540-1](https://doi.org/10.1016/S1578-2190(07)70540-1) PMID: 18035025
- [10] Franchimont C, Pierard GE, Van Cauwenberge D, Damseaux M, Lapiere CH. Episodic progression and regression of basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*, 1982, 106(3):305–310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1982.tb01728.x> PMID: 7066190
- [11] Swetter SM, Boldrick JC, Pierre P, Wong P, Egbert BM. Effects of biopsy-induced wound healing on residual basal cell and squamous cell carcinomas: rate of tumor regression in excisional specimens. *J Cutan Pathol*, 2003, 30(2):139–146. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0560.2003.00002.x> PMID: 12641794
- [12] Lupu M, Caruntu C, Ghita MA, Voiculescu V, Voiculescu S, Rosca AE, Caruntu A, Moraru L, Popa IM, Calenic B, Greabu M, Costea DE. Gene expression and proteome analysis as sources of biomarkers in basal cell carcinoma. *Dis Markers*, 2016, 2016:9831237. <https://doi.org/10.1155/2016/9831237> PMID: 27578920 PMCID: PMC4992754
- [13] Garcia C, Poletti E, Crowson AN. Basosquamous carcinoma. *J Am Acad Dermatol*, 2009, 60(1):137–143. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.09.036> PMID: 19103364
- [14] Marasà L, Marasà S, Sciancalepore G. Collagen IV, laminin, fibronectin, vitronectin. Comparative study in basal cell carcinoma. Correlation between basement membrane molecules expression and invasive potential. *G Ital Dermatol Venereol*, 2008, 143(3):169–173. PMID: 18833058
- [15] Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):63. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0983-5> PMID: 30927923 PMCID: PMC6441173
- [16] Sasaki K, Sugai T, Ishida K, Amano H, Kimura H, Sakuraba M, Kashiwa K, Kobayashi S. Analysis of cancer-associated fibroblasts and the epithelial–mesenchymal transition in cutaneous basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant melanoma. *Hum Pathol*, 2018, 79:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.03.006> PMID: 29555579
- [17] Christian MM, Moy RL, Wagner RF, Yen-Moore A. A correlation of alpha-smooth muscle actin an invasion in micronodular basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*, 2001, 27(5):441–445. <https://doi.org/10.1046/j.1524-4725.2001.00200.x> PMID: 11359490
- [18] Bozdoğan O, Erkek E, Atasoy P, Koçak M, Birol A, Caydere M. Bcl-2-related proteins, alpha-smooth muscle actin and amyloid deposits in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. *Acta Derm Venereol*, 2002, 82(6):423–427. <https://doi.org/10.1080/000155502762064548> PMID: 12575847

- [51] Stanoszek LM, Wang GY, Harms PW. Histologic mimics of basal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141(11): 1490–1502. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0222-RA> PMID: 29072946
- [52] Quatresooz P, Martalo O, Piérard GE. Differential expression of alpha1 (IV) and alpha5 (IV) collagen chains in basal-cell carcinoma. *J Cutan Pathol*, 2003, 30(9):548–552. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0560.2003.00118.x> PMID: 14507402
- [53] Goździalska A, Wojas-Peic A, Drag J, Brzewski P, Jaśkiewicz J, Pastuszczyk M. Expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in basal-cell carcinoma. *Mol Biol Rep*, 2016, 43(10): 1027–1033. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4040-9> PMID: 27406386 PMID: PMC5025502
- [54] Lesack K, Naugler C. Morphometric characteristics of basal cell carcinoma peritumoral stroma varies among basal cell carcinoma subtypes. *BMC Dermatol*, 2012, 12:1. <https://doi.org/10.1186/1471-5945-12-1> PMID: 22405101 PMID: PMC3338565
- [55] ShamsiMeymandi S, Dabiri S, ZeynadinMeymand A, Iranpour M, Khalili M, Alijani S, Afatoonian M. Evaluation of immunohistochemical findings and clinical features associated with local aggressiveness in basal cell carcinoma. *Iran J Pathol*, 2019, 14(3):193–196. <https://doi.org/10.30699/ijp.2019.82907.1781> PMID: 31582995 PMID: PMC6742741
- [56] Sahin IH, Uzunparmak B. Comment on: α -Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: results from the CONKO-001 study. *Br J Cancer*, 2015, 112(11):1838. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.663> PMID: 25602961 PMID: PMC4647247
- [57] Song X, Yan L, Lu C, Zhang C, Zhu F, Yang J, Jing H, Zhang H, Qiao J, Guo H. Activation of hedgehog signaling and its association with cisplatin resistance in ovarian epithelial tumors. *Oncol Lett*, 2018, 15(4):5569–5576. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8008> PMID: 29552194 PMID: PMC5840551
- [58] Horn A, Palumbo K, Cordazzo C, Dees C, Akhmetshina A, Tomcik M, Zerr P, Avouac J, Gusinde J, Zwerina J, Roudaut H, Traiffort E, Ruat M, Distler O, Schett G, Distler JH-W. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(8):2724–2733. <https://doi.org/10.1002/art.34444> PMID: 22354771
- [59] Katoh M. Genomic testing, tumor microenvironment and targeted therapy of Hedgehog-related human cancers. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(8):953–970. <https://doi.org/10.1042/CS20180845> PMID: 31036756
- [60] Casas BS, Adolphe C, Lois P, Navarrete N, Solís N, Bustamante E, Gac P, Cabané P, Gallegos I, Wainwright BJ, Palma V. Downregulation of the Sonic Hedgehog/Gli pathway transcriptional target Neogenin-1 is associated with basal cell carcinoma aggressiveness. *Oncotarget*, 2017, 8(48):84006–84018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21061> PMID: 29137400 PMID: PMC5663572
- [61] Jacobsen AA, Strasswimmer J. Spontaneous resolution of advanced basal cell carcinoma after short-pulse treatment with hedgehog pathway inhibitor. *JAAD Case Rep*, 2016, 2(4):360–361. <https://doi.org/10.1016/j.jdcr.2016.06.010> PMID: 27626056 PMID: PMC5011173
- [62] Tolani B, Hoang NT, Acevedo LA, Leprieur EG, Li H, He B, Jablons DM. Preclinical characterization of therapeutic antibodies targeted at the carboxy-terminus of Sonic hedgehog. *Oncotarget*, 2018, 9(18):14311–14323. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24510> PMID: 29581846 PMID: PMC5865672
- [63] Carpenter RL, Ray H. Safety and tolerability of sonic hedgehog pathway inhibitors in cancer. *Drug Saf*, 2019, 42(2):263–279. <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0777-5> PMID: 30649745 PMID: PMC6434684

Corresponding author

Jelena Moisejenko-Golubovica, MD, Department of Doctoral Studies, Riga Stradins University, 16 Dzirciema Street, LV-1007 Riga, Latvia; Phone +37126048005, e-mail: jelena.moisejenko@gmail.com

Received: November 16, 2019

Accepted: March 28, 2021

Otrā publikācija

Moisejenko-Golubovica, J., Volkovs, O., Ivanova, A., Petrošina, E., Groma, V. 2021. What We Need to Learn When Exploring the Mixed Basal Cell Carcinoma of Head and Neck. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. *Section B, Natural Sciences*, 75, 75–85.



PROCEEDINGS OF THE LATVIAN ACADEMY OF SCIENCES. Section B,
Vol. 75 (2021), No. 2 (731), pp. 75–85.

DOI: 10.2478/prolas-2021-0013

WHAT WE NEED TO LEARN WHEN EXPLORING THE MIXED BASAL CELL CARCINOMA OF HEAD AND NECK

Jeļena Moisejenko-Goluboviča^{1,*}, Oļegs Volkovs², Anna Ivanova³, Eva Petrošina⁴,
and Valērija Groma⁵

¹ Department of Doctoral Studies, Rīga Stradiņš University, 16 Dzirciema Str., Rīga, LV-1007, LATVIA

² Faculty of Residency, Rīga Stradiņš University, 16 Dzirciema Str., Rīga, LV-1007, LATVIA

³ Institute of Stomatology Rīga Stradiņš University, 20 Dzirciema Str., Rīga, LV-1007, LATVIA

⁴ Statistics Unit, Rīga Stradiņš University, 16 Dzirciema Str., Rīga, LV-1007, LATVIA

⁵ Institute of Anatomy and Anthropology, Rīga Stradiņš University, 9 Kronvalda Blvd., Rīga, LV-1010, LATVIA

* Corresponding author, jeļena.moisejenko@gmail.com

Communicated by Modra Murovska

Coexistence of different histopathological types of basal cell carcinomas (BCC) in the same anatomical localisation is rare, and, therefore, is engaging for histopathologists and clinicians. In many cases, the determination of a neoplasm type remains difficult, since BCC may consist of more than one histopathological subtype. Mixed BCCs often present with an aggressive course and recurrence when compared to other subtypes of a tumour. Furthermore, tumours of this type are associated with time-consuming treatment and not a very satisfactory cosmetic result, thus worsening the quality of the patient's life. Several clinical studies have been published regarding the histopathologically diverse tumours developed in the same anatomical region; however, largely peculiarities of mixed BCCs are not explored sufficiently. The purpose of this study was to substantiate the use of dermoscopy and morphology, assessing mixed type BCC of the head and neck. The tumours were removed with a surgical excision of 1 cm margins, and the tumour sites were assessed in a 24-month-long follow-up period. The dermoscopic characteristics of mixed and aggressive BCC are analysed in this study. Finally, to better estimate the invading cone of the tumour, a complex morphology, which included collagen type IV and podoplanin immunohistochemistry, and electron microscopy were used.

Key words: *mixed type, dermoscopy, podoplanin, collagen IV immunohistochemistry, electron microscopy.*

INTRODUCTION

Basal cell carcinoma (BCC) is a common malignant cutaneous tumour constituting up to 80% of registered non-melanocytic neoplasms (Abbas and Kalia, 2016; Muzic *et al.*, 2017; Nolan *et al.*, 2020). In European populations, the BCC tumour predominantly affects individuals with the skin phototype I and II, who have a 30% lifelong risk of developing BCC (Muzic *et al.*, 2017). Basal and squamous cell carcinomas are the most prevalent skin malignancies in Latvia. The annual incidence of these types of tumours in the population of Latvia exceeds 1000 new registered cases. According to the data of the Centre for Disease Prevention and Control of Latvia, 448 new cases of skin cancer were

detected in 2017, while the number of diagnoses in patients under the age of 35 years increased by almost 35% in two years (2016 and 2017) when compared to 2014 and 2015. In up to 80% of cases, BCC develops as a skin tumour of the head and neck (Goh *et al.*, 2006; Ghafouri-Fard *et al.*, 2010; Muzic *et al.*, 2017). According to international estimates, the mortality associated with BCC is rather low (Abbas and Kalia, 2016; Muzic *et al.*, 2017). Slow progression and rare distant spread simultaneously with often locally invasive and destructive growth are characteristics of the tumour first described by Jacob in 1827 (Mackiewicz-Wysocka *et al.*, 2015). An increase in the number of patients who develop multiple BCC was demonstrated in recent years (Khalesi *et al.*, 2013). This increase may be associated either with the

destruction of the ozone layer and longer exposure to ultraviolet radiation, or the spread of cancer (Laikova *et al.*, 2019). Multiple tumours develop as multiple lesions in more than one anatomical localisation or demonstrate the coexistence of identical or different morphological types in the same or very close localisation (Bartoš, 2019).

Clinical manifestations of BCC vary; its differential diagnosis includes skin pathologies from a nevus and cutaneous squamous cell carcinoma to melanoma. Although a histopathological examination remains a standard diagnostic procedure, the use of advanced diagnostic tools, including dermoscopy, is encouraged (Verduzco-Martinez *et al.*, 2013). Dermoscopy becomes essential when choosing a treatment method and assessing the characteristics of the tumour such as localisation, size, histopathological subtype, presence of pigmentation and residual lesions, as well as the risk of recurrence (Lallas *et al.*, 2013; Popadič, 2014; Emiroglu *et al.*, 2015; El-Sayed *et al.*, 2020).

In most cases, BCC can be successfully treated; however, some patients are at high risk of tumour recurrence when lesions progress or become destructive. The recognition of the histopathological type of the tumour is mandatory for selecting an appropriate method for treating the tumour, in which more aggressive types require more argumentative treatment (Cohen *et al.*, 2005). Commonly invasive growth of the tumour is associated with a high recurrence rate; therefore, a complex assessment of clinical, instrumental and pathological findings is needed when suggesting aggressive behaviour and a high risk of recurrence (Dandurand *et al.*, 2006).

The common morphological forms of BCC, as well as the subtypes of these forms, are superficial, nodular, infiltrative, pigmented, and mixed (Madan *et al.*, 2016). Among them, infiltrative, micronodular, mixed and metatypical BCC with admixed foci indistinguishable from squamous cell carcinoma are considered to be high-risk histopathological types (Marzuka *et al.*, 2015). Mixed BCC is a subtype of BCC with mixed histology. A tumour of this type is a carcinoma that consists of two or more tumours in the same lesion. The diagnosis of mixed BCC is established histopathologically (Ghanadan *et al.*, 2014). Mixed-type BCC, in contrast to other tumour types, is often manifested as a nodular type, and, therefore, is not recognised as an aggressive tumour by clinicians. Collagens are the most abundant protein polymers, which affect tumour tissue stiffness, regulate tumour immunity and contribute to its aggressiveness. Type IV collagen, as a major component of the basement membrane (BM), ensures its integrity and prevents the penetration of tumours deeper into the stroma (Khlebnikova *et al.*, 2020). The destruction of the BM is associated with changes in the expression of type IV collagen, leading to an increase in the invasiveness of tumour cells (Tanjore *et al.*, 2006). A single violation of the BM integrity associated with the expression of type IV collagen is not enough for the development of invasive cancer. Podoplanin controlling tumour cell motility and migration is a potential actor exhibiting a decisive ef-

fect for initiating tumour invasiveness and metastasis (Nesina *et al.*, 2020).

Underestimating the tumour, many choose a therapy that is suitable for the treatment of the non-aggressive types of BCC, which is absolutely not suitable for the aggressive forms of this tumour and ultimately leads to its recurrence. Therefore, assessing the biological behaviour of BCC, especially of the tumours with mixed structural appearance, the presence of more aggressive histological type should be suspected, leading to a proper selection of treatment tactics (Bartoš and Kullová, 2016). Despite the wide range of treatment modalities for BCC, the overall rate of recurrence is about 4–5% over five years (Wadhera *et al.*, 2006; Kyrgidis *et al.*, 2010). Highly invasive types of BCC commonly present with a higher incidence of recurrence. According to Sexton *et al.*, the recurrence rate for the removal of superficial and nodular BCC varies from 3.6 up to 6.4%, whereas for micronodular it is 18.6% (Sexton *et al.*, 1974). Surgery and radiation therapy become the methods of choice for most patients with high-risk BCC lesions (Telfer *et al.*, 2012).

Due to the presence of certain dermoscopic and morphological correlations, some histopathological variants of BCC may be distinguished already during dermoscopic examination (Lallas *et al.*, 2015). Aggressive forms of BCC, including scleroderma-like and infiltrative, demonstrate the presence of scattered arborising vessels in a whitish structureless region without clear boundaries (Longo *et al.*, 2014). In contrast, mixed types of BCC remain poorly diagnosed during a dermoscopic performance and become a challenge to specialists. Dermatologists, pathologists and surgeons study these types of tumours to find out clinical features that could help in early diagnosis and choosing the right tactics to reduce the incidence of recurrence and advanced neglected tumours.

This study aimed to substantiate the use of dermoscopy and morphology, assessing mixed BCC of the head and neck.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-nine patients clinically presented with suspected aggressive BCC of the head and neck, and treated prospectively in Riga Stradiņš University, Institute of Stomatology, Department of Maxillofacial Surgery and the Oncology Centre of Latvia, within the timespan from 1 September 2016 to 1 September 2019, were enrolled in this study. In all twenty-nine cases, mixed type BCC was confirmed. All patients (18 male and 11 female patients) were examined clinically, dermoscopically, whereas the tissue samples — histopathologically. The age range was 37–90 years. The clinical data obtained from the patients were concerned with the duration and type of the lesion at the time of presentation, clinical and dermoscopic features, anatomical localisation and the size of the tumour. The disease relapse was monitored over a two-year follow-up period. The study was approved by the Ethical Committee of Riga Stradiņš Uni-

versity, and written informed consent was obtained from all patients. The tumour tissue samples were taken following the tenets of the Declaration of Helsinki.

The dermoscopic diagnostic criteria for BCC included the presence of arborising vessels, short fine telangiectasia, leaf-like areas, large blue-grey ovoid nests, white streaks, ulceration, multiple small erosions, shiny white areas, infocus dots, milky-pink to red areas, spoke-wheel areas, multiple blue-grey dots and globules (Puig *et al.*, 2012; Lallas *et al.*, 2013; Popadič, 2014; Wozniak-Rito *et al.*, 2018).

The dermoscopic examination was conducted with a hand-held dermatoscope (3Gen DermLite DL3N with Pigmentboost; Olympus, USA) with a 30 mm × 10 lens. A polarised mode with both contact and non-contact techniques was used to visualise the dermoscopic findings of BCC in each lesion. A digital photography of clinical and dermoscopic presentation of the lesion was performed using a Samsung Galaxy S9+ (Samsung Electronics, Korea, Seoul) mobile camera. A semiquantitative assessment of dermoscopic findings was used (Argenziano and Zalaudek, 2007; De Vita *et al.*, 2012; Okuboyejo *et al.*, 2018). The levels appearing during dermoscopy were graded as follows: low – ≤ 25%, moderate – 26-70% and strong visualisation – > 70%.

The formalin-fixed, paraffin-embedded excised tumour tissues were processed and sectioned conventionally. The sections were mounted on SuperFrost Plus Adhesion slides (Gerhard Menzel GmbH, Germany), whereas parallel sections — mounted and routinely stained to diagnose the type of BCC. The histopathology of the tumour was assessed by two independent observers following the classifications of World Health Organisation (WHO). Based on the last WHO classification of skin tumours revised in 2018 and recent publication (Elder *et al.*, 2018), the presence of either low-risk BCC presented by nodular, superficial, pigmented, infundibulocystic and fibroepithelial, or higher-risk BCC presented by basosquamous carcinoma, sclerosing/morphoeic, infiltrative, micronodular and BCC with sarcomatoid differentiation was confirmed.

For immunohistochemical reactions, the sections were incubated overnight at 4 °C with the following primary mouse monoclonal antibodies: anti-collagen IV type (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark, clone CIV 22, 1 : 25), which labels the *lamina densa* of the basement membrane; and anti-podoplanin (Abcam, Cambridge, MA, USA, clone PDPN/1433, 1 : 200), which mediates a pathway leading to cell migration and invasion *in vivo* and *in vitro* (Wicki *et al.*, 2006).

The amplification of primary antibody and visualisation of reaction products were performed applying the HiDef Detection HRP Polymer system (CellMarque, Rocklin, CA, USA); after rinsing in phosphate-buffered saline (PBS) solution, sections were incubated with HiDef Detection™ Amplifier for 10 min at room temperature (RT) and HiDef Detection™ HRP Polymer Detector for 10 min (RT), re-

spectively. The antigen sites were visualised with 3,30 diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride kit (DAB+ Chromogen and DAB+Substrate buffer, Cell Marque, Rocklin, CA, USA) applied for 5 minutes. The cell nuclei were counterstained with Mayer's hematoxylin, washed, dehydrated, cleared, mounted in Roti® Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and cover-slipped. The sections were further analysed, and the results of immunohistochemical reactions were evaluated semiquantitatively using the gradation system proposed by Marasa *et al.* (2008). The assessment of immunostaining was performed semiquantitatively in 20 randomly selected visual fields of each sample (magnification 400×) representing the regions of interest. Immunostaining for collagen type IV was confined to the BM and displayed a linear (continuous and discontinuous) pattern. In turn, podoplanin revealed cellular membranous expression, including coloration of the membranous portion of cell projections.

The sections were photographed using a Leica light microscope (LEICA, LEITZ DMRB, Wetzlar, Germany) with a DFC 450C digital camera and scanned by a Glissando Slide Scanner (Objective Imaging Ltd., Cambridge, UK).

For a better exploration of the ultrastructural peculiarities of tumour cells forming an invasive cone, a transmission electron microscopy (TEM) was used. The tissue samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated through graded ethanol series and embedded in epoxy resin (Sigma-Aldrich). The ultrathin sections of thickness 70–80 nm were cut with LBR ultramicrotome, collected on formvar-coated grids, double-stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a JEM 1011 electron microscope (JEOL, Japan). The specimens were examined at magnification ×8000–×50 000.

Statistical data analysis with the help of SPSS version 26.0 software was performed to assess the dermoscopy and immunohistochemistry results. The diagrams were acquired using the Amchart software. To test whether the collected numerical data were normally distributed, a Kolmogorov-Smirnov normality test was applied. The quantitative data were expressed as means ± standard deviation, whereas categorical parameters were expressed as frequencies and percentages. The Pearson's rank correlation coefficient was used to estimate the relationships between the immunostaining patterns of the antibodies used in this study. The correlation between antigen expression and histopathological type of BCC was studied by Chi-Square statistics. The Friedman Chi-squared test was used to estimate relationships between the dermoscopic pattern and a morphological type of the tumour. In the case of paired group comparisons, the Wilcoxon matched-pairs signed rank test with Bonferroni correction was used. *p* values of < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Twenty-nine cases were diagnosed histopathologically as mixed type BCCs. One case was interpreted as a rare case

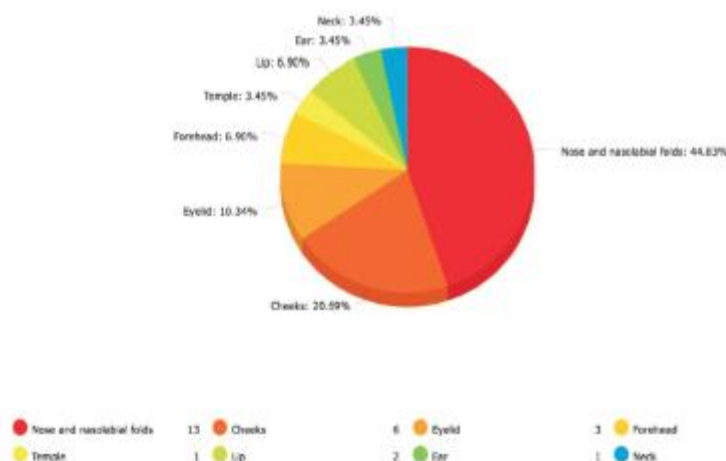


Fig. 1. Frequencies of the mixed type BCC demonstrated in different regions of the head and neck.

and included a combination of a solid-adenoid- and infiltrative arrangement of tumour cells in one tumour. The most frequent combinations of the mixed BCCs included nodular-infiltrative, nodular-superficial and nodular-micro-nodular types. Anatomically, the tumours were located as follows: one (3.45 %) on the temple, two (6.90%) on the forehead, 6 (20.69 %) on cheeks, 13 (44.83 %) on the nose and nasolabial folds, one (3.45%) on the ear, one (3.45%) on the neck, three (10.34 %) on the eyelid; and two (6.90 %) on the lip (Fig. 1). During the study, 18 tumours further developed as recurrent neoplasms. Among them, seven tumours developed after a complete surgical excision with clean histopathological margins, whereas 11 — after minimally-invasive treatments such as cryotherapy, imiquimod therapy and laser ablation. Among 18 recurrent BCC tumours, ten neoplasms were diagnosed as a mixed type.

In most cases, the histopathologically aggressive mixed type BCC was localised on the nose and nasolabial fold, and commonly presented as nodular-infiltrative or solid-adenoid tumours. The size of mixed tumours was greatly varying from 0.2 mm to 2.5 cm, and, occasionally, up to 4 cm (Table 1).

Dermoscopically, 29 cases of aggressive BCC were suspected. The characteristic dermoscopic findings observed in aggressive BCC are presented in Figure 2A, B and summarised schematically in Figures 3 and 4. The most common vascular pattern of mixed BCC was the presence of arborising vessels and short-fine telangiectasias, mostly found in small-sized BCCs. Shiny white areas (16 patients, 55.1%), white streaks (19 patients, 65.4%), milky-pink to red areas (23 patients, 79.3%), ulceration (10 patients, 34.4%), and multiple small erosions (11 patients, 26.5%) appeared to be frequent dermoscopic findings. In turn, pigmented structures distinguished as blue-grey globules (three patients, 10.3%), blue-grey ovoid nests (four patients, 13.7%) and in-focus dots (two patients, 6.8%) were less frequently diagnosed. The pigment-associated lesions were commonly

Table 1. Distribution of mixed type BCCs by anatomical localization and size

Localisation	Number of cases	Min size	Max size	The average estimate
Nose	13	0.3 cm	4 cm	1.1 cm
Cheek	6	0.2 cm	3.2 cm	1.85 cm
Temple	1	0.5cm	0.5 cm	0.5 cm
Forehead	2	0.3 cm	0.7 cm	0.5 cm
Eyelid	3	0.2 cm	0.6 cm	0.4 cm
Lip	2	0.3 cm	1.3 cm	0.8 cm
Ear	1	0.8 cm	0.8 cm	0.8 cm
Neck	1	2.8 cm	2.8 cm	2.8 cm

BCC, basal cell carcinoma; Min, minimal; Max, maximal

shaped as maple leaf-like areas (two patients, 6.9%) and spoke-wheel areas (one patient, 3.4%).

The frequency of dermoscopic findings recognised in mixed BCC is summarised in Table 2. The presence of arborising vessels was the most common dermoscopic finding in BCC. Importantly, arborising vessels were found to differ in all BCC types. In this study, the arborising vessels were most often diagnosed in mixed BCCs with a nodular component. In mixed superficial BCCs, arborising vessels were accompanied by milky-pink to red areas, multiple erosions, and short fine telangiectasia. Blue-grey ovoid nests were the most common features of pigmented BCCs, whereas white streaks in infiltrative BCCs.

To evaluate the invasion pattern of mixed BCCs, collagen type IV and podoplanin immunohistochemistry was performed. The immunoreaction was greatly varying, demonstrating continuous, discontinuous, and lacking expression (Fig. 5A). When estimated, mixed BCCs presented with 49.47% tumours, revealing the absence of collagen type IV expression, 40% — revealing discontinuous decoration, and only 10.53% — demonstrating the continuous pattern of the BM. In highly infiltrative variants of BCC, colla-

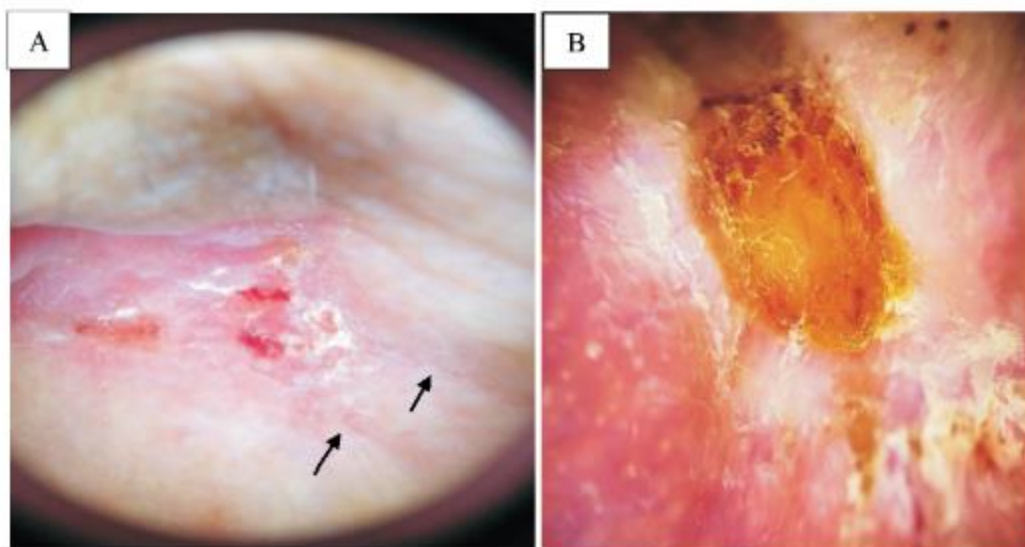


Fig. 2. (A) Homogeneous shiny structureless areas with the milky-pink background; superficial short-fine telangiectasia and few fine arborizing vessels. The tumour surface with multiple small erosions, and dermoscopically not clearly detectable edges in the case of primary mixed type BCC, which histopathologically was recognised as superficial and infiltrative type. Filamentous and thread-like slender cords beyond the visual boundaries of the tumour characteristic of more aggressive BCC demonstrating a high risk of recurrence (black arrows). (B) A homogeneous white-to-pink background and ulceration in the middle of the tumour demonstrated dermoscopically in the case of recurrent mixed type BCC, which histopathologically was recognised as nodular with cysts and infiltrative type.

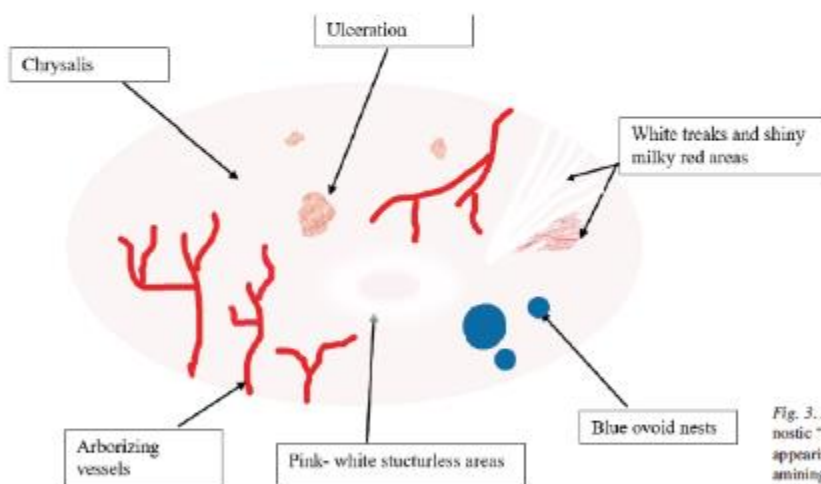


Fig. 3. A scheme, which depicts diagnostic "keys" for the mixed BCC type appearing dermoscopically when examining this type of tumour.

gen expression was absent in up to 96% of tumours. Collagen type immunostaining was recognised as a linear decoration along the basal aspect of the tumour cord or nest (Fig. 5B, C).

Among 29 mixed BCC samples were analysed, 58.6% expressed podoplanin. Some tumours did not express podoplanin (Fig. 6B, C, D), whereas others expressed podop-

planin exclusively in the invading front (Fig. 6A, B). Finally, some tumours expressed podoplanin within the basal cell layer with frequent cytoplasmic staining (Fig. 6A, C, D).

Finally, for better assessment of tumour architecture in the front, the cellular morphology was explored using TEM. The cells displayed an irregular cell shape, and the intercel-

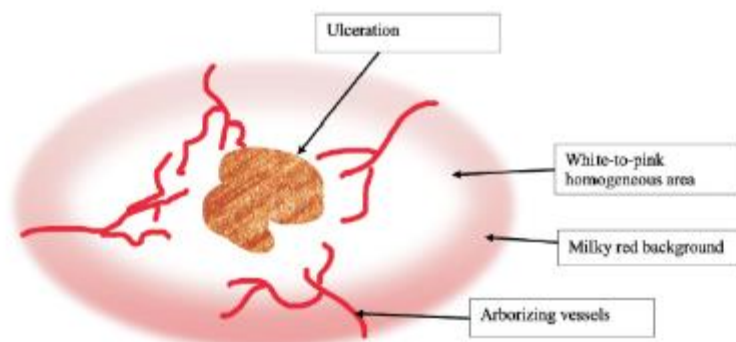


Fig. 4. A scheme, which depicts diagnostic «keys» for the infiltrative sclerosing BCC type appearing dermoscopically.

Table 2. The prevalence of dermoscopic findings in mixed BCC

Dermoscopic findings	No visualization, %	Visualization <25%	Visualisation >25-70%	Visualisation >70%
Arborizing vessels	9 (31.0)	8 (27.6)	4 (13.8)	8 (27.6)
Blue-grey ovoid nests	25 (86.2)	0	1 (3.4)	3 (10.3)
Concentric structures	23 (79.3)	0	3 (10.3)	3 (10.3)
In-focus dots	27 (93.1)	1 (3.4)	0	1 (3.4)
Maple leaf-like areas	27 (93.1)	0	0	2 (6.9)
Milky-pink to red areas	6 (20.7)	4 (13.8)	2 (6.9)	17 (58.6)
Multiple blue-grey dots	26 (89.7)	0	2 (6.9)	1 (3.4)
Multiple small erosions	21 (72.4)	1 (3.4)	3 (10.3)	4 (13.8)
Shiny white areas	13 (44.8)	1 (3.4)	6 (20.7)	9 (31.0)
Spoke-wheel areas	28 (96.6)	0	0	1 (3.4)
Short fine telangiectasias	10 (34.5)	2 (6.9)	7 (24.1)	10 (34.5)
Ulceration	19 (65.5)	2 (6.9)	3 (10.3)	5 (17.2)
White streaks	10 (34.5)	1 (3.4)	3 (10.3)	15 (51.7)

BCC, basal cell carcinoma

lular spaces were dilated (Fig. 7A, B). Almost all cellular cords presented with loss of cell-to-cell junctions; only primitive junctions were preserved. There were only occasional tonofilaments observed in the cytoplasm. The changes of the BM included the presence of multi lamination, splitting and development of a discontinuous course.

DISCUSSION

Despite the high incidence of BCC, there are very few studies describing the peculiarities of different subtypes of the

tumour and likely differences between them. There are various methods of treating BCCs, ranging from minimally invasive methods to surgical therapy, in which the histopathological findings of the tumour is one of the most determining factors in choosing an appropriate treatment method (Drucker *et al.*, 2018). The specialists involved in the diagnostics and treatment of BCC should be aware of the successful and safe management of patients due to frequent recurrence, even in the case of a complete primary surgical removal of the tumour (Paoli *et al.*, 2019).

According to the results of the present study, the majority of mixed-type BCCs are localised on the face, nose and nasolabial area. These are sun-exposed skin regions of the face. Furthermore, most mixed-type BCCs have a larger size than the tumours of other subtypes. Most mixed-type BCCs have a common nodular component, which might have an association with the stem cells of the hair follicles (Peterson *et al.*, 2015). By analysing dermoscopic and histopathological correlates, clear evidence comes to light — the aggressive potential of tumour does not increase only by enlargement of neoplasm (Roldán-Marín *et al.*, 2014; Emiroglu *et al.*, 2015; Enache *et al.*, 2019).

These findings are supported also by other authors; localisation of aggressive tumours should be taken into account, since these are often localised in the areas traversed by large-sized arteries (Lammers *et al.*, 2011; Karaninder *et al.*, 2012). Routinely, the diagnosis of BCC is established by histopathological examination after the removal of a suspicious mass. However, in recent years, diagnostics of skin tumours was improved by using a non-invasive and cheap *in vivo* dermoscopic examination method. This modern and convenient method of examination allows practitioners to study the morphological features of tumours that are not obviously visible, thus contributing to the accuracy of the diagnosis.

The most frequent dermoscopic finding of mixed BCC is the presence of arborising vessels and short-fine telangiectasias. Shiny white areas, white streaks, milky-pink to the red background, ulceration and multiple small erosions were also observed more often than the other findings. The afore-

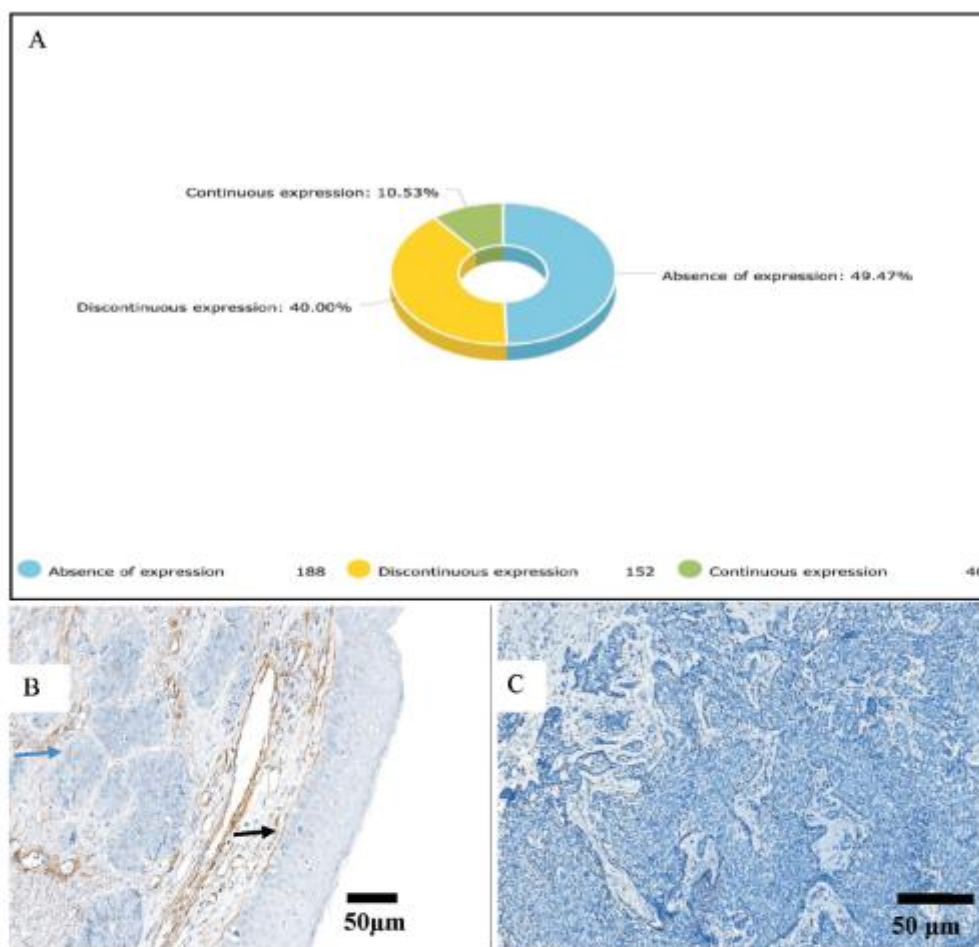


Fig. 5. Collagen type IV expression in the mixed type BCC. Panel (A) shows frequencies of the absence of collagen expression and the presence of continuous and discontinuous patterns confirmed immunohistochemically. Panels (B and C): collagen type IV immunohistochemistry. The panel B demonstrates the presence of linear structures along the basal aspect of the epidermis (black arrow), which reflects the immunohistochemical appearance of collagen type IV within the *lamina densa* of the basement membrane displaying continuous pattern, which becomes discontinuous when enveloping small nodules of the tumour mass (blue arrow), $\times 200$. Panel C demonstrates the tumor nodules displaying infiltrative growth and the absence of collagen type IV expression, $\times 100$.

mentioned dermoscopic criteria recognised by the authors of this research as suitable findings when suggesting aggressive BCC are in accordance with the results of other authors (Emiroglu *et al.*, 2015; Enache *et al.*, 2019). The appearance of arborising vessels, ulceration, white streaks, and milky pink to the red background is consistent with peritumoural inflammation often found in aggressive BCC (Zalaudek *et al.*, 2010; El-Sayed *et al.*, 2020). Dermoscopically, upon the detection of a lesion with a probability of neoplastic transformation, a specialist should treat it as a tumour with an increased risk of recurrence.

In the present study examining the aggressiveness of mixed BCC by the use of morphological methods, a special inter-

est was shown in exploring the invading cone of the tumour mass. An invasive growth is highly dependent on epithelial-mesenchymal interactions, when a tumour cell gradually loses its adhesive properties, detaches from the BM and continues migration into the underlying connective tissue (Rowe, 2008). During this process, the apical-basal polarity of the epithelial cell is lost, intercellular junctions become more primitive, the cytoskeleton rearranges, and matrix metalloproteinases are synthesised increasingly and degrade the main components of the BM, one of which is type IV collagen (Rowe, 2008; Khlebnikova, 2020).

The destruction of type IV collagen within the *lamina densa* of the BM is significant and crucial for the germination of

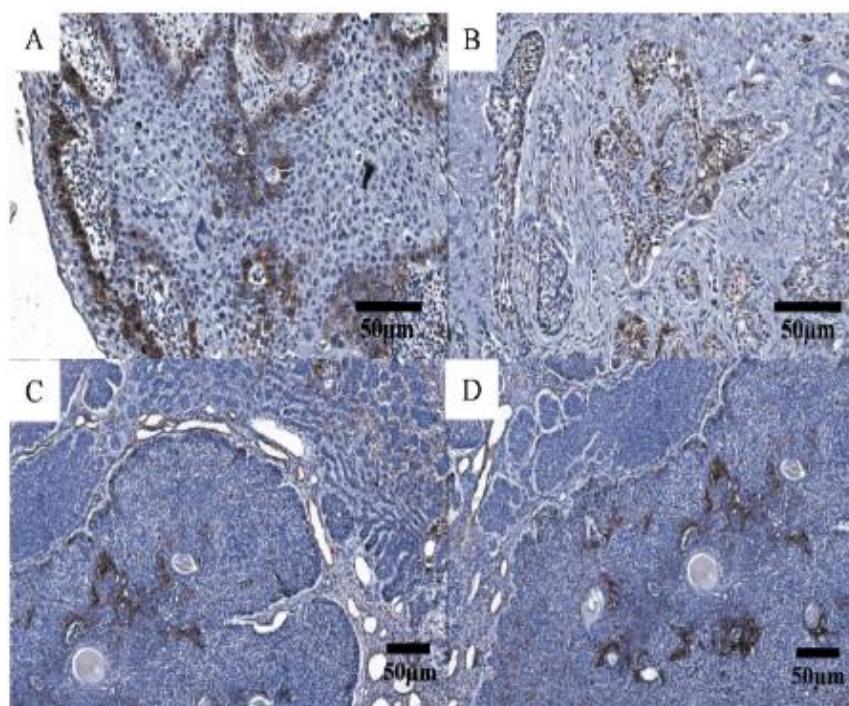


Fig. 6. Podoplanin immunohistochemistry. (A) The irregularly shaped nodular mass, demonstrating invasive growth into the stroma in primary BCC. Most of the cells at the basal aspect of the invading tumour express podoplanin, $\times 200$. (B) Some tumour nests and strands of mixed recurrent BCC with infiltrative growth, demonstrating podoplanin immunopositivity, whereas some — the absence of immunostaining, $\times 200$. (C, D) Mixed-type BCC presents with a large nodule demonstrating podoplanin expression along the basal aspect and within the tumour mass, and multiple tumoral nests and strands revealing micronodular architecture and lacking the expression, $\times 100$.

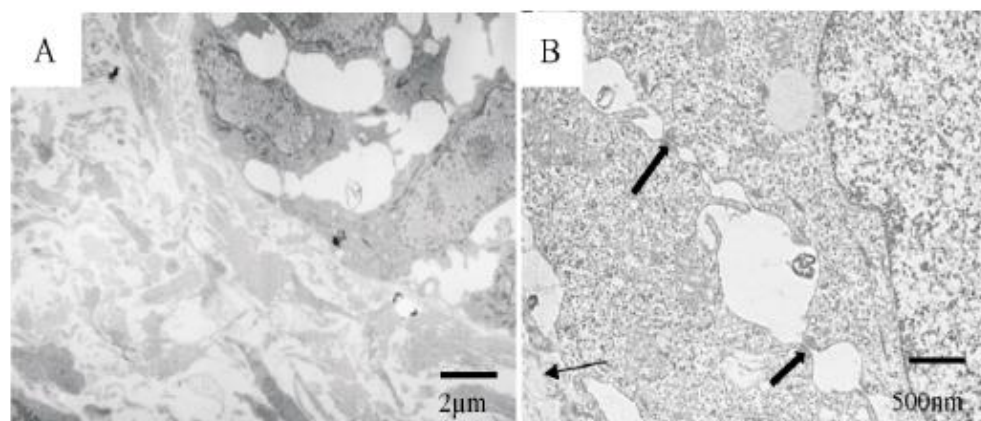


Fig. 7. The ultrastructural appearance of tumour cells forming an invasive cone in the case of mixed BCC on transmission electron microscopy. (A) Low-power view of the outer edge of the invading tumour surrounded by collagenous stroma, $\times 4\,000$. (B) Fragments of two tumour cells separated by dilated intercellular spaces; there are only primitive cellular contacts preserved (thick arrows); the basement membrane is recognised by the lamina densa displaying discontinuous appearance (thin arrows), $\times 15\,000$.

tumour cells and the infiltration of the underlying connective tissue (Fang *et al.*, 2014). Changes in collagen type IV expression along with the formation of infiltrative growth patterns and tumour budding are demonstrated in aggressive bladder tumours (Miyake *et al.*, 2017). It is believed that collagen changes cause biomechanical signals in a suppor-

tive scaffold, which, in turn, are sensed by both tumour cells and stromal cells, thus, triggering a cascade of biological events (Fang *et al.*, 2014).

In this study, a violation of the integrity of the BM and the disappearance of collagen type IV collagen leading to an in-

crease in the invasive potential of the tumour in mixed and infiltrative BCC was demonstrated. This evidence is partly in agreement with studies that showed differences in the expression of type IV collagen, distinguished as linear and continuous in the superficial BCC and almost nil in the micronodular and infiltrative BCC (Chuprov, 2008; Arduino, 2010; Khlebnikova *et al.*, 2020). The ability of mixed and infiltrative forms of BCC to destroy the basement membrane can be associated with their invasive potential and should be considered in the early diagnosis of neoplasm and prediction of the biological behavior of BCC (Crowson, 2006).

Apart from the assessment of collagen type IV impairment, the expression of the podoplanin marker was estimated and ultrastructural peculiarities of BCC at the invading cone was analysed. Studies exploring the expression of tumour-associated genes in squamous cell carcinoma have already suggested the role of podoplanin in normal and malignant homeostasis of the epidermis (Acton, 2012; Baars *et al.*, 2015). Previous studies have highlighted the role of podoplanin in the induction of collective and single tumour cell migration (Wicki and Christofori, 2007). In this study, we demonstrated irregularly shaped invasive tumour cords highly decorated with the anti-podoplanin antibody along the basal aspect and reflecting aggressive neoplastic potential. Simultaneously, large and smoothly delineated nodular tumour masses demonstrated a different pattern of podoplanin expression and even its absence. These differences in podoplanin marker expression may somehow reflect the peculiarities of a tumour growth in BCC and are partly consistent with the results of other authors (Wojciechowska-Zdrojowy *et al.*, 2016). Additionally, we observed an increase of podoplanin expression demonstrated at the invading cone and paralleled by a decrease of cytoplasmic tonofilaments, simplification of cellular junctions and the discontinuity of the BM assessed ultrastructurally.

In this case, a high frequency of the combination of nodular-infiltrative, nodular-superficial and nodular-micronodular types in mixed BCC was confirmed by the use of histopathology. Clinically, the nodular form of BCC remains one of the most commonly diagnosed, whereas dermoscopically, nodular, superficial and infiltrative BCCs are often distinguished by the presence of tumour-associated diagnostic criteria. Aggressive BCC demonstrates impairment of the integrity of the BM and higher expression of podoplanin at the invasive front. However, a more extensive analysis of the cellular and molecular mechanisms that govern the tumour invasion process warrants further investigation.

CONCLUSION

The coexistence of two or more different histopathological types of BCC in the same anatomical position is very rare. Nevertheless, one should suspect and explore such coexistence when faced with BCC. Such coexistence can include a large area and requires extensive surgical removal and

grafting of the skin. BCC biopsy is recommended before choosing non-surgical treatment methods. These timely therapeutic procedures are mitigated in preventing relapses and metastases.

Histopathological examination showed that dermoscopy is 100% accurate when diagnosing BCC. Due to the developed dermoscopic algorithms, it is possible to suspect BCC with a tendency to an aggressive course. In this context, filamentary thin strands extending beyond visually recognised borders of the tumour may be suggestive of aggressive BCC. However, further studies should be conducted to understand whether these algorithms are sufficient for error-free forecasting of aggressive subtypes of BCC. The morphological assessment applied in this study proved the necessity of further exploration of the molecular players and mechanisms responsible for the better understanding of an invasion process in mixed BCC. Due to a rather small number of patients, this study has a certain limitation, and the results should be tested on larger cohorts.

The authors declare that there is no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Rīga Stradiņš University Department of Doctoral Studies is acknowledged for reagents and publishing support.

REFERENCES

- Abbas, M., Kalia, S. (2016). Trends in non-melanoma skin cancer (basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma) in Canada: A descriptive analysis of available data. *J. Cutan. Med. Surg.*, **20** (2), 166–175.
- Acton, S. E., Astarita, J. L., Malhotra, D., Lukacs-Kornek, V., Franz, B., Hess, P. R., Jakus, Z., Kuligowski, M., Fletcher, A. L., Elpek, K. G. *et al.* (2012). Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity*, **37** (2), 276–289.
- Arduino, P. G., Carrozzo, M., Pagano M., Broccoletti, R., Scully, C., Gandolfo, S. (2010). Immunohistochemical expression of basement membrane proteins of verrucous carcinoma of the oral mucosa. *Clin. Oral Investig.*, **14** (3), 297–302.
- Argenziano, G., Zalaudek, I. (2007). Recent advances in dermoscopic diagnostic technologies. *Eur. Oncol. Dis.*, **1** (2), 104–106.
- Baars, S., Bauer, C., Szabowski, S., Hartenstein, B., Angel, P. (2015). Epithelial deletion of podoplanin is dispensable for re-epithelialization of skin wounds. *Exp. Dermatol.*, **24** (10), 785–787.
- Bartoš, V. (2019). Development of multiple-lesion basal cell carcinoma of the skin: A comprehensive review. *Sisli Efal Hastanesi tip bulleteni*, **53** (4), 323–328.
- Bartoš, V., Kullová, M. (2016). Basal cell carcinoma of the skin with mixed histomorphology: A comparative study. *Cesk. Patol.*, **52** (4), 222–226.
- Carucci, J. A., Leffell, D. J. (2008). Basal cell carcinoma. In: Wolff, K., Goldsmith, L., Katz, S., Gilchrist, B., Paller, A. S., Leffell, D. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th edition. McGraw Hill, New York, pp. 1036–1042.
- Cohen, P. R., Schulze, K. E., Nelson, B. R. (2005). Cutaneous carcinoma with mixed histology: A potential etiology for skin cancer recurrence and an indication for Mohs microscopically controlled surgical excision. *South. Med. J.*, **98** (7), 740–747.

- Costache, M., Georgescu, T. A., Oproiu, A. M., Costache, D., Naie, A., Sajin, M., Nica, A. E. (2018). Emerging concepts and latest advances regarding the etiopathogenesis, morphology and immunophenotype of basal cell carcinoma. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **59** (2), 427–433.
- Crowson, A. N. (2006). Basal cell carcinoma: Biology, morphology and clinical implications. *Mod. Pathol.*, **19** (2), S127–S147.
- Chuprov, I. N. (2008). Immunomorphological features of cutaneous basal-cell carcinoma. *Vopravy onkologii*, **54** (6), 715–719.
- Dandurand, M., Petit, T., Martel, P., Guillot, B., ANAES (2006). Management of basal cell carcinoma in adults Clinical practice guidelines. *Eur. J. Dermatol.*, **16** (4), 394–401.
- De Vita, V., Di Leo, G., Fabbrocini, G., Liguori, C., Puolillo, A., Sommella, P. (2012). Statistical techniques applied to the automatic diagnosis of dermoscopic images. *ACTA IMEKO*, **1** (1), 7–18.
- Drucker, A. M., Adam, G. P., Rofeberg, V., Gazala, A., Smith, B., Moustafa, F., Weinstock, M. A., Trikalinos, T. A. (2018). Treatments of primary basal cell carcinoma of the skin: A systematic review and network meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, **169** (7), 456–466.
- Elder, D. E., Massi, D., Scolyer, R. A., Willemsz, R. (2018). *WHO classification of skin tumours. WHO Classification of Tumours*. 4th edn. Volume 11, pp. 27–33.
- El-Sayed, S. K., El-Sayed, G. D. A., Kamef, A. M., Al-Tramsy, A. A., Ateia, S. Y. (2020). Efficacy of dermoscopy in the diagnosis of different basal cell carcinoma subtypes. *Egypt J. Dermatol. Venerol.*, **40** (1), 15–22.
- Emiroglu, N., Cengiz, F. P., Kemeriz, F. (2015). The relation between dermoscopy and histopathology of basal cell carcinoma. *An. Bras. Dermatol.*, **90** (3), 351–356.
- Enache, A. O., Pătrăscu, V., Simionescu, C. E., Căurea, R. N., Vaduva, A., Stoica, L. (2019). Dermoscopy patterns and histopathological findings in nodular basal cell carcinoma—study on 68 cases. *Curr. Health Sci. J.*, **45** (1), 116–122.
- Fang, M., Yuan, J., Peng, C., Li, Y. (2014). Collagen as a double-edged sword in tumour progression. *Tumour Biol.*, **35** (4), 2871–2882.
- Ghaffouri-Fard, S., Abbasi, A., Moslehi, H., Faramarzi, N., Tabatabaie Vakili, S., Mobasher, M. B., Modarresi, M. H. (2010). Elevated expression levels of testis-specific genes *TEX101* and *SPATA19* in basal cell carcinoma and their correlation with clinical and pathological features. *Brit. J. Dermatol.*, **162** (4), 772–779.
- Ghanadan, A., Abbasi, A., Rabet, M., Abdollahi, P., Abbasi, M. (2014). Characteristics of mixed type basal cell carcinoma in comparison to other BCC subtypes. *Indian J. Dermatol.*, **59** (1), 56–59.
- Goh, B. K., Ang, P., Wu, Y. J., Goh, C. L. (2006). Characteristics of basal cell carcinoma amongst Asians in Singapore and a comparison between completely and incompletely excised tumours. *Int. J. Dermatol.*, **45** (5), 561–564.
- Khalesi, M., Whiteman, D. C., Doi, S. A., Clark, J., Kimlin, M. G., Neale, R. E. (2013). Cutaneous markers of photo-damage and risk of basal cell carcinoma of the skin: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **22** (9), 1483–1489.
- Khlebnikova, A. N., Belova, L. A., Garevich, L. E., Selezneva, E. V., Sedova, T. G. (2020). Specifics of type IV collagen expression in basal cell skin carcinoma [Характеристики экспрессии коллагена IV типа в базально-клеточном раке кожи]. *Альманах Clin. Med.*, **48** (2) (in Russian). <https://www.almanacmed.ru/jour/article/view/1256> (accessed 25.03.2021).
- Kyrgidis, A., Vahsevanos, K., Tzellos, T. G., Xirou, P., Kitikidou, K., Antoniadou, K., Zouboulis, C. C., Triaridis, S. (2010). Clinical, histological and demographic predictors for recurrence and second primary tumours of head and neck basal cell carcinoma. A 1062 patient-cohort study from a tertiary cancer referral hospital. *Eur. J. Dermatol.*, **20** (3), 276–282.
- Laikova, K. V., Oberemok, V. V., Krasnodubets, A. M., Galchinsky, N. V., Useinov, R. Z., Novikov, I. A., Temirova, Z. Z., Gorlov, M. V., Shved, N. A., Kameiko, V. V. et al. (2019). Advances in the understanding of skin cancer: Ultraviolet radiation, mutations, and antisense oligonucleotides as anticancer drugs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **24** (8), 1516.
- Lallas, A., Apalla, Z., Ioannides, D., Argenziano, G., Castagnetti, F., Moscarella, E., Longo, C., Palmieri, T., Ramundo, D., Zalaudek, I. (2015). Dermoscopy in the diagnosis and management of basal cell carcinoma. *Future Oncol.*, **11** (22), 2975–2984.
- Lallas, A., Argenziano, G., Zandri, E., Moscarella, E., Longo, C., Grenzi, L., Pellacani, G., Zalaudek, I. (2013). Update on non-melanoma skin cancer and the value of dermoscopy in its diagnosis and treatment monitoring. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **13** (5), 541–558.
- Lammers, G., Verhaegen, P., Ulrich, M., Schalkwijk, J., Middelkoop, E., Weiland, D., Daamen W. (2011). An overview of methods for the *in vivo* evaluation of tissue-engineered skin constructs. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **17** (1), 33–55.
- Longo, C., Lallas, A., Kyrgidis, A., Rabinovitz, H., Moscarella, E., Ciardo, S., Zalaudek, I., Oliviero, M., Lusi, A., Gonzalez, S., Guitera, P., Piana, S., Argenziano, G., Pellacani, G. (2014). Classifying distinct basal cell carcinoma subtype by means of dermoscopy and reflectance confocal microscopy. *J. Amer. Acad. Dermatol.*, **71** (4), 716–724.e1.
- Mackiewicz-Wysocka, M., Bowszyc-Dmochowska, M., Strzelecka-Węklar, D., Dańczak-Pazdrowska, A., Adamki, Z. (2013). Basal cell carcinoma — diagnosis. *Contemp. Oncol (Poznan)*, **17** (4), 337–342.
- Madan, V., Lear, J. T. (2016). *Basal cell carcinoma*. In: Griffiths, C. E., Barker, J., Bleaker, T., Chalmers, R., Creamer, D. (eds.) *Rook's Textbook of Dermatology*. 9th edn. John Wiley & Sons, West Sussex, UK, pp. 141–146.
- Marsaj, L., Marsaj, S., Sciancalepore, G. (2008). Collagen IV, laminin, fibronectin, vitronectin. Comparative study in basal cell carcinoma. Correlation between basement membrane molecules expression and invasive potential. *G. Ital. Dermatol. Venerol.*, **143** (3), 169–173.
- Marzuka, A. G., Book, S. E. (2015). Basal cell carcinoma: Pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale. J. Biol. Med.*, **88** (2), 167–179.
- Mehta, K. S., Mahajan, V. K., Chauhan, P. S., Sharma, A. L., Sharma, V., Abhinav, C., Khatri, G., Prabhu, N., Sharma, S., Negi, M. (2012). Metastatic basal cell carcinoma: A biological continuum of basal cell carcinoma? *Case Rep. Dermatol. Med.*, **2012**, 157187.
- Miyake, M., Hori, S., Morizawa, Y., Tatsumi, Y., Toritsuka, M., Ohnishi, S., Shimada, K., Furuya, H., Khadka, V. S., Deng, Y. et al. (2017). Collagen type IV alpha 1 (COL4A1) and collagen type XIII alpha 1 (COL13A1) produced in cancer cells promote tumour budding at the invasion front in human urothelial carcinoma of the bladder. *Oncotarget.*, **8** (22), 36099–36114.
- Muzic, J. G., Schmin, A. R., Wright, A. C., Alniemi, D. T., Zubair, A. S., Olazagasti Lourido, J. M., Sosa Seda, I. M., Weaver, A. L., Baam, C. L. (2017). Incidence and trends of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma: A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *Mayo Clinic Proc.*, **92** (6), 890–898.
- Neinay, Y., El-Ashawy, A. A., Alshenawy, H. A., Dorgham, W. L. (2020). The prognostic value of podoplanin expression in nonmelanoma skin cancers: Correlation with lymphatic vessel density. *Amer. J. Dermatopathol.*, **42** (6), 432–438.
- Nolan, G. S., Wormald, J. C. R., Kiely, A. L., Totty, J. P., Jain, A. (2020). Global incidence of incomplete surgical excision in adult patients with non-melanoma skin cancer: Study protocol for a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Syst. Rev.*, **9**, 83.
- Okuboyejo, D. A., Oluhbara, O. O. (2018). A review of prevalent methods for automatic skin lesion diagnosis. *Open Dermatol. J.*, **12** (1), 14–53.
- Paoli, J., Gyllencreutz, J. D., Fouglerberg, J., Backman, E. J., Modin, M., Polesie, S., Zaar, O. (2019). Nonsurgical options for the treatment of basal cell carcinoma. *Dermatol. Pract. Concept.*, **9** (2), 75–81.
- Peterson, S. C., Eberl, M., Vugnozzi, A. N., Belkadi, A., Veniaminova, N. A., Verhaegen, M. E., Bichakjian, C. K., Ward, N. L., Dlugosz, A. A.,

- Wong, S. Y. (2015). Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. *Cell Stem Cell*, **16** (4), 400–412.
- Popadić, M. (2014). Statistical evaluation of dermoscopic features in basal cell carcinomas. *Dermatol. Surg.*, **40** (7), 718–724.
- Puig, S., Cecilia, N., Malvey, J. (2012). Dermoscopic criteria and basal cell carcinoma. *G. Ital. Dermatol. Venereol.*, **147** (2), 135–140.
- Roldán-Marín, R., Leal-Osuna, S., Lammoglia-Ordiales, L., Toussaint-Caire, S. (2014). Infundibulocystic basal cell carcinoma: dermoscopic findings and histologic correlation. *Dermatol. Pract. Concept.*, **4** (3), 51–54.
- Rowe, R. G., Weiss, S. J. (2008). Breaching the basement membrane: Who, when and how? *Trends Cell Biol.*, **18** (11), 560–574.
- Rubin, A. I., Chen, E. H., Ratner, D. (2005). Basal-cell carcinoma. *New Engl. J. Med.*, **353** (21), 2262–2269.
- Russo, T., Piccolo, V., Lallas, A., Argenziano, G. (2016). Recent advances in dermoscopy. *F1000Res.*, **5**, F1000 Faculty Rev–184.
- Sexton, M., Scotto, J., Kopf, A. W., Urbach, F. (1974). Non-melanoma skin cancer among Caucasians in four areas of the United States. *Cancer*, **34**, 1333–1338.
- Tanjore, H., Kalluri, R. (2006). The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *Amer. J. Pathol.*, **168** (3), 715–717.
- Telfer, N. R., Colver, G. B., Morton, C. A., British Association of Dermatologists (2008). Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Brit. J. Dermatol.*, **159** (1), 35–48.
- Verduzco-Martínez, A. P., Quiñones-Venegas, R., Guevara-Gutiérrez, E., Tlacuilo-Parra, A. (2013). Correlation of dermoscopic findings with histopathologic variants of basal cell carcinoma. *Int. J. Dermatol.*, **52** (6), 718–721.
- Wadhwa, A., Fazio, M., Bricca, G., Stanton, O. (2006). Metastatic basal cell carcinoma: A case report and literature review. How accurate is our incidence data? *Dermatol. Online J.*, **12** (5), 7.
- Wicki, A., Lehenbre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D., Christofori, G. (2006). Tumour invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*, **9** (4), 261–272.
- Wicki, A., Christofori, G. (2007). The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Brit. J. Cancer*, **96** (1), 1–5.
- Wojciechowska-Zdrojowy, M., Szepietowski, J. C., Matusiak, Ł., Dzięgieł, P., Puła, B. (2016). Expression of podoplanin in non-melanoma skin cancers and actinic keratosis. *Anticancer Res.*, **36** (4), 1591–1597.
- Wozniak-Rito, A., Zalaudek, I., Rudnicka, L. (2018). Dermoscopy of basal cell carcinoma. *Clin. Exp. Dermatol.*, **43** (3), 241–247.
- Zalaudek, I., Kreusch, J., Giacomel, J., Ferrara, G., Catricalà, C., Argenziano, G. (2010). How to diagnose nonpigmented skin tumours: A review of vascular structures seen with dermoscopy. Part I. Melanocytic skin tumours. *J. Amer. Acad. Dermatol.*, **63** (3), 361–376.

Received 21 July 2020

Accepted in the final form 2 March 2021

KAS JĀŅĒM VĒRĀ, PĒTOT GALVAS UN KAKLA RAJONA JAUKTA TIPĀ BAZĀLO ŠŪNU KARCINOMU

Dažādu bazālo šūnu karcinomas (BŠK) histopatoloģisko tipu pastāvēšana vienā anatomiskajā lokalizācijā ir reta. Šīs patoloģijas izpēte izraisa gan morfoloģu, gan klīnicistu interesi. Iepriekš veiktajos pētījumos demonstrēts, ka jaukta tipa BŠK bieži manifestējas ar agresīviem audzēja apakštīpiem. Turklāt šie audzēji ir saistīti ar laikietilpīgu ārstēšanu, nepārliciešo kosmētisko rezultātu, un tā rezultātā pacienta dzīves kvalitāte neuzlabojas. Literatūrā apskatīti vairāki klīniski gadījumi par diviem dažādas struktūras audzējiem, kas attīstījušies vienlaicīgi, bet par jaukta tipa BŠK viena audzēja ietvaros pētījumu dati ir ierobežoti. Šī pētījuma mērķis bija izvērtēt dažādas jaukta tipa BŠK, izmantojot dermoskopijas un morfoloģijas analīzes iespējas. Audzēju audi tika iegūti ar ķirurģisko eksēciju ar 1 cm atkāpi veselu audu robežās, kam sekoja novērošana 24 mēnešu laikā pēc ārstēšanas. Pētījumā noskaidroti jaukto tipu BŠK dermoskopiskie kritēriji, kas ir nozīmīgi pareizas ārstēšanas taktikas izvēlei. Kompleksi izmantojot morfoloģijas metodes, kas ietvēra IV tipa kolagēna un podoplanīna ekspresijas imūnhistoķīmisko analīzi un elektronu mikroskopiju, izpētīta audzēja invāzijas fronte.

Trešā publikācija

Moisejenko-Goluboviča, J., Groma, V., Svirskis, Š., Ivanova, A. 2022. Serum Vitamin D Levels Explored in the Latvian Cohort of Patients with Basal Cell Carcinoma Linked to the Sonic Hedgehog and Vitamin D Binding Protein Cutaneous Tissue Indices. *Nutrients*, 14(16), 3359.



Article

Serum Vitamin D Levels Explored in the Latvian Cohort of Patients with Basal Cell Carcinoma Linked to the Sonic Hedgehog and Vitamin D Binding Protein Cutaneous Tissue Indices

Jelena Moisejenko-Goluboviča ^{1,*,†}, Valērija Groma ^{2,†}, Šimons Svirskis ³ and Anna Ivanova ⁴

¹ Department of Doctoral Studies, Riga Stradins University, Dzirnieku Street 16, LV-1007 Riga, Latvia

² Institute of Anatomy and Anthropology, Riga Stradins University, 9 Kronvalda Blvd., LV-1010 Riga, Latvia

³ Institute of Microbiology and Virology, Riga Stradins University, Rātsupītes Str. 5, LV-1067 Riga, Latvia

⁴ Department of Maxillofacial Surgery, Institute of Stomatology, Riga Stradins University, Dzirnieku Street 20, LV-1007 Riga, Latvia

* Correspondence: jelena.moisejenko@gmail.com; Tel: +371-26048005

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Moisejenko-Goluboviča, J.; Groma, V.; Svirskis, Š.; Ivanova, A. Serum Vitamin D Levels Explored in the Latvian Cohort of Patients with Basal Cell Carcinoma Linked to the Sonic Hedgehog and Vitamin D Binding Protein Cutaneous Tissue Indices. *Nutrients* 2022, 14, 3359. <https://doi.org/10.3390/nu14163359>

Academic Editor: Andrea Tabbet

Received: 10 July 2022

Accepted: 8 August 2022

Published: 16 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Ultraviolet radiation is known as one of the major contributors to skin malignancies, including basal cell carcinoma (BCC), which is the most common type of skin cancer. It is a heterogeneous tumor, which presents with various types that are stratified into low- and high-risk tumors. Sunlight is important for overall health and vitamin D synthesis in the skin, whereas deviations from the optimal level of vitamin D are shown to be associated with the risk of the development of BCC. The accumulating evidence suggests the ability of vitamin D to antagonize the Sonic Hedgehog (SHH) signaling, the key tumor pathway, and play a protective role in the development of BCC. Additionally, a vitamin D binding protein (DBP) is shown to be implicated in the complex regulation of vitamin D. Here, we aimed to explore serum vitamin D in patients with different primary and recurrent BCC of the head and neck and investigate cutaneous DBP and SHH indices, confirmed immunohistochemically in these subjects. According to the results, 94.9% of the Latvian cohort of BCC patients were found to be deficient in vitamin D. No significant differences in serum vitamin D levels were found between genders, primary and recurrent tumors, and different types of BCC. Serum vitamin D was inversely associated with tumor size. Susceptible male individuals with low blood vitamin D levels were recognized at risk of developing aggressive and recurrent BCC confirmed by the use of hierarchical clustering analysis. In smaller tumors with a favorable course, such as superficial and nodular BCC, the association between high DBP and low SHH tissue expression was found, providing supportive evidence of the existence of a link between vitamin D, proteins involved in its metabolism, as exemplified by the DBP and SHH signaling pathway. The assumption of a deficiency in the protective effect of vitamin D in patients with high-risk BCCs was proposed in low DBP and high SHH tissue indices. New extensions to existing knowledge and characterization of the BCC signaling pathways and their cross-talk with vitamin D are warranted when searching for a preferential effect of vitamin D on skin cancer.

Keywords: basal cell carcinoma; ultraviolet radiation; vitamin D deficiency; serum levels of vitamin D; Sonic Hedgehog; vitamin D binding protein; immunohistochemistry; hierarchical clustering

1. Introduction

Basal cell carcinoma (BCC) of the skin is one of the most common types of skin cancer that commonly affects people with fair skin. It rarely metastasizes, however, it may manifest with severe tissue damage that occurs locally. Clinically and morphologically, BCC presents with various types that are stratified into low- and high-risk tumors. The latter primary BCCs may relapse and display a worse overall prognosis. Commonly, BCC

develops in the sun-exposed areas of the skin, such as the head and neck area of elderly people, and the causative role of ultraviolet radiation (UVR) in the development of a tumor has been considered [1–4]. Globally, a higher incidence of BCC in more equatorial than polar latitudes and areas with significant Caucasian populations has been reported [1,5,6]. Apart from the environmental, occupational, and other risk factors, such as the presence of Fitzpatrick I skin type, family history of skin carcinoma, and immunosuppression, the significance of UVR-induced mutations in the development of BCC has been pointed out [1]. The mutations that activate the Hedgehog intercellular signaling pathway genes, including PTCH, Sonic Hedgehog (SHH), and Smoothened, play a significant role in BCC carcinogenesis [1,3,7–9]. Due to the geographic factor, people living in the Baltic region, including the Latvian population, are likely to have a low risk of developing BCC related to chronic ultraviolet exposure; however, these issues remain underexplored until now. Similarly, little is known about the extent of the contribution of solar radiation to the development of more and less aggressive BCC.

Being a substantial nutrient, vitamin D plays a pivotal role in human health. The classical role of vitamin D is associated with the regulation of calcium and phosphorus metabolism and, therefore, the growth and remodeling of bone [10]. Nowadays, the concept of vitamin D is extensively reviewed and revised. It has numerous functions implicated in the complex regulation of physiological processes in the human body [10–14]. Under exposure to ultraviolet B (UVB) rays with a wavelength from 290 up to 315 nm, the synthesis of vitamin D₃ (cholecalciferol) from 7-dehydrocholesterol (7-DHC) occurs in the skin (Figure 1). Due to its unique feature related to the production of vitamin D₃ in the skin upon activation by the sun's UVB rays, vitamin D has been referred to as the sunshine vitamin [15]. Simultaneously, vitamin D₂ (ergocalciferol) can only be obtained from plant foods, such as yeast, bread, mushrooms, and some vegetables. Taking into account the peculiarities of the synthesis of vitamin D in the skin, which requires intense ultraviolet B-radiation, and the deficiency in the consumption of a sufficient amount of animal products containing vitamin D, the problem of vitamin D deficiency has gained global significance [16]. Furthermore, there is growing concern among professionals that sun protection, recommended by dermatologists to reduce morbidity from skin cancers, can lead to abnormally low levels of vitamin D, which, in turn, could have subsequent adverse effects on the body [17].

Vitamin D is reported to have anti-carcinogenic effects, however, accumulating evidence is controversial [18,19]. The contribution of vitamin D to the prevention of skin malignancies, including BCC, squamous cell carcinoma (SCC), and melanoma, is proven by some studies [20,21]. Subjects with high levels of vitamin D are reported to be less likely to develop non-melanoma skin cancer (NMSC) than people with low levels, and the maintenance of 25-OH vitamin D₃ levels above 25 ng/mL is shown to significantly reduce the rate of recurrence [22–24]. In contrast, no beneficial effect in preventing BCC was shown in a randomized clinical trial of supplementation with vitamin D and/or calcium [25]. Furthermore, the results of other studies suggest that higher serum 25-OH vitamin D₃ levels are associated with an increased risk of the subsequent development of BCC and melanoma, thus pointing out the inconsistency of current knowledge and the absence of widely applicable strategies [26,27].

The effect of vitamin D₃ is mediated through the interaction with the nuclear vitamin D receptor (VDR) and retinoic acid orphan receptors (ROR) α and ROR γ [13,28]. The 1,25(OH)₂D-induced activation of VDR transcription, followed by the enhanced differentiation and reduced proliferation of keratinocytes, was proven [29]. Conversely, decreased VDR expression, found in advanced colorectal and other neoplasms, suggests that loss of VDR may contribute to cancer progression [30]. In addition to expressing the VDR, numerous cells, including keratinocytes, express the vitamin D 1 α -hydroxylase, thus permitting local synthesis of the active hormonal form of the vitamin [31]. In turn, the specific transporter, vitamin D binding protein (DBP) contributes to inflammatory and immune processes, binding of actin and circulating fatty acids [32]. The liver cells highly express DBP and

export it into the blood [33]. The uptake of circulating DBP is mediated by the endocytic process in several epithelial cell types [34]. Cell bearing receptor proteins megalin and cubulin can internalize the DBP-bound-25(OH)D complex into an endolysosome and further metabolize and/or catabolize 25(OH)D in the cell interior. Intracellularly, binding proteins can specifically target vitamin D either for association with the VDR and activation or degradation [21]. Notably, factors that influence the levels of megalin or intracellular vitamin D binding proteins could, therefore, potentially alter the cell-specific responses to vitamin D, however, the investigations focused on these issues have not been undertaken as far.

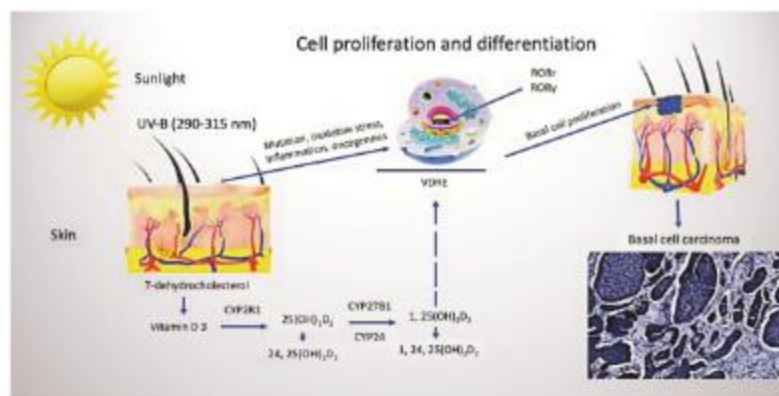


Figure 1. Vitamin D metabolism and cutaneous synthesis. Under exposure to UVB rays, the process of vitamin D₃ synthesis proceeds in keratinocytes, which contain CYP enzymes necessary for the photochemical conversion of the precursor of vitamin D₃, 7-dehydrocholesterol, into its active form (calcitriol 1, 25(OH)₂D₃). The activities of hydroxyderivatives of vitamin D are mediated by the involvement of the ligand-binding domain of the nuclear receptor, VDR. Furthermore, vitamin D₃ is implicated in the regulation of biological functions and gene expression of keratinocytes of both healthy and BCC-affected subjects, mediated by the presence of ROR α and γ nuclear receptors. Abbreviations: UVB, ultraviolet B; VDR, vitamin D receptor; ROR α and γ , retinoic acid-related orphan receptors α and γ ; BCC, basal cell carcinoma.

Therefore, we aimed to explore serum vitamin D in patients who presented with different, both less and more aggressive types of BCC, and investigate cutaneous DBP and SHH indices confirmed in these subjects.

2. Materials and Methods

2.1. Patients' Characteristics and BCC Classification

In total, 79 patients clinically presented with the suspected BCC of the head and neck treated prospectively in Riga Stradins University, Institute of Stomatology, Department of Maxillofacial Surgery, and the Oncology Centre of Latvia between September 2016 and September 2019 were used in this study. The age range of subjects was 37–90 years. Among all BCC patients, 46 were women and 33 were men. Clinical data included information on patients' characteristics, clinical outcomes, complications of BCC, and findings of dermoscopic imaging. Characteristics of a neoplasm included information on the duration and type of the BCC lesion at the time of presentation, anatomical localization, and the size of the tumor. Patients with vitamin D deficiency were prescribed vitamin D therapy, depending on the severity of its deficiency. The disease relapse was monitored over a 2-year follow-up period.

The study was approved by the Ethical Committee of Riga Stradins University (Decision No. 11/08.09.2016.), and written informed consent was obtained from all patients

included in the research. The tumor tissue samples were obtained following the tenets of the Declaration of Helsinki.

In all cases, BCC was confirmed, and different types of a tumor were distinguished according to the international classification. The latest WHO classification of skin tumors states that BCC is divided into two types based on the risk of the development of a complicated course and further treatment recommended: 1. lower risk tumors: nodular, superficial, pigmented, and infundibulocystic (a variant of BCC with accessory differentiation), fibroepithelial; 2. higher risk tumors: basosquamous carcinoma, sclerosing/morphoid, infiltrating, BCC with sarcomatoid differentiation, and micronodular [35].

2.2. Assays Used for the Detection of Serum Vitamin D Levels

Blood samples for the assessment of vitamin D levels were prospectively collected from all BCC patients and further transferred to the certified E. Gulbis Laboratory Ltd (LATAK accreditation ISO 15189). A conventional chemiluminescence immunoassay using the Cobas 8000 analyzer (Roche, Basel, Switzerland) was performed to measure a total vitamin D serum level [36–38].

2.3. Dermoscopic Examination Used to Diagnose BCC and Its Assessment Criteria

The dermoscopic examination was performed with a handheld dermatoscope (3Gen DermLite DL3N with PigmentBoost; OlympusDermLite LLC, San Juan Capistrano, CA, USA) using a 30 mm × 10 lens before a tumor mass excision. Both contact and non-contact techniques and a polarized mode were used to visualize BCC lesions. A digital photography of the dermoscopic presentation of the BCC lesion was performed using a Samsung Galaxy S9+ (Samsung Electronics, Seoul, Korea) mobile camera.

The diagnosis of BCC was based on the following dermoscopic criteria: the presence of ulceration, maple-leaf-like structures, blue-gray globules, blue-ovoid nests, arborizing vessels, and spoke-wheel structures. Additionally, we used to include the following criteria: translucency, white areas, and milky pink or red background when confirming the presence of BCC. Vascular patterns of the lesions were described as clustered, diffuse, and homogeneous. Background differences between white-red colors were referred to as white-red structureless areas [17].

2.4. Histopathological and Immunohistochemical Methods Used to Assess the Cutaneous Tissue Expression of SHH and DBP

In this study, the surgically excised BCC masses were further processed as the formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE), and conventionally sectioned tissue samples. The sections were mounted on adhesive SuperFrost Plus glasses (Gerhard Menzel GmbH, Brunswick, Germany) to better save the tumor tissues exposed to immunohistochemistry. Initially, the sections were routinely stained with hematoxylin and eosin (HE) to confirm the diagnosis and detect the type of BCC. The histopathology of the tumor was assessed by two independent observers.

For the detection of SHH signaling protein and DBP, the tumor tissue sections were deparaffinized in xylene and hydrated in a series of graded ethanol. An endogenous peroxidase blocking process (5 min) was conducted with 0.3% (*v/v*) H₂O₂ in 95% methanol. The sections were further placed in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0, at 96–98 °C for 5 min in a microwave for heat-induced epitope retrieval. SHH- and DBP-positive cells were identified by the incubation overnight (4 °C) with the rabbit anti-human monoclonal SHH (Abcam, Cambridge, MA, USA, clone EP1190Y, 1:200), which recognizes the full length and c-product subunit of human SHH protein, and the rabbit anti-human polyclonal DBP (Bioss Antibodies, MA, USA, 1:300), which detects endogenous DBP proteins, and visualized using the HiDef Detection HRP Polymer system (CellMarque, Rocklin, CA, USA). Thereafter, the sections were rinsed and incubated with the HiDef Detection™ Amplifier and the HiDef Detection™ HRP Polymer Detector for 10 min each, respectively. The SHH and DBP immunostaining protocols were adapted from those published previously [39]. The tumor

tissue antigenic sites were visualized with 3, 30 diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride kit (DAB+Chromogen and DAB+Substrate buffer, Cell Marque, Rocklin, CA, USA) applied for 5 min. The cell nuclei were counterstained with Mayer's hematoxylin. The sections were washed, dehydrated, cleared, mounted in Roti® Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and coverslipped. Cells that were labeled by the anti-SHH and anti-DBP antibody and displayed brown reaction products were considered immunopositive. The substitution of the primary antibody with tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) solution was used in negative IHC controls.

The stained slides were scanned with a Glissando Slide Scanner (Objective Imaging Ltd., Cambridge, UK). Bright-field images were generated and analyzed by a Leica light microscope (LEICA, LEITZ DMRB, Wetzlar, Germany) using a DFC 450C digital camera. The assessment of immunostaining was performed semi-quantitatively in 10 randomly selected visual fields of each sample (magnification 400×) representing the regions of interest as described previously [9].

2.5. Statistical Data Analysis

Statistical data analysis and plotting were performed using Prism 9 software for the macOS (GraphPad Software, LLC, San Diego, CA, USA) and JMP Pro 16 (SAS, Cary, NC, USA). A two-sample *t*-test was performed to examine the relation between sex, and different prognostic groups (primary and recurrent, low risk and high risk) of BCC and serum D vitamin level. Spearman rank correlation was applied to detect the possible correlation between serum vitamin D level and tumor size, as well as the relation between sex and type of tumor. Pearson's correlation coefficient was used to estimate the relationships between the immunostaining patterns. For all statistical tests used, a significance level of $p < 0.05$ was chosen. Multivariate analysis and a hierarchical clustering method were used to determine the main subsets of the results obtained.

3. Results

3.1. General Information, Contact and Non-Contact Dermoscopic Examination of the BCC Lesions

Collectively, a cohort of 79 patients diagnosed with BCC was used in this study. Among all patients who presented with BCC, 58% were women and 42% were men. The mean age of women was 70 years ($SD \pm 15$) and for men it was 64 years ($SD \pm 17$). Anatomically, BCC tumors often were localized on the nose and nasolabial folds, followed by the localization on the cheeks and other areas of the face and neck.

Dermoscopically, the common criteria characteristic of BCC included pink or milky-pink and milky-red color structureless areas, erosions, ulcerations, short thin telangiectasias, arborizing vessels, blue-gray globules, maple leaf-like structures, white streaks, and translucency. The specific dermoscopic diagnostic criteria for the superficial type of BCC included the presence of short thin telangiectasias and comma vessels, small ulcerations, pink homogeneous areas, and blue-gray ovoid nests (Figure 2A). Nodular and micronodular types were presented with the border raised above the central part of the lesion, arborizing vessels, ulceration, blue-gray ovoid nests, and translucency (Figure 2B,C). Infiltrative BCC was commonly presented with arborizing vessels, short thin telangiectasia, shiny white structureless areas, ulceration, and white streaks (Figure 2D). Finally, the diagnosis of mixed BCCs was based on histopathological observations and the presence of certain dermoscopic characteristics that included such standard features of BCC as arborizing vessels, ulcerations, milky-red color structureless areas, and less commonly found signs, such as masses of keratin, superficial scaling, and white streaks (Figure 2D).

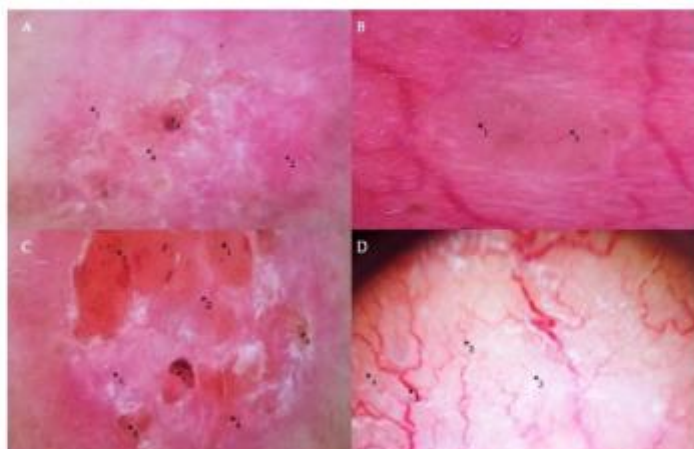


Figure 2. Dermoscopic findings in different types of BCC. (A) Milky-pink color structureless areas (*₁), pink homogeneous areas (*₂), short thin telangiectasia (*₃), and erosion (*₄) on the central part of the tumor in the case of superficial BCC. (B) A translucent nodule (*₁) raised above the skin and arborizing vessels (*₂) in nodular BCC. (C) The nodular appearance of a tumor with a border raised above the central part of the lesion (*₁), arborizing and short thin telangiectasias (*₂), milky-pink (*₃) and milky-red color structureless areas (*₄), ulceration (*₅), and erosion (*₆) in the case of micronodular BCC. (D) Arborizing vessels (*₁), short thin telangiectasia (*₂) on shiny white (*₃) and milky-red structureless areas (*₄) in the infiltrative and mixed type of BCC.

3.2. Assessment of Serum Vitamin D Levels

The assessment of serum vitamin D levels revealed that women presented with a range of 5.9–40.0 ng/mL, whereas men presented a range of 9–32 ng/mL, respectively (Figure 3A). In women, the mean value of vitamin D level was 17.9 ng/mL (SD ± 6.7 ng/mL), whereas, in men, the mean value was 17.7 ng/mL for men (SD ± 7.0 ng/mL), however, these differences were not statistically significant. Only 4 patients in the study cohort had enough serum vitamin D levels estimated above 30.0 ng/mL. In patients presenting with primary BCCs, statistically significant differences in serum vitamin D levels when assessed in men and women were not found (Figure 3B). Simultaneously, in 2 women diagnosed with recurrent BCC tumors, the mean value of vitamin D level was 13.5 ng/mL (SD ± 5.0 ng/mL), whereas, in 16 men, the mean value was 17.0 ng/mL for men (SD ± 6.7 ng/mL), however, these differences were not statistically significant. Serum vitamin D levels were significantly lower in women presented with mixed BCC tumors when compared to men ($p < 0.05$). Simultaneously, serum vitamin D levels did not differ when patients of both genders presented with different types of BCC were compared (Figure 3C).

For a better understanding of the spectrum of serum vitamin D levels observed in BCCs, the indices were analyzed separately for primary and recurrent, as well as for low-risk (superficial and nodular) and high-risk (micronodular, infiltrative, and mixed) tumors. Statistically significant differences in serum vitamin D levels were not observed when low-risk and high-risk BCCs diagnosed in both genders were compared (Figure 4). Similarly, there was not a statistically significant difference found when the results of the assessment of serum vitamin D levels were compared for patients presented with either different types or primary and recurrent BCC tumors (Figure 5).

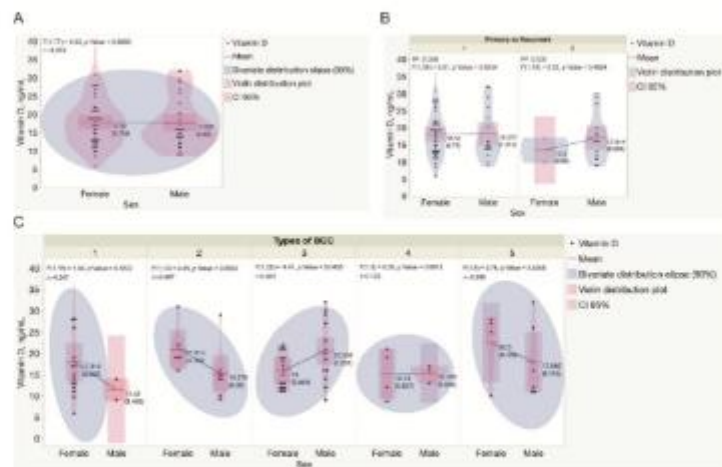


Figure 3. Assessment of serum vitamin D levels in the study cohort. (A) Assessment of serum vitamin D levels in males and females recruited in the study. Each dot represents a single data point. (B) Assessment of serum vitamin D levels in males and females presented with either primary or recurrent BCC tumors. Each dot represents a single data point. (C) Assessment of serum vitamin D levels in males and females presented with different types of BCC tumors. Each dot represents a single data point. Statistically significant differences in serum vitamin D levels were not observed when different types of BCC diagnosed in both genders were compared, except in mixed BCC tumors, diagnosed in females presented with significantly lower serum vitamin D levels when compared to males ($p = 0.0456$). Abbreviations: (B) 1—primary BCC tumors; 2—recurrent BCC tumors; (C) 1—superficial BCC tumors; 2—nodular BCC tumors; 3—mixed BCC tumors; 4—micronodular BCC tumors; 5—infiltrative BCC tumors.

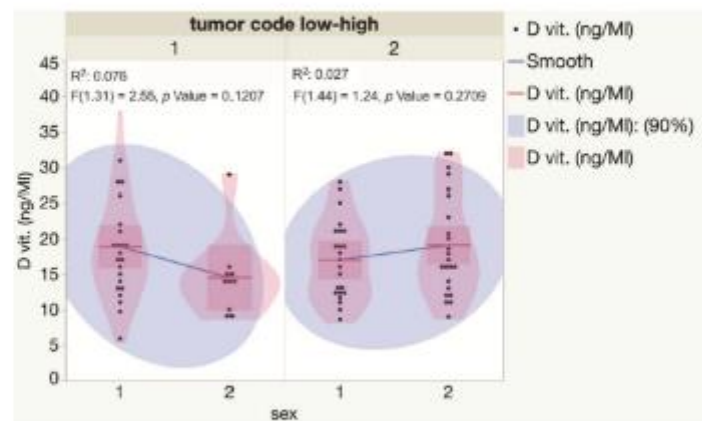


Figure 4. Assessment of serum vitamin D levels in males and females presented with low and high risk BCCs. Each dot represents a single data point. Abbreviations: 1—low-risk BCC tumors; 2—high-risk BCC tumors.

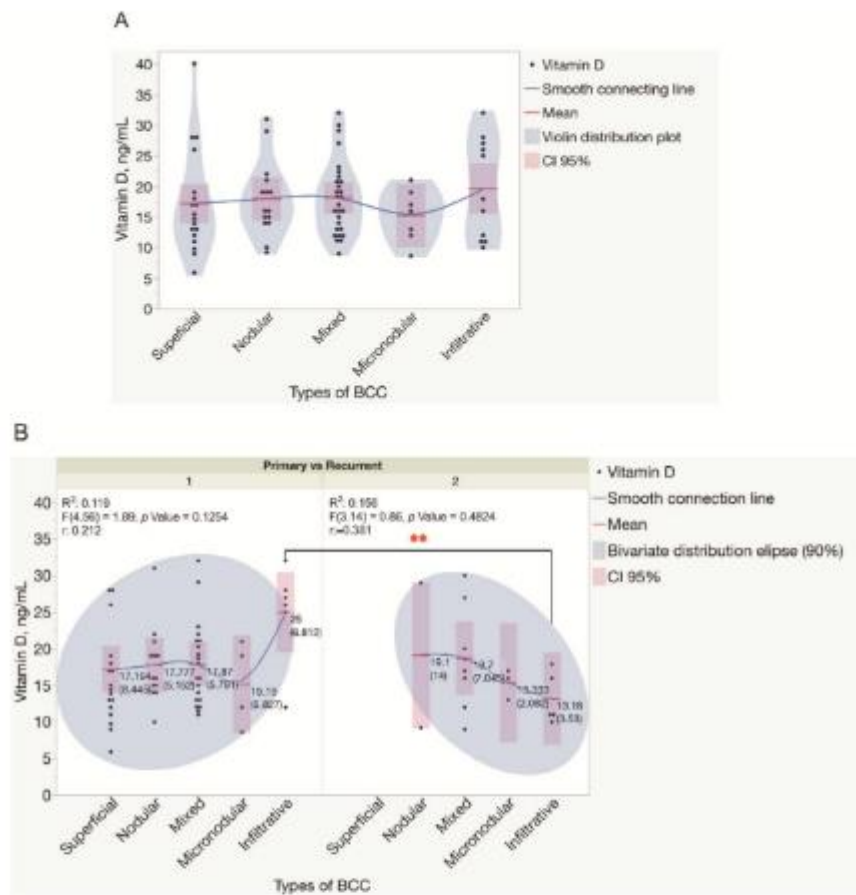


Figure 5. Assessment of serum vitamin D levels in patients presented with different types of BCC tumors. **(A)** Violin distribution plots depict the results of the assessment of serum vitamin D levels in patients presented with different types of BCC tumors. Each dot represents a single data point. **(B)** The results of the assessment of serum vitamin D levels in patients presented with either primary or recurrent BCC tumors. Each dot represents a single data point. Abbreviations: (B) 1—primary BCC tumors; 2—recurrent BCC tumors. ** $p < 0.01$.

As depicted in the dendrogram presented in Figure 6, the data were separated into three main branches using the hierarchical clustering method. The blue branch was characteristically represented by males with low serum vitamin D levels and large, mostly high risk and recurrent BCC tumors. In turn, the green branch was represented by both males and females with greatly varying serum vitamin D levels and small-sized primary, however, high-risk BCC tumors. Finally, the red branch was represented by males and females with varying serum vitamin D levels and small-sized primary and less aggressive BCC tumors. Furthermore, in general, a negative association between the tumor size and serum vitamin D level was demonstrated by the use of correlation analysis (Figure 7).

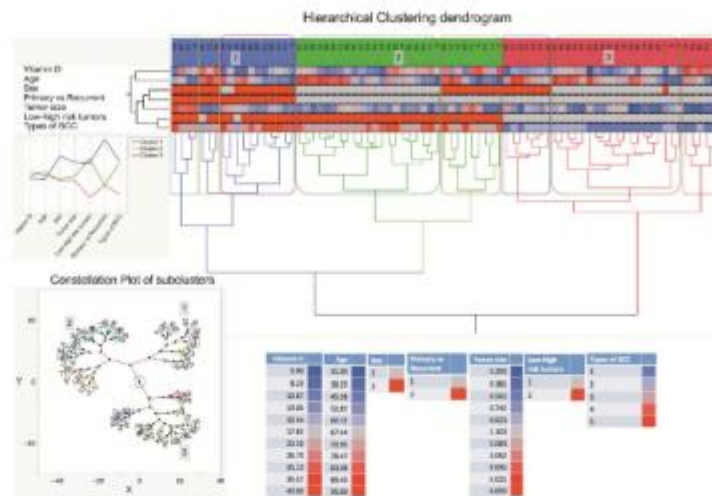


Figure 6. A dendrogram shows hierarchical clustering—relationships between sets of data. The dendrogram consists of stacked branches (clades) that break down into further smaller branches. At the lowest level, individual elements appear and then they are grouped according to clusters with fewer and fewer clusters on higher levels. The end of each clade (a leaf) are the data. The sets of data included assessments of serum vitamin D level patterns of 79 subjects presenting with the different types of BCC, information about a patient age and sex, a tumor type (primary vs. recurrent), and a type of BCC, and seen in the right lower part of the Figure. The tumor specimens were divided into five subtypes based on differences in histopathology and dermoscopic imaging. The three major data clusters with 2–3 subclusters each are highlighted in the constellation plot of the dendrogram depicted in the left lower part of the Figure. Abbreviations: sex: 1—females; 2—males; primary vs. recurrent BCC: 1—primary BCC; 2—recurrent BCC; low and high-risk BCC: 1—low risk BCC; 2—high risk BCC; types of BCC: 1—superficial BCC tumors; 2—nodular BCC tumors; 3—mixed BCC tumors; 4—micronodular BCC tumors; 5—infiltrative BCC tumors.

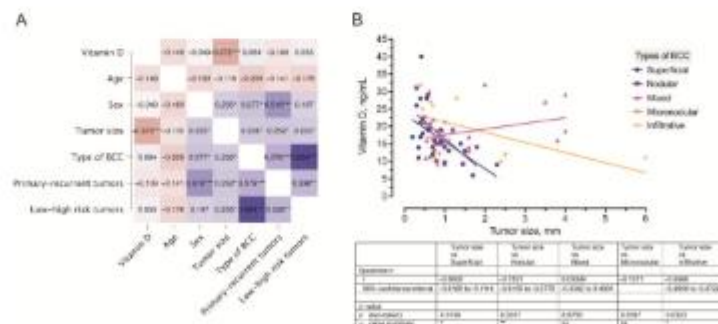


Figure 7. (A) A correlogram of the studied variables. In this plot, correlation coefficients are colored according to the value. Positive correlations are displayed in blue, whereas negative correlations are in red. Color intensity is proportional to the correlation coefficients. The negative association ($r = -0.372$) between the tumor size and serum vitamin D level is marked by a dark red color. (B) Correlation between the tumor size and serum vitamin D level was observed in different types of BCC. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.3. Histopathology, SHH, and DBP Immunohistochemistry of the BCC Tissue Samples

Histopathologically, BCC cells formed nests, cords, and islands. The tumor cells displayed little pleomorphism, and mitotic figures were infrequent. The presence of peripheral palisading, artefactual clefting, and myxoid stroma was characteristic of the BCC tumor. In superficial BCC, a superficial proliferation of neoplastic cells was demonstrated. A nodular type presented with the nodules displaying the typical nuclear palisading at the periphery of the tumor, whereas a micronodular type demonstrated a cauliflower appearance. In infiltrative BCC, small aggregations or cords of basaloid cells were found penetrating the stroma, interspersing muscular fibers, and revealing perineural invasion. The infiltrative growth often showed heavy stromal collagenization. Mixed growth BCC commonly revealed an admixture of rounded and irregularly contoured tumor cell nests and cords embedded in a fibrous stroma. In addition, the presence of mitotic figures and apoptotic cellular debris was characteristic of the aggressive growth.

A pattern of DBP and SHH immunostaining varied when different types of BCC were compared. To better assess the possible associations between the expressions of cutaneous tissue markers, a correlation analysis was performed separately for different BCC types. Assessments of cutaneous DBP and SHH indices observed in low and high risk BCCs by the use of IHC assays and correlation analysis are depicted and summarized in Figures 8 and 9. In superficial BCC, mostly moderate expression of both tissue markers was revealed in superficial BCC (Figure 8A,B). Furthermore, in superficial BCC, a strong negative correlation between SHH and DBP expression in both tumoral ($r = -0.77$) and stromal ($r = -0.49$) compartments was found (Figure 8C). It is worth noting that, weak DBP expression was commonly demonstrated in aggregations of basaloid cells and peripheral cells of the tumor nodules with scanty cytoplasm that displayed the typical nuclear palisading. In contrast, moderate to strong expression of DBP was found in differentiated tumor cells (Figure 8D). Simultaneously, a weak expression of SHH was demonstrated in nodular BCC masses (Figure 8E). The only natural intrinsic correlation was found for the DBP marker in nodular BCC (Figure 8F).

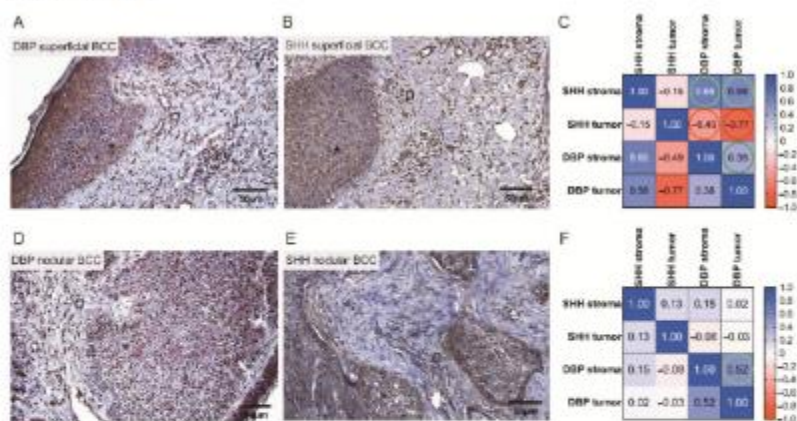


Figure 8. Assessment of cutaneous DBP and SHH expression in low risk BCCs by the use of IHC. Representative images demonstrating cutaneous structures (tumoral (*) and stromal (□)) decorated by the anti-DBP (A,D) and anti-SHH (B,E) antibodies and recognized by the presence of brown reaction products found in the BCC samples. Scale bars: 50 μ m. Correlograms that highlight associations between the expression of DBP and SHH in superficial (C) and nodular (F) BCCs. A strong negative correlation between SHH and DBP expressions is marked by red color (C).

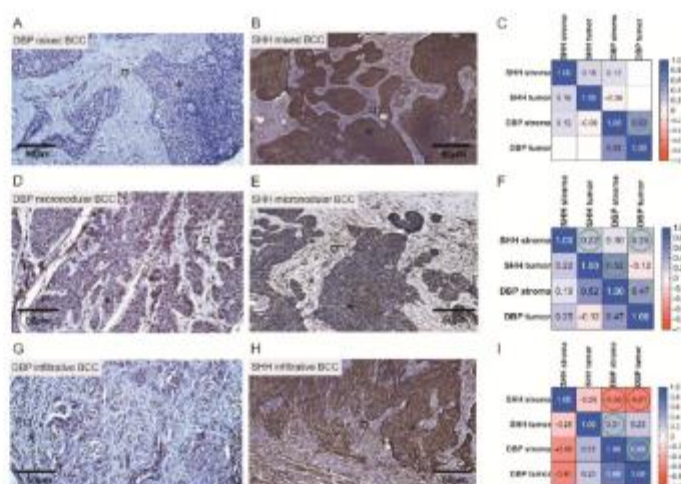


Figure 9. Assessment of cutaneous DBP and SHH expression in high risk BCCs by the use of IHC. Representative images demonstrating cutaneous structures (tumoral (*) and stromal (□)) decorated by the anti-DBP (A,D,G) and anti-SHH (B,E,H) antibodies and recognized by the presence of brown reaction products found in the BCC samples. Scale bars: 50 μ m. Correlograms that highlight associations between the expression of DBP and SHH in mixed (C), micronodular (F), and infiltrative (I) BCCs. A negative correlation between SHH and DBP expressions is marked by red color (I).

Overall, a more pronounced expression of SHH was observed in tumor cells with low expression of DBP, and vice versa (Figure 9A,B,D,E,G,H). In both infiltrative and mixed BCCs, high SHH expression was found in the tumor tongues presented as admixtures of rounded nodules and nodules with irregular contours, and small irregular tongues of tumor cells embedded in the fibrous stroma (Figure 9B,H). Characteristically, high risk infiltrative BCCs, often with scanty cytoplasm, poorly expressed DBP (Figure 9G). Intrinsic correlations were found for the DBP and SHH markers presented in the tumoral and stromal compartment of a neoplasm when assessing high risk BCCs by the use of statistical data analysis (Figure 9C,F). Simultaneously, in infiltrative BCC, a negative correlation between DBP and SHH stromal expression ($r = -0.56$) was found (Figure 9I).

Finally, to better assess the complex associations between serum vitamin D level patterns detected in the Latvian cohort of patients presenting with the different types of BCC and the cutaneous tissue expression of DBP and SHH confirmed by the use of IHC in these individuals, a Spearman's rank correlation analysis was performed (Figure 10A–C). Similarly, to the results obtained and interpreted when describing a dendrogram (Figure 6), in this final assessment, males recruited in the given study characteristically presented with lower than females serum vitamin D levels, high risk ($r = -0.87$), and recurrent ($r = -0.87$) BCC tumors.

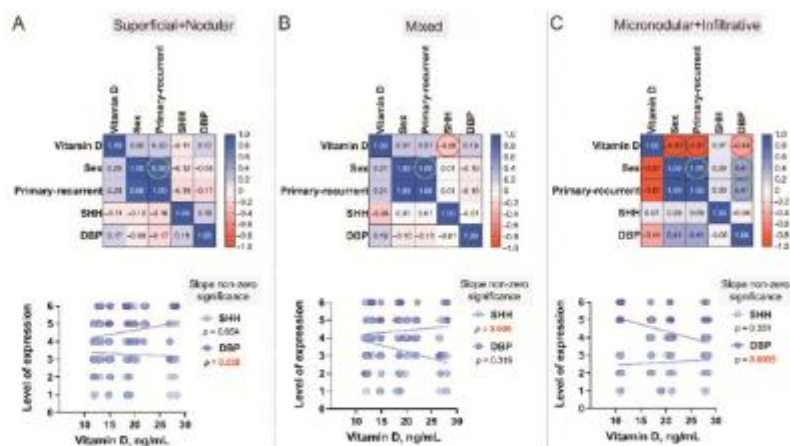


Figure 10. Correlograms of the studied variables, Superficial+Nodular (A), Mixed (B) and Micronodular+Infiltrative (C). The correlograms depict the complex associations between serum vitamin D level patterns of 79 subjects presenting with the different types of BCC and the cutaneous tissue expression of vitamin D binding protein (DBP) and Sonic Hedgehog (SHH) confirmed by the use of IHC in these individuals. Each dot represents a single data point. The levels of expression are assessed as a sum of the tumoral and stromal BCC tissue indices. In these plots, correlation coefficients are colored according to the value. Positive correlations are displayed in blue, whereas negative correlations are in red. Color intensity is proportional to the correlation coefficients.

4. Discussion

In the present study, the serum levels of vitamin D were explored in the Latvian cohort of patients who presented with different primary and recurrent BCC of the head and neck; cutaneous DBP and SHH indices found in these subjects were investigated, and established correlations were analyzed. According to the results of the present research, 94.9% of the Latvian cohort of patients with primary and recurrent BCC of the head and neck were found to be deficient in vitamin D. In total, 5.1% of the examined patients had a sufficient level of 30.0–40.0 ng/mL. These data are in agreement with the results of the vitamin D deficiency study conducted in Latvia in 2015 by specialists from the Latvian Osteoporosis and Bone Metabolic Diseases Association, Riga Stradins University, and Riga East Clinical Hospital which is the only study that has been performed before in Latvia [40]. The results of the aforementioned study and the drawn conclusions have highlighted the presence of vitamin D deficiency in 82% of the study participants. Similar results come from the neighboring countries reporting vitamin D deficiency when carrying out a large Swedish cohort study and confirming the average estimated level of vitamin D as 19.9 ng/mL [41], thus being slightly higher than that determined in the Latvian cohort of BCC patients. In turn, the Lithuanian colleagues confirmed the presence of seasonal vitamin D deficiency in 67% of outpatient department subjects investigated retrospectively [42]. Furthermore, according to the results of the study undertaken by the National Institutes of Health using the developed protocols to standardize the existing 25(OH)D values from National Health/Nutrition Surveys in a frame of the International Vitamin D Standardization Program, the prevalence of vitamin D deficiency assessed at 55,844 Europeans is 40.4% [43]. These data are also supported by another large cohort study suggesting vitamin D deficiency occurs in <20% of the populations in Northern Europe, in 30–60% in Western, Southern, and Eastern Europe, and up to 80%—in the Middle Eastern countries, severe deficiency (<12 ng/mL) is found in >10% of Europeans [44]. Based on the results of the analysis of pertinent literature and present research, it is safe to say that in Europe, in general, and in the Baltic region, in particular, the serum vitamin D level can be described as catastrophically low.

The knowledge accumulated to date about the role of vitamin D in the human body and the relationship of its level with the development and course of oncological pathology suggests that the correction of insufficient levels of vitamin D may be relevant in the prevention and complex treatment of cancer. The recommendation by the Institute of Medicine for serum 25(OH)D targets of 50–75 nmol/L appears prudent and is supported by skin cancer association studies [45]. Vitamin D supplementation is shown to be beneficial in the reduction in cancer, 25(OH)D concentrations ≥ 60 ng/mL markedly lower the risk of cancer [46,47]. The results of this study highlight the necessity of educative measures related to the effects of sunshine on the skin and raise awareness about vitamin D deficiency in the general population.

Deficient levels of 25(OH)D have been found in tumors with the locally destructive and metastatic course, tumors with the involvement of lymph nodes, and neoplasms demonstrating higher proliferative activity [48]. Low levels of vitamin D determined in menopausal patients were consistent with the presence of advanced neoplastic disease, larger tumor size, and its grade [20]. A significant association between metastatic breast cancer and vitamin D levels is shown [49,50]. Low serum DBP levels are thought to predict lung cancer-specific death, and preservation of serum DBP was recognized as a significant independent factor associated with better cancer outcomes in operated lung cancer patients [51]. Of note, deviations from the optimal level of vitamin D have been associated with the risk of the development of BCC [19,52].

In the present study, conducted using a medium-sized cohort of BCC patients, a cluster tree stratified into three major branches was recognized. The first branch was represented by males with low serum vitamin D levels and large, mostly high risk and recurrent BCC tumors. Therefore, it can be said with certainty that male sex and low blood vitamin D levels are risk factors for the development of aggressive types of BCC. The second branch was represented by both males and females with greatly varying serum vitamin D levels and small-sized primary, however, high risk BCC tumors. Finally, the third branch was represented by males and females with varying serum vitamin D levels and small-sized primary and less aggressive BCC tumors.

Among several signaling pathways which exert their effects on BCC pathogenesis, the hedgehog pathway has been intensively investigated. The body of evidence suggests that vitamin D inhibits the SHH signaling pathway and, therefore, displays a protective role in arresting tumor growth [52–55]. D₃ specifically binds to Smo and thereby inhibits the activity of Gli proteins in fibroblasts in vitro, suggesting that the Ptch1 protein performs its suppression of SHH signaling by transporting vitamin D₃ to the Smo protein [56–59]. Vitamin D can affect skin cancer cells also through interaction with the immune system cells. Calcitriol inhibits type 1 (Th1) helper T cells and increases Th2 and regulatory T cell responses, which reduces immune surveillance for skin cancer [20,56]. In turn, there is an increase in innate immunity and the induction of Toll-like receptors, which possibly improves anticancer responses [57]. Pertinent literature suggests that the intracrine metabolism of 25(OH)D to 1,25(OH)₂D is likely to occur in several tissue cells, including keratinocytes, that express VDR and harbor a specific enzyme CYP27B1 [32]. Furthermore, some epithelial cells, including mammary gland and renal tubular cells express megalin and cubilin, which contribute to the endocytic uptake of 25(OH)D₃-DBP and activation of the VDR pathway [60,61]. Intracellularly, 25(OH)D₃-DBP binds the cytosolic actin to create a complex.

Vitamin D and its metabolites are bound to a specific transporter—DBP, which belongs to the albuminoid family of proteins and ensures the storage/transport of vitamin D and fatty acids, scavenging of extracellular G-actin, enhancement of the chemotactic activity of C5 alpha for neutrophils, and contributes to other physiological processes [34,62]. Although serum DBP is a protein that displays multiple properties, including the regulation of vitamin D levels, its functional implications largely remain unknown. In turn, the tissue expression of DBP is likely to be associated with favorable prognostic characteristics, such as small tumor size, and low invasiveness. This is consistent with the evidence that DBP-positive

tumors are associated with a reduced risk of metastasis and mortality from various cancers. Recent studies that are in line with the results of the present research demonstrate a significantly low to no-DBP immunohistochemical staining in advanced tumors [63]. In contrast, moderate to strong immunostaining was found to correlate with early-stage tumors. The possible stimulation of an intracellular immune-modulating signaling pathway in thyroid cancer oncogenesis in the loss-of-DBP-function in the tumor tissues was suggested [63]. In the present study, statistically significant differences in vitamin D levels between males and females, and different types of BCC were not found. Simultaneously, a correlation between the tumor size and serum vitamin D levels was established, and this observation is in agreement with data from other studies [64]. Furthermore, the association between high DBP and low SHH tissue expression found in smaller tumors with a favorable course, such as superficial and nodular BCC, was demonstrated. Importantly, low expression of DBP and high expression of SHH were observed in mixed and infiltrative BCCs which may correlate with the assumption of a deficiency in the protective effect of vitamin D in patients with high-risk tumors and a tendency to relapse after treatment. Simultaneously, it becomes obvious that the link between exposure to sunlight and BCC is not straightforward, as high levels of intermittent UV exposure appear to be more associated with the development of a tumor in susceptible individuals rather than long-term exposure, as seen in long-term outdoor workers [65,66].

The results of the given study have to be viewed in light of some limitations. A moderate sample size of the study cohort may be assumed as a potential limitation. The disease relapse was monitored over a 2-year follow-up period only. Simultaneously, the relevance of the results that are obtained and conclusions that are drawn out is enhanced by the prospective nature of the present research. Only a conventional chemiluminescence immunoassay was used to measure the total vitamin D serum level in BCC patients. Finally, the size of BCC tissue obtained by surgical excision in the head and neck region was strongly associated with the treatment necessity, and, therefore, explains some difficulties related to the number of histopathology and immunohistochemistry assays performed.

5. Conclusions

Vitamin D deficiency was determined in the Latvian cohort (94.9%) of patients with both primary and recurrent BCC of the head and neck. Higher serum vitamin D levels correlate with the appearance of smaller neoplasms and a more favorable disease prognosis. In smaller tumors with a favorable course, such as superficial and nodular BCC, the association between high-DBP and low-SHH tissue expression was found, providing supportive evidence of the existence of a link between vitamin D, proteins involved in its metabolism, as exemplified by the DBP, and SHH signaling pathway. The assumption of a deficiency in the protective effect of vitamin D in patients with high-risk BCCs was proposed in low-DBP and high-SHH tissue indices. New extensions to existing knowledge and characterization of the BCC signaling pathways and their cross-talk with vitamin D are warranted when searching for a preferential effect of vitamin D on skin cancer.

Author Contributions: Conceptualization, J.M.-G. and V.G.; formal analysis, J.M.-G., V.G. and Š.S.; data curation, J.M.-G., V.G., Š.S.; IHC, V.G.; patients' recruitment and surgery, J.M.-G. and A.I.; dermoscopy, J.M.-G.; writing—original draft preparation, J.M.-G., V.G. and A.I.; writing—review and editing, J.M.-G., V.G., Š.S. and A.I.; supervision, V.G.; funding acquisition, A.I. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received funding from Riga Stradiņš University Department of Doctoral studies and Roche Latvia for the purchase of reagents. The article processing charge was covered by Riga Stradiņš University Department of Maxillofacial Surgery and Research Department.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: A publicly available bibliographic database, [PubMed.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/), was used in this study. The complete search query is specified in the Methods section of the article. The full bibliographic reference list is available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Situm, M.; Buljan, M.; Bulat, V.; Lugović-Mihić, L.; Bolanca, Z.; Simić, D. The role of UV radiation in the development of basal cell carcinoma. *Coll. Antropol.* **2008**, *32*, 167–170. [[PubMed](#)]
2. Birch-Johansen, F.; Jensen, A.; Mortensen, L.; Olesen, A.B.; Kjaer, S.K. Trends in the incidence of non-melanoma skin cancer in Denmark 1978–2007: Rapid incidence increase among young Danish women. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 2190–2198. [[CrossRef](#)]
3. Tampa, M.; Georgescu, S.R.; Mitran, C.I.; Mitran, M.L.; Matei, C.; Scheau, C.; Constantin, C.; Neagu, M. Recent Advances in Signaling Pathways Comprehension as Carcinogenesis Triggers in Basal Cell Carcinoma. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 3010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lee, J.W.; Ratnakumar, K.; Hung, K.F.; Rokunohe, D.; Kawasumi, M. Deciphering UV-induced DNA Damage Responses to Prevent and Treat Skin Cancer. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96*, 478–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Harris, R.B.; Griffith, K.; Moon, T.E. Trends in the incidence of non-melanoma skin cancers in southeastern Arizona 1985–1996. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2001**, *45*, 528–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Staples, M.P.; Elwood, M.; Burton, R.C.; Williams, J.L.; Marks, R.; Giles, G.G. Non-melanoma skin cancer in Australia: The 2002 national survey and trends since 1985. *Med. J. Aust.* **2006**, *184*, 6–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bijlsma, M.F.; Spek, C.A.; Zivkovic, D.; van de Water, S.; Rezaee, F.; Peppelenbosch, M.P. Repression of smoothed by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lehmann, B. Role of the vitamin D3 pathway in healthy and diseased skin-facts, contradictions, and hypotheses. *Exp. Dermatol.* **2009**, *18*, 97–108. [[CrossRef](#)]
9. Moisejenko-Golubovica, J.; Volkovs, O.; Ivanova, A.; Groma, V. Analysis of the occurrence and distribution of primary and recurrent basal cell carcinoma of head and neck coupled to the assessment of tumor microenvironment and Sonic hedgehog signaling. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2020**, *61*, 821–831. [[CrossRef](#)]
10. Sun, M.; Wu, X.; Yu, Y.; Wang, L.; Xie, D.; Zhang, Z.; Chen, L.; Lu, A.; Zhang, G.; Li, F. Disorders of Calcium and Phosphorus Metabolism and the Proteomics/Metabolomics-Based Research. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *10*, 576110. [[CrossRef](#)]
11. Morgado-Águila, C.; Gil-Fernández, G.; Dávila-Villalobos, O.R.; Pérez-Rey, J.; Rey-Sánchez, P.; Rodríguez-Velasco, F.J. Vitamin D serum levels and non-melanoma skin cancer risk. *PeerJ* **2021**, *9*, e12234. [[CrossRef](#)]
12. Brzeminski, P.; Fabisiak, A.; Slominski, R.M.; Kim, T.K.; Janjetovic, Z.; Podgórska, E.; Song, Y.; Saleem, M.; Reddy, S.B.; Qayyum, S.; et al. Chemical synthesis, biological activities and action on nuclear receptors of 20S(OH)D₃, 20S,25(OH)₂D₃, 20S,23S(OH)₂D₃ and 20S,23R(OH)₂D₃. *Bioorg. Chem.* **2022**, *121*, 105660. [[CrossRef](#)]
13. Warwick, T.; Schulz, M.H.; Günther, S.; Gilsbach, R.; Neme, A.; Carlberg, C.; Brandes, R.P.; Seuter, S. A hierarchical regulatory network analysis of the vitamin D induced transcriptome reveals novel regulators and complete VDR dependency in monocytes. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6518. [[CrossRef](#)]
14. Šimolintnas, E.; Rinkūnaitė, I.; Bukelskienė, Ž.; Bukelskienė, V. Bioavailability of Different Vitamin D Oral Supplements in Laboratory Animal Model. *Medicina* **2019**, *55*, 265. [[CrossRef](#)]
15. Mostafa, W.Z.; Hegazy, R.A. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 793–804. [[CrossRef](#)]
16. Asakura, K.; Etoh, N.; Imamura, H.; Michikawa, T.; Nakamura, T.; Takeda, Y.; Mori, S.; Nishiwaki, Y. Vitamin D Status in Japanese Adults: Relationship of Serum 25-Hydroxyvitamin D with Simultaneously Measured Dietary Vitamin D Intake and Ultraviolet Ray Exposure. *Nutrients* **2020**, *12*, 743. [[CrossRef](#)]
17. Moisejenko-Golubovica, J.; Volkovs, O.; Ivanova, A.; Petrošima, E.; Groma, V. What We Need to Learn When Exploring the Mixed Basal Cell Carcinoma of Head and Neck. *Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B Nat. Exact Appl. Sci.* **2021**, *75*, 75–85. [[CrossRef](#)]
18. Mahamat-Saleh, Y.; Aune, D.; Schlesinger, S. 25-Hydroxyvitamin D status, vitamin D intake, and skin cancer risk: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13151. [[CrossRef](#)]
19. Martin-Gorgojo, A.; Gilaberte, Y.; Nagore, E. Vitamin D and Skin Cancer: An Epidemiological, Patient-Centered Update and Review. *Nutrients* **2021**, *13*, 4292. [[CrossRef](#)]
20. Jeon, S.M.; Shin, E.A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 1–14. [[CrossRef](#)]
21. Samuel, S.; Sitrin, M.D. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutr. Rev.* **2008**, *66*, S116–S124. [[CrossRef](#)]
22. Ameen, K.; Scherkl, M.; Hoffmann, M.; Neuwersch-Sommeregger, S.; Köstenberger, M.; Berisha, A.T.; Martucci, G.; Pilz, S.; Malle, O. Vitamin D deficiency 2.0: An update on the current status worldwide. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2020**, *74*, 1498–1513. [[CrossRef](#)]
23. Ince, B.; Yildirim, M.; Dadaci, M. Assessing the Effect of Vitamin D Replacement on Basal Cell Carcinoma Occurrence and Recurrence Rates in Patients with Vitamin D Deficiency. *Horm. Cancer* **2019**, *10*, 145–149. [[CrossRef](#)]
24. Tang, J.Y.; Parimi, N.; Wu, A.; Boscardin, W.J.; Shikany, J.M.; Chren, M.M.; Cummings, S.R.; Epstein, E.H., Jr.; Bauer, D.C.; Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Group. Inverse association between serum 25(OH) vitamin D levels and non-melanoma skin cancer in elderly men. *Cancer Causes Control* **2010**, *21*, 387–391. [[CrossRef](#)]

25. Passarelli, M.N.; Karagas, M.R.; Mott, L.A.; Rees, J.R.; Barry, E.L.; Baron, J.A. Risk of keratinocyte carcinomas with vitamin D and calcium supplementation: A secondary analysis of a randomized clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2020**, *112*, 1532–1539. [\[CrossRef\]](#)
26. Reddy, K.K. Vitamin D level and basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma risk. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 589–592. [\[CrossRef\]](#)
27. Asgari, M.M.; Tang, J.; Warton, M.E.; Chren, M.M.; Quesenberry, C.P., Jr.; Bikle, D.; Horst, R.L.; Orentreich, N.; Vogelmann, J.H.; Friedman, G.D. Association of prediagnostic serum vitamin D levels with the development of basal cell carcinoma. *J. Investig. Dermatol.* **2010**, *130*, 1438–1443. [\[CrossRef\]](#)
28. Slominski, A.; Brożyna, A.; Zmijewski, M.; Józwicki, W.; Jetten, A.M.; Mason, R.S.; Tuckey, R.C.; Elmets, C.A. Vitamin D signaling and melanoma: Role of vitamin D and its receptors in melanoma progression and management. *Lab. Investig.* **2017**, *97*, 706–724. [\[CrossRef\]](#)
29. Otsuka, A.; Levesque, M.P.; Dummer, R.; Kabashima, K. Hedgehog signaling in basal cell carcinoma. *J. Dermatol. Sci.* **2015**, *78*, 95–100. [\[CrossRef\]](#)
30. Kallay, E.; Boreis, P.; Bajna, E.; Kriwanek, S.; Bonner, E.; Toyokuni, S.; Cross, H.S. Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1191–1196. [\[CrossRef\]](#)
31. Bikle, D.D. The Vitamin D Receptor as Tumor Suppressor in Skin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2020**, *1268*, 285–306. [\[PubMed\]](#)
32. Rozmus, D.; Ciesielska, A.; Plomiński, J.; Grzybowski, R.; Fiedorowicz, E.; Kordulewska, N.; Savelkoul, H.; Kostyra, E.; Cieslińska, A. Vitamin D Binding Protein (VDBP) and Its Gene Polymorphisms—The Risk of Malignant Tumors and Other Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7822. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Chun, R.F.; Shieh, A.; Gottlieb, C.; Yacoubian, V.; Wang, J.; Hewison, M.; Adams, J.S. Vitamin D Binding Protein and the Biological Activity of Vitamin D. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 718. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Bouillon, R.; Schuit, F.; Antonio, L.; Rastinejad, F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Front. Endocrinol.* **2020**, *10*, 910. [\[CrossRef\]](#)
35. Elder, D.E.; Massi, D.; Scolyer, R.A.; Willemze, R. *WHO Classification of Skin Tumours*, 4th ed.; WHO: Lyon, France, 2018; Volume 11, pp. 27–33.
36. Garnett, E.; Li, J.; Rajapakshe, D.; Tam, E.; Meng, Q.H.; Devaraj, S. Efficacy of two vitamin D immunoassays to detect 25-OH vitamin D2 and D3. *Pract. Lab. Med.* **2019**, *17*, e00130. [\[CrossRef\]](#)
37. Vandikas, M.S.; Landin-Wilhelmsen, K.; Gillstedt, M.; Osmancevic, A. Vitamin D-Binding Protein and the Free Hormone Hypothesis for Vitamin D in Bio-Naïve Patients with Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1302. [\[CrossRef\]](#)
38. Enko, D.; Fridrich, L.; Režanka, E.; Stolba, R.; Ernst, J.; Wendler, I.; Fabian, D.; Hauptlorenz, S.; Halwachs-Baumann, G. 25-hydroxy-Vitamin D status: Limitations in comparison and clinical interpretation of serum-levels across different assay methods. *Clin. Lab.* **2014**, *60*, 1541–1550. [\[CrossRef\]](#)
39. Simpson, C.A.; Cusano, A.M.; Bihuniak, J.; Walker, J.; Insogna, K.L. Effect of 25(OH) vitamin D reference method procedure (RMP) alignment on clinical measurements obtained with the IDS-iSYS chemiluminescent-based automated analyzer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *148*, 41–46. [\[CrossRef\]](#)
40. Mukane, M.; Rasa, I.; Mukans, M. First epidemiological study about vitamin D status and lifestyle factors in healthy young adults from Latvia: DLAT study (Part 1). In Proceedings of the World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases, Milano, Italy, 26–29 March 2015; Volume P359, p. 187.
41. Summerhays, E.; Eliasson, M.; Lundqvist, R.; Söderberg, S.; Zeller, T.; Oskarsson, V. Time trends of vitamin D concentrations in northern Sweden between 1986 and 2014: A population-based cross-sectional study. *Eur. J. Nutr.* **2020**, *59*, 3037–3044. [\[CrossRef\]](#)
42. Bleizgys, A.; Kurovskij, J. Vitamin D Levels of Out-Patients in Lithuania: Deficiency and Hypervitaminosis. *Medicina* **2018**, *54*, 25. [\[CrossRef\]](#)
43. Cashman, K.D.; Dowling, K.G.; Škrabáková, Z.; Gonzalez-Gross, M.; Valtueña, J.; De Henauw, S.; Moreno, L.; Damsgaard, C.T.; Michaelsen, K.F.; Mølgaard, C.; et al. Vitamin D deficiency in Europe: Pandemic? *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *103*, 1033–1044. [\[CrossRef\]](#)
44. Lips, P.; Cashman, K.D.; Lamberg-Allardt, C.; Bischoff-Ferrari, H.A.; Obermayer-Pietsch, B.; Bianchi, M.L.; Stepan, J.; El-Hajj Fuleihan, G.; Bouillon, R. Current vitamin D status in European and Middle East countries and strategies to prevent vitamin D deficiency: A position statement of the European Calcified Tissue Society. *Eur. J. Endocrinol.* **2019**, *180*, P23–P54. [\[CrossRef\]](#)
45. Ross, A.C.; Manson, J.E.; Abrams, S.A.; Aloia, J.E.; Brannon, P.M.; Clinton, S.K.; Durazo-Arvizu, R.A.; Gallagher, J.C.; Gallo, R.L.; Jones, G.; et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 53–58. [\[CrossRef\]](#)
46. Bouillon, R.; Manousaki, D.; Rosen, C.; Trajanoska, K.; Rivadeneira, F.; Richards, J.B. The health effects of vitamin D supplementation: Evidence from human studies. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2022**, *18*, 96–110. [\[CrossRef\]](#)
47. McDonnell, S.L.; Baggerly, C.A.; French, C.B.; Baggerly, L.L.; Garland, C.F.; Gorham, E.D.; Hollis, B.W.; Trump, D.L.; Lappe, J.M. Breast cancer risk markedly lower with serum 25-hydroxyvitamin D concentrations >60 vs <20 ng/ml (150 vs 50 nmol/L): Pooled analysis of two randomized trials and a prospective cohort. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0199265. [\[CrossRef\]](#)
48. Thanasitthichai, S.; Prasitthipayong, A.; Boonmark, K.; Purisa, W.; Guayraksa, K. Negative Impact of 25-hydroxyvitamin D Deficiency on Breast Cancer Survival. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2019**, *20*, 3101–3106. [\[CrossRef\]](#)
49. Atoum, M.; Alzoughool, F. Vitamin D and Breast Cancer: Latest Evidence and Future Steps. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* **2017**, *11*, 1178223417749816. [\[CrossRef\]](#)

50. Estébanez, N.; Gómez-Acebo, I.; Palazuelos, C.; Llorca, J.; Diessen-Sotos, T. Vitamin D exposure and Risk of Breast Cancer: A meta-analysis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9039. [[CrossRef](#)]
51. Akiba, T.; Morikawa, T.; Odaka, M.; Nakada, T.; Kamiya, N.; Yamashita, M.; Yabe, M.; Inagaki, T.; Asano, H.; Mori, S.; et al. Vitamin D Supplementation and Survival of Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 4089–4097. [[CrossRef](#)]
52. Tang, J.Y.; Fu, T.; Lau, C.; Oh, D.H.; Bikle, D.D.; Asgari, M.M. Vitamin D in cutaneous carcinogenesis: Part II. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2012**, *67*, 817.E1–817.E11. [[CrossRef](#)]
53. Kim, H.S.; Kim, Y.S.; Lee, C.; Shin, M.S.; Kim, J.W.; Jang, B.G. Expression profile of sonic hedgehog signaling-related molecules in basal cell carcinoma. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0225511. [[CrossRef](#)]
54. Eibenschutz, L.; Caputo, S.; Camera, E.; Carbone, A.; Silipo, V.; Migliano, E.; Aurizi, C.; Cota, C.; Frascione, P.; Bellei, B. Evaluation of Hedgehog Pathway Inhibition on Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome Fibroblasts and Basal Cell Carcinoma-Associated Fibroblasts: Are Vismodegib and Sonidegib Useful to Target Cancer-Prone Fibroblasts? *Cancers* **2021**, *13*, 5858. [[CrossRef](#)]
55. Takada, T. Activation of the Hedgehog and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathways in Basal Cell Carcinoma. *Case Rep. Dermatol.* **2021**, *13*, 506–512. [[CrossRef](#)]
56. Li, P.; Zhu, X.; Cao, G.; Wu, R.; Li, K.; Yuan, W.; Chen, B.; Sun, G.; Xia, X.; Zhang, H.; et al. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reverses exhaustion and enhances antitumor immunity of human cytotoxic T cells. *J. Immunother. Cancer.* **2022**, *10*, e003477. [[CrossRef](#)]
57. Brożyna, A.A.; Hoffman, R.M.; Slominski, A.T. Relevance of Vitamin D in Melanoma Development, Progression and Therapy. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 473–489. [[CrossRef](#)]
58. Kumar, V. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *59*, 391–412.
59. Bariwal, J.; Kumar, V.; Dong, Y.; Mahato, R.I. Design of Hedgehog pathway inhibitors for cancer treatment. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 1137–1204. [[CrossRef](#)]
60. Rowling, M.J.; Kemmis, C.M.; Taffany, D.A.; Welsh, J. Megalin-mediated endocytosis of vitamin D binding protein correlates with $25\text{-hydroxycholecalciferol}$ actions in human mammary cells. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2754–2759. [[CrossRef](#)]
61. Negri, A.L. Proximal tubule endocytic apparatus as the specific renal uptake mechanism for vitamin D-binding protein/ $25\text{-}(\text{OH})\text{D}_3$ complex. *Nephrology* **2006**, *11*, 510–515. [[CrossRef](#)]
62. Bikle, D.D.; Schwartz, J. Vitamin D Binding Protein, Total and Free Vitamin D Levels in Different Physiological and Pathophysiological Conditions. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 317. [[CrossRef](#)]
63. Mull, B.; Davis, R.; Munir, I.; Perez, M.C.; Simental, A.A.; Khan, S. Differential expression of Vitamin D binding protein in thyroid cancer health disparities. *Oncotarget* **2021**, *12*, 596–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ismail, A.; El-Awady, R.; Mohamed, G.; Hussein, M.; Ramadan, S.S. Prognostic Significance of Serum Vitamin D Levels in Egyptian Females with Breast Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2018**, *19*, 571–576. [[PubMed](#)]
65. Teng, Y.; Yu, Y.; Li, S.; Huang, Y.; Xu, D.; Tao, X.; Fan, Y. Ultraviolet Radiation and Basal Cell Carcinoma: An Environmental Perspective. *Front. Public Health* **2021**, *9*, 666528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Trakatelli, M.; Barkitzi, K.; Apap, C.; Majewski, S.; De Vries, E.; EPIDERM group. Skin cancer risk in outdoor workers: A European multicenter case-control study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **2016**, *30*, 5–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

RSU Ētikas komitejas atļauja

Veidlapa Nr. E-9 (2)

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS NR. 11 / 08.09.2016.

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel. 67061596

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Profesors Olafs Brūvers	Dr.theo.	teologs
2. Professore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
3. Asoc.prof. Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
4. Asoc.prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
5. Professore Regīna Kleina	Dr.med.	patalogs
6. Profesors Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs
7. Asoc.prof. Viesturs Līguts	Dr.med.	toksikologs
8. Docente Iveta Jankovska	Dr.med.	
9. Docents Kristaps Cīrcenis	Dr.med.	

Pieteikuma iesniedzējs: Dr. Jeļena Moisejenko-Goluboviča (Latvijas universitāte)
Medicīnas fakultāte

Pētījuma nosaukums: „Bazālo šūnu karcinomas patoģenēzes un lokoreģionālo recidīvu attīstības īpatnības galvas un kakla rajonā”

Iesniegšanas datums: 08.09.2016.

Pētījuma protokols: Izskatot iesniegtos pētījuma dokumentus (protokolu) ir redzams, ka pētījuma mērķis tiek sasniegts veicot, bez kāda apdraudējuma veselībai un dzīvībai, pacientu objektīvā stāvokļa izvērtējumu, ievācot pacientu anamnēzes datus un analizējot iegūtos (izoperētos) BŠK audu materiālus, veicot pacientu medicīniskās dokumentācijas (medicīnas vēstures) izpēti, visu iegūto datu apstrādi un analīzi, kā arī izsakot priekšlikumus. Personu (pacientu, dalībnieku) datu aizsardzība, brīvprātīga informēta piekrišana piedalīties pētījumā un konfidencialitāte tiek nodrošināta. Līdz ar to pieteikums atbilst medicīnas pētījuma ētikas prasībām.

Izkaidrošanas formulārs: ir

Piekrīšana piedalīties pētījumā: ir

Komitejas lēmums: piekrist pētījumam

Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers

Tituls: Dr. miss., prof.

Paraksts



Ētikas komitejas sēdes datums: 08.09.2016.