

**Универзитет „Св. Кирил и Методиј“  
Медицински факултет-Скопје**



**Институт за хистологија и ембриологија  
м-р Лена Какашева-Маженковска**

**„Проценка на густината на неоваскуларизацијата и длабочината на инвазијата кај планоцелуларниот карцином на кожата и долната усна како параметри за туморска прогресија“**

**Докторска дисертација**

**Ментор:**

**Проф. д-р Весна Јаневска**

**Скопје, Јули 2018**

**МЕНТОР : Проф. д-р Весна Јаневска - Институт за патологија,  
Медицински факултет , Скопје**

**КОМИСИЈА ЗА РЕЦЕНЗИЈА :**

**Проф. д-р Лилјана Миленкова – претседател**

*Редовен професор и Раководител на катедрата по хистологија и ембриологија ,  
Медицински факултет, Скопје*

**Проф. д-р Весна Јаневска – ментор**

*Редовен професор на Институтот за патологија, ,  
Медицински факултет, Скопје*

**Проф. д-р Гордана Петрушевска – член**

*Редовен професор и Раководител на Институтот за патологија,  
Медицински факултет, Скопје*

**Проф. д-р Невена Костовска – член**

*Редовен професор и Раководител на Институтот за хистологија и ембриологија  
Медицински факултет, Скопје*

**Проф. д-р Андеја Арсовски – член**

*Редовен професор на Медицински факултет,  
Универзитет Гоце Делчев, Штип*

**Одбрана :**

**12 Јули 2018**

***Во знак на благодарност и сеќавање  
на две силни и влијателни жени во мојот живот,  
мојата мајка Менка Маженковска  
и мојата свекрва Ката Какашева***

## **Благодарност**

*Голема е листата на добри луѓе кои дадоа свој придонес за создавањето на оваа дисертација. На сите од сè срце им се заблагодарувам.*

*Меѓутоа, неколку се личностите на кои сакам посебно да им се заблагодарам:*

- ❖ Со особена почит и задоволство, искрена благодарност изразувам на мојот ментор, проф. д-р Весна Јаневска, бидејќи прифати одговорна должност да биде ментор. Со своите стручни совети, педантно, систематично, со пријателска наклоност учествуваше и ме водеше низ процесот на создавањето на овој труд.*
- ❖ Неизмерна почит и благодарност должам на проф. д-р Гордана Петрушевска, Раководител на Институтот за патологија, која безрезервно ми овозможи користење на сите расположливи ресурси на Институтот, за реализација на ова истражување.*
- ❖ Почит и благодарност изразувам кон проф. д-р Лилјана Миленкова, Раководител на Катедрата за Хистологија и ембриологија, менторот на мојот магистерскиот труд, која со своите совети ме поттикнуваше да продолжам понатаму и учествуваше во финалниот изглед на оваа дисертација.*
- ❖ Искрена благодарност и почит кон проф. д-р Невена Костовска, Раководител на Институтот за хистологија и ембриологија, која ми овозможи услови за почеток на ова истражување, реализација и финализирање на проектот.*

- ❖ *Почит и благодарност изразувам кон проф. д-р Нели Башеска од Клиниката за онкологија, која учествуваше во реализацијата на дел од оваа студија и ме научи како да ги систематизирам и прикажам резултатите од истражувањето.*
- ❖ *Почит и благодарност кон доц. д-р Симонида Црвенковска од Клиниката за онкологија, која со своите совети во дел од оваа студија даде свој придонес .*
- ❖ *Почит и благодарност кон доц. д-р Рубенс Јовановиќ од Институтот за патологија, кој несебично помогна при статистичката обработка на податоците.*
- ❖ *Благодарност до лаборантката Јанка Петрова од Институтот за патологија, за изработката и имунохистохемиските боења на хистолошките препарати.*
- ❖ *На колегите и вработените од Институтот за хистологија и ембриологија и Институтот за патологија, кои ми дадоа поддршка во текот на изработката на дисертацијата.*
- ❖ *На Ленче Даневска, Раководителот на Библиотеката на Медицински факултет - Скопје, за лекторските корекции и англискиот превод на докторатот.*
- ❖ *На моето семејство, Зоран, Александар и Катерина, кои беа моја поддршка и помош, за целото време на моето научно истражувачко патешествие.*
- ❖ *На моите родители кои ми ги покажаа вредностите на животот и кои беа моја потпора.*
- ❖ *На семејството на мојот сопруг кое веруваше во мене и ме бодреше да истравам на патот кон мојот успех.*

## ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

SCC	squamous cell carcinoma, плоскоклеточен карцином
ДИ	длабочина на инвазија
ГНА	густина на неоангиогенеза
МВГ	микроваскуларна густина
HPV	хуман папилома вирус
HPV16, HPV24	типови на хуман папилома вирус
HSV1 и HSV2	херпес симплекс вирус 1, 2
ECM (ЕЦМ)	екстрацелуларен матрикс
CAFs	cancer-associated fibroblasts, карцином-асоцирани фибробласти
MMP	матрикс металопроотеиназите
VEGF	vascular endothelial growth factor, васкуларен ендотелен фактор за раст
TP phosphorylase	тимидин фосфорилази
hot spots	жешки точки
KDR	kinase insert domain receptor, тирозин киназни рецептори
Bcl-2 apoptosis regulator	инхибитори на ендотелната апоптоза
NO nitric oxide	азотен оксид
PGI <sub>2</sub> prostacyclin	простациклин
VSA	vascular survival ability, васкуларна способност за опстанок
$\alpha$ -SMA	alpha smooth muscle actin, алфа мазно мускулаен актин
CD34	антитело против тип CD34 бележи ендотелни клетки
AJCC TNM	Staging System 2010 American Joint Committee on Cancer и International Union for Cancer Control, Американско здружение за рак, Интернационално здружение за контрола на рак и класификација
pTNM	параметри: големина на тумор, зафатеност на лимфни јазли и метастази
p 27	киназа инхибиторен протеин
pT1 (T1 $\leq$ 2 cm)	големина на неоплазма до 2 cm
pT2 (T2 > 2 cm)	големина на неоплазма над 2 cm
TGF- $\beta$	трансформиращкиот фактор на раст бета
TIMP	инхибитори на матрикс металопроотеинази
TSP-1, TSP-2	тромбоспондин-1, тромбоспондин-2
IL-8, IL-12	интерлеукин-8, интерлеукин-12
bFGF-2	базичен фибробластен фактор за раст 2
VEGF-A	васкуларен ендотелен фактор за раст А
VEGFR-1 и VEGFR-2	тирозински рецептори 1 и 2

# СОДРЖИНА

<b>ИЗВАДОК .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>1. ВОВЕД .....</b>	<b>18</b>
➤ <b>1.1. Платоцелуларен карцином на кожа.....</b>	<b>18</b>
➤ <b>1.2. Платоцелуларен карцином на долна усна .....</b>	<b>21</b>
➤ <b>1.3. TNM класификација на платоцелуларен         карцином на кожа.....</b>	<b>22</b>
➤ <b>1.4. TNM класификација на платоцелуларен         карцином на долна усна.....</b>	<b>24</b>
➤ <b>1.5. Туморска строма .....</b>	<b>26</b>
➤ <b>1.6. Ангиогенеза.....</b>	<b>29</b>
<b>2. МОТИВ.....</b>	<b>34</b>
<b>3. ХИПОТЕЗА.....</b>	<b>35</b>
<b>4. ЦЕЛ.....</b>	<b>35</b>
<b>5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....</b>	<b>37</b>
➤ <b>5.1. Материјал.....</b>	<b>37</b>
➤ <b>5.2. Методи.....</b>	<b>40</b>
➤ <b>5.3. Статистичка обработка.....</b>	<b>42</b>
<b>6. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>44</b>
➤ <b>6.1 Платоцелуларен карцином на кожа.....</b>	<b>44</b>
• <b>6.1.1. Податоци од патохистолошките рапорти... 44</b>	
• <b>6.1.2. Длабочина на туморска инвазија .....</b>	<b>49</b>
• <b>6.1.3. Васкуларна густина во стромата на                 инвазивниот фронт.....</b>	<b>54</b>

➤ 6.2. Паноцелуларен карцином на долна усна .....	67
• 6.2.1. Податоци од патохистолошките рапорти...	67
• 6.2.2. Длабочина на туморска инвазија .....	71
• 6.2.3. Васкуларна густина во стромата на инвазивниот фронт.....	74
• 6.2.4. Квантитативни и атрибутивни параметри на паноцелуларните карциноми на долната усна во зависност од присуството на метастази во вратните лимфни јазли .....	79
<b>7. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>88</b>
<b>8. ЗАКЛУЧОЦИ.....</b>	<b>111</b>
<b>9.ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>113</b>



## **Проценка на густината на неоваскуларизацијата и длабочината на инвазијата кај планоцелуларниот карцином на кожата и долната усна како параметри за туморска прогресија**

**Какашева-Маженковска Л, Институт за хистологија и ембриологија,  
Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје**

### ***ИЗВАДОК***

**ВОВЕД:** Од вкупната застапеност на кожните карциноми околу 95% отпаѓа на немеланомските карциноми, од кои планоцелуларниот карцином (Squamous cell carcinoma, SCC) учествува со околу 20%. Иако овој карцином има релативно ниска процентуална застапеност, заради можноста да метастазира и доведе до смрт, ова заболување се наоѓа меѓу првите пет причинители за смртност од карциноми во светот.

Планоцелуларниот карцином на долната усна е со инциденција од околу 1-2%, но е најчест карцином во оралната шуплина и опфаќа околу 25%-30% од сите малигни тумори во неа, со тенденција овој процент да расте. Вкупната стапка на 5-годишно преживување кај пациентите со SCC на долната усна изнесува 60%.

Прогнозата на пациентите со планоцелуларен карцином предоминантно зависи од стадиумот на болеста, но новите истражувања укажуваат на можни морфолошки карактеристики на неоплазмата кои би имале значајно влијание врз неговата прогресија, а со тоа и на прогнозата на пациентите.

**ЦЕЛ:** Длабочината на инвазија (ДИ) и густината на неоангиогенеза (ГНА) претставуваат параметри кои би можеле да се користат како морфолошки карактеристики и како можни показатели за прогресијата на неоплазмата, што претставуваат предмет на истражување на оваа научноистражувачка студија.

ДИ и ГНА кај SCC се корелирани со диференцираноста на туморот и pT статусот (големината на туморот) кај SCC на кожата и кај SCC на долната усна, и со присуството на метастази во вратните лимфни жлезди кај SCC на долната усна, со цел да се утврди прогностичкото значење на истражуваните параметри во однос на прогресијата на неоплазмата.

**МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ:** Материјалот за ова научно истражување го сочинуваат 30 ткивни примероци од пациенти со SCC на кожата и 60 ткивни примероци од пациенти со SCC на долната усна.

Контролната група ја сочинуваат 15 ткивни примероци со нормална структура на кожата и 15 ткивни примероци со нормална структура на долната усна добиени од ресекционите рабови кај еден дел од овие пациенти.

Студијата е ретроспективно-проспективна со користење на архивскиот материјал од Институтот за патологија, при што беа користени парафински блокови, хистопатолошки препарати и хистопатолошки извештаи. Од парафинските блокови дополнително беа направени нови хистолошки пресеци за имунохистохемиско боене од испитуваниот материјал како и од контролната група.

Длабочината на инвазијата кај секој поединечен случај беше мерена со софтвер за хистоморфолошка морфометрија на микроскоп Olimpus BX-41 на зголемување (10 x 40). Беше мерено беше растојанието од базалната мембрана на интактниот епидермис до најдлабоката плажа на инвазивниот фронт (најдлабокиот продор на малигни клетки во дермисот). Добиените вредности се апсолутни броеви изразени во микрометри ( $\mu\text{m}$ ).

На зголемување (10 x 4) најпрво се одредуваа подрачјата со најголема васкуларна густина (hot spots), а потоа на зголемување (10 x 40), во 10 видни полиња, се броеја крвните садови вклучувајќи и групи на пролиферирани ендотелни клетки со формиран лумен. Тие беа визуелизирани со имунохистохемиски боенка со антителата против CD34 и alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA.

Добиените резултати се корелирани меѓу себе, со градусот и големината на неоплазмата кај SCC на долната усна и со присуството на метастази во регионалните лимфни јазли кај SCC на долната усна, параметри преземени од патолошкиот наод.

**РЕЗУЛТАТИ:** Во групата на кожни SCC карциноми, од вкупно 30-те анализирани примероци, 10 (33,3%) беа од пациенти од женски пол, на возраст од 70-98 години, со просечна старост од  $85,7 \pm 8,4$  години, а 20 примероци (66,7%) беа од пациенти од машки пол на возраст од 57-89 години,

со просечна старост од  $74,2 \pm 10,4$  години. Најголем број примероци беа од регијата на лицето.

Од вкупниот број примероци, 21 (70%) беа со pT1 статус на неоплазми ( $T1 \leq 2$  cm), а 9 (30%) пациенти беа со pT2 статус на неоплазми ( $T2 > 2$  cm).

Во анализираната група добро диференцирани карциноми (G1) имаше во 12 (40%) случаи, умерено диференцирани (G2) во 13 (43,3%) и лошо диференцирани (G3) беа 5 (16,7) случаи.

Најмалата морфометриски измерена длабочина на инвазијата во стромата на инвазивниот фронт кај неоплазмата со SCC на кожата изнесуваше  $1561,2 \mu\text{m}$ , а најголемата  $13000,1 \mu\text{m}$ .

Длабочината на стромалната инвазија беше најмала кај добро диференцираните (G1) планоцелуларни карциноми и нејзината средна вредност изнесуваше  $2579,3 \mu\text{m}$ , а најголема кај лошо диференцираните (G3) планоцелуларни карциноми каде средната вредност изнесуваше  $9219,9 \mu\text{m}$ .

Длабочината на стромалната инвазија беше помала кај неоплазмите со pT1 статус и нејзината средна вредност изнесуваше  $3957,5 \pm 1843,5$  микрометри, додека кај неоплазмите со pT2 статус таа беше поголема и изнесуваше  $7404,8 \pm 3066,0$  микрометри.

Разликата во длабочината на стромална инвазија кај SCC на кожата, која се регистрира кај неоплазмите со различен степен на хистолошка диференцијација беше статистички значајна за  $p=0,00008$ , со примена на Kruskal-Wallis-овиот тест.

Длабочината на стромалната инвазија статистички значајно се разликува кај неоплазмите со различен туморски статус. Кај pT1 неоплазмите длабочината на стромалната инвазија беше помала во однос на pT2 неоплазмите за  $p=0,003$  со примена на Mann-Whitney статистичкиот тест.

Најмалата васкуларна густина (најмала средна вредност) во инвазивниот фронт на неоплазмата беше најдена кај добро диференцираните SCC, а најголемата кај лошо диференцираните SCC, при што средните вредности на неоваскуларизацијата се движеа од 15,8 до 24,8 и беа со статистички значајна разлика на густината на неоангиогенезата помеѓу групите неоплазми со

различен степен на диференцираност со примена на Kruskal-Wallis-овиот тест за  $p=0,0003$ .

Во групата примероци од 60-те пациенти со SCC на долната усна, 13 примероци (21,7%) беа од пациенти од женски пол, на возраст од 65-75 години, со просечна старост од  $70,2 \pm 2,9$  години, а 47 (78,3%) беа од пациенти од машки пол на возраст од 41-78 години, со просечна старост од  $66,4 \pm 8,5$  години. Во однос на pT статусот, 39 случаи (65%) беа со pT1 статус ( $T1 \leq 2$  cm), и 21 случаи (35%) со pT2 статус ( $T2 > 2$  cm) на неоплазмите. Во анализираната серија, 34 (56,7%) примероци беа со G1 (добро диференцирани неоплазми), 12 (20%) беа со G2 (умерено диференцирани неоплазми) и 14 (23,3%) примероци беа со G3 (лошо диференцирани неоплазми).

Најмалата морфометриски измерена длабочина на инвазијата во испитуваната серија изнесуваше 1341,3  $\mu\text{m}$ , а најголемата 14105,6  $\mu\text{m}$ .

Беше најдена разлика во длабочината на стромалната инвазија кај SCC на долната усна, која се регистрира кај неоплазмите со различен степен на хистолошка диференцијација и таа беше статистички значајна за  $p=0,00001$  со примена на Kruskal-Wallis-овиот тест. Длабочината на стромалната инвазија статистички значајно се разликуваше и кај неоплазмите со различен туморски статус (pT1 и pT2) со примена на Mann-Whitney статистичкиот тест за  $p=0,00001$ .

Разликата која се регистрира помеѓу средните вредности на густината на неоангиогенезата кај SCC на долната усна во однос на здравото околно ткиво беше исто така статистички сигнификантна за  $p=0,0000001$ , со примена на Mann-Whitney статистичкиот тест.

Најмала васкуларна густина (најмала средна вредност) во инвазивниот фронт на неоплазмата беше најдена кај добро диференцираните SCC на долна усна, а најголема кај лошо диференцираните SCC на долната усна, при што средните вредности на васкуларизацијата се движеа од 20,4 до 37,2 и покажаа статистички значајна разлика на густината на неоангиогенезата помеѓу групите неоплазми со различен степен на диференцираност, со примена на Kruskal-Wallis-овиот тест за  $p = 0,00001$ .

Беше најдена статистички значајна разлика во густината на васкуларизацијата и помеѓу туморите со големина  $pT1 \leq 2$  cm и големина  $pT2 > 2$  cm, со примена на Mann-Whitney статистичкиот тест за  $p=0,00001$ .

Разликата во длабочината на стромалната инвазија кај SCC на долната усна, које се регистрира кај неоплазмите на пациентите без метастази и неоплазмите на пациентите со метастази беше статистички значајна, со примена на Mann-Whitney статистичкиот тест за  $p=0,000083$ .

Направената статистичка анализа покажа статистички значајна разлика и во густината на васкуларизацијата на SCC на долната усна помеѓу неоплазмите без метастази и неоплазмите со вратни метастази, со примена на Mann-Whitney статистичкиот тест за  $p=0,0002$ .

**ЗАКЛУЧОК:** Длабочината на инвазијата во стромата кај планоцелуларниот карцином на кожата и планоцелуларниот карцином на долната усна како и неоангиогенезата во инвазивниот фронт на неоплазмата се параметри кои играат улога во прогресијата на неоплазмата и претставуваат предиктивни фактори за појава на вратни метастази кај планоцелуларниот карцином на долната усна.

**Клучни зборови:** планоцелуларен карцином, CD34, густина на неоангиогенеза, инвазивен фронт, хистолошка диференцираност, длабочина на инвазија.

## **Evaluation of neovascular density and depth of invasion in squamous cell carcinoma of the skin and lower lip as parameters for tumor progression**

**Kakasheva-Mazhenkovska Lena, Institute of Histology and Embryology, Medical Faculty, Skopje**

### ***ABSTRACT***

**INTRODUCTION:** In the overall prevalence of skin carcinoma about 95% account for non-melanoma carcinomas, of which squamous cell carcinoma (SCC) participates with 20%. Although this carcinoma is with relatively low percentage prevalence, it can metastasize and lead to fatal outcome; hence this disease is among the first five causes of death from carcinoma in the world.

The incidence of squamous cell carcinoma of the lower lip is around 1-2%, but it is the most common one in the oral cavity accounting for about 25-30% of all malignant oral cavity tumors with an increasing tendency. The overall 5-year survival rate in patients with SCC of the lower lip is not higher than 60%.

Prognosis in patients with squamous cell carcinoma mainly depends on the stage of the disease, but recent research has shown possible morphological characteristics of the tumor that could have a significant influence on tumor progression as well as on patient's outcome.

**AIM:** Depth of invasion (DI) and density of neovascularization (VD)(neoangiogenesis) are parameters that might be used as morphological characteristics and possible indicators for neoplasm progression, which is the subject of investigation in this scientific research.

DI and VD in SCC were correlated with the tumor differentiation and pT stage (tumor size) in skin SCC and lower lip SCC in order to determine the prognostic importance of the analyzed parameters in relation to neoplasm progression.

**MATERIAL AND METHODS:** The material for this scientific research consisted of 30 tissue specimens from patients with skin SCC and 60 tissue specimens from patients with lower lip SCC. The control group comprised 15 tissue specimens with normal skin structure and 15 tissue specimens with normal structure of the lower lip obtained from the resection margins of some of these patients.

This was a retrospective-prospective study, which used the archival data of the Institute of Pathology, where paraffin blocks, histopathological slides and histopathological reports were analyzed. From the paraffin blocks new additional sections for immune-staining of the analyzed material and control group were made.

The depth of invasion in each case was measured with computer software for histomorphologic morphometry on Olympus BX-41 microscope with magnification of (10 x 40). The distance from the basal membrane of the intact epidermis to the deepest tumor nest of the invasive front was measured. The obtained values were absolute numbers expressed in micrometers ( $\mu\text{m}$ ).

First of all, on magnification (10 x 4) the areas with the largest vascular density (hot spots) were determined, and later, on magnification (10 x 40), in 10 visual fields blood vessels including groups of proliferated endothelial cells with formed lumen were counted. They were visualized by immune-staining with antibodies against CD34 and alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA.

The obtained results were correlated among themselves, with the grade and size of the neoplasm, and in lower lip SCC with present metastases in regional lymph nodes, parameters taken from the pathological reports.

**RESULTS:** In the group of skin SCC carcinomas, of the total number of 30 analyzed specimens, 10 cases (33.3%) were from female patients, aged 70-98 years, mean age  $85.7 \pm 8.4$ , whereas 20 cases (66.7%) were specimens from male patients at the age of 57-89 years, mean age  $74.2 \pm 10.4$ . The largest number of specimens was from the facial region.

Of the total number of specimens, 21 (70%) were with pT1 neoplasm stage ( $T1 \leq 2$  cm), and 9 (30%) specimens were with pT2 neoplasm stage ( $T2 > 2$  cm).

In the analyzed group, well-differentiated carcinomas (G1) were found in 12 (40%) cases, moderately differentiated (G2) in 13 (43.3%) and poorly differentiated (G3) in 5 (16.7%) cases.

The smallest morphometrically measured depth of stromal invasion in the invasive front of the neoplasm with skin SCC was  $1561.2 \mu\text{m}$ , and the largest  $13000.1 \mu\text{m}$ .

The depth of stromal invasion was the smallest in well-differentiated (G1) squamous cell carcinoma and its mean value was  $2579.3 \mu\text{m}$ , whereas the largest

was in poorly differentiated (G3) squamous cell carcinoma and its mean value was 9219.9  $\mu\text{m}$ .

The depth of stromal invasion was smaller in neoplasms of pT1 stage and its mean value was  $3957.5 \pm 1843.5 \mu\text{m}$ , while in neoplasms of pT2 stage it was larger and reached  $7404.8 \pm 3066.0 \mu\text{m}$ .

The difference in the depth of stromal invasion in skin SCC, registered in the neoplasms of different grade of histological differentiation was statistically significant for  $p = 0.00008$  by applying the Kruskal-Wallis test.

The depth of stromal invasion was statistically different in neoplasms of different tumor stage. In pT1 neoplasms the depth of stromal invasion was smaller compared to the depth in pT2 neoplasms for  $p = 0.003$  by applying the Mann-Whitney statistical test.

The lowest vascular density (smallest mean value) in the invasive front of the neoplasm was found in well-differentiated SCC, and the highest in poorly differentiated SCC. Mean values of neovascularization (neoangiogenesis) ranged from 15.8 to 24.8 and showed a statistically significant difference in the density of neovascularization (neoangiogenesis) among groups of neoplasms with different grade of differentiation for  $p = 0.0003$  according to the Kruskal-Wallis test.

In the group of specimens from lower lip SCC, obtained 60 patients, 13 cases (21.7%) were from female patients, aged 65-75 years, mean age  $70.2 \pm 2.9$ , whereas 47 (78.3%) were from male patients, aged 41-78 years, mean age  $66.4 \pm 8.5$ . Regarding pT stage, 39 cases (65%) were with pT1 ( $T1 \leq 2 \text{ cm}$ ), and 21 cases (35%) were with pT2 stage ( $T2 > 2 \text{ cm}$ ) of neoplasms. In the analyzed series, 34 (56.7%) cases were with G1 (well-differentiated neoplasms), 12 (20%) cases were with G2 (moderately differentiated neoplasms) and 14 (23.3%) cases were with G3 (poorly differentiated neoplasms).

The smallest morphometrically measured depth of invasion in the analyzed series was 1341.3  $\mu\text{m}$ , and the largest 14105.6  $\mu\text{m}$ .

The registered difference in the depth of stromal invasion of lower lip SCC, detected in neoplasms with different grade of histological differentiation, was statistically significant for  $p = 0.00001$  by application of Kruskal-Willis test. The depth



of stromal invasion was statistically different in neoplasms of different tumor stage (pT and pT2) for  $p < 0.05$  according to the Mann-Whitney statistical test.

There was also a statistically significant difference between mean values of density of neoangiogenesis in lower lip SCC and the healthy surrounding tissue for  $p = 0.0000001$  by applying the Mann-Whitney statistical test.

The lowest vascular density (smallest mean value) in the invasive neoplasm front was found in well-differentiated lower lip SCC, and the highest in poorly differentiated lower lip SCC. Mean values of neovascularization (neoangiogenesis) ranged from 20.4 to 37.2 and showed statistically significant difference in the density of neovascularization (neoangiogenesis) among groups of neoplasms with different degree of differentiation for  $p = 0.0001$  by applying the Kruskal-Wallis test.

A statistically significant difference was found between the density of angiogenesis and tumors with size  $T1 \leq 2$  cm and size  $T2 > 2$  cm for  $p = 0.00001$  by applying the Mann-Whitney statistical test.

The difference in the depth of stromal invasion of lower lip SCC registered in neoplasms of patients without metastases and neoplasms of patients with metastases was statistically significant for  $p = 0.000083$  according to the Mann-Whitney statistical test.

Also, the performed statistical analysis showed a significant difference in the density of vascularization of lower lip SCC between neoplasms without metastases and neoplasms with neck metastases for  $p = 0.0002$  by applying the Mann-Whitney statistical test.

**CONCLUSION:** The depth of stromal invasion in skin squamous cell carcinoma and lower lip squamous cell carcinoma as well as the neovascularization (neoangiogenesis) in the invasive neoplasm front are parameters that play a role in the neoplasm progression and present predictive factors for development of neck metastases in lower lip squamous cell carcinoma.

**Key words:** squamous cell carcinoma, CD34, density of neovascularization (neoangiogenesis), invasive front, histological differentiation, depth of stromal invasion.

## **1. ВОВЕД**

Поставена меѓу надворешната и внатрешната средина кожата е структурно комплексен, мултифункционален и софистициран витален орган, најголем во организмот, специјализиран да извршува битни функции со координирани клеточни и молекуларни настани.

Надворешните влијанија, првенствено зголемената изложеност на сонце т.е. штетното ултравиолетово зрачење, живеењето во загадена животна средина, користењето на различни хемиски средства за лична хигиена, алкохол, никотин, инфекција со хуман папилома вирус (HPV), индустријализацијата во големите градови, штетното влијание на индустриските масла и катрани, индустриски хемикалии како винил хлорид, полициклични ароматични хидрокарбонати, изложеност на бензин и испарувањата од бензин и слично се дел од причинителите за појава на промени на кожата од најразличен тип [1,2].

Последните декади сведоци сме на зголемен пораст на појава на карциноми на кожата како резултат на ултравиолетовото зрачење.

Од вкупната застапеност на кожните карциноми околу 95% отпаѓа на немеланомските карциноми, од кои планоцелуларниот карцином учествува со околу 20%. Иако овој карцином има релативно ниска процентуална застапеност, заради можноста да метастазира и доведе до смрт, ова заболување се наоѓа меѓу првите пет причинители за смртност од карциноми во светот [3].

### **1.1. ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ НА КОЖА (SCC)**

Планоцелуларниот карцином (squamous cell carcinoma, SCC) е малигна неоплазма на епидермалните кератиноцити. Овој тип на тумори се разликуваат според клиничкото појавување зависно од типот на лезијата и степенот на развој. Тие на различни локации покажуваат разлики во однос на симптоматологијата, потеклото на болеста, прогнозата и начинот на третман на болеста [4,5].

Покрај погоренаведените можни причинители за појава на промени на кожата, како главни етиолошки фактори кај планоцелуларниот карцином се: ултравиолетовото Б зрачење, радиолошкото зрачење, постоење на претходни изгореници на кожата, инфламаторни лезии и долготрајни улцерации на кожата, труења со арсен, катрани и индустриски карциногени. Планоцелуларниот карцином се јавува почесто кај лица со трансплантирани органи како резултат на имunosупресија. Овој вид карцином на кожата најчесто се појавува на непокриените делови од телото, кои директно се изложени на сонце: чело, лице, уши, скалп, врат, на рацете и преодната зона на усните (вермилион). Почесто се јавува кај постарата популација, додека кај помладата популација најчесто се јавува кај лица со светол тен, руса коса и светла боја на очите. Во високоразвиените земји годишната инциденција изнесува 166 случаи на 100.000 жители. Инциденцијата е повисока во земјите поблиску до екваторот каде процентот на заболени е значајно поголем. Кај припадниците на црната раса овој карцином се јавува многу ретко [5]. Кај нас, во Република Македонија не постојат прецизни податоци за овој вид карцином на кожата. Во Институтот за јавно здравје на Република Македонија податоците кои статистички се обработуваат опфаќаат две категории малигни неоплазми на кожата, и тоа: малигни меланоми на кожата и други малигни неоплазми на кожата, во кои се вклучени планоцелуларниот карцином, базоцелуларниот карцином и малигните неоплазми на потните и лојните жлезди.

Надворешните, со око видливи промени на кожата кај планоцелуларниот карцином, во претходно наброените регии се претставени најчесто во форма на плитки улцери со сквамозни крусти, издигнати и ограничени плаки или нодули [6].

Микроскопските промени покажуваат зголемена пролиферација на епидермисот што доведува до нарушување на нормалното површинско препокривање. Степенот на кератоцитната атипичност е различен во различните лезии. Променетите кератиноцити се со обилна еозинофилна цитоплазма, со големи везикуларни јадра со проминентни јадреница; дел се хиперхроматични, покажуваат дискератоза и бројни митози. Сквамозните епителни клетки формираат ограничени гнезда, нишки или ленти кои се шират од епидермисот

кон дермисот. Постои зголемено орожнување кое резултира со појава на видливи, свамозни структури кои личат на бисери (кератински перли) зависно од диференцираноста на туморот. Степенот на анаплазија во туморските гнезда се користи за одредување на диференцираноста на туморот и категоризацијата на добро, умерено и лошо диференциран тумор. Овие карциноми може да инфилтрираат во нервните обвивки, околните крвни садови, лимфните садови и во фасциите. Присуството на лимфоцити во околината на нервите е знак за ширење на карциномот во длабоките партии [6]. Во периферијата на неоплазмата може да е присутно варијабилно количество на воспалителен инфилтрат во кој може да доминираат еозинофили. Поретко во хистолошките варијанти на овој тумор се среќаваат поинаков тип клетки како што се: светли клетки, клетки во форма прстен-печатник, пигментирани, базални и рабдоидни. Клетките на планоцелуларниот карцином се позитивни на епителниот мембрански антиген и цитокератини [6,7].

Планоцелуларните кожни карциноми покажуваат главно локална агресивност и се јавуваат во неколку модалитети. Кај пациенти кои се инфицирани со хумани папилома вируси имаат агресивен тек. Туморите кои се шират во длабочина инфилтрираат во периневралните обвивки, имаат присутна акантолиза, а притоа се лошо диференцирани, и се склони кон метастазирање. Ризикот за метастазирање кај карцином на кожа оштетена од сончева радијација е мал и изнесува 0,5%, додека кај карциноми во регии неизложени на сонце ризикот е поголем и изнесува 2-3%. Ризикот е поголем ако туморот е лоциран на усните, вулвата, перинеумот, пенисот, како и кај т.н. Marjolin ulcer, радијациска лузна, или термички изгореници. Туморската длабочина на инвазијата е прогностичка варијабла. Карциноми со длабочина на инвазија помала од 2 mm ретко метастазираат, оние меѓу 2 и 5 mm длабочина на инвазија имаат среден ризик за метастазирање од околу 5%, додека тумори со длабочина на инвазија поголема од 5 mm имаат голем ризик за метастазирање кој изнесува околу 20%. Тумори поголеми од 2 cm во дијаметар имаат поголем ризик за рецидивирање и метастазирање во однос на малите лезии [18].

Планоцелуларните карциноми на кожата имаат широк дијапазон на различни форми, од индолентни тумори со слаб метастатски потенцијал до агресивни тумори со висок инвазивен потенцијал. Разграничувањата на различните форми на овој карцином може исклучиво да се направи со микроскопска анализа, која јасно ја дава точната дијагноза и го одредува понатамошното лекување. Раното поставување на дијагнозата кај високо ризичните форми на овој карцином го намалува ризикот од метастази и рецидиви, ги намалува трошоците за лекување и секако го продолжува животот на пациентите.

## ***1.2. ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ НА ДОЛНА УСНА***

Планоцелуларниот карцином на долната усна е редок, со инциденција од околу 1-2%, но е најчест карцином во оралната шуплина, што опфаќа околу 25% -30% од сите малигни тумори во неа, со тенденција овој процент да расте. Карциномот на долната усна најчесто се јавува кај пациенти на возраст од 60-70 години, главно кај луѓе од белата раса и почесто кај машкиот пол. Во етиопатогенетски фактори за појава на сквамозниот карцином на долната усна се вбројуваат: пушењето луле, цвакањето тутун, хронична консумација на алкохол и долготрајна експозиција на сонце кај луѓе чија професија е на отворено, како што се рибари, морнари, земјоделци. Во поново време се појавуваат извештаи дека планоцелуларниот карцином на долната усна е поврзан и со некои вирусни инфекции како што се инфекциите со HPV16, HPV24, HSV1 и HSV2. Одредени хемиски фактори исто така се вклучуваат во етиопатогенезата на овој карцином [8,9].

Метастази во вратните лимфни јазли од планоцелуларен карцином на долната усна се јавуваат во помалку од 20% и тие се почести кај пациентите со полошо диференцирани карциноми. Кај пациентите со помали тумори (T1 и T2) во време на дијагнозата метастазите се присутни во околу 8% [10,11,12].

Утврдена е значајна поврзаност помеѓу лимфонодалниот вратен статус и големината на туморот, хистолошкиот градус, максималната дебелина, перинеуралната инвазија и ниската експресија на p27 протеинот. Пациентите

со планоцелуларен карцином на долната усна поголем од 2 cm, со хистолошки градус G3-G4, максимална дебелина поголема од 6 mm, со периневрално ширење и ниска експресија на p27 протеин се со висок ризик од појава на вратни метастази [13,14,15,16,17].

Вообичаените прогностички фактори кај пациентите со SCC ги вклучуваат стадиумот на болеста и степенот на хистолошка диференцираност на туморот. Стадиумот на болеста вообичаено се одредува според TNM класификацијата издадена од American Joint Committee on Cancer и International Union for Cancer Control (табела 1) (AJCC. TNM Staging System 2010) [18].

### **1.3. TNM КЛАСИФИКАЦИЈА НА ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ НА КОЖА**

Примарен тумор-T

Tx	Примарниот тумор не може да се оцени
T0	Нема потврда за примарен тумор
Tis	<i>In situ</i> карцином
T1	Тумор 2 cm или помалку во најголемата димензија со помалку од 2 карактеристики за висок ризик*
T2	Тумор поголем од 2 cm во најголемата димензија или тумор со која било големина со две или повеќе карактеристики за висок ризик*
T3	Тумор со инвазија во максила, мандибула, орбита или темпорална коска
T4	Тумор со инвазија на скелетот (аксијален или апендикуларен) или периневрална инвазија на базата на черепот

\*Карактеристики за висок ризик на примарниот тумор:

Длабочина на инвазијата: > 2 mm дебелина

Кларково ниво  $\geq$  IV

Анатомска локализација: Примарна локализација - уво

Примарна локализација - невлакнест дел од усна

Диференцијација: Лошо диференциран или недиференциран

## Нодален статус

Nx	Регионалните лимфни јазли не може да се оценат
N0	Нема метастази во регионалните лимфни јазли
N1	Метастаза во единечен ипсилатерален лимфен јазол, 3 cm или помалку во најголемата димензија
N2	Метастаза во единечен ипсилатерален лимфен јазол, поголем од 3 cm но, не поголем од 6 cm во најголемата димензија, или мултипни ипсилатерални лимфни јазли, ниту еден поголем од 6 cm во најголемата димензија; или билатерални или контралатерални лимфни јазли, ниту еден поголем од 6 cm во најголемата димензија
N2a	Метастаза во единечен ипсилатерален лимфен јазол, поголем од 3 cm, но не поголем од 6 cm во најголемата димензија
N2b	Метастази во мултипни ипсилатерални лимфни јазли, ниту еден поголем од 6 cm во најголемата димензија
N2c	Метастаза во билатерални или контралатерални лимфни јазли, ниту еден поголем од 6 cm во најголемата димензија
N3	Метастаза во лимфен јазол, поголем од 6 cm во најголемата димензија

## Далечни метастази

M0	Нема далечни метастази
M1	Далечни метастази

## Стадиум

Стадиум	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
IV	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T кое било	N3	M0
	T4	N кое било	M0
	T кое било	N кое било	M1

## **1.4. TNM КЛАСИФИКАЦИЈА НА ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ НА ДОЛНА УСНА**

Примарен тумор -T

Tx	Примарниот тумор не може да се оцени
T0	Нема потврда за примарен тумор
Tis	<i>In situ</i> карцином
T1	Тумор 2 cm или помалку во најголемата димензија
T2	Тумор поголем од 2 cm, но не поголем од 4 cm во најголемата димензија
T3	Тумор поголем од 4 cm во најголемата димензија
T4a	Умерено напредната локална болест*  Туморот инвадира низ кортикалната коска, долниот алвеоларен нерв, подот на устата, или кожата на лицето, каде се брадата или носот
T4b	Многу напредната локална болест  Туморот инвадира во мастикаторниот простор, птеригоидната плоча, или базата на черепот и/или ја обвиткува каротидната артерија

\*Само површинска ерозија на коската/забна алвеола од примарен гингивален тумор не е доволна туморот да се класифицира како T4

Нодален статус

Nx	Регионалните лимфни јазли не може да се оценат
N0	Нема метастази во регионалните лимфни јазли
N1	Метастаза во единечен ипсилатерален лимфен јазол, 3 cm или помалку во најголемата димензија
N2	Метастаза во единечен ипсилатерален лимфен јазол, поголем од 3 cm, но не поголем од 6 cm во најголемата димензија, или мултипни ипсилатерални лимфни јазли, ниту еден поголем од 6 cm во најголемата димензија; или билатерални или контралатерални лимфни јазли, ниту еден поголем од 6 cm во најголемата димензија
N2a	Метастаза во единечен ипсилатерален лимфен јазол, поголем од 3 cm, но не поголем од 6 cm во најголемата димензија
N2b	Метастази во мултипни ипсилатерални лимфни јазли, ниту еден поголем од 6 cm во најголемата димензија
N2c	Метастаза во билатерални или контралатерални лимфни јазли, ниту еден поголем од 6 cm во најголемата димензија
N3	Метастаза во лимфен јазол, поголем од 6 cm во најголемата димензија



## Далечни метастази

M0	Нема далечни метастази
M1	Далечни метастази

## Стадиум

Стадиум	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
IVB	T кое било	N3	M0
	T4b	N кое било	M0
IVC	T кое било	N кое било	M1

Новите сознанија укажуваат на тоа дека и други морфолошки карактеристики може да имаат значајна улога во прогресијата на туморот, како што се стромалните промени, односно густината на миофибробластите, периневралната и периваскуларната инвазија, инфламаторниот одговор, губењето на експресијата на E кадхерин и CD44 кај туморската популација, експресијата на p16 и бројни други фактори. Длабочината на инвазија (карактеристика за висок ризик од TNM класификацијата) и густината на новскуларизацијата претставуваат исто така параметри кои би можеле да се користат како морфолошки карактеристики кои укажуваат на прогресијата на неоплазмата, што претставува предмет на истражување на оваа студија.

Иако новите хируршки техники и радио-хемотерапевтски модалитети го подобрија преживувањето на пациентите со сквамозен карцином на долна усна, сепак вкупната стапка на 5-годишното преживување кај овие пациенти

изнесува не повеќе од 60%, поради што интензивното барање на нови параметри кои би укажувале на прогресијата на неоплазмата, како што се длабочината на инвазијата и густината на неоангиогенезата може да дадат придонес за развивање на нови терапевтски модалитети кај овие пациенти.

### **1.5. ТУМОРСКА СТРОМА**

Туморите структурно содржат **паренхим** изграден од туморски клетки специфични за секој вид тумор и **строма** - структура која потекнува од домаќинот и е составена од сврзно ткиво, крвни садови и воспалителни клетки. Без строма туморските клетки не можат да преживеат и растат бидејќи од неа црпат она што им е неопходно потребно за нивниот опстанок, раст и ширење. Стромата не претставува само потпорна рамка на неоплазмата туку и новоформирано и модифицирано место од страна на паренхимските клетки каде постои взаемна и континуирана интеракција помеѓу компонентите на неоплазмата [19].

Стромата на неоплазмите е висококомплексна структура изградена од: специјализирани мезенхимни клетки својствени за секое ткивно опкружување, карцином-асоцирачки фибробласти (cancer-associated fibroblasts, CAFs) / миофибробласти, вродени и стекнати имуни клетки, васкуларна мрежа со ендотелни клетки и перицити, мастоцити, макрофаги, леукоцити и адипоцити, сите вкалупени во екстрацелуларниот матрикс (ЕЦМ). Екстрацелуларниот матрикс е изграден од структурни протеини (колаген и еластин), специјализирани протеини (фибрилин, фибронектин и еластин) и протеогликани. Секоја неоплазма создава своја уникатна микросредина во која туморот расте и се модифицира. Иако повеќето клетки на домаќинот во стромата имаат задолжително тумор супресорска способност, стромата се менува во текот на малигниот процес и дури промовира раст, инвазија и метастази [20]. Генетските промени кои се случуваат во текот на развитокот на канцерот, водени од малигните клетки доведуваат до промени во стромата на домаќинот, која ќе ја потчинат и приспособат на своите потреби. Во раните етапи на развиток и инвазијата на туморот, се деградира базалната мембрана и

се активира стромата која содржи зголемен број фибробласти, воспалителен инфилтрат и новоформирани капилари кои доаѓаат во директен контакт со туморските клетки. Ваквите промени во стромата водат кон канцерска инвазија [21].

**Строматогенеза** е термин кој означува формирање на нова специфична строма на местата на активна клеточна туморска инвазија и метастази како составен дел од инвазивниот процес. Новата строма се создава и се управува од инвазивните туморски клетки со апсолутна толеранција и соучество на околните фибробласти на домаќинот. Строматогенезата не е формирање на реактивна фиброза околу бенигна неоплазма која секогаш се јавува како фиброзна капсула, ниту пак создавање на аваскуларно сврзно ткиво кое го пополнува местото на повреда кај лузните или формира фиброзно дно на улкусите во зоната на цикатризација. Новата строма е туѓинец во структурата на нормалното ткиво, ја потпомага инвазијата на туморските клетки и миграцијата на ендотелни клетки и не е во насока на задржување и одложување на неопластичниот процес.

**Може да се каже дека строматогенезата е железничка пруга преку која возот се лизга, а брзиот воз е освојувачкиот тумор [22].**

Во текот на процесот на карциногенезата, туморските клетки стапуваат во интеракции со: околното туморско опкружување во коешто е вклучен екстрацелуларниот матрикс (ЕЦМ), факторите на раст, цитокините, сите заедно во взаемна асоцијација со ЕЦМ, како и со околните ендотелни клетки, фибробластите, макрофагите, мастоцитите, неутрофилите, перицитите и адипоцитите. Четирите обележја на карциномите (миграцијата, инвазијата, метастазирањето и ангиогенеза) се зависни од околното микроопкружување. Клучните играчи во овој процес се матрикс металопротеиназите (ММП) бидејќи тие ги раскинуваат различните клеточни атхезивни молекули, ги модулираат споевите меѓу клетките и споевите на клетките со ЕЦМ [23,24].

Што се случува при малигниот процес за да дојде до тоа малигните клетки да ги кинат нормалните ткивни бариери и да остварат инвазија?

Се претпоставува дека се вклучени следните механизми:

- Механички притисок создаден од еномната продукција на малигните клетки долж ткивните рамнини со најмала резистентност;
- Слабеене на туморските клеточни атхезии - губиток на површинските молекули на кадхерини и интегрини;
- Зголемен мотилитет на туморските клетки/амебовидни движења преку секреција на мотогени цитокини со појава на зголемен број рецептори за фактори за раст;
- Деградација на екстрацелуларниот матрикс преку ослободување на повеќе протеолитични ензими, т.е. металопротеази, колагенази, плазминогени, катепсинази и други;
- Стимулација на ангиогенезата преку секреција на васкуларни ендотелни фактори за раст (vascular endothelial growth factor, VEGF) и тимидин фосфорилази (thymidine phosphorylase, TP) зголемувајќи го преживувањето на малигните клетки и нивното продирање во циркулацијата.

ЕЦМ е динамична структура која го оркестрира преживувањето на клетките заедно со сите чинители на тој ЕЦМ. Протеолитичната активност на ММП им е потребна на канцерските клетки за да ги раскинат физичките бариери во текот на локалната експанзија на туморот како и за навлегување (интравазација) во околните крвни садови, излегување од крвотокот и населување на оддалечени локации. Во текот на инвазијата локално ММП-те поттикнуваат создавање на специјализирани структури на површината на клетките т.н. инвадоподии кои се помагачи на инвазијата. Вакви структури се присутни секаде каде што ЕЦМ се деградира. Преку трансмембранските инвадоподиски релациски протеинази, на локалното место се активираат ММП-ите како што се ММП-2 и ММП-9 и ги разградуваат различните молекули од ЕЦМ, со што обезбедуваат инвазија [25-31].

## **1.6. АНГИОГЕНЕЗА**

**Ангиогенезата** е процес на формирање на нови крвни садови од постојните нормални капилари. Туморите со висока ангиогенетска активност се вбројуваат во категоријата на многу агресивни тумори со неповолна прогноза за пациентите [32]. Се смета дека туморите кои имаат повеќе крвни садови во однос на другите се ангиогенски.

Туморите пројавуваат способност за експресија на ангиогенски фактори за раст како што се: VEGF, TP и други [33].

Туморските клетки, стромалните и тумор-асоцирачките макрофаги секретираат ангиогенски молекули, кои поттикнуваат пролиферација на ендотелните клетки, нивна миграција и матурација со формирање на васкуларни канали. Ваквите активности се остваруваат главно од страна на VEGF, а помалку од страна на TP. Постои зголемена присутност на овие фактори кај тумори со зголемена васкуларна густина. Исто така, зголеменото присуство на хепатоцитен фактор на раст, базичен фибробластен фактор на раст и некои интерлеукини можат да пројават ангиогенски активности. Weidner и сор. први се обиделе со помош на имунохистохемиско боење на ендотелни клетки да ги поделат малигните тумори на богато ангиогенски и сиромашно ангиогенски тумори. Туморите во кои има зголемена васкуларна густина имаат поголем ризик за појава на метастази како полоша постоперативна прогноза кај различни хумани малигноми [34].

Податоците од литературата укажуваат дека во неоплазмите васкуларните канали се нерамномерно распространети. Постојат регии со многу крвни садови, т.н. „жешки точки“ (hot spots) на периферијата на туморот на границата со нормалното ткиво [35].

Овие „жешки точки“ први ги регистрирале Thompson и сор. кои ја опишале васкуларната густина кај аденокарцином на градата и откриле дека ангиогенезата практично проминира во инвазивниот фронт на туморот и ја има многу повеќе на границата помеѓу нормалното ткиво и туморот. Ваквиот наод им сугерирал на авторите дека туморите ја добиваат васкуларизацијата преку крвно-садовно здружување, а не од васкуларното разраснување.

Фох и сор. ја потврдиле важноста на туморската периферија за ендотелна клеточна пролиферација и сугерирале дека васкуларните канали во внатрешните туморски регии се во релација со континуираното ремоделирање.

Анализите направени на примероци од 151 пациент со карцином на дојка и 178 пациенти со карцином на бели дробови ги потврдиле овие податоци [36]. Притоа, била одредувана васкуларната густина на „жешки точки“ во туморската периферија, односно регија која тие ја именуваат како T1 и во две внатрешни зони T2 (во средината помеѓу периферијата и центарот) и T3 (во центарот на туморот). Најголема васкуларна густина се забележува во зоната T1 близу до нормалното ткиво, а опаѓа одејќи кон внатрешноста на туморот, варирајќи зависно од различните типови неоплазми. Ваквата тенденција на васкуларна регресија од периферијата кон центарот се потврдува и со користење на антитела за препознавање на VEGF и на тирозин киназа рецептори (kinase insert domain receptor, KDR), комплекс присутен на површината на васкуларниот ендотел. Ваквите крвни садови ги има во голем број во VEGF-експресирачките тумори. VEGF/KDR позитивната васкуларна густина е висока во периферијата на туморот и на места каде тој допира до нормалното ткиво, а опаѓа видливо кон внатрешните туморски регии на VEGF-позитивните тумори, наспроти фактот дека VEGF се појавува и дистрибуира воедначено низ туморската маса. Ова наведува на мислење дека во текот на туморската ангиогенеза ендотелната активност се јавува и во нормалното ткиво во непосредна близина на инвазивниот туморски фронт [36].

На местата на активна туморска клеточна инвазија феноменот на ангиогенеза се гледа паралелно со феноменот на строматогенеза. Создадената едематозна, растресита строма е поволна за ендотелна клеточна миграција и олеснето продирање на туморските клетки. Таквата фиброваскуларна пролиферација (строматогенеза/ангиогенеза) заедно со инвазивните туморски клетки формира добро организирана туморска клеточна област. Формирањето на новите крвни садови и строматогенезата се случуваат истовремено со туморската клеточна инвазија и се блиску поврзани со туморското метастазирање. Условите во микроопкружувањето на туморот не се насекаде еднакви. Хипоксијата, ацидитетот, недостатокот на хранливи продукти се

доминантните специфики во средината на туморот. Прашањето кое се наметнува е како туморот опстојува во централните партии на неоплазмата кога има несоодветни услови. Објаснувањето би било дека малигните клетки и младите крвни садови се толерантни на хипоксијата преку активација на гликолитичките анаеробни патишта. Внатрешната циркулација толерира ниска концентрација на кислород преку активација на ангиогенски фактори (VEGF, VEGF/KDR, TP, bFGF) и инхибитори на ендотелната апоптоза (VEGF, Apoptosis regulator bcl-2,). VEGF е одговорен не само за формирање на нови крвни садови, туку и за инхибирање на ендотелната клеточна апоптоза. Со стимулација се поттикнува ендотелната продукција на азотен оксид (nitric oxide, NO) и простаглицин (prostacyclin, PGI<sub>2</sub>) кои иницираат анти-апоптоза. Исто така, VEGF преку антиромботичниот ефект спречува тромбоцитната агрегација со што се поддржува функционалната внатрешна туморска васкуларизација [32,34,36].

Станува очигледно дека потенцијалот на туморот да поднесува смалена васкуларизација во внатрешноста на туморот зависи од способноста за секреција на протеини со антиапоптотички својства. Тие се продуцираат и секретираат од туморските и ендотелните клетки и со тоа ја определуваат туморската карактеристика наречена васкуларна способност за опстанок (vascular survival ability, VSA). На периферијата од туморот инвазивните малигни клетки и новоформираните крвни садови во содејство со немалигното ткиво се во привилегирана позиција поради присуството на нормалната васкуларна и лимфна мрежа. Крвните садови кои ја васкуларизираат периферијата се типични крвни капилари, а внатрешноста на туморот поседува крвни садови со поинаква градба, кои се со неправилна вретеновидна форма, дилатирани, извиткани со слепи завршетоци. Тие не се организирани во венули, артериоли и капилари туку содржат специфики од сите заедно хаотично распоредени. Крвните садови на васкуларната мрежа формирана во туморите содржи широки процепи кои се причина за појава на крвавења во околината. Перицитите се лабаво споени со ендотелните клетки и се ретки, а честопати во сидот на туморските крвни садови има малигни клетки. Протокот на крвта е ирегуларен, бавен и осцилирачки, што се должи на нефункционалните капилари. Причината

за ваквата поинаква градба е непозната и се претпоставува дека е резултат од нарушеност во појавувањето и функционирањето на ангиогенските фактори. Се поставува прашањето која е всушност примарната улога на туморските крвни садови: Дали тоа е транспортот на кислород и хранливи материи за малигните клетки или транспортот на малигните клетки од „срцето“ на туморот кон периферијата? Можеби дефектните сидови на крвните садови фаворизираат подобро навлегување на малигните клетки во нив и фаворизираат метастатско ширење [35,36].

Ангиогенезата кај планоцелуларниот карцином е испитувана на тумори на повеќе локализации, во најголем број случаи со цел да се одреди нејзината улога во прогресијата на туморот или неговата агресивност, а со тоа прогнозата на болеста. Анализата на ангиогенезата кај соларната кератоza, кај површно инвазивниот и инвазивниот планоцелуларен карцином на кожата, покажала значајно зголемување на микроваскулатурата во однос на околната нормална кожа, што укажува на тоа дека ангиогенезата се јавува рано во развојот на кутаниот планоцелуларен карцином. Притоа е утврдено дека неоваскуларизацијата е паралелна со туморската прогресија [37]. Испитувањата на густината на микроваскулатурата кај планоцелуларен и базоцелуларен карцином на кожата со помош на имунохистохемиско боене со CD34 и одредување на нивото на VEGF покажале дека врската меѓу високата микроваскуларна густина и високите вредности на VEGF кај сквамозниот хистолошки тип посочуваат на можна улога на ангиогенезата во определувањето на поагресивни типови на канцер [38]. Кај оралниот сквамозен карцином постои поврзаност помеѓу микроваскуларната густина и позитивните лимфонодални метастази, што укажува на тоа дека ангиогенезата игра клучна улога кај оралните карциноми [39,40].

Кај едно истражување на SCC на глава и врат биле утврдени корелации меѓу васкуларната густина, лошата прогноза и појавата на метастази [41], додека кај едно друго истражување не била утврдена корелација меѓу ангиогенезата и градусот на туморот и прогнозата [42]. Дали ваквите разлики се должат на различните туморски степени, локализации или методи за анализа, сè уште не е разјаснето [43,18].



Разликите што постојат во податоците од литературата можат да се должат на: потеклото на материјалот (од луѓе или од животни), различната динамика на туморската прогресија, како и различните причинители кои влијаат врз настанувањето, т.е. дали се вирусни или ув-индицирани карциногенези. Од друга страна, кожните епителни тумори остануваат долго да бидат површински тумори без потреба да ја зголемат ангиогенезата, бидејќи добрата исхранетост, по пат на дифузија на епидермисот, ги задоволува нивните потреби. Порастот на ангиогенезата ќе биде покренат ако порасне туморската маса и консеквентно порасне хипоксијата во таа регија [44].

Со оглед на тоа дека кај SCC на кожата одредувањето на T-параметарот од pTNM класификацијата подразбира мерење на најголемиот дијаметар на неоплазмата, кој не секогаш е идентичен со оној кој ја одредува длабочината на инвазијата, многу автори ја истражувале длабочината на инвазијата на SCC како прогностички фактор.

Тап WJ и сор. ја истражувале прогностичката сигнификантност на длабочината на инвазијата кај карцином на јазикот и утврдиле дека таа е важен прогностички индикатор [45].

Во едно друго истражување во кое биле анализирани предиктивните фактори кај пенилен SCC било утврдено дека длабочината на инвазијата и васкуларната инвазија претставуваат значајни претскажувачи на канцерската прогресија [46].

Kristensen GB и сор. во студијата за одредување на главни прогностички фактори кај раниот цервикален SCC, утврдиле дека туморската големина, длабочината на инвазија и градусот во инвазивниот фронт на неоплазмата, претставуваат главни прогностички фактори кај раниот планоцелуларен карцином на грлото на матката [47].

## **2. МОТИВ**

Планоцелуларниот карцином на кожата поради неговиот релативно индолентен начин на раст во минатото не бил особено значаен предмет на истражување освен во однос на терапевтските можности.

Планоцелуларниот карцином на долната усна поради инвазивниот раст, мутилантноста која при тоа ја предизвикува, прави потешкотиите при хируршката и адјувантната терапија, кога е во напредната фаза. Поради тоа во последните децении овој тип на неоплазма поттикнува зголемување на бројот на истражувањата, но сепак литературните податоци за планоцелуларен карцином на долната усна се релативно скромни во однос на останатите неоплазми кои се јавуваат кај луѓето.

Дополнителен поттик за истражување во оваа област претставува релативно честата појава на вратни метастази кај пациентите со планоцелуларниот карцином на долната усна, што дополнително ја усложнува терапијата кај овие пациенти. Секако преживувањето на овие пациенти зависи од раното детектирање на болеста и спроведување на соодветна терапија.

Поради тоа одредувањето на параметрите кои би укажувале на прогресија на туморот би биле од големо значење при планирањето на третманот кај овие пациенти како и судбината на пациентите.

***Мотивот за ова научно-истражувачката студија е да параметрите: длабочината на туморската инвазија и густината на туморската ангиогенеза, како дел од патохистолошката анализа, помогнат при планирањето на третманот и терапијата кај пациентите со планоцелуларен карцином на кожата и долната усна.***

### **3. ХИПОТЕЗА**

Кај планоцелуларните карциноми (SCC) на кожата и долната усна, постои позитивна корелација помеѓу туморскиот статус, туморскиот градус, длабочината на туморската инвазија и густината на неоваскуларизацијата во инвазивниот фронт.

### **4. ЦЕЛИ**

1. Да се измери длабочината на инвазијата на епителната компонента во стромата на планоцелуларните карциноми на кожата и на долната усна.
2. Длабочината на туморската инвазија да се корелира со градусот на неоплазмата и со pT-параметарот на неоплазмите од pTNM класификацијата според AJCC 2010.
3. Со примена на дополнителни боења јасно да се визуелизираат крвните садови за да се овозможи квантифицирање на бројот на крвни садови (васкуларна густина) во стромата на инвазивниот фронт на сите испитувани неоплазми како и во подепидермалната строма (дермис) кај здравата кожа која служи како контролна група.
4. Васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт на неоплазмите да се корелира со васкуларната густина во дермисот на здравата кожа, со градусот на неоплазмата и со pT-параметарот од pTNM класификацијата според AJCC 2010.
5. Кај планоцелуларните карциноми на кожата да се корелираат двата параметри: васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт со длабочината на туморската инвазија.

6. Кај планоцелуларните карциноми на долната усна да се корелираат двата параметри: васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт со длабочината на туморската инвазија
7. Кај планоцелуларните карциноми на долната усна да се споредат сите параметри на неоплазмите меѓу групите неоплазми без и со метастази во вратните лимфни јазли.
8. Да се утврди кои корелации се статистички значајни.

## **5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ**

### **5.1. МАТЕРИЈАЛ**

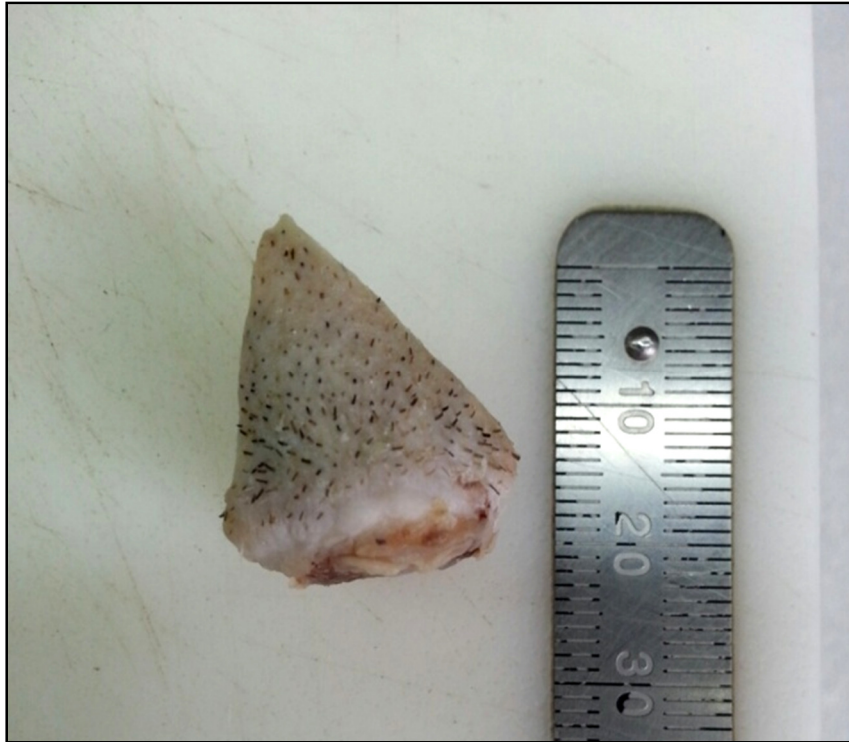
Предмет на ова истражување беа оперативните материјали од 90 пациенти со планоцелуларен карцином (squamous cell carcinoma, SCC) на кожата и долната усна, оперирани на Универзитетските клиници за Пластична и Максилофацијална хирургија (Слика 1-4). Истите беа хистопатолошки обработени на Институтот за патологија при Медицински факултет во Скопје.

#### **Фотографии од оперативниот материјал од планоцелуларен карцином на долната усна**



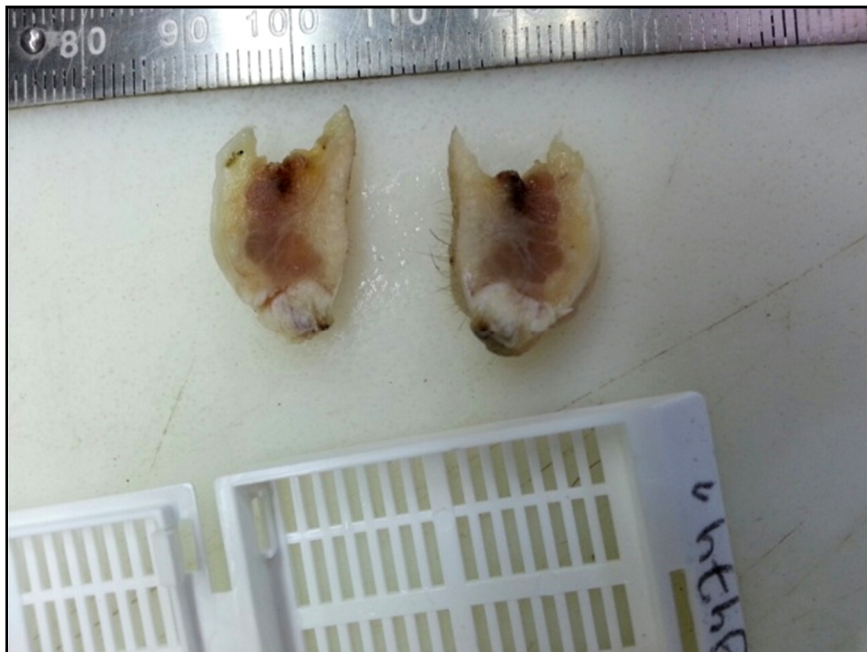
**Слика 1**

**Слика 1.** Планоцелуларен карцином (SCC) на долна усна. Триаглеста ексцизија со елевирен нодус во пределот на вермилионот, со потемна боја од околната кожа и со површна улцерација



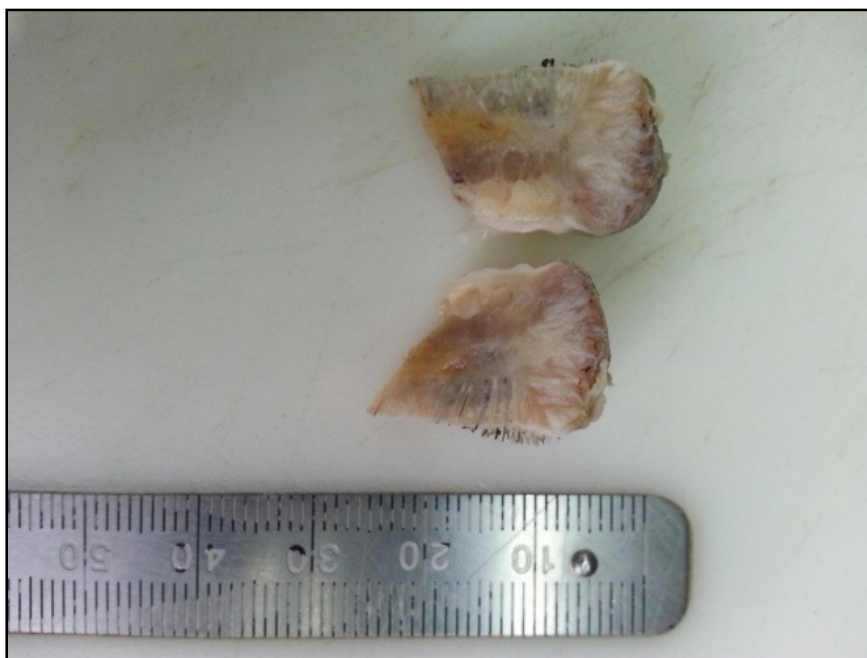
**Слика 2**

**Слика 2.** Паноцелуларен карцином (SCC) на долна усна. Триаглеста ексцизија со централна улцерација и круста врз неа.



**Слика 3**

**Слика 3.** Паноцелуларен карцином (SCC) на долната усна. Пресек на триаглеста ексцизија со релативно јасно ограничено, сиво-бело пребоено туморско ткиво, кое инфилтрира до мускулатурата на долната усна.



**Слика 4**

**Слика 4.** Планоцелуларен карцином (SCC) на долната усна. Пресек на триаглеста ексцизија со неајсно ограничено сиво бело пребоено туморско ткиво кое инфилтрира во мускулатурата.

Во оваа студија, обработените хистопатолошки примероци беа поделени во 2 основни групи: испитувана група примероци и контролна група примероци.

**Испитуваната група примероци** се состоеше од:

1. 30 примероци со планоцелуларен карцином на кожата
2. 60 примероци со планоцелуларен карцином на долната усна, од кои
  - 45 примероци од пациенти без метастази во регионалните лимфни јазли
  - 15 примероци од пациенти со метастази во регионалните лимфни јазли

Од ресекционите ивици на 30 оперативни материјали беа приготвени хистолошки препарати со нормална структура на кожата, изработени на Институтот за Хистологија и ембриологија при Медицинскиот факултет во Скопје, кои ја претставуваа **контролната група примероци** и тоа:

- 15 примероци со нормална структура на кожата
- 15 примероци со нормална структура на долната усна

Студијата е ретроспективно-проспективна со користење на архивскиот материјал од Институтот за патологија, при што беа користени парафински блокови, хистопатолошки препарати и хистопатолошки рапорти.

Од архивскиот материјал (парафинските блокови) дополнително беа направени нови хистолошки пресеци за имунохистохемиско боење и понатамошна анализа како од испитуваниот материјал така и од контролната група.

## **5.2. МЕТОДИ**

Од хистопатолошките рапорти беа земени податоци за полот, возраста на пациентите како и димензиите на оперативниот материјал. Врз основа на димензиите на туморската промена во оперативниот материјал беше одреден pT статусот на неоплазмата и тоа: со димензии до 2 cm се класифицираа со pT1 статус ( $T1 \leq 2 \text{ cm}$ ), а останатите примероци беа со димензии поголеми од 2 cm и беа класифицирани со pT2 статус ( $T2 > 2 \text{ cm}$ ).

Анализата на хистопатолошките препарати беше изведена на светлосен микроскоп. На Институтот за Патологија беше направена стандардна хистопатолошка анализа на оперативниот материјал на хистопатолошки препарати боени по Хематоксилин-Еозин (HE). Притоа беше одреден степенот на диференцираност на неоплазмата и беше направена класификација во три категории: G1 (добро диференцирана неоплазма), G2 (умерено диференцирана неоплазма) и G3 (лошо диференцирана неоплазма).

Во оваа студија, анализата на хистопатолошките препарати опфаќаше испитување на два параметри: **длабочина на туморската инвазија и густина на крвните садови во стромата на инвазивниот фронт на планоцелуларниот карцином.**

На хистопатолошките препарати од испитуваната и од контролната група примероци боени по Хематоксилин–Еозин беше одредувана длабочината на инвазијата на планоцелуларниот карцином. Длабочината на инвазијата кај секој поединечен случај беше мерена со софтвер за хистоморфолошка морфометрија на микроскоп Olympus BX-41 на зголемување x 400. Мерено беше



растојанието од базалната мембрана на интактниот епидермис до најдлабоката плажа на инвазивниот фронт (најдлабокиот продор на малигни клетки во дермисот). Добиените вредности се апсолутни броеви изразени во микрометри ( $\mu\text{m}$ ).

На хистопатолошките препарати од испитуваната и од контролната група примероци боени со имунохистохемиски боења беше одредувана густината на крвните садови (неоангиогенеза) во стромата на инвазивниот фронт на планоцелуларниот карцином.

Имунохистохемиските боења беа изведувани со стандардна процедура користена на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје, со користење на Immunoperoxidase LSAB + system и специфични примарни моноклонални антитела против:

1. CD 34 DAKO, Monoclonal Mouse Anti-Human CD 34 Classe II Clon QBEnd 10, code M716501-2 (сите примероци)
2. Actin DAKO, Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clon 1A4, code MO85101-2 (10 примероци)

Хистопатолошките препарати за имунохистохемиска анализа беа депарафинирани во ксилен, рехидрирани во градуирани алкохоли и претретирани за антиген retrieval во 10 mM цитратен пуфер во микробранова печка од 700W, 15 минути и оставени во пуферот да се оладат на собна температура. Ендогената пероксидаза се супримираше со Peroxidase Blocking reagent (Dako Cytomation) 10 минути, а неспецифичното врзување на антителото се блокираше со инкубација во Protein Block Serum Free (Dako Cytomation) 10 минути.

Инкубацијата со примарните антитела разредени во Anibody Diluent (Dako Cytomation) се одвиваше 2 часа во влажна комора на собна температура.

За боење беше користена EnVision + two step визуелизирачка техника (Dako) со употреба на DAB како хромоген, инкубиран 10 минути и хематоксилин за контраст. Негативната контрола беше без примарно антитело, а за

позитивна се користеше карциномско ткиво со висока експресија на соодветните протеини.

Боењето со антителото CD34 се користеше за визуелизација на туморската неангиогенеза во стромата на инвазивниот фронт на неоплазмата, преку кафено пребојување на ендотелните клетки во крвните садови. На зголемување (10 x 4) најпрво се одредуваа подрачјата со најголема васкуларна густина (hot spots), а потоа на зголемување (10 x 40), во 10 видни полиња, се броеја крвните садови вклучувајќи и групи на пролиферирани ендотелни клетки со формиран лумен.

Боењето со антителото против алфа мазно мускулаен актин (alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA), се искористеше како контрола на боењето со антителото против CD34, диференцирајќи ги крвните садови кои содржат мазено мускулен актин обоени идентично како при боењето со CD34 (кафено). Со тоа се прави дистинкција помеѓу постоечките крвни садови кои содржат мазен мускулен актин од новосоздадените крвни садови кои не го содржат овој протеин.

### **5.3. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА**

Резултатите од хистолошката анализа беа описно (дескриптивно) обработени и прикажани преку атрибутивни и нумерички статистички серии. Од дескриптивните методи се користеа атрибутивни обележја: минимална, максимална и средна вредност, стандардната девијација, како и графичко и табеларно прикажување на податоците.

За евалуација на резултатите се користеа современи информатички методи на статистичка обработка со користење на компјутерска техника. За креирање на базите на податоци беше користен SPSS 15.0 статистички софтвер. Користени беа следните статистички тестови:

- Kruskal Wallis test, за споредување на разликите во рангирањето на три и повеќе варијабли кои не се изразени во нумерички единици. Овој тест го користевме за утврдување на статистичка значајност: за густината на

крвните садови и длабочината на инвазивниот фронт кај неоплазми со различен степен на хистолошка диференцијација (G1,G2,G3).

- Mann Whitney  $U$  test е соодветен на Student  $t$  test, се користи за споредба на средни вредности од две испитувани варијабли, кои не се изразени во нумерички вредности и кога работиме со релативно мал број на примероци, а сепак постои поврзаност помеѓу варијаблите. Овој тест го користевме за утврдување на статистичка значајност на густината на крвни садови во здраво и туморско ткиво, кај неоплазми со pT1 и pT2 туморски статус.
- Spearman's rank correlation. Овој тест се користи за одредување на заедничкото варирање на две варијабли со цел одредување на степенот на поврзаност на двете варијабли. Овој статистички тест го користевме за одредување на корелацијата меѓу густината на неоангиогенезата и длабочината на инвазијата на карциномот.

Кај сите користени статистички тестови нивоата на веројатност, согласно меѓународните стандарди за био-медицински науки се  $p \leq 0,05$  и  $p \leq 0,01$ .

Добиените резултати се графички и табеларно прикажани, а хистолошките наоди фотографски документирани.

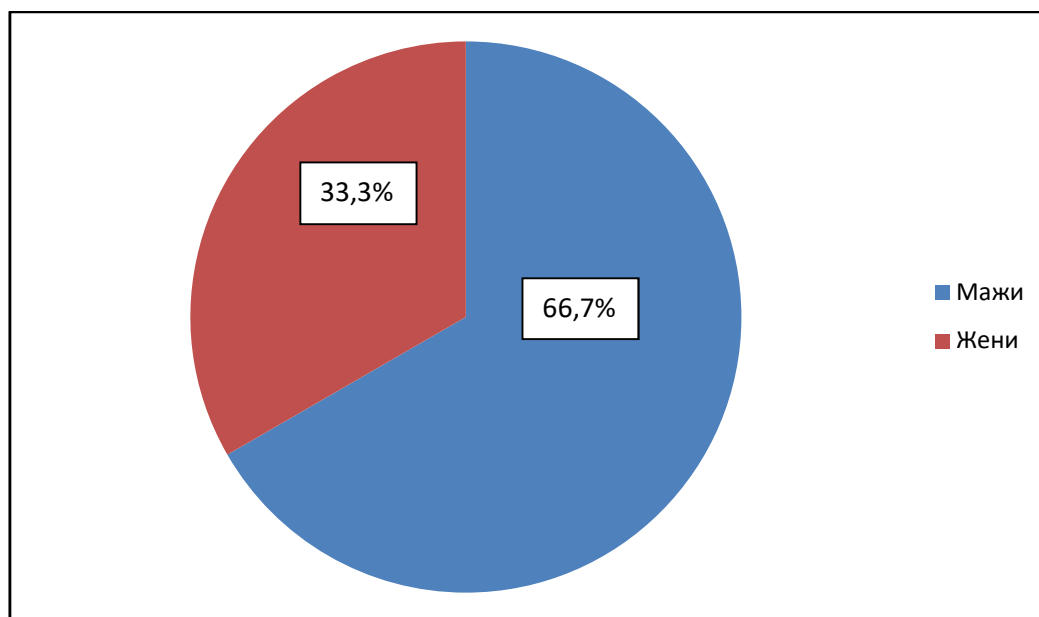
## **6. РЕЗУЛТАТИ**

### **6.1. ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ НА КОЖА**

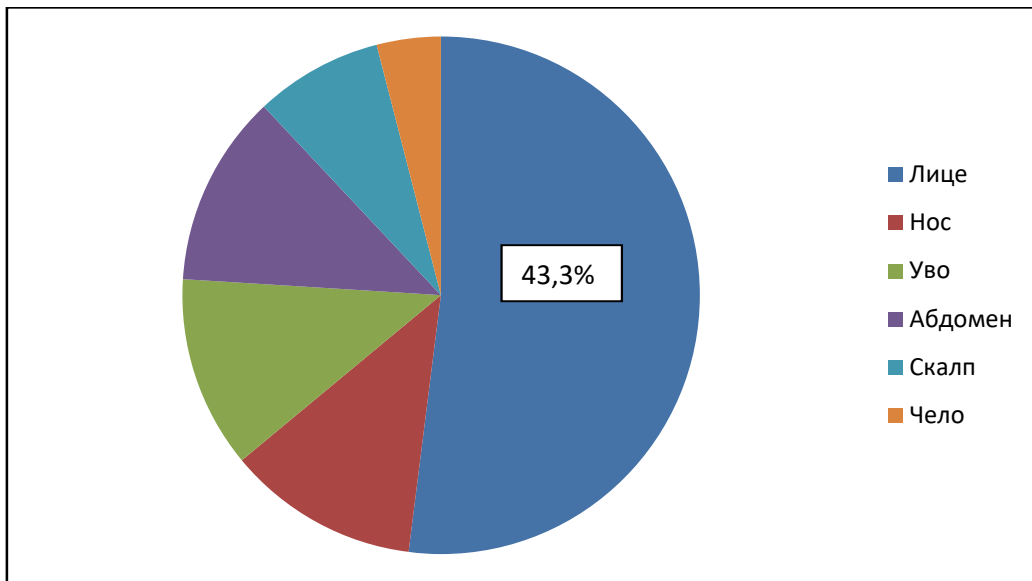
#### **6.1.1. Податоци од патохистолошките рапорти**

Од вкупно 30 пациенти чиј оперативен материјал бил предмет на патохистолошка анализа, 10 (33.3%) биле од женски пол, на возраст од 70-98 години, со просечно  $85,7 \pm 8,4$  години, а 20 (66,7%) биле од машки пол на возраст од 57-89 години, со просечно  $74,2 \pm 10,4$  години (Графикон 1).

Најзастапена кожна регија во испитуваната група беше регијата на лицето кај 13 случаи (43,3%), а најмалку беа застапени региите на чело, врат, града, очен капак, рака и нога со по еден случај (3,3%) (Графикон 2).

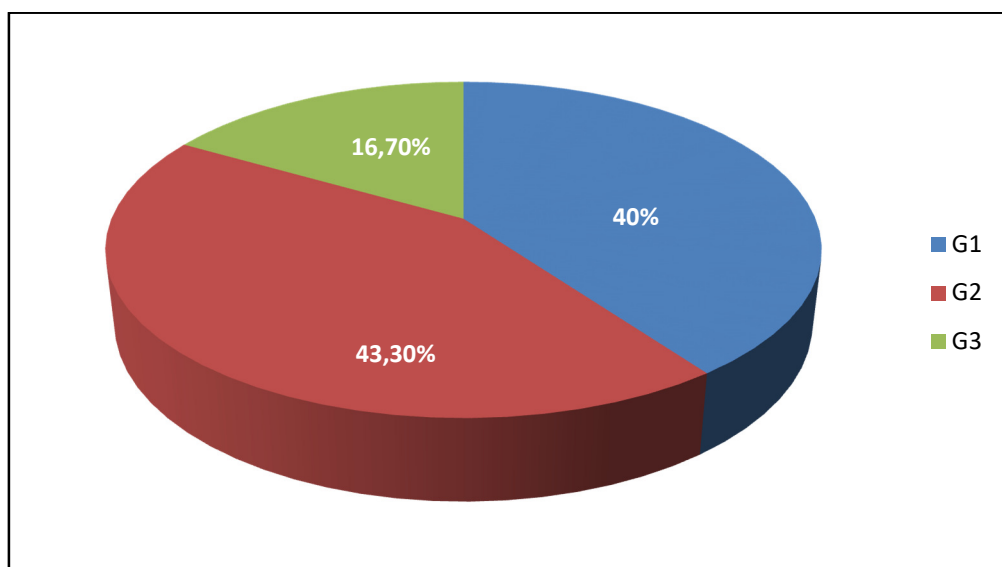


**Графикон 1.** Дистрибуција на примероците од пациентите со SCC на кожата според полот



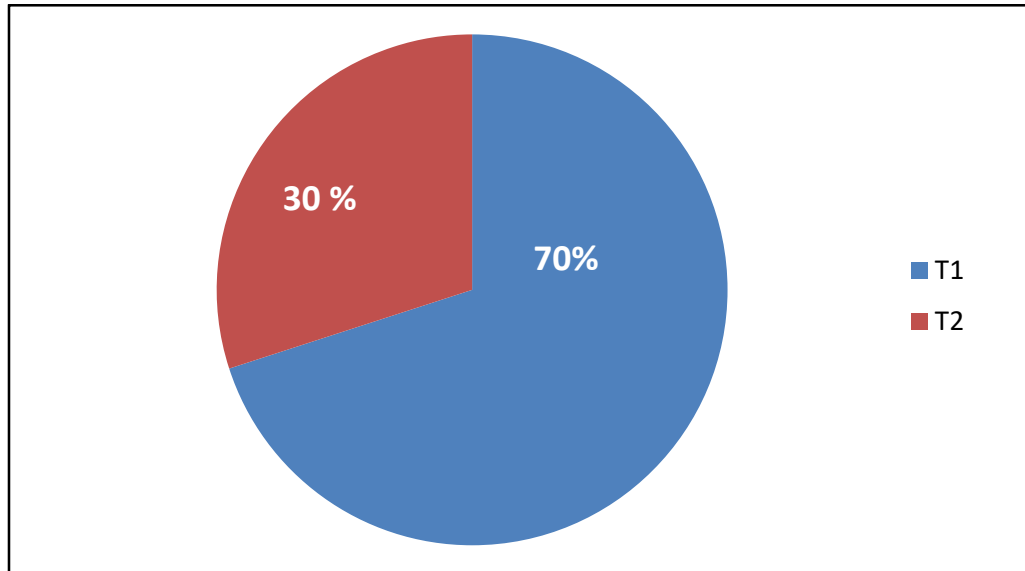
**Графикон 2.** Дистрибуција на примероците од пациентите со SCC на кожата според локализација

Од примероците на пациентите со SCC на кожата добро диференцирани карциноми (G1) биле 12 (40,0%), умерено диференцирани (G2) биле 13 (43,3%) а лошо диференцирани (G3) биле 5 (16,7%) (Графикон 3).



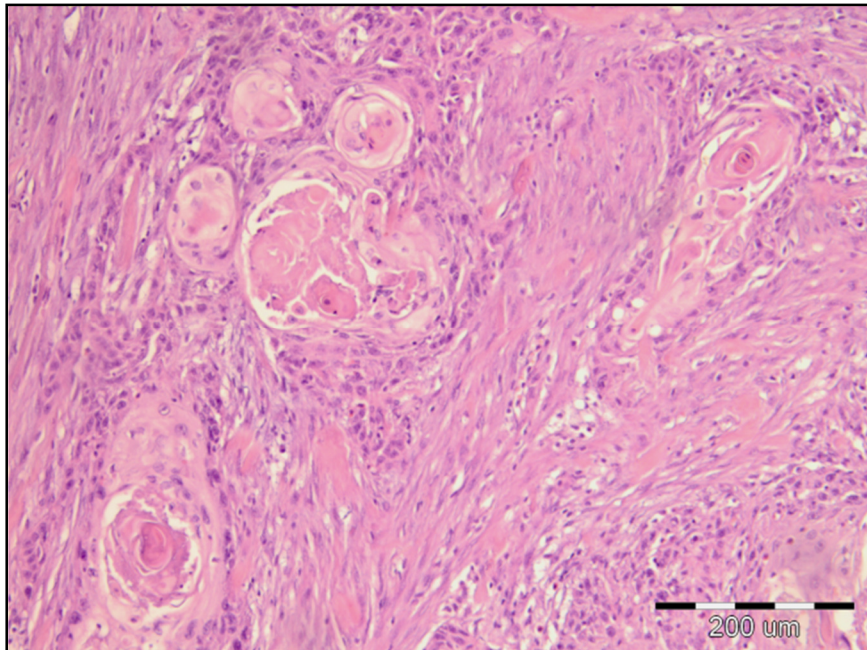
**Графикон 3.** Дистрибуција на примероците од пациентите со SCC на кожата според степенот на диференцираност на неоплазмите

Од вкупниот број примероци од пациентите со SCC на кожата, 21 (70%) биле со големина на неоплазмите помали од 2cm ( $T1 \leq 2$  cm) , а 9 (30,0%) биле со големина поголема од 2cm, ( $T2 > 2$  cm). (Графикон 4).

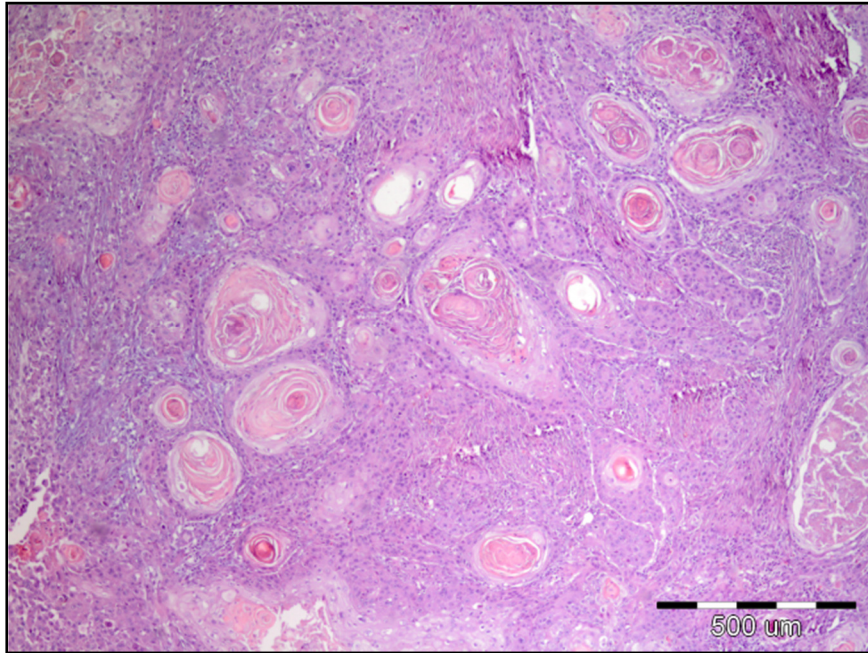


**Графикон 4.** Дистрибуција на примероците од пациентите со SCC на кожата според големината на неоплазмите

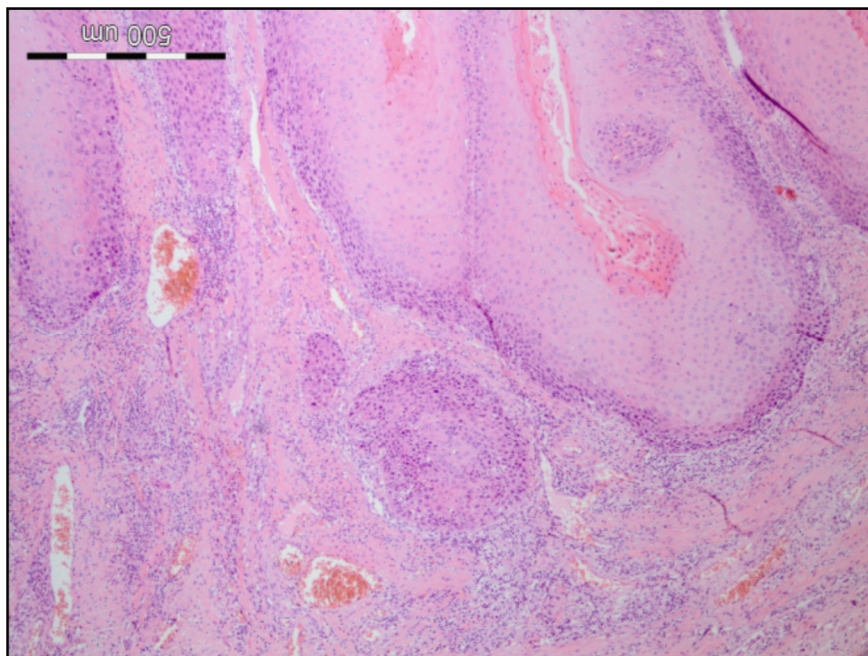
### **Добро диференциран плоскоцелуларен карцином на кожа (G 1)**



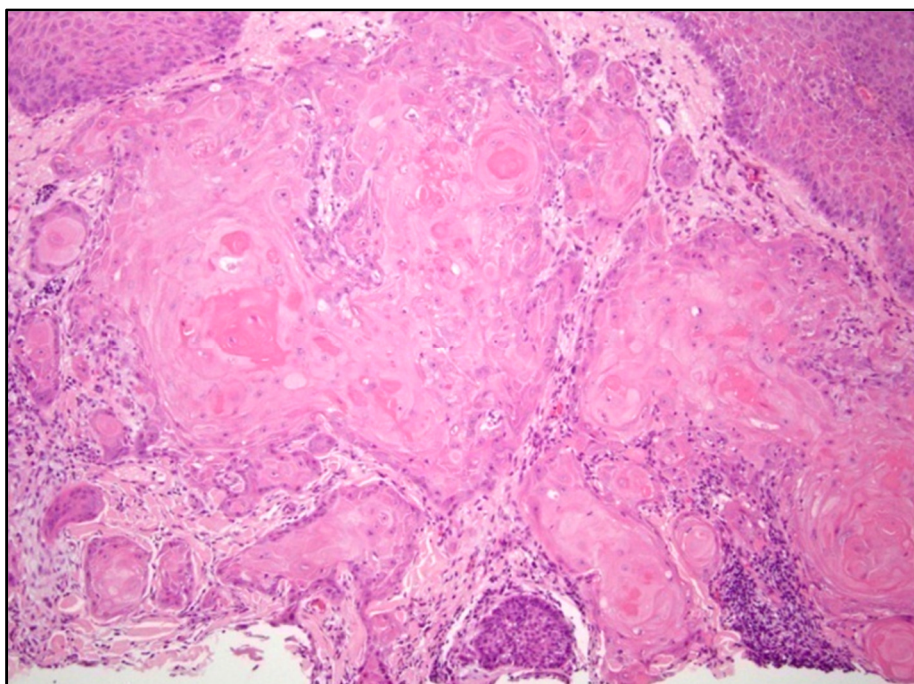
**Слика 1.** Присуство на островца со кератинизирани епителни клетки (орожненти перли) (HE 10x20)



**Слика 2.** Присуство на орожени перли во центарот на карциномските плажи (HE 10 x 4)

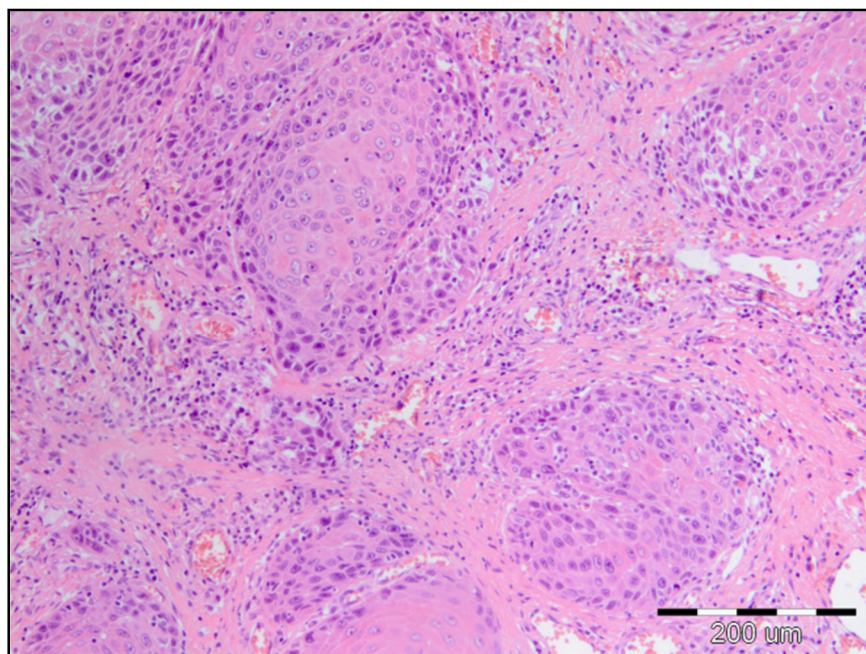


**Слика 3.** Верукозен тип на SCC на кожата (HE 10 x 4)



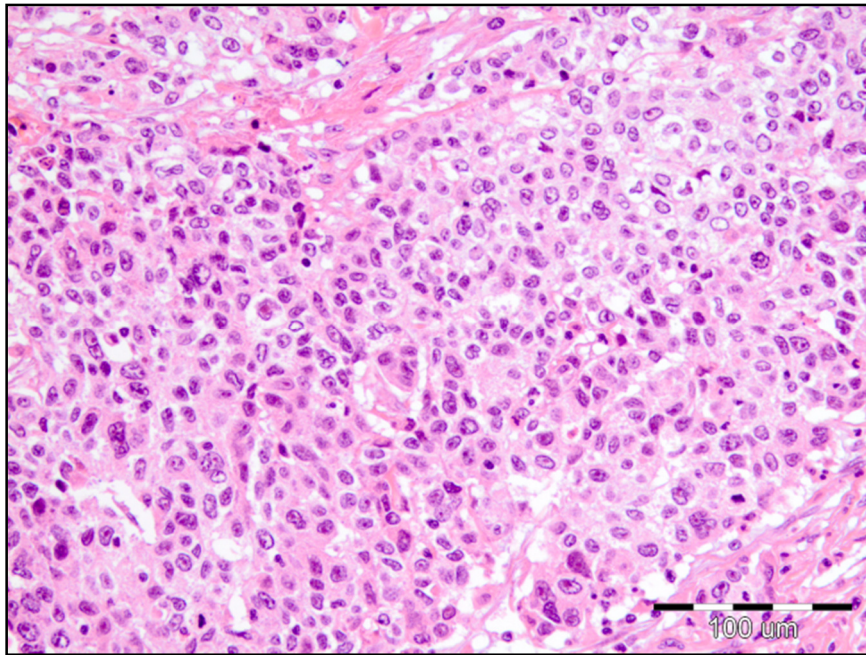
**Слика 4.** Присуство на обилна кератинизација (HE 10 x 4)

**Умерено диференциран планоцелуларен карцином на кожата (G2)**



**Слика 5.** Приказ на централно орожнети плажи (HE 10 x 20)

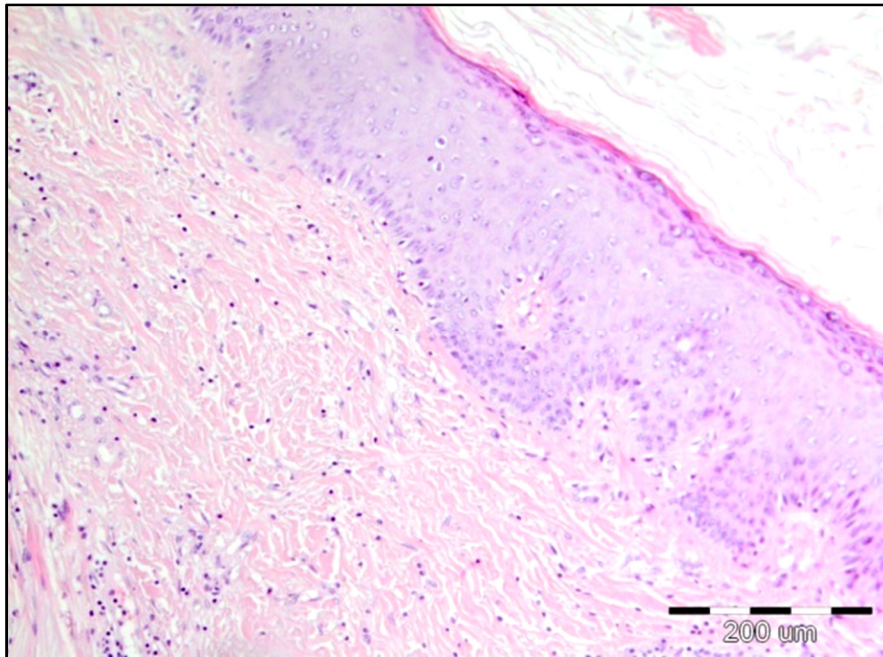




**Слика 6.** Присуство на маса од малигни клетки без орогнување (HE 10x 40)

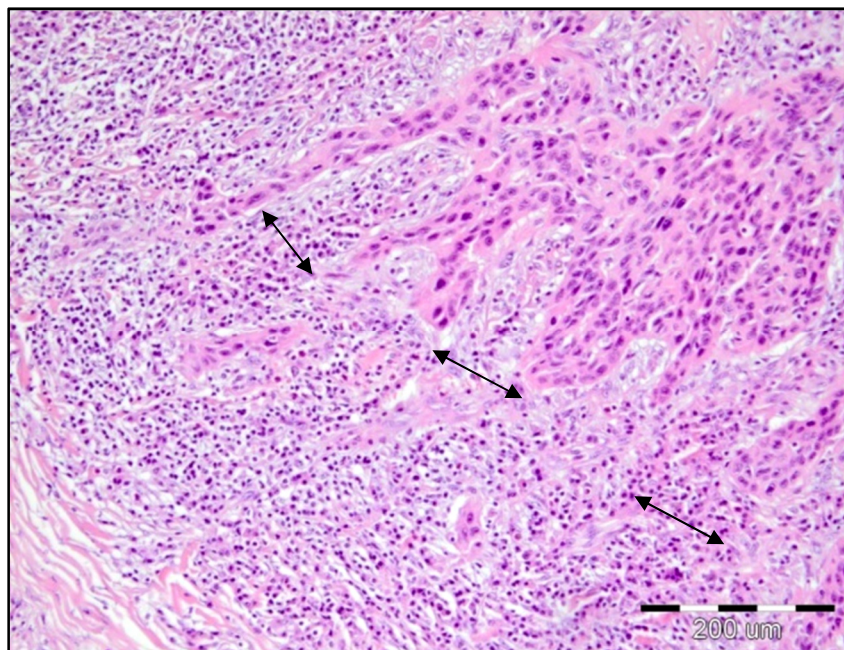
### **6.1.2. Длабочина на туморската инвазија**

Интактната базална мембрана е бариерата која попречува да се наруши нормалната структура на кожата при почеток на малигна алтерација на епидермисот. Туморската инвазија претставува продор на малигни клетки низ граничната базална мембрана кон стромата на дермисот. На слика бр. 7 е прикажана здрава кожа со јасна гранична линија меѓу епидермисот и дермисот.

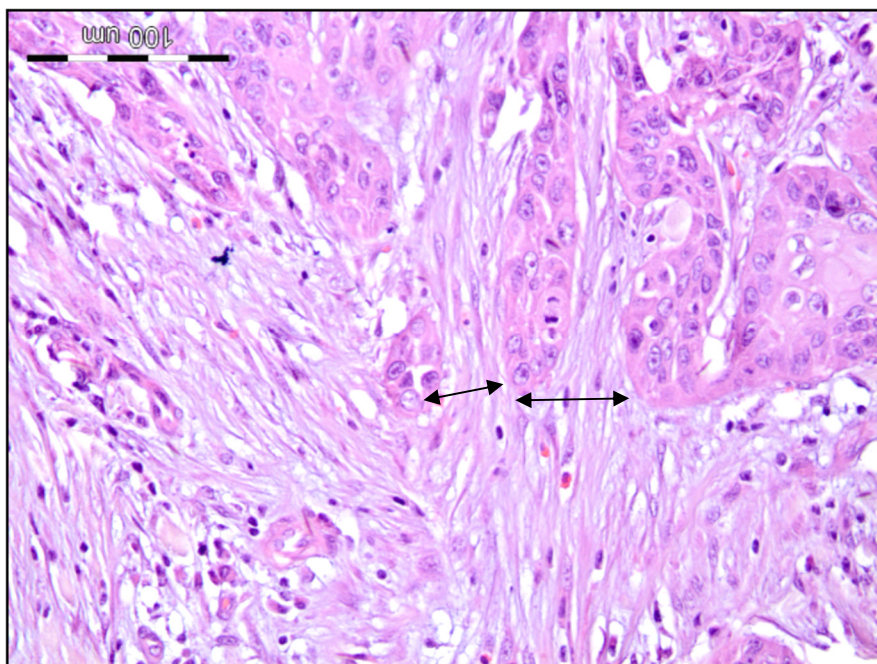


**Слика 7.** Приказ на хистолошката градба на нормална кожа (HE 10x 20)

Сликите 8 и 9 се приказ на инвазија на планоцелуларен карцином во подлабоките партии на дермисот, како резултат на пробивањето на бариерата - базалната мембрана.



**Слика 8.** Приказ на инвазивниот фронт и ширењето на малигните клетки во форма на ленти низ стромата кај SCC на кожата (HE 10 x 20)



**Слика 9**

**Слика 9.** Приказ на инвазивниот фронт и ширењето на малигните клетки во форма на ограничени гнезда, нишки низ стромата кај SCC на кожата (HE 10 x 40)

Од базата на нумерички податоци добиени од мерењата на длабочината на туморската инвазија во сите анализирани примероци од SCC на кожата ги добивме вредностите прикажани на Табела 1.

**Табела 1.** Просечна, минимална и максимална длабочина на туморската инвазија кај SCC на кожата во сите анализирани случаи.

	Просечна $\pm$ стандардна девијација	Минимална	Максимална
Длабочина на туморската инвазија ( $\mu\text{m}$ )	4991,7 $\pm$ 2741,9 $\mu\text{m}$	1561,2 $\mu\text{m}$	13000,1 $\mu\text{m}$

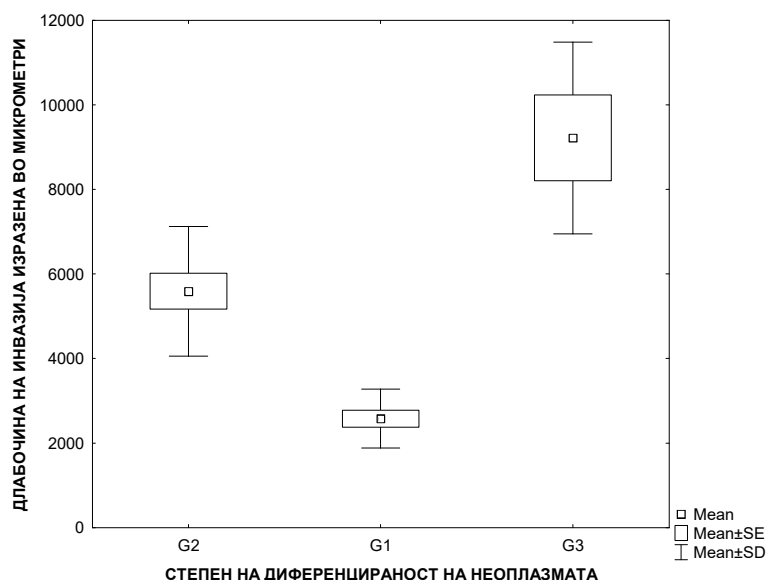
Кога податоците за длабочината на туморската инвазија ги систематизиравме според различниот степен на хистолошка диференцијација на неполазмите, утврдивме дека постојат значителни разлики во длабочината на туморската инвазијата. Добиените вредности се прикажани на Табела 2.

Од нив се воочува дека добро диференцираните SCC на кожата имаат и најмала длабочина на прогресија во подлежаќката строма и таа во нашиот материјал во просек изнесуваша  $2579,3 \pm 697,3 \mu\text{m}$ . Длабочината на туморската инвазија расте со опаѓањето на диференцираноста на туморското ткиво. Инвазијата достигнува значителна длабочина (во нашиот материјал:  $9219,9 \pm 2268,8 \mu\text{m}$ ) кај лошо диференцираните SCC на кожата.

**Табела 2.** Просечна длабочина на туморската инвазија кај SCC на кожа со различен степен на хистолошка диференцираност.

Степен на хистолошка диференцијација (G)	Број на примероци	Просечна длабочина на туморската инвазија ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD
G1	12	$2579,3 \pm 697,3$
G2	13	$5592,3 \pm 1532,5$
G3	5	$9219,9 \pm 2268,8$

За понатамошна анализа на добиените нумерички вредности, со цел да се утврди дали меѓу добиените различни вредности постои и статистичка сигнификантност, го применивме Kruskal-Wallis-ов статистички тест. Тој потврди дека различната длабочина на туморската инвазија утврдена кај неоплазмите со различен степен на хистолошка диференцијација е статистички значајна и изнесува  $p = 0.00008$  (Графикон 5).



Легенда: (G1)-добро диференциран карцином, (G2)-умерено диференциран карцином, (G3)- лошо диференциран карцином

**Графикон 5.** Споредба на длабочината на туморската инвазија кај планоцелуларните карциноми на кожата со различен степен на хистолошка диференцираност изведена со Kruskal-Wallis-овиот тест.

Податоците за длабочината на туморската инвазија ги систематизиравме и според туморскиот статус на испитуваните примероци од планоцелуларниот карцином на кожата. Според добиените податоци (презентирани во Табела 3), длабочината на туморската инвазија е значително помала кај неоплазмите со pT1 ( $T1 \leq 2$  cm) статус. Додека нејзината средна вредност изнесувала  $3957,5 \pm 1843,5$   $\mu\text{m}$ , кај неоплазмите со pT2 ( $T2 > 2$  cm) статус средната вредност на длабочината на туморската инвазија изнесувала  $7404,8 \pm 3066,0$   $\mu\text{m}$ .

**Табела 3.** Просечна длабочина на туморската инвазија кај примероците на SCC на кожата со различен туморскиот статус (pT1 и pT2)

Туморски статус на неоплазмата	Број на примероци	Просечна длабочина на туморската инвазија ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ CD
T1 ( $T1 \leq 2$ cm)	21	$3957,53 \pm 1843,46$
T2 ( $T2 > 2$ cm)	9	$7404,77 \pm 3066,00$

За понатамошна анализа на добиените нумерички вредности, со цел да се утврди дали меѓу добиените различни вредности за длабочината на туморската инвазија постои статистичка сигнификантност, го применивме Mann-Whitney статистичкиот тест. Тој потврди дека нумерички утврдената разликата во длабочината на туморската инвазија кај неоплазмите со различен туморски статус, е статистички значајна и изнесува  $p=0.0030$ , (Графикон 6).



Легенда: (pT1) големина на туморот помала или еднаква на 2cm ( $T1 \leq 2$  cm), (pT2) големина на туморот поголема од 2cm ( $T2 > 2$  cm)

**Графикон 6.** Споредба на длабочината на туморската инвазија кај планоцелуларните карциноми на кожата со различен pT статус, изведена со Mann-Whitney статистичкиот тест

### 6.1.3. Васкуларна густина во стромата на инвазивниот фронт

#### Визуелизација на крвните садови во дермисот по примена на имунохистохемиски бојења

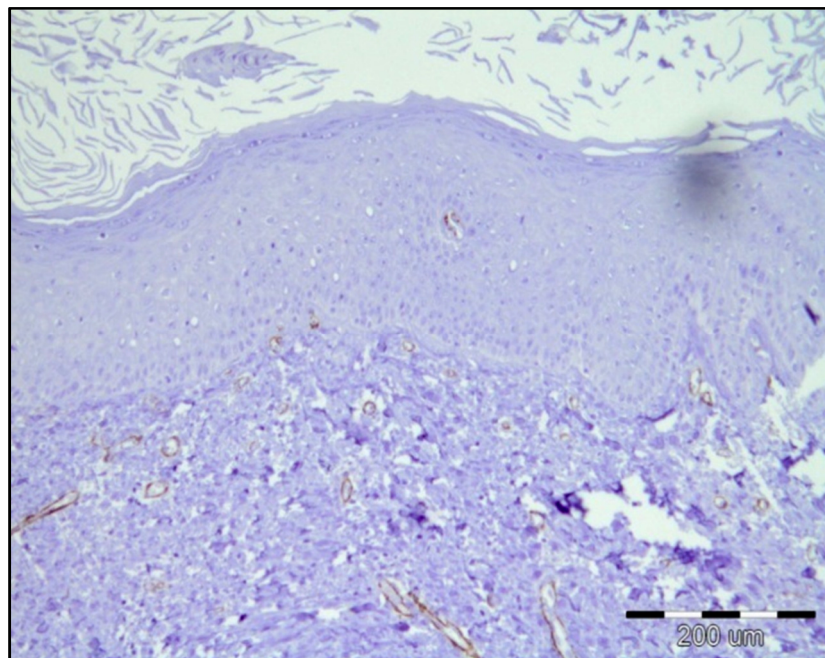
Имунохистохемиското бојење на хистолошките препарати со антитело против CD 34 овозможи визуелизација на крвните садови, како во туморската строма, така и во стромата на нормалната кожа (Слика 10). Со ова бојење, ендотелните клетки на крвните садови и пупките од ендотелни клетки вклопени во стромата се прикажуваат кафено обоени (Слика 13,14,15,16).

Со примена на имунохистохемиското бојење со антитело против alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA се прикажуваат мазните мускулни клетки во сидовите на крвните садови, кафено обоени. Освен крвните садови, со оваа метода кафено се бојат и карцином асоцираните фибробласти (CAF), односно

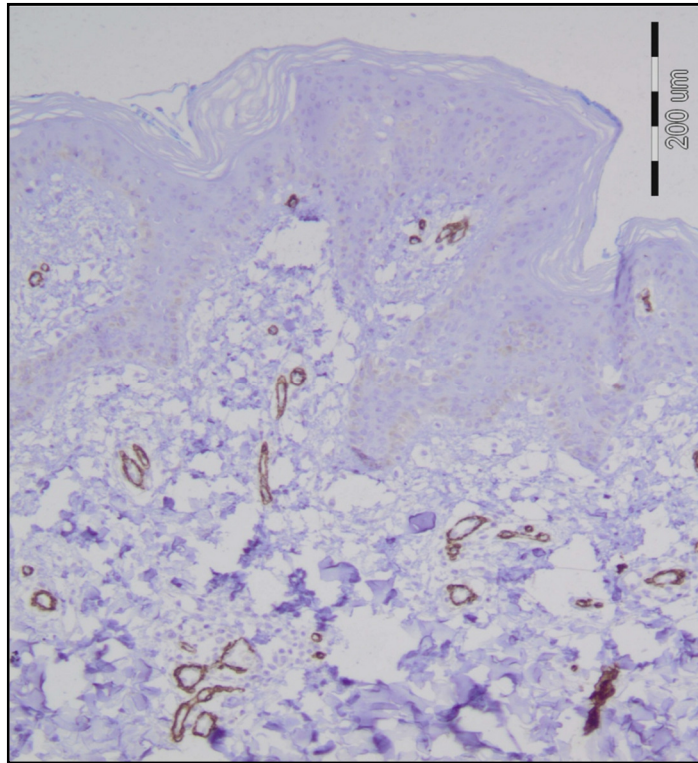
миофибробластите во туморската строма. Миофибробластите се значајна компонента во туморската строма (инвазивниот фронт) на планоцелуларниот карцином и се силен предиктор за инвазивноста и пролиферацијата на карциномот, па затоа се обилно застапени кај умерено и лошо диференцираните планоцелуларни карциноми.

Препознавањето на крвните садови со оваа метода на боене е возможно само доколку нема значително присуство на карцином асоцирани фибробласти (миофибробласти) чие зголемено присуство ги маскира крвните садови (Слика 18 и 19). Оттука произлегува дека имунохистохемиското боене со антитело против  $\alpha$ -SMA не е погодно за визуелизација на крвните садови, но е корисно за визуелизација на миофибробластите во инвазивниот фронт на планоцелуларниот карцином на кожата и долната усна.

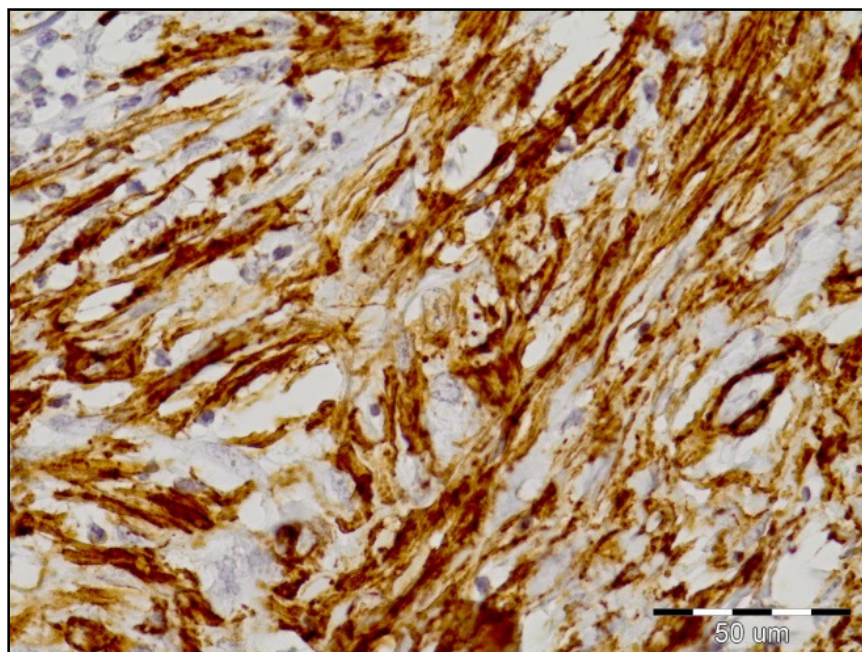
За разлика од хистопатолошките препарати, на хистолошките препарати од нормалната кожа и долна усна боени со антитело против  $\alpha$ -SMA крвните садови се јасно видливи, што се должи на отсуството на CAF (Слика 11).



**Слика 10.** Приказ на нормална кожа со имунохистохемиско боене (со антитело против CD34). Во дермис се забележуваат ретки издолжени крвни садови кафено пребоени (10 x 20)



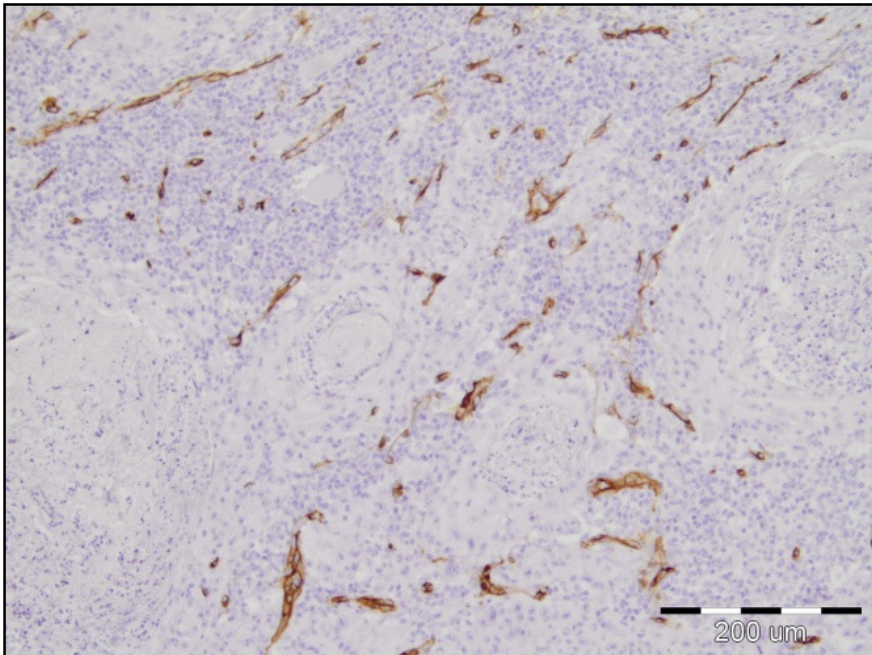
**Слика 11.** Приказ на нормална кожа со имунохистохемиско боеење со (антитело против alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA). Во дермис се забележуваат издолжени крвни садови кафено пребоени заради присуство на мазен мускулен актин во мускулните клетки во сидот на големите крвни садови (10 x 20).



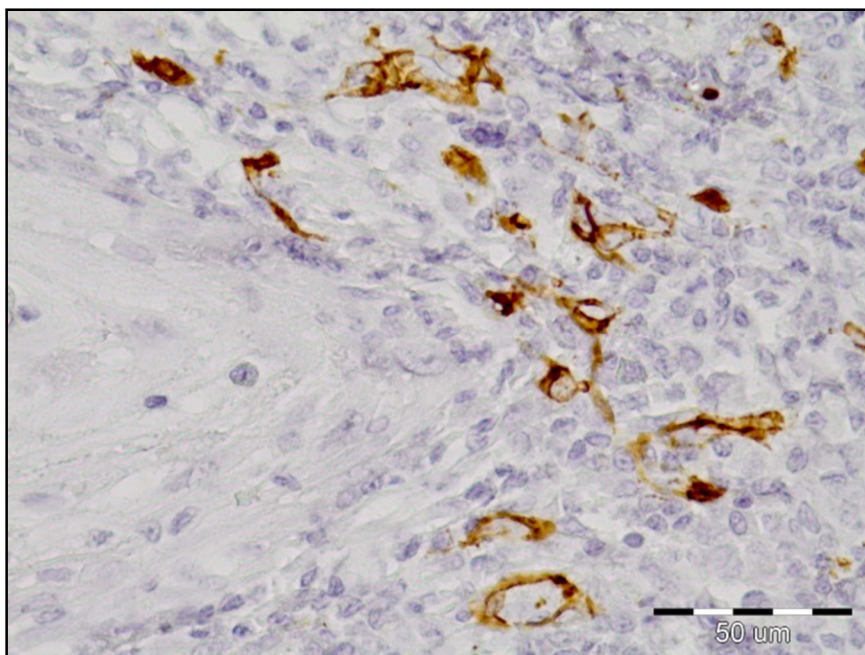
**Слика 12.** Умерено диференциран планоцелуларен карцином. Инвазивниот фронт боен со антитело против alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA (10 x 40). Тумор асоцираните миофибробласти ја маскираат ангиогенезата.



**Кај добро диференциран планоцелуларен карцином на кожата (G1)  
прикажани на различно зголемување на објективот**

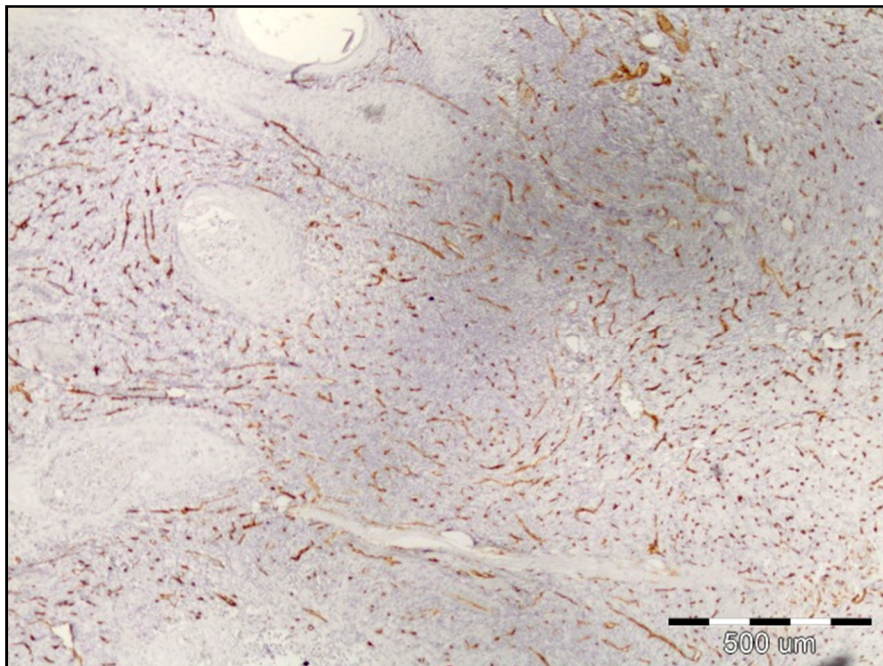


**Слика 13.** Визуелизација на васкуларните простори со антитело против CD34 (10 x 20). Јасно се видливи васкуларните простори кафено пребоени

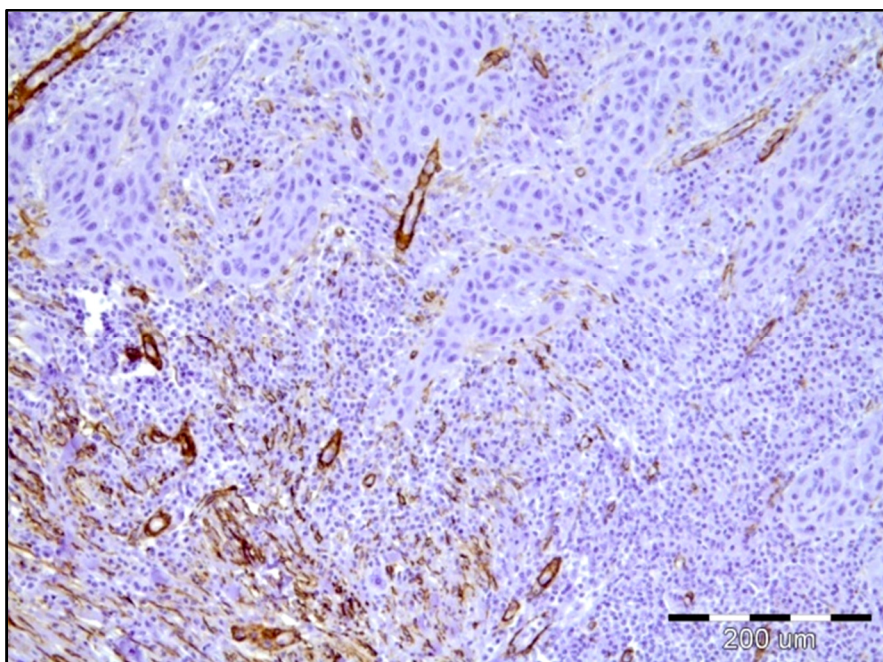


**Слика 14.** Визуелизација на васкуларните простори со антителото против CD34, во инвазивниот фронт (10 x 100) со јасно видливи лумени

**Кај умерено диференциран планоцелуларен карцином на кожата (G2)  
прикажани на различно зголемување на објективот**

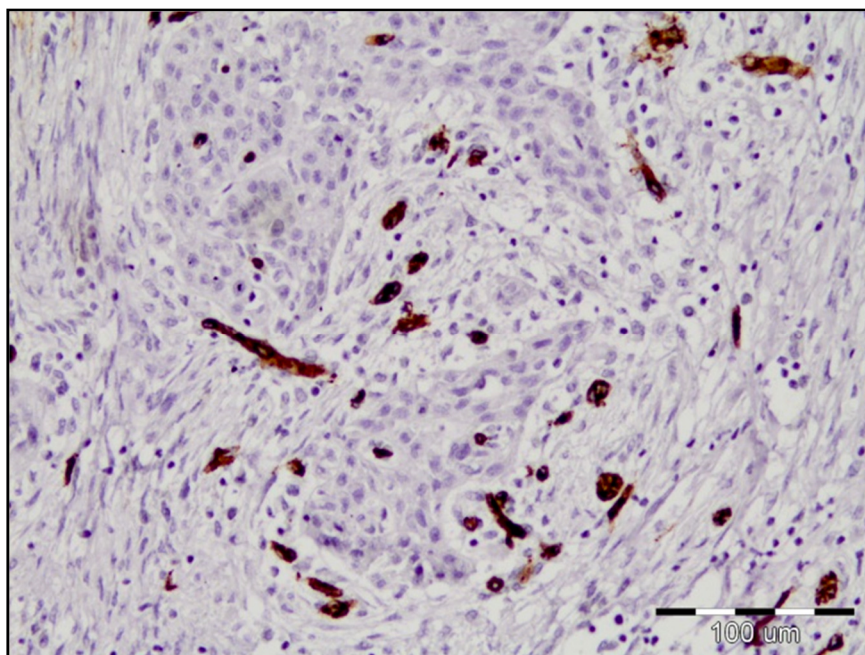


**Слика 15**

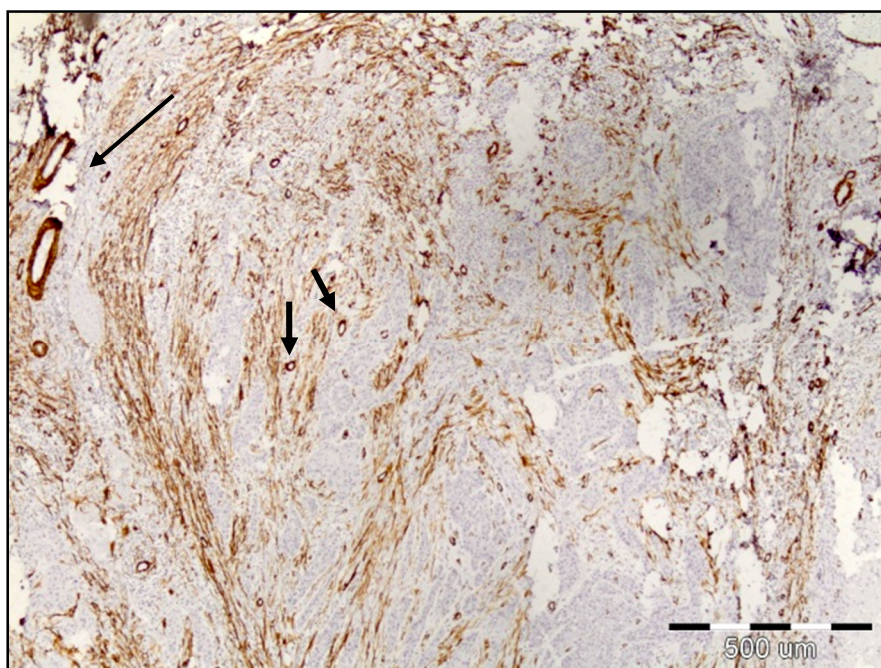


**Слика 16**

**Слика 15 и 16.** Приказ на васкуларната густина со антителото против CD34  
(10 x 4, 10x20).

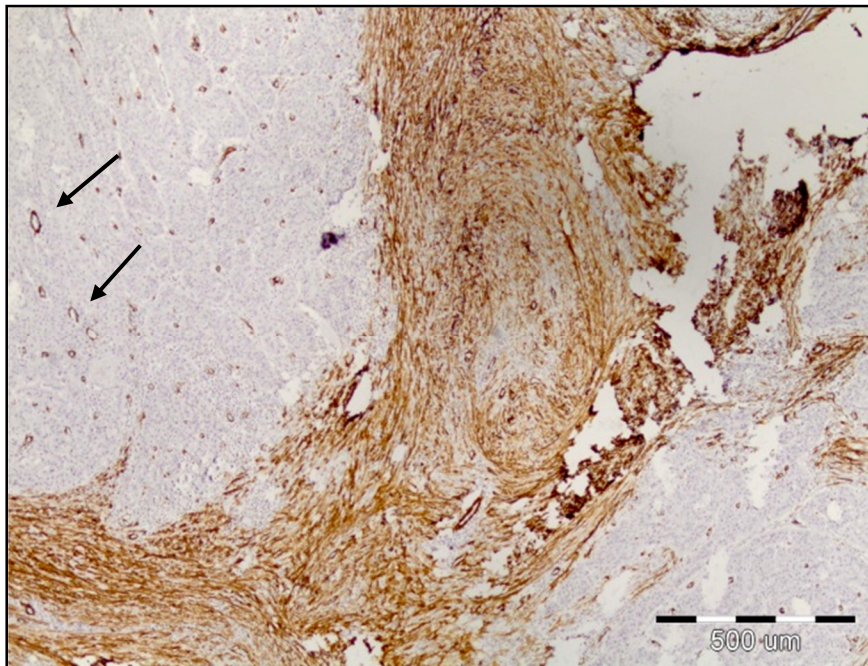


**Слика 17.** Варијација во васкуларната густината. Видно поле со помалку изразена густина на васкуларни простори (CD34 10 x 40)



**Слика 18.** Приказ на инвазивниот фронт кај SCC на кожа со  $\alpha$ -SMA (10 x 4). Јасно се визуелизирани малите артериски крвни садови присутни во левиот горен дел на сликата.

## Кај лошо диференциран планоцелуларен карцином на кожата (G3)



**Слика 19.** Приказ на инвазивниот фронт кај лошо диференциран SCC на кожа со  $\alpha$ -SMA (10 x 4). Васкуларните простори тешко се препознаваат за разлка од горниот левиот агол на сликата.

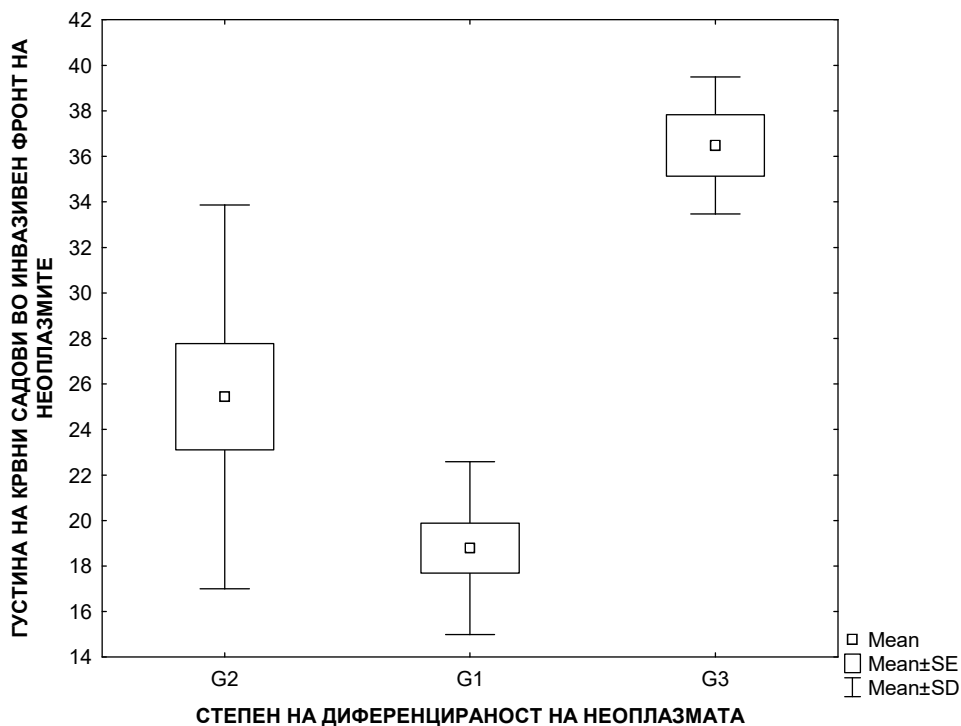
Резултатите од определувањето на васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт кај SCC на кожата, се прикажани на следните две табели. Во Табела 4. тие се систематизирани во групи, според степенот на диференцираноста на неоплазмата. Овие нумерички податоци покажаа дека бројот на воочените крвни садови во стромата на инвазивниот фронт е најмал кај добро диференцираните SCC на кожата. Кај умерено диференцираните тумори бројот на крвните садови во стромата на инвазивниот фронт е поголем а најголема васкуларна густина постои кај лошо диференцираните SCC на кожата.

**Табела 4.** Васкуларна густина во стромата на инвазивниот фронт кај неоплазмите (SCC на кожата) со различен степенот на хистолошка диференцијација

Степен на хистолошка диференцијација (G)	G1	G2	G3
*Вкупен број на крвни садови	187,9 ± 37,9	256,6 ± 83,3	364,8 ± 30,1
Минимален број на крвни садови	13	15	17
Максимален број на крвни садови	25	33	39
Просечен број на крвни садови ± SD	<b>18,8 ± 3,8</b>	<b>25,4 ± 8,4</b>	<b>36,5 ± 3,0</b>

(\*) Го одразува просечниот број на крвни садови од вкупно изброените во сите примероци, во по 10 последователни видни полиња.

Добиените податоци од мерењата, статистички ги анализиравме со тестот на Kruskal-Wallis кој утврди сигнификантност од  $p=0.0003$ . Тоа покажа дека нумерички утврдената разликата во густина (бројот) на крвните садови во стромата на инвазивниот фронт кај туморите со различен степен на диференцијација, не се должи на случајност, туку е статистички значајна (Графикон 7).



Легенда: (G1)-добро диференциран карцином, (G2)-умерено диференциран карцином,  
(G3) - лошо диференциран карцином

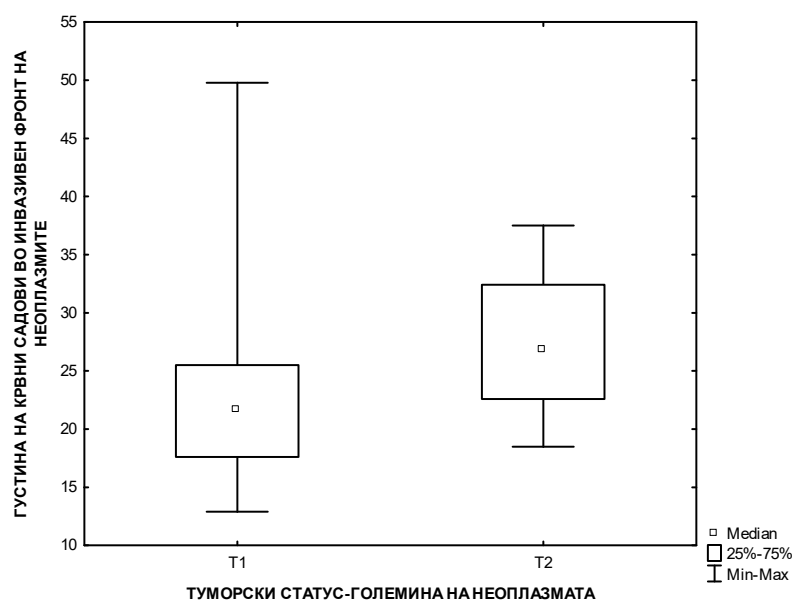
**Графикон 7.** Споредба на густината на крвните садови во инвазивниот фронт на неоплазмата кај карциномите на кожата со различен степен на хистолошка диференцираност, изведена со Kruskal-Wallis-овиот тест.

Во Табела 5. ги презентираме вредностите за васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт кај SCC на кожата, систематизирани според pT статусот на неоплазмата. Нумеричките податоци покажуваат дека туморите со pT1 ( $T_1 \leq 2$  cm), имаат помала васкуларната густина во инвазивниот фронт на неоплазмата. Меѓутоа, понатамошната анализа со Mann-Whitney тест покажа несигнификантна вредност ( $p=0.153993$ ) односно, дека најдената разлика во бројот (густината) на крвните садови кај неоплазмите со pT1 ( $T_1 \leq 2$  cm) и pT2 ( $T_2 > 2$  cm) статус не е значајна и се должи на случајност (Графикон 8).

**Табела 5.** Васкуларна густината во стромата на инвазивниот фронт кај неоплазмите со SCC на кожата со различен pT статус (pT1 и pT2)

Туморски статус на неоплазмата	pT1 (T1 ≤ 2 cm)	pT2 (T2 > 2 cm)
*Вкупен број на крвни садови ± SD	237,2 ± 92,5	270,3 ± 68,3
Минимален број на крвни садови	14	14
Максимален број на крвни садови	29	33
Просечен број на крвни садови ± SD	<b>23,6 ± 9,3</b>	<b>26,9 ± 6,9</b>

(\* ) Го одразува просечниот број на крвни садови од вкупно изброените во сите примероци, во по 10 последователни видни полиња.



Легенда: (pT1) големина на туморот помала или еднаква на 2cm (T1 ≤ 2 cm), (pT2) на туморот поголема од 2cm (T2 > 2 cm)

**Графикон 8.** Споредба на васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт кај карциномите на кожата со различен pT статус, изведена со Mann-Whitney тестот

За поточно да се вреднуваат добиените сознанија и да се добие јасна слика каква и колкава е таа промена на васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт во однос на здравата кожа, ги прикажуваме добиените податоци од мерењата изведени кај контролните примероци (здрава кожа). Табелата бр.6 ги содржи вредностите на васкуларната густина определена во околната здрава кожа.

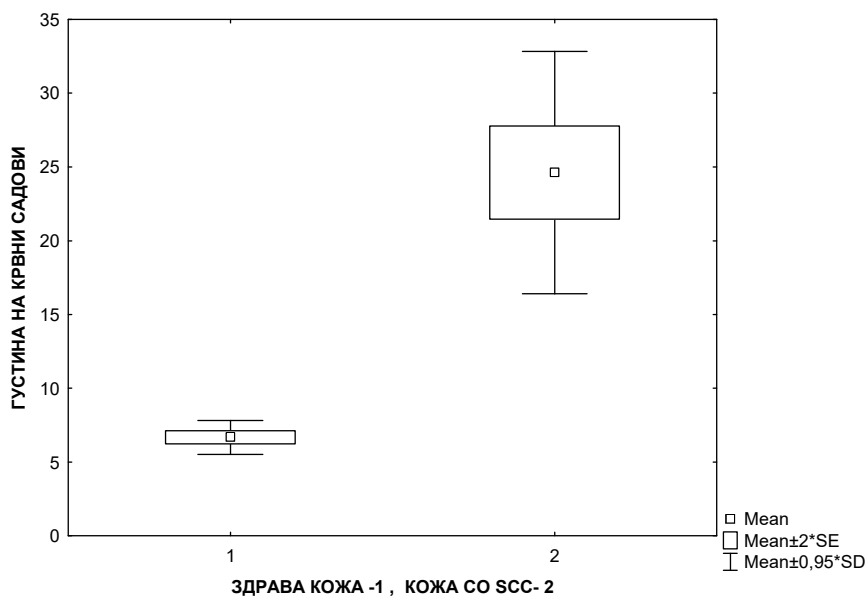
**Табела. 6.** Васкуларна густина во стромата под епидермисот кај здравата околна кожа

Крвни садови параметар	Дермис на здрава кожа
*Вкупен број на крвни садови $\pm$ СД	65.4 $\pm$ 8,2
Минимален број на крвни садови	4
Максимален број на крвни садови	10
Просечен број на крвни садови $\pm$ СД	<b>6.7 <math>\pm</math> 1,2</b>

(\*) Го одразува просечниот број на крвни садови од вкупно изброените во сите примероци, во по 10 последователни видни полиња.

За да утврдиме што значи нумеричката разлика меѓу бројот на крвните садови во нормалната кожа и во инвазивниот фронт на неоплазмите, го применивме Mann-Whitney тестот со кој ги споредивме вредностите од нормалната кожа со вредностите од целата група SCC на кожата. Оваа статистика споредба е прикажана на Графикон 9. Mann-Whitney тестот покажува дека меѓу васкуларната густина во двете групи постои високо сигнификантна разлика за  $p=0.0000001$ . Со тоа утврдивме дека, во однос на здравата кожа, кај неоплазмите како резултат на интензивниот процес на неоваскуларизација, во стромата на инвазивен фронт се формирале многубројни нови крвни садови.

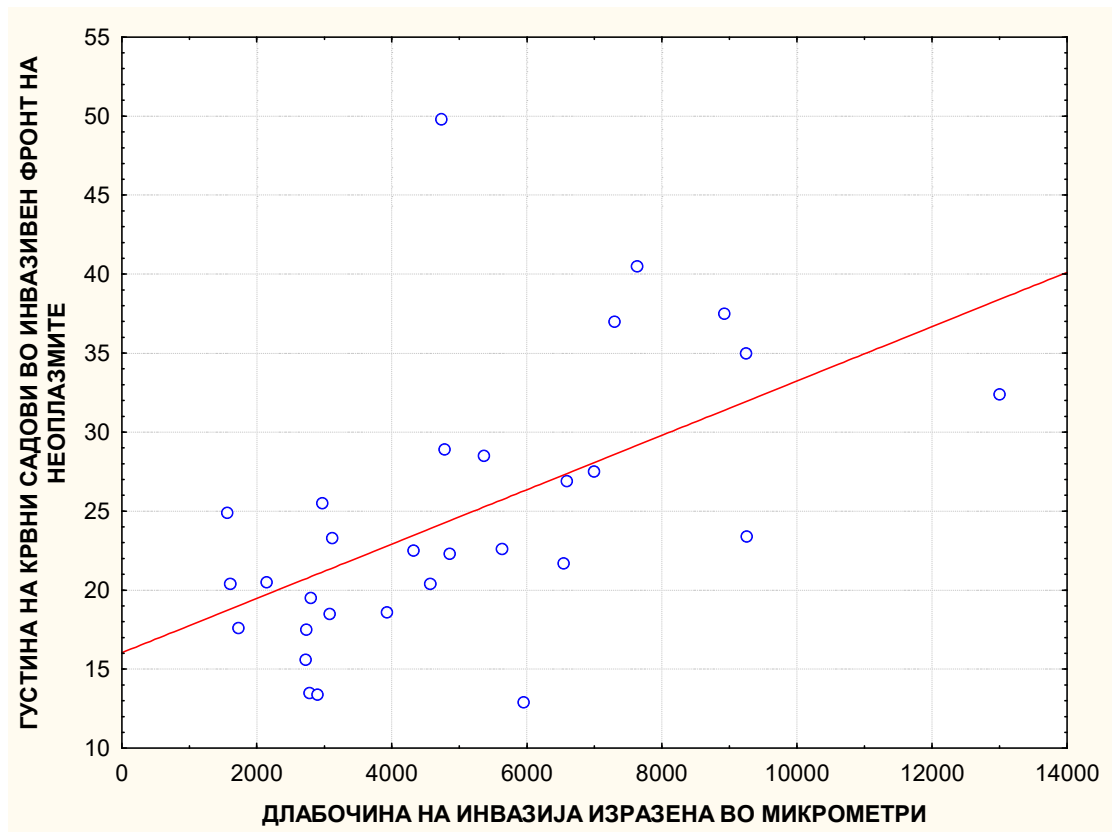




Легенда :1-здрава кожа, 2-кожа со SCC

**Графикон 9.** Споредба меѓу васкуларната густина во субепидермалната строма на нормална кожа и во стромата на инвазивниот фронт кај целата група SCC на кожата, изведена со Mann-Whitney тестот

Дали и каква корелација постои меѓу длабочината на туморската инвазија и густината на неоваскуларизацијата во инвазивниот фронт, истражувавме применувајќи го тестот Spearman Rank Order Correlations. Тој покажа статистички високо значајна позитивна корелација ( $r=0,5455$ ,  $p=0,00018$ ) меѓу овие два квалитети на туморскиот раст (Графикон 10). Со други зборови, кај анализираната група на неоплазми со SCC на кожата прогредирањето на туморскиот процес (изразено преку длабочината на инвазивниот фронтот) истовремено го следи и интензивна неоваскуларизација т.е. зголемување на бројот на нови крвни садови во туморската строма.

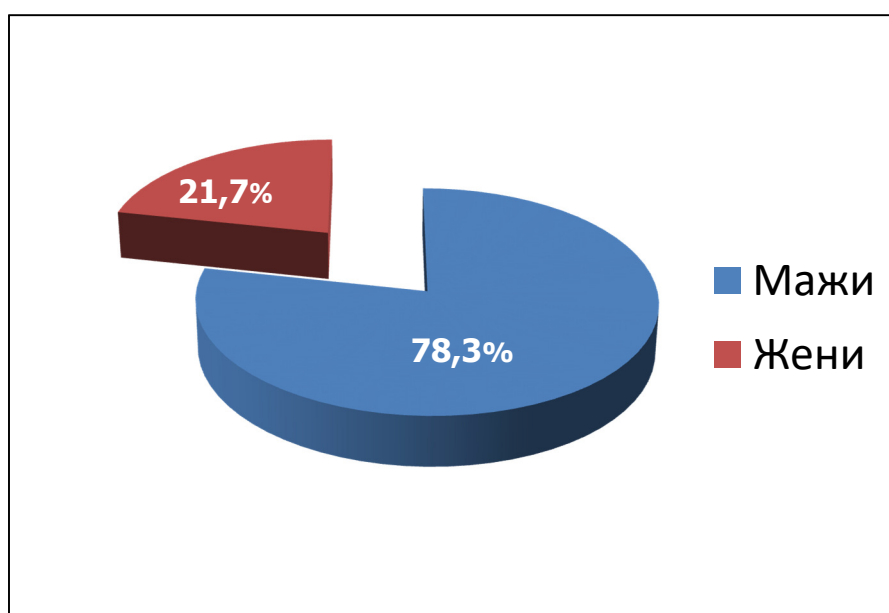


**Графикон 10.** Споредба на длабочината на туморската инвазија и васкуларната густина во инвазивниот фронт кај SCC на кожата изведена со Spearman Rank Order Correlations тест

## **6.2. ПЛАНИЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ НА ДОЛНА УСНА**

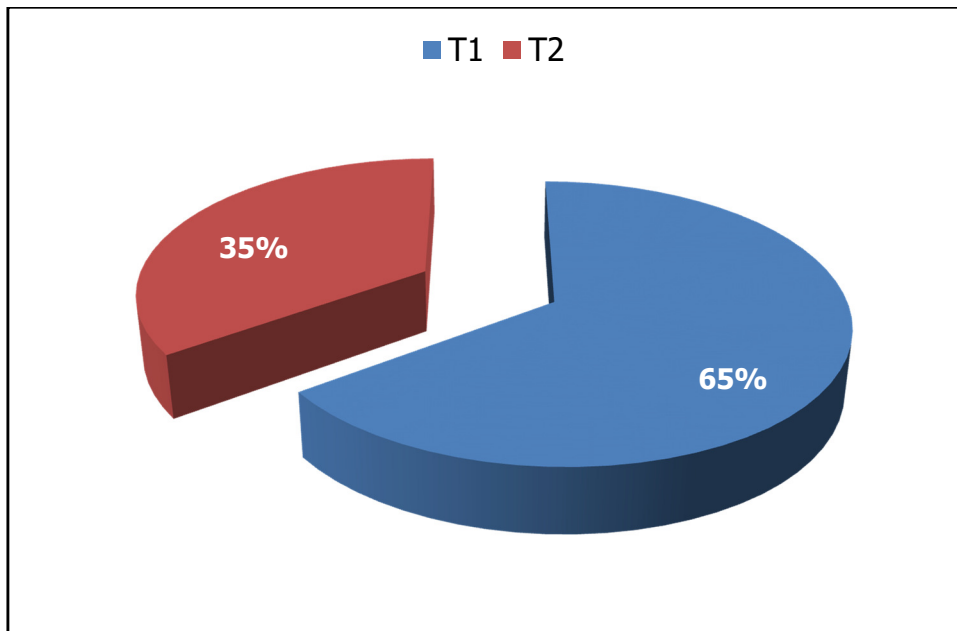
### **6.2.1. Податоци од хистопатолошките рапорти**

Од вкупно 60 анализирани испитаници, 13 случаи (21,7%) беа од женски пол, на возраст од 65-75 години, со просечна старост од  $70,2 \pm 2,9$  години, а 47 случаи (78,3%) беа испитаници од машки пол на возраст од 41-78 години, со просечна старост од  $66,4 \pm 8,5$  години. (Графикон 1).

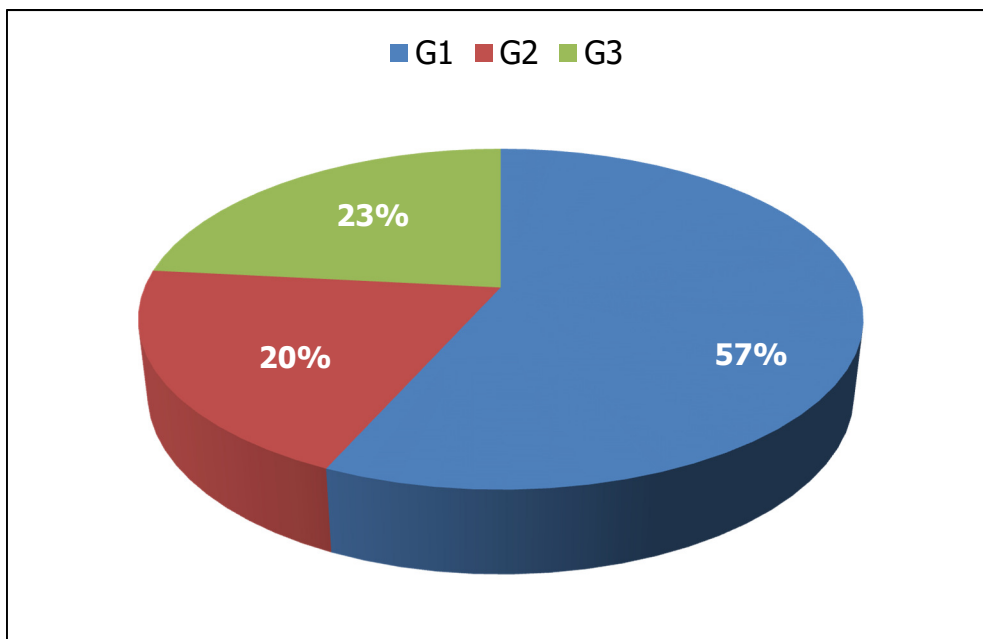


**Графикон 1.** Дистрибуција на испитаниците по пол

Во однос на pT статусот 39 случаи (65%) беа со pT1 и 21 случаи (35%) со pT2 статус (Графикон 2). Во анализираната серија 34 (56,7%) случаи беа со G1 диференцираност на неоплазмата, 12 (20%) случаи со G2 (умерено диференцирани неоплазми) и 14 (23,3%) случаи со G3 (лошо диференцирани неоплазми) (Графикон 3).

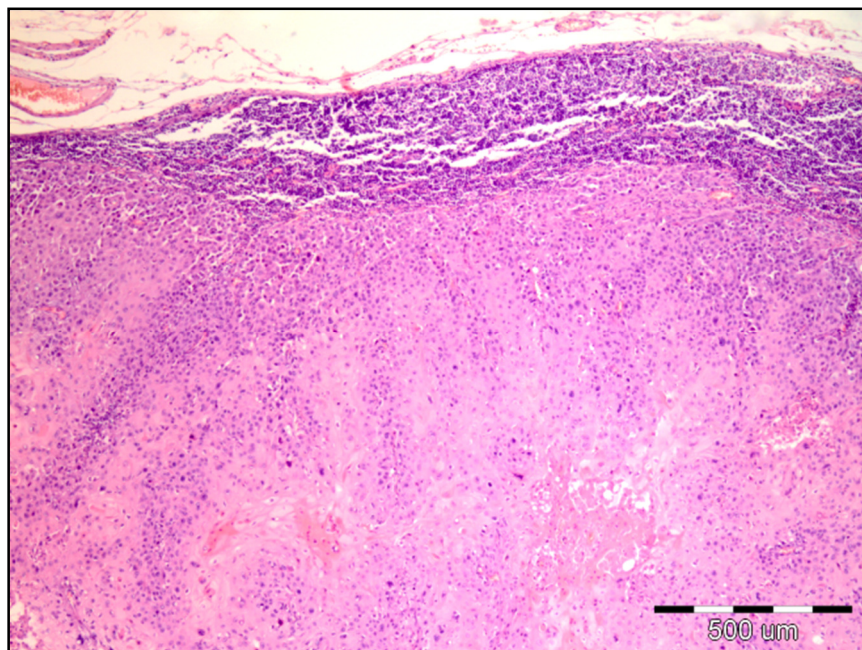


**Графикон 2.** Дистрибуција на примероците од пациентите со SCC на долна усна според големината на неоплазмите

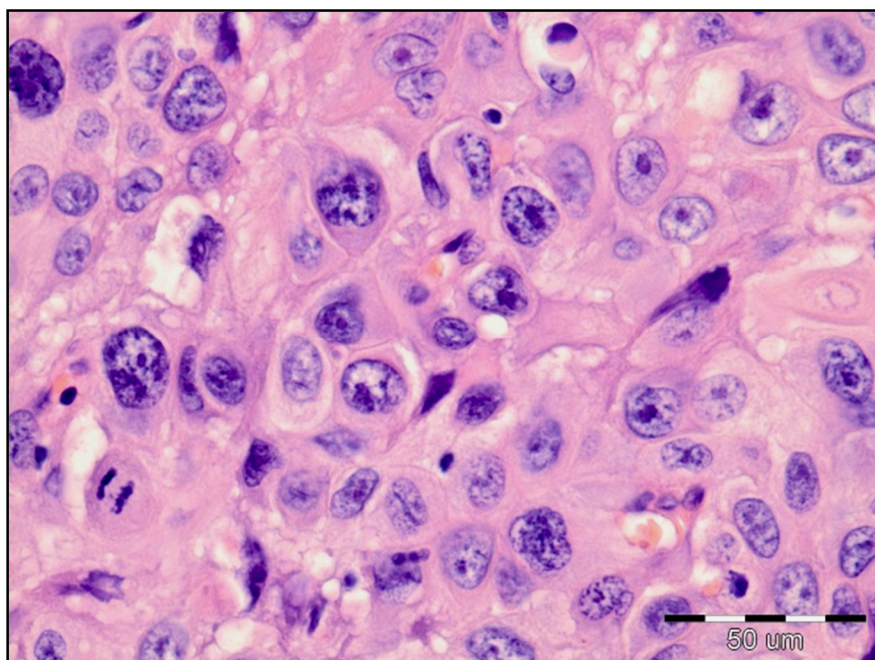


**Графикон 3.** Дистрибуција на примероците од пациентите со SCC на долна усна според степенот на диференцираност на неоплазмите

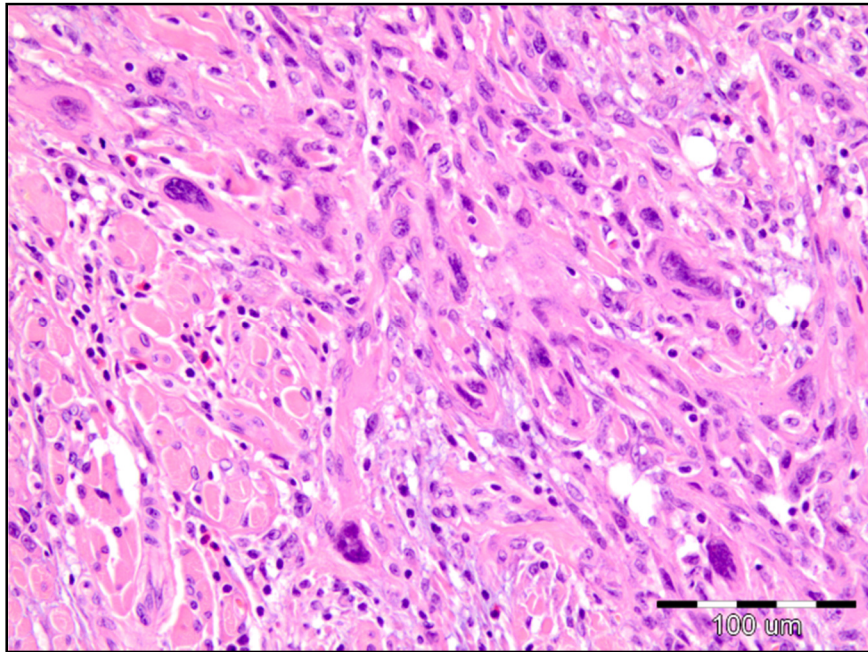
**Лошо диференциран планоцелуларен карцином на долната усна  
(степен на диференцијација G3)**



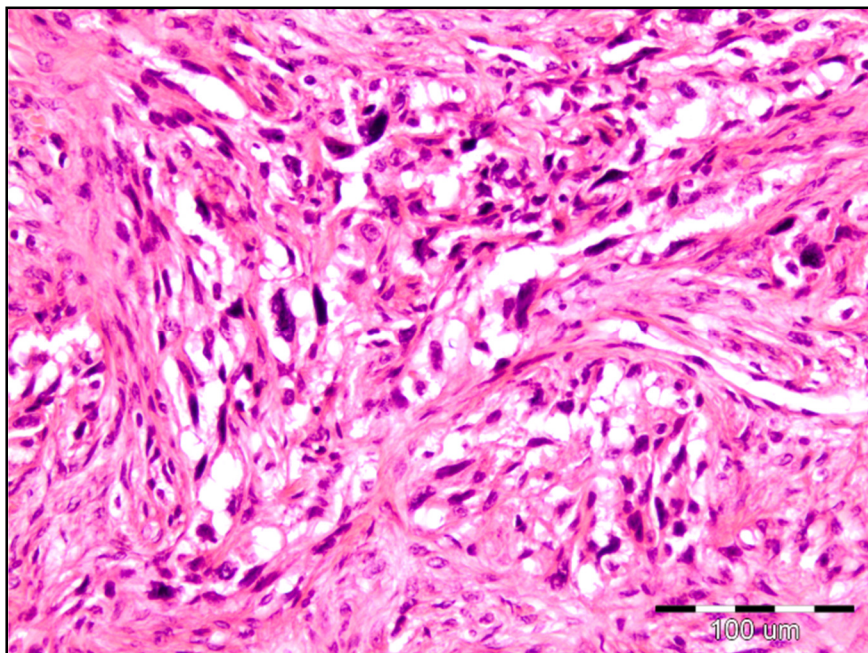
**Слика 1.** Интензивна туморска инвазија во стромата; присутна круста на површината формирана на местото на улцерацијата на туморската маса (HE 10 x 4)



**Слика 2.** Присуство на малигни клетки со обилна еозинофилна цитоплазма, со големи везикуларни јадра со проминентни јадренца, дел се хиперхроматични, покажуваат дискератоза и бројни митози. (HE 10x 100)



**Слика 3.** Приказ на инвазивниот фронт и ширењето на малигните клетки во форма на ленти низ стромата на долна усна (HE 10x 40)



**Слика 4.** Приказ на инвазивниот фронт и ширењето на малигните клетки формирајќи ограничени гнезда, нишки низ стромата на долна усна (HE 10x 40)

## 6.2.2. Длабочина на туморската инвазија

Од базата на нумерички податоци добиени од мерењата на длабочината на туморската инвазија во сите анализирани примероци од SCC на долната усна ги добивме вредностите прикажани на Табела 1.

**Табела 1.** Просечна, минимална и максимална длабочина на туморската инвазија кај SCC на долна усна во сите анализирани случаи.

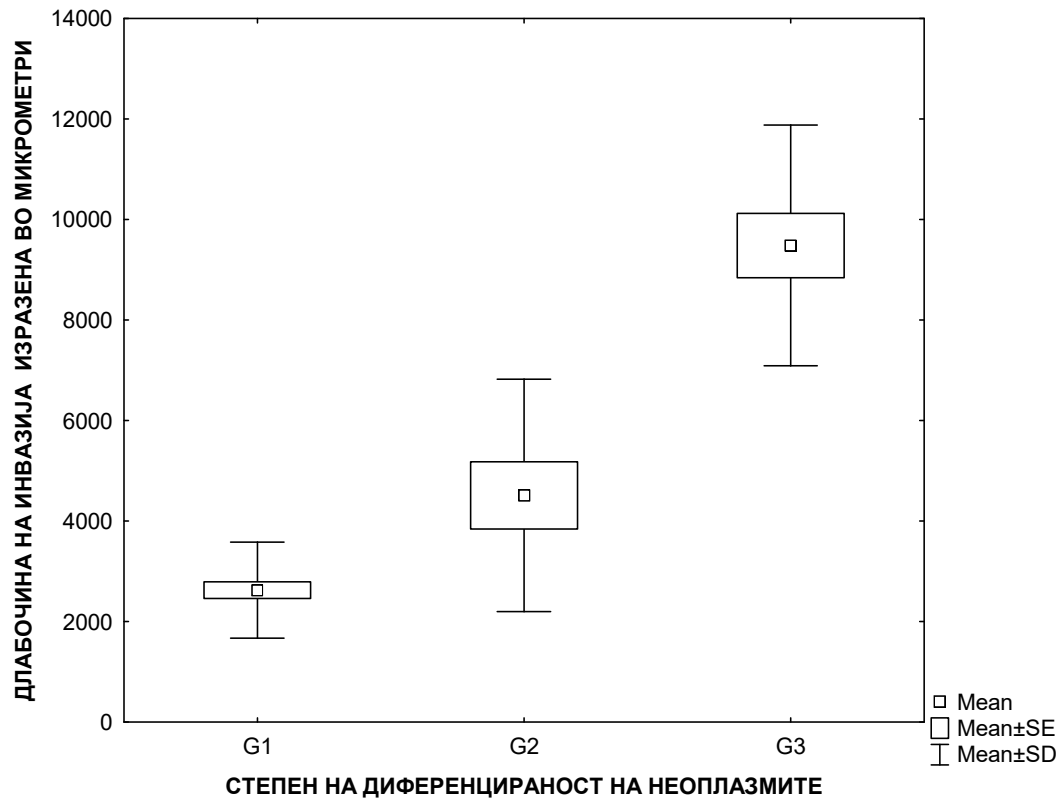
	Просечна $\pm$ SD	Минимална	Максимална
Длабочина на туморската инвазија ( $\mu\text{m}$ )	4603,3 $\pm$ 3267,6 $\mu\text{m}$	1341,3 $\mu\text{m}$	14105,6 $\mu\text{m}$

Кога податоците за длабочината на туморската инвазија ги систематизиравме според различниот степен на диференцијација на неполазмите, утврдивме дека постојат значителни разлики во длабочината на туморската инвазијата. Добиените вредности се прикажани на табела 2. Од нив се воочува дека најмала, односно најплитка стромална инвазија била измерена во групата на добро диференцираните (G1) планоцелуларни карциноми на долната усна и таа во нашиот материјал во просек изнесуваша 2626,31  $\pm$  955,7  $\mu\text{m}$ . Длабочината на туморската инвазија расте со опаѓањето на диференцираноста на туморското ткиво. Инвазијата достигнува значителна длабочина (во нашиот материјал: 9483,9  $\pm$  2396,2  $\mu\text{m}$ ) кај лошо диференцираните SCC на кожата (G3).

**Табела 2.** Длабочина на туморската инвазија кај SCC на долната усна кај тумори со различна хистолошка диференцијација

Степен на хистолошка диференцијација (G)	Број на примероци	Просечна длабочина на туморската инвазија ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Минимална вредност	Максимална вредност
G1	34	2626,3 $\pm$ 955,7	1341,3	5713,8
G2	12	4510,8 $\pm$ 2310,5	1718,9	8012,6
G3	14	9483,9 $\pm$ 2396,2	4192,5	14105,6

За понатамошна анализа на добиените нумерички вредности, со цел да се утврди дали меѓу добиените различни вредности постои и статистичка сигнификантност, го применивме Kruskal-Wallis-овиот тест. Тој потврди дека различната длабочина на туморската инвазија утврдена кај неоплазмите со различен степен на хистолошка диференцијација е статистички значајна и изнесува за  $p = 0.0000$  (Графикон 4).



Легенда: (G1) - добро диференциран карцином, (G2)-умерено диференциран карцином, (G3) - лошо диференциран карцином

**Графикон 4.** Споредба на длабочината на туморската инвазија кај планоцелуларните карциноми на долната усна со различен степен на хистолошка диференцираност, изведена со Kruskal-Wallis-овиот тест.

Податоците за длабочината на туморската инвазија ги систематизиравме и според туморскиот статус (pT1 и pT2) на испитуваните примероци од планоцелуларниот карцином на долната усна. Според добиените податоци



(презентирани во Табелата 3), длабочината на туморската инвазија е значително помала кај неоплазмите со pT1 статус (неоплазмите со големина  $T \leq 2\text{cm}$ ). Додека незината средна вредност изнесувала  $2666,1 \pm 1360,2 \mu\text{m}$ , кај неоплазмите со pT2 статус (неоплазми поголеми  $T2 > 2\text{cm}$ ), средната вредност на длабочината на туморската инвазија изнесувала  $7719,6 \pm 3023,8 \mu\text{m}$ .

**Табела 3.** Длабочината на стромалната инвазија кај планоцелуларните карциноми на долна усна, според туморскиот статус pT1 и pT2

Туморски статус на неоплазмата	Број на примероци	Просечна длабочина на туморската инвазија ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Минимална вредност ( $\mu\text{m}$ )	Максимална вредност ( $\mu\text{m}$ )
pT1	39	$2666,1 \pm 1360,2$	1341,3	9781,6
pT2	21	$7719,6 \pm 3023,8$	2197,75	14105,62

За понатамошна анализа на добиените нумерички вредности, со цел да се утврди дали меѓу добиените различни вредности за длабочината на туморската инвазија постои статистичка сигнификантност, го применивме Mann-Whitney статистичкиот тест. Тестот потврди дека измерената поголема длабочина на туморската инвазија кај неоплазмите со туморски статус pT2, е статистички значајна и изнесува за  $p=0.00003$  (Графикон 5).



Легенда: (pT1) големина на туморот помала или еднаква на 2cm ( $T1 \leq 2$  cm), (pT2) големина на туморот поголема од 2cm ( $T2 > 2$  cm)

**Графикон 5.** Споредба на длабочината на туморската инвазија кај планоцелуларните карциноми на долната усна со различен pT статус, изведена со Mann-Whitney статистичкиот тест

### 6.2.3 Васкуларна густина во стромата на инвазивниот фронт

Васкуларната густина ја определивме во стромата на инвазивниот фронт во сите примероци од SCC на долната усна. Кога резултатите ги систематизиравме според степенот на диференцираноста на неоплазмата, ги добивме податоците кои се прикажани на Табела 4. Овие нумерички податоци покажаа дека бројот на воочените крвни садови во стромата на инвазивниот фронт е најмал кај добро диференцираните SCC на долната усна (просечен број  $20,37 \pm 4,36$ ). Кај послабо диференцираните тумори, бројот на крвните садови во стромата на инвазивниот фронт е поголем (во просек  $24,90 \pm 6,27$ ) а најголема васкуларна густина постои кај лошо диференцираните SCC на кожата ( $37,17 \pm 6,90$ ).

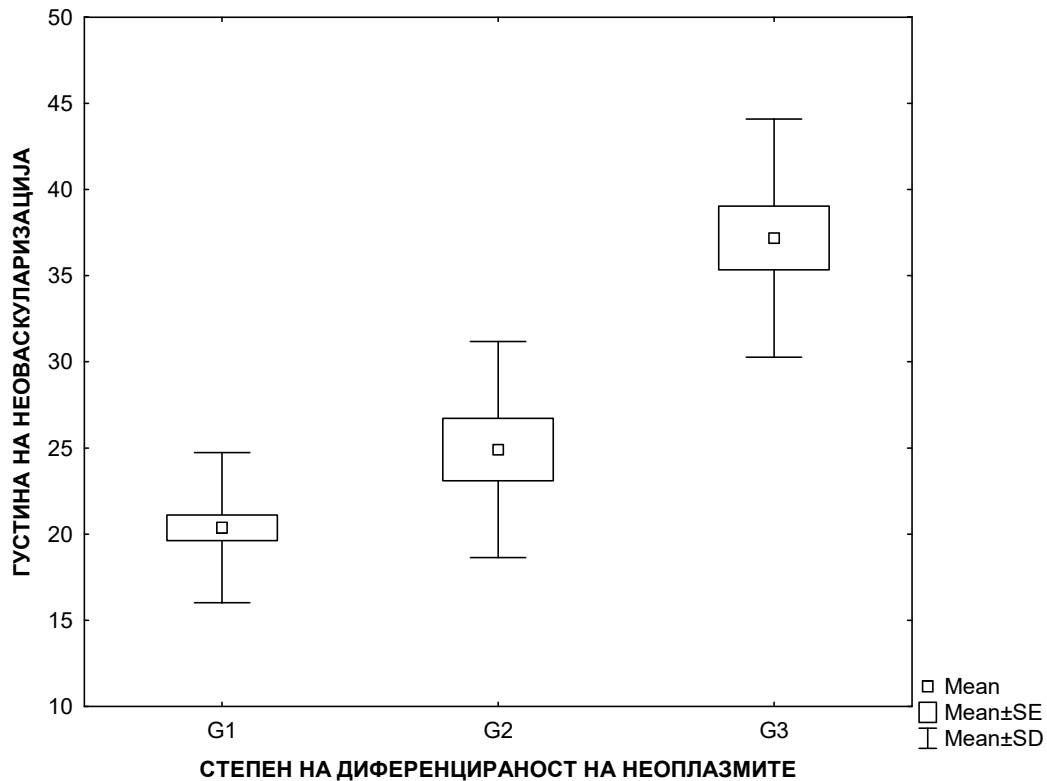
**Табела 4.** Васкуларна густина во стромата на инвазивниот фронт кај неоплазмите со SCC на долната усна, кои се со различен степен на хистолошка диференцијација

Степен на хистолошка диференцијација (G)	G1 n=34	G2 n=12	G3 n=14
Минимален број на крвни садови	10	18	20
Максимален број на крвни садови	32	37	46
Просечен број на крвни садови $\pm$ SD	<b>20,37 <math>\pm</math> 4,36</b>	<b>24,90 <math>\pm</math> 6,27</b>	<b>37,17 <math>\pm</math> 6,90</b>

n = број на примероци

Добиените податоци од мерењата, статистички ги анализиравме со тестот на Kruskal-Wallis и ги прикажуваме на Графикон бр 6. Утврдена беше

сигнификантност од  $p=0.00001$ . Тоа докажа дека утврдената разлика во бројот на крвните садови кај туморите на долната усна кои се со различен степен на диференцијација е статистички значајна. односно дека бројот на крвните садови прогресивно расте со опаѓањето на степенот на диференцираноста на туморското ткиво.



Легенда: (G1)-добро диференциран карцином, (G2)-умерено диференциран карцином,  
(G3) - лошо диференциран карцином

**Графикон 6.** Споредба на густината на крвните садови во инвазивниот фронт на неоплазмата кај карциномите на кожата со различен степен на хистолошка диференцираност, изведена со Kruskal-Wallis-овиот тест.

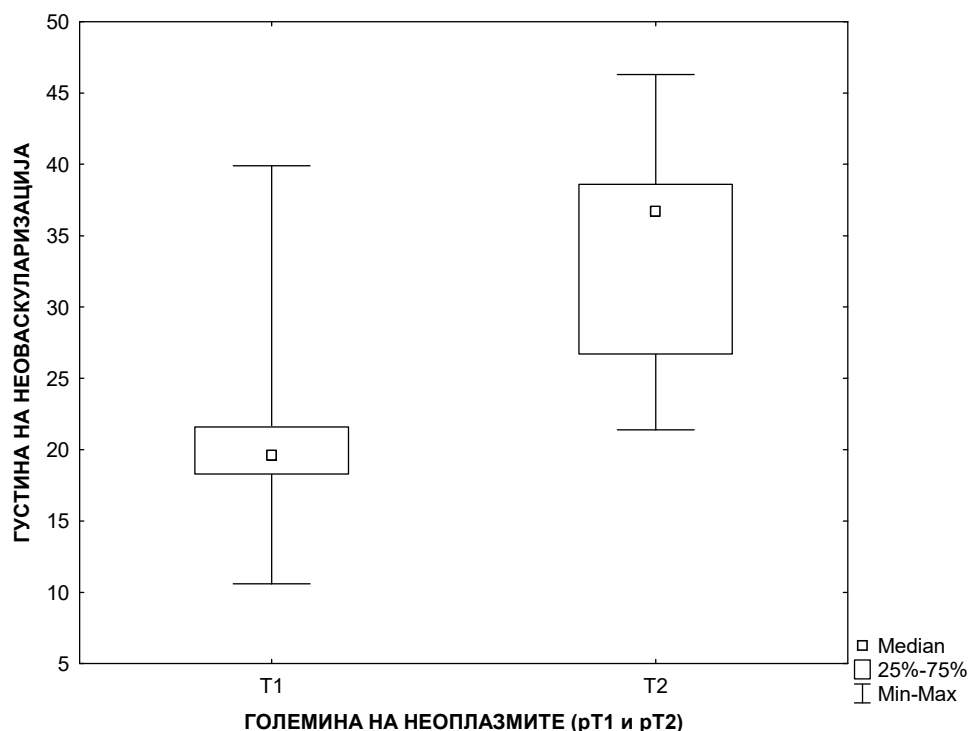
Во Табела 5. ги презентираме вредностите за васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт кај SCC на долната усна, систематизирани според pT стадиумот на неоплазмата. Нумеричките податоци покажуваат дека туморите со pT1 статус имаат помала васкуларната густина во инвазивниот фронт на неоплазмата а туморите со pT2 поголема васкуларна густина во инвазивниот фронт. Дали таа разлика е значајна и навистина зависна од

големината на туморот изразена како pT туморски статус, анализиравме со примена на Mann-Whitney-евиот тест, кој покажа висока сигнификантност (со вредност  $p=0.00001$ ). Со тоа се потврди дека туморите на долната усна кои имаат повисок pT статус (големина над 2 cm) имаат значително поголем број на крвни садови во стромата на својот инвазивен фронт (Графикон 7).

**Табела 5.** Васкуларна густината во стромата на инвазивниот фронт кај неоплазмите (SCC) на кожата со различен pT статус

Туморски статус на неоплазмата	T1 n=39	T2 n=12
Минимален број на крвни садови	10	19
Максимален број на крвни садови	40	46
Просечен број на крвни садови $\pm$ SD	<b>20,48<math>\pm</math> 5,03</b>	<b>32,79 <math>\pm</math> 0,04</b>

n = број на примероци



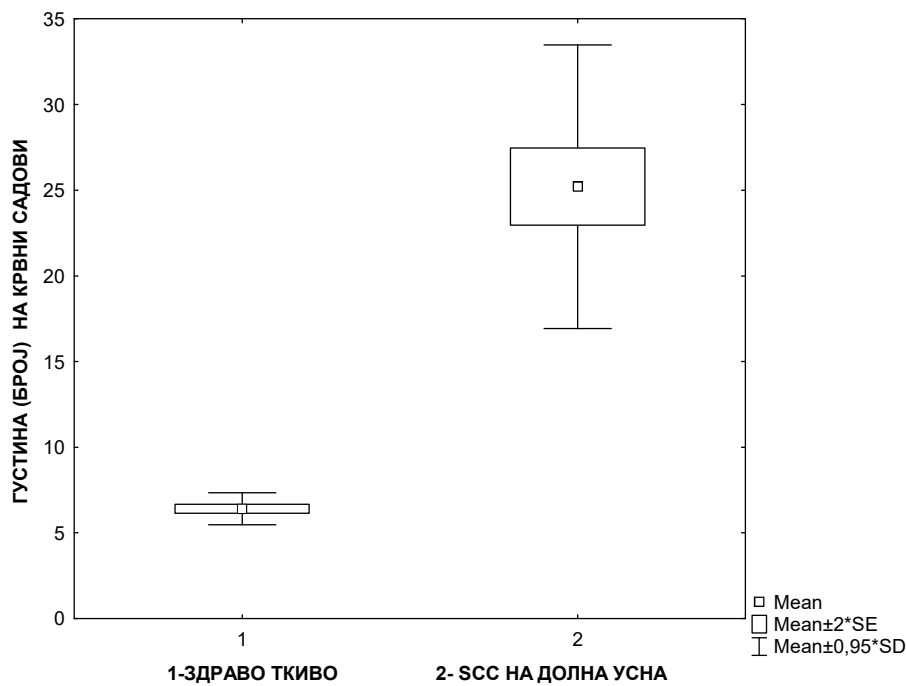
Легенда: pT1 големина на неоплазмите ( $T1 \leq 2$  cm) и pT2 големина на неоплазмите ( $T2 > 2$  cm)

**Графикон 7.** Споредба на васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт кај SCC на долната усна со различен pT статус, изведена со Mann-Whitney тестот

За поточно да се вреднуваат добиените сознанија и да се добие јасна слика каква и колкава е промената на васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт кај SCC на долната усна во однос на здравата кожа, ги споредивме вредностите утврдени кај нормалната кожа со вредностите од целата група SCC на долната усна (Табела 6) а потоа ги анализиравме со примена на Mann-Whitney тестот. Резултатот од таа анализа е прикажан на Графиконот 8. Mann-Whitney тестот покажува дека меѓу васкуларната густина во двете групи постои високо сигнификантна разлика за  $p=0.0000001$ . Со тоа утврдивме дека, во однос на здравата кожа, кај неоплазмите како резултат на интензивниот процес на неоангиогенеза, во стромата на нивниот инвазивен фронт се формирале многубројни нови крвни садови.

**Табела 6.** Васкуларната густина кај здравата кожа и во инвазивниот фронтна SCC на долна усна

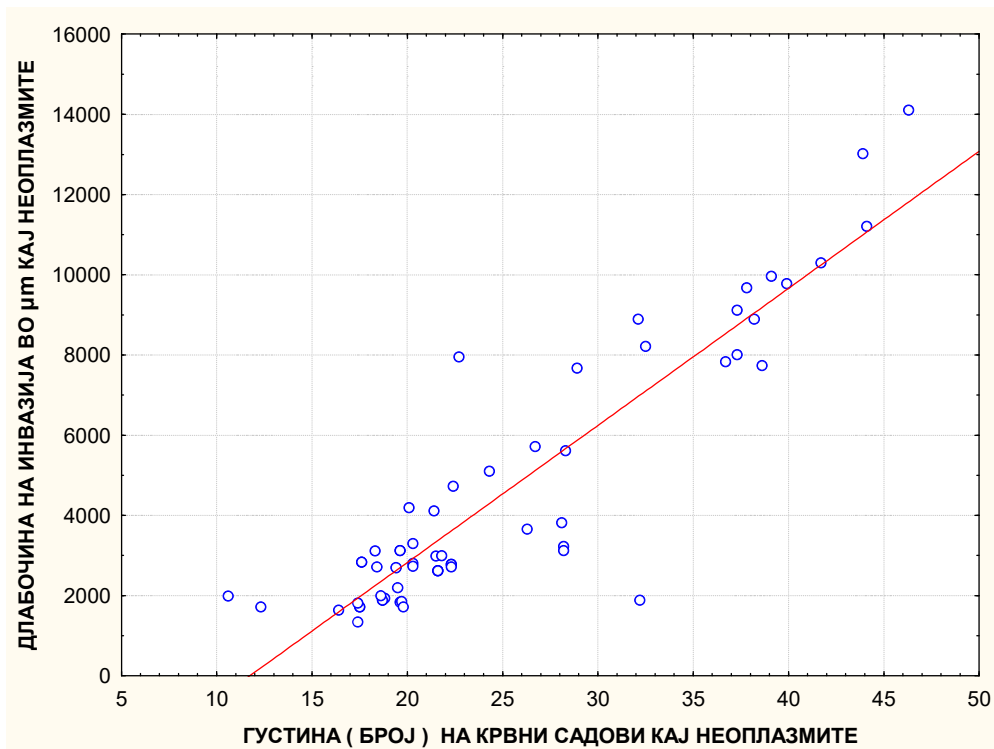
Тип на анализиран примерок	Број на примероци	Просечен број крвни садови $\pm$ SD	Минимален број крвни садови	Максимален број крвни садови
Здрава кожа на долна усна	60	<b>6,40 <math>\pm</math> 0,97</b>	5	9
SCC долна усна	60	<b>25,20 <math>\pm</math> 8,71</b>	11	46



Легенда : 1-здрава ткиво , 2- SCC на долна усна

**Графикон 8.** Споредба меѓу васкуларната густина во субепидермалната строма на нормална кожа и во стромата на инвазивниот фронт кај целата група SCC на долната усна, изведена со Mann-Whitney тестот

Дали и каква корелација постои меѓу длабочината на туморската инвазија и густината на неоваскуларизацијата во инвазивниот фронт, истражувавме применувајќи го тестот Spearman Rank Order Correlations. Тој покажа статистички високо значајна позитивна корелација ( $r=0,843$ ,  $p=0,00000$ ) меѓу овие два квалитети на туморскиот раст (Графикон 9). Со други зборови, кај анализираната група на неоплазми (SCC на долната усна) прогредирањето на туморскиот процес (изразено преку длабочината на инвазивниот фронтот) истовремено го следи и интензивна неоваскуларизација т.е. зголемување на бројот на нови крвни садови во туморската строма.



**Графикон 9.** Споредба на длабочината на туморската инвазија и васкуларната густина во инвазивниот фронт кај SCC на долната усна, изведена со Spearman Rank Order Correlations тест

#### **6.2.4. Квантитативни и атрибутивни параметри на планоцелуларните карциноми на долната усна во зависност од присуството на метастази во вратните лимфни јазли**

Во испитуваната серија од 60 примероци, вкупно 45 (75%) беа примероци од пациенти кои немале вратни метастази. 15 примероци, односно 25% од примероците потекнуваа од пациенти кај кои биле присутни метастази во вратните лимфни жлезди. Сите пациенти со метастатски депозит биле од машки пол, на возраст од 47 до 77 години, со средна возраст од  $67 \pm 8,2$  години.



**Графикон 10.** Дистрибуција на примероците од пациентите со SCC на долна усна без метастази и со метастази

Добиените податоци за длабочината на туморската инвазија и густината на васкуларизацијата на стромата во инвазивниот фронт ги класифициравме според податокот во однос на присуството или отсуството на вратни метастази и ги прикажуваме во Табелите 7 и 8.

**Табела 7.** Вредности на длабочината на туморската инвазија и густината на васкуларизацијата во стромата на инвазивниот фронт кај SCC на долната усна **без присуство на вратни метастази**, класирани според T статусот и според градусот на диференцираност на неоплазмата.

Параметар	Број на случаи	Средна Вредност	Стандардна девијација	Минимална Вредност	Максимална Вредност
<b>Длабочина на туморската инвазија (<math>\mu\text{m}</math>)</b>					
T1	35	2660,46	$\pm 1357,39$	1341,33	9781,56
T2	10	6006,15	$\pm 1950,52$	3654,23	8892,21
G1	33	2650,82	$\pm 959,59$	1341,33	5713,78
G2	9	4388,33	$\pm 2156,34$	2197,75	7953,62
G3	3	8802,65	$\pm 1026,62$	7734,18	9781,56



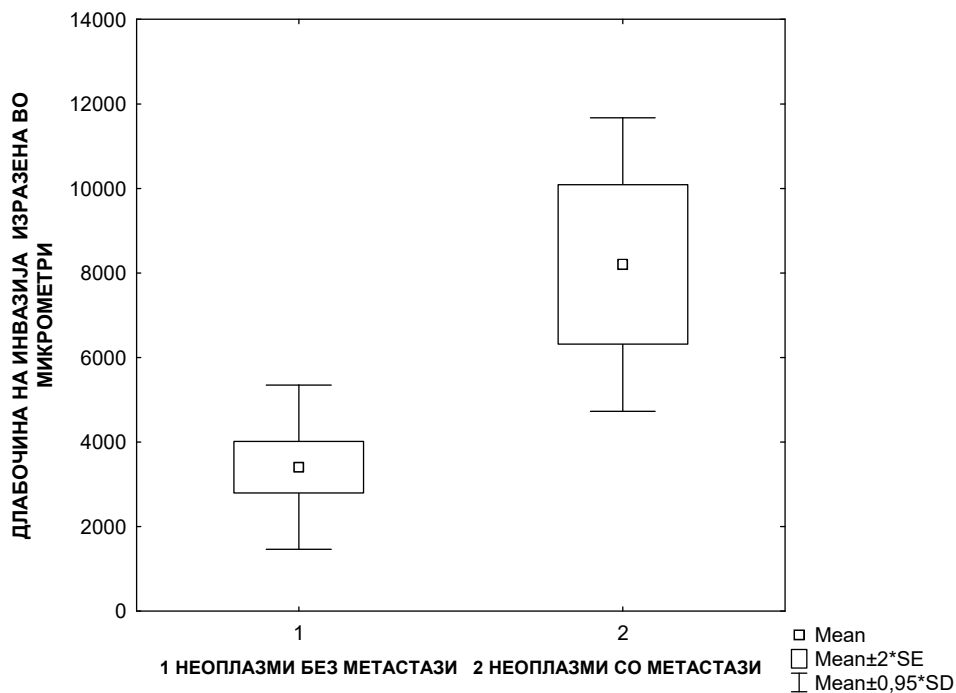
Густина на васкуларизација					
T1	35	20,57	± 5,15	10,60	39,90
T2	10	28,33	± 5,88	21,40	38,60
G1	33	20,46	± 4,39	10,60	32,20
G2	9	24,16	± 5,57	18,60	36,70
G3	3	36,86	± 4,17	32,10	39,90

**Табела 8.** Вредности на длабочината на туморската инвазија и густината на васкуларизацијата во стромата на инвазивниот фронт кај SCC на долната усна пратени со вратни метастази, класирани според Т статусот и според градусот на диференцираност на неоплазмата.

Параметар	Број на случаи	Средна Вредност	Стандардна девијација	Минимална Вредност	Максимална Вредност
Длабочина на туморската инвазија (µm)					
T1	4	3985,96	± 3042,63	1718,89	8215,28
T2	11	9734,32	± 2493,52	5106,01	14105,62
G1	1	1817,22	/	1817,22	1817,22
G2	3	4945,84	± 3149,92	1718,89	8012,62
G3	11	9669,69	± 2660,16	4192,47	14105,62
Густина на васкуларизација					
T1	4	22,45	± 6,80	17,40	32,50
T2	11	38,08	± 6,53	24,30	46,30
G1	1	17,40	/	17,40	17,40
G2	3	27,13	± 9,08	19,80	37,30
G3	11	37,26	± 7,64	20,10	46,30

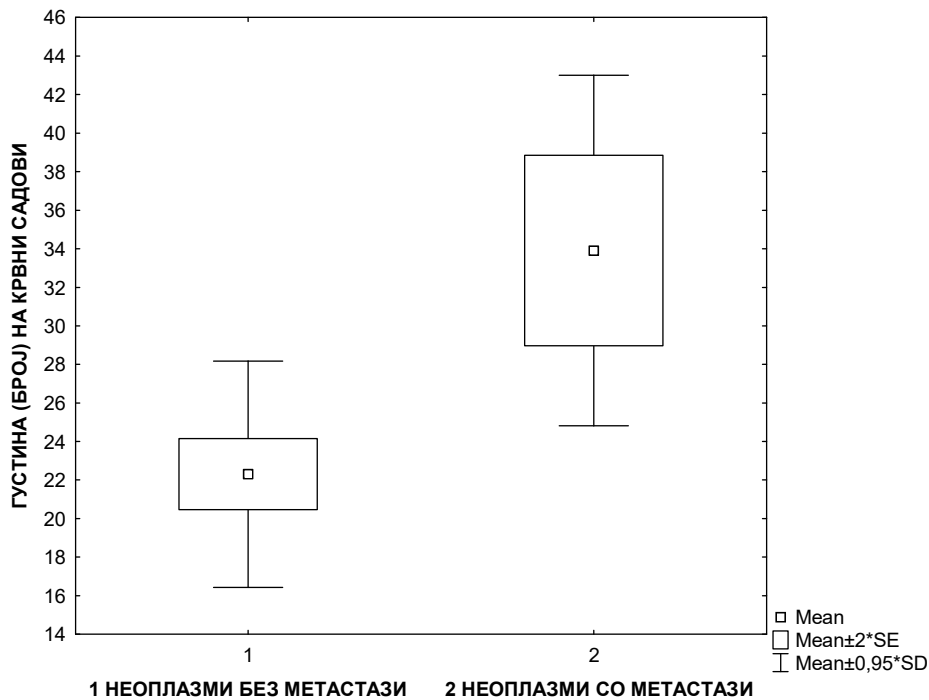
Кога со примена на Mann-Whitney U тест ги споредивме сите податоци за длабочината на туморската инвазија кај SCC на долната усна без метастази со тие добиени кај примероците со метастази, го утврдивме следново:

Длабочината на туморската инвазија е статистички значајно поголема ( $p=0.000083$ ) кога SCC на долната усна е пратен со присуство на метастази во вратните лимфни жлезди. Тоа го илустрира Графиконот 8.



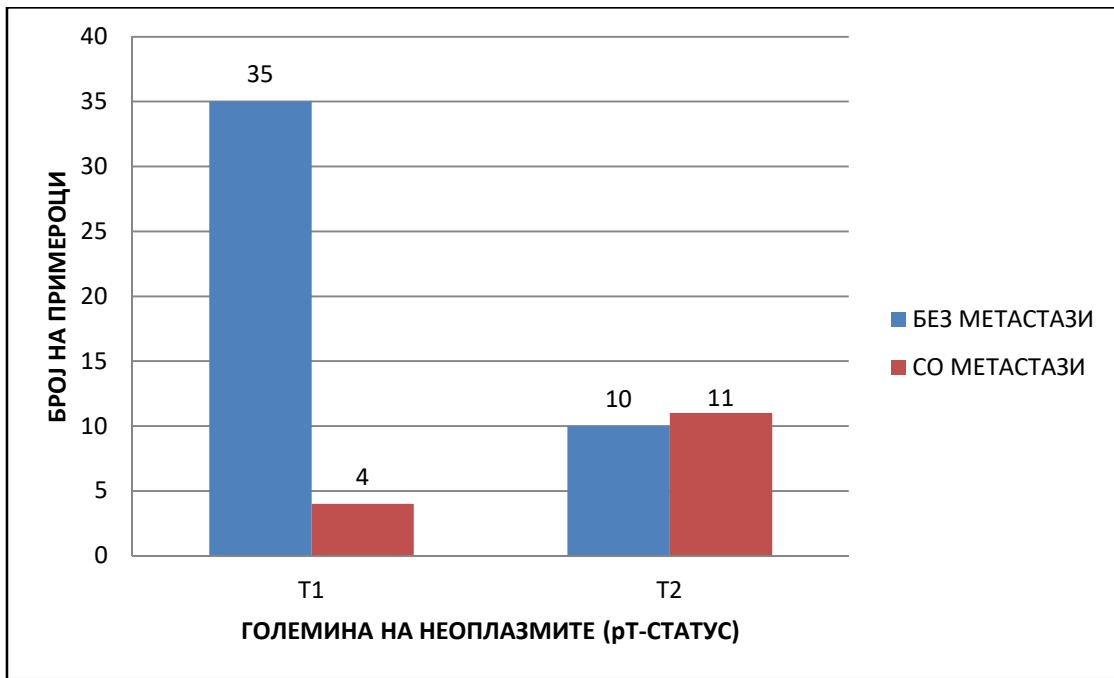
**Графикон 11** .Споредба на длабочината на туморската инвазијата на SCC на долната усна, меѓу неоплазмите со и без метастази, изведена со статистичкиот метод на Mann-Whitney U тестот.

Кога со примена на Mann-Whitney U тест ги споредивме сите податоци за густината на васкуларни елементи во стромата на инвазивниот фронт кај SCC на долната усна без метастази со тие добиени кај примероците со метастази, го утврдивме следново: Густината на васкуларни елементи во стромата на инвазивниот фронт е статистички значајно поголема за  $p=0.00019$  кога SCC на долната усна е пратена и со присуство на метастази во вратните лимфни жлезди. Тоа го илустрира Графиконот 9.



**Графикон 12.** Споредба на васкуларната густина во стромата на инвазивниот фронт кај SCC на долната усна, меѓу неоплазмите со и без метастази, изведена со статистичкиот метод на Mann-Whitney U тестот.

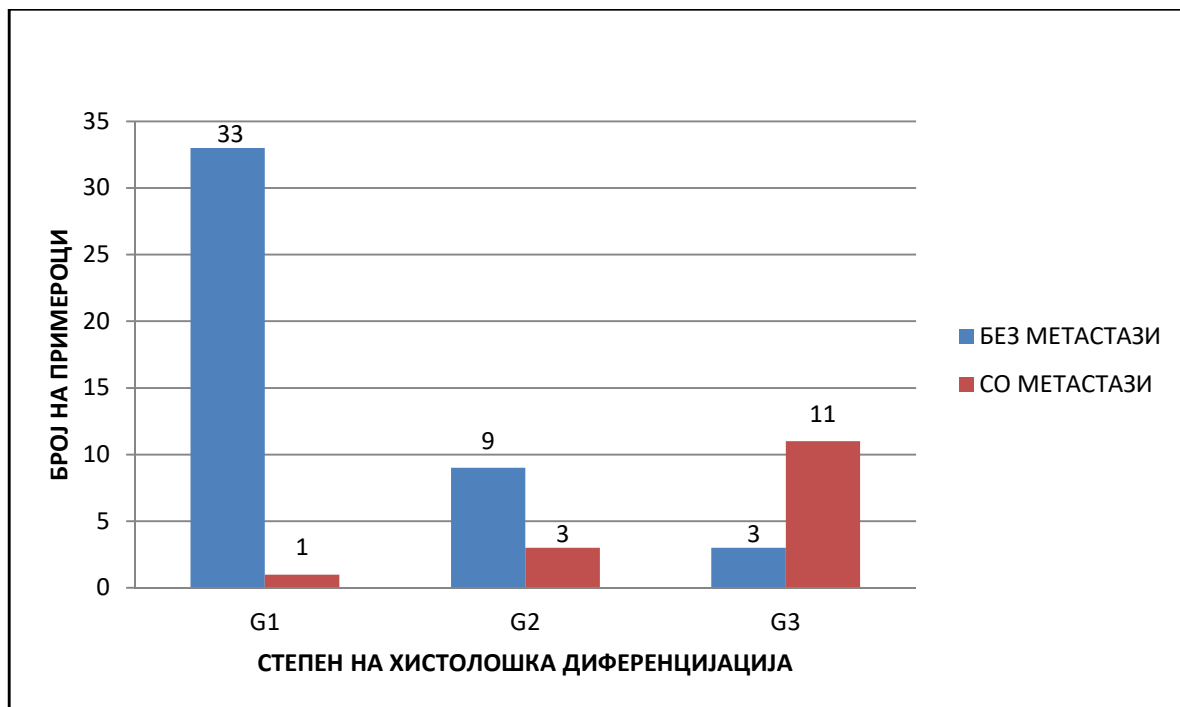
Споредувавме големина на неоплазмите според pT стаусот (pT1 и pT2) кај примероците со метастази и без метастази. Статистичката обработка на овие податоци со примена на Pearson chi square test покажа сигнификантност за  $p=0.00033$ . Од графичкиот приказ на Графикон 10. се забележува дека туморите со статус pT1 во најголем број случаи не се пратени со метастази во вратните лимфни јазли. Кај примероците од неоплазмите со статус pT2, поради скоро идентичниот број на примероци со и без метастази, можеме да констатираме дека кај неоплазмите кои се со поголеми димензии можноста за метастазирање е поголема. Тоа го потврдуваат примероците од неоплазмите со метастази. Големината на неоплазмите е можен показател за прогледирање и метастазирање на малигниот процес но не како самостоен параметар туку заедно со: густината на неоангиогенезата, длабочината на инвазијата и степенот на хистолошката диференцијација.



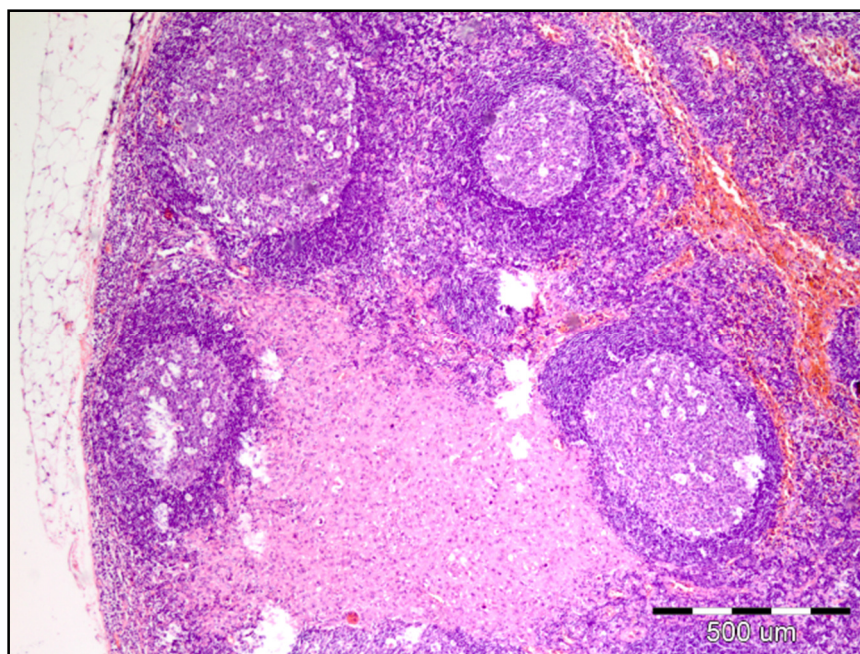
**Графикон 13.** Споредба на бројот на тумори со и без метастази, во двете групи со различен pT статус на неоплазмите (pT1 и pT2)

Во однос на степенот на хистолошката диференцираност на неоплазмите кај примероците со и без метастази, статистичката обработка на податоците со примене на Pearson chi square test покажа висока сигнификантност за  $p=0,0000$ .

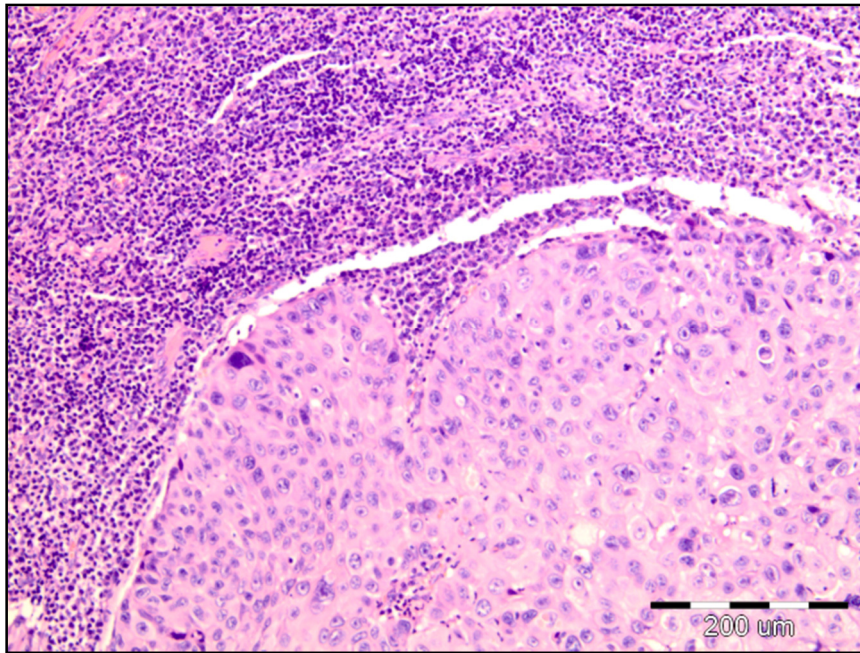
На графиконот 11 најголем број на примероци со метастази, се со лоша хистолошка диференцираност. Кај примероците од неоплазми без метастази, доминираат неоплазми кои се со добра хистолошка диференцираност. Од изнесеното би можеле да констатираме дека опаѓањето на степенот на хистолошка диференцираност на неоплазмата е сигурен показател за прогледирање на малигниот процес, за метастазирање и полош исход за пациентите.



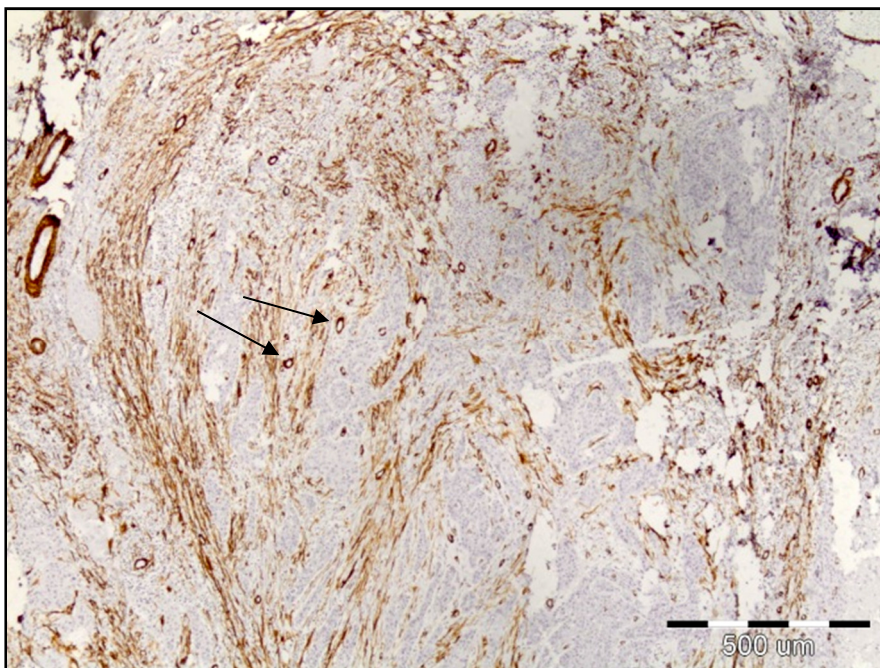
**Графикон 14.** Споредба на бројот на тумори со и без метастази, во трите групи со различен степен на диференцираност на неоплазмите (G1, G2, G3)



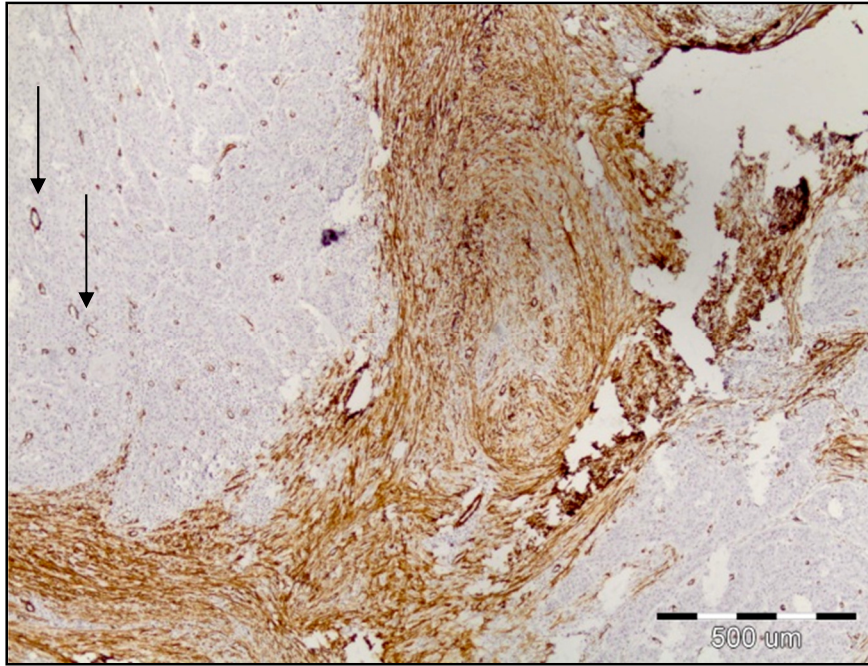
**Слика 5.** Вратна лимфна жлезда со присуство на метастатски депозит, од пациент со умерено диференциран планоцелуларен карцином на долната усна (HE 10 x 4)



**Слика 6.** Вратна лимфна жлезда со метастатски депозит, од пациент со лошо диференциран планоцелуларен карцином на долната усна (HE 10 x 20)



**Слика 7.** Приказ на инвазивниот фронт кај SCC на долна усна со  $\alpha$ -SMA (10 x 4). Јасно се визуелизирани малите артериски крвни садови присутни во левиот горен дел на сликата.



**Слика 8.** Приказ на инвазивниот фронт кај SCC на долна усна со  $\alpha$ -SMA (10 x 4)  
Васкуларните простори не се видливи за разлика од горниот лев агол

## **7. ДИСКУСИЈА**

Според дефиницијата на Светската здравствена организација планоцелуларниот карцином претставува малигна неоплазма на епидермалните кератиноцити и мукозните мембрани во која клетките покажуваат варијабилна кератининска диференцијација [48].

Тој се јавува на кожата, но и во сите органи препокриени со кератински епител, што вклучува повеќе анатомски локализации, како што се устата, усната шуплина, езофагусот, вагината, грлото на матка. Дополнителни локализации каде што може да се јави планоцелуларниот карцином се и уринарниот тракт, простатата, белите дробови, каде што планоцелуларниот карцином се јавува по процес на метаплазија на друг епител [4].

Планоцелуларниот карцином на кожата се развива низ процес на мултиетапна карциогенеза во која се вклучени активација на прото-онкогени и/или инактивација на тумор-супресорни гени во хуманите кератиноцити [49, 50]. Кај овој карцином се опишани бројни генетски алтерации, но молекуларните механизми кои учествуваат во иницијацијата и прогресијата на неоплазмата сè уште не се сосема разјаснети [4, 51,53].

Генетските абнормалности кај кератиноцитните неоплазми се најчесто индуцирани од експозицијата на ултравиолетови зраци. Ултравиолетовите зраци покрај тоа ги индуцираат и ги реактивните кислородни радикали, кои играат важна улога во ткивното оштетување. Нивната покачена продукција или намалената ефикасност на антиоксидативниот одбранбен систем исто така придонесува за развој на кожен карцином [48, 54].

Покрај ултравиолетовото зрачење, во карциногенезата на кожните немеланомски малигни неоплазми се вклучени и бројни други егзогени карциногени како што се: хуман папилома вирусот, херпес симплекс вируси 1, 2 употребата на тутун, индустриските хемикалии, од типот на винил хлоридот, полициклични ароматични хидројаглери, алкалични агенси, арсенот како и експозиција на бензин и бензински пареи [48].



Неоплазмите од кератиноцити претставуваат значаен проблем на јавното здравје и покрај ниската стапка на смртност. Повеќето кожни планоцелуларни карциноми се само локално агресивни.

Поагресивни кожни неоплазми се јавуваат кај луѓето со имунодефициенција, вклучувајќи ги тука и пациентите со ХИВ-сида [55].

Почесто рецидивираат туморите кои се со подлабока инвазија, полоша хистолошка диференцијација, периневрална инвазија, туморите со морфолошки карактеристики на акантолитичен планоцелуларен карцином и оние со тесни хируршки маргини [56].

Ризикот за појавата на метастази од планоцелуларен карцином на кожа е под влијание и на клиничките услови во кои тој се јавува. Најнизок ризик за појава на метастази имаат планоцелуларните карциноми кои се јавуваат на кожа оштетена од сонце и тој се движи до 0,5%. Ризикот за појава на метастази станува поголем кај неоплазмите кои се јавуваат на кожата која е покриена и неоштетена од сонце и тој изнесува 2 до 3% [48].

Вкупната стапка на смртност кај планоцелуларниот карцином изнесува 0,1%. Инвазивниот планоцелуларен карцином има потенцијал за рецидивирање и метастазирање во временски период од 5 година каде стапка за рецидив на примарниот тумор изнесува од 8%. Степенот на 10-годишно преживување е различно кај пациенти со метастази во регионални лимфни жлезди во однос на оние со далечни метастази. Пациентите со метастази во регионалните лимфни јазли имаат стапка на преживување од 20%, додека кај пациентите со далечни метастази таа стапка изнесува 10%. [57,58].

Оралниот планоцелуларен карцином опфаќа 95% од сите форми на карциноми кои се јавуваат во пределот на главата и вратот. Планоцелуларниот карцином е најчест карцином кој се јавува во усната шуплина, а карциномот на долната усна е најчестиот карцином во усната празнина [59]. Планоцелуларниот карцином на долната усна честопати се јавува врз база на претходно постоечка преканцерозна лезија какви што се: радиодерматитис, хроничен хејлитис и xeroderma pigmentosum. Факторите на ризик опфаќаат експозиција на ултравиолетови зраци, употреба на тутун, алкохол, betel quid (вид на смола која е комбинација на лист од растение бетел, орев, гасена вар и тутун) која се

жвака и се става под усните во Азија, експозиција на некои хемиски фактори и секако инфекциите со хуман папилома вирусот, херпес симплекс вирус 1 и 2 кои се докажани во околу 25% од малигните неоплазми на глава и врат [60,4].

Прогнозата на планоцелуларниот карцином на долна усна зависи од повеќе фактори кои опфаќаат: експозиција на горе наведените ризик-фактори и нивни комбинации [60], стадиум на болеста [18], големина на туморот [61], присуство на метастази во регионалните лимфни јазли, разни хистолошки варијабли, како што се туморскиот градус, максималната дебелина, перинеуралната инвазија и експресија на протеини [62], како и други кои се во доменот на хируршките критериуми / фактори / варијабли поврзани со хируршката интервенција [60].

Метастазите во вратните лимфни жлезди се јавуваат во помалку од 20% од пациентите со SCC на долната усна. Појавата на метастатски депозити во регионалните лимфни јазли претставува предиктивен и прогностички параметар кај пациентите со планоцелуларен карцином на долната усна [14].

Процентот на пациенти со присутни метастатски депозити во лимфните јазли кај туморите со pT1(T1 ≤ 2 cm) и pT2(T2 > 2 cm) статус изнесува 8% во моментот на дијагностицирањето, но тој процент значајно расте со прогресија на примарниот тумор [60,63].

Метастазите поретко се јавуваат кај пациентите кои имаат добро диференциран тумор (околу 5%) во однос на оние со недиференциран карцином (20%). Раната детекција на овој карцином е од особено значење за добивање естетски и функционални постоперативни резултати и секако добра прогноза кај пациентите [12].

Многослојниот плочест (орожнет) епител ги препокрива надворешните и внатрешните површини на телото подложни на механички стрес. Епителот е морфолошки стратифициран и соодветствува со функционалните својства на ткивото. Епителните клетки се во контакт со базалната мембрана. Овој контакт е преодоминантно посредуван преку интегрини, при што се формираат хемидезмосоми. Базалната мембрана ја сочиниваат колаген тип 4, ламинин, фибронектин и олигополисахариди, вклучувајќи хепарин сулфат [64]. Базалната мембрана не претставува само обична пасивна подлога на која се

атхерираат (прикрепуваат) клетките, туку таа претставува активна подлога, која има улога на посредник во клеточната епителна атхезија и пролиферација, како и во снабдувањето на клетките со хранливи материи и кислород и сигнални молекули, хормони и фактори на раст. Базалната мембрана го одделува епителот од подлежачката строма, односно фибробластите [65]. Под базалната мембрана на кожата се наоѓа строма, папиларниот дермис изграден од ретко сврзно ткиво со сите пропратни елементи својствени за овој тип на ткиво [19].

Како што веќе е кажано во поглавјето вовед, туморите структурно содржат **паренхим** изграден од туморски клетки специфични за секој вид на тумор и **строма**, структура која потекнува од домаќинот [19].

Туморската строма која уште се вика и канцер-асоцирана строма, тумор-асоцирана строма или реактивна строма се разликува од нормалната строма [66].

Реактивната строма настанува како резултат на фенотипските и генотипските алтерации кои се случуваат во клетките во текот на одговорот на оштетувањето на ткивото.

Оваа новосоздадена реактивна строма е слична на стромата која се појавува во процесот на заздравување на рана и вклучува ремоделирање на матриксот и алтерирани експресија на факторите на раст и цитокините [67,68]. Иако реактивната строма во процесот на заздравување на раната е слична со реактивната строма кај карциномот, кај карциномот сепак отсуствува самоограничувачката природа на заздравувањето на раната. Строматогенезата не претставува формирање на вообичаена реактивна фиброза. Новосоздадената строма всушност претставува тврдо ткиво во организмот кое ја олеснува клеточната инвазија и миграција на ендотелните клетки, односно таа не го одложува прогресот на неоплазмата туку претставува погодна средина за ширење на карциномот [69,70].

Стромалната микросредина се појавува како клучен играч во растот и развојот на малигните неоплазми [71].

Основните карактеристики кои ги одбележуваат малигните неоплазми се локалната ткивна инвазија и метастазирање на оддалечени места од

примарниот тумор. Се смета дека клеточно-стромалните интеракции играат значајна улога во процесот на создавањето на малигните тумори [22].

**Строматогенезата,** односно формирањето на новата специфична строма се јавува во подрачјата на активна клеточна инвазија и метастазирање и претставува интегрален дел на овие два процеса [72]. Новата строма се создава и уредува под влијание на инвадирачките малигни клетки, при што постои толеранција и соучесништво од страна на стромата, односно фибробластите на домаќинот [36]. Прогресијата на орган ограничениите тумори се случува под влијание на ангиогенезата и инфламаторните клетки [73].

Реактивните стромални клетки во туморската микросредина координирано ја приспособуваат прогресијата и агресивноста на карциномот и регулираат одредени детали од ангиогенезата и инфламацијата [74,75].

Стромалниот и епителниот компартман кај карциномот влијаат еден на друг и се самоодржуваат во текот на прогресијата на карциномот. За да се регулира стромалниот дел, канцер-асоцираните фактори функционираат во координација со протеините и факторите кои ги секретираат крвните садови, имуно-асоцираните клетки, па дури и нервите. Циркулирачките клетки и резидентните фибробласти одговараат со цел повторно да создадат хомеостаза. Главната разлика кај малигните неоплазми, за разлика од репарацијата, претставува потенцијалот на овие стромални клетки усогласено да ко-еволуираат со карциномските клетки на прилично индолентен начин, кој што трае со месеци па и години, многу повеќе отколку типичниот шаблон на заздравување на рана. Се претпоставува дека, како што расте туморот така тој вклучува сè повеќе и повеќе стромални клеточни елементи за да се развијат во реактивна строма, бидејќи потребите во микросредината се зголемуваат, што доведува до одржлив воспалителен одговор [36,76].

Сепак, треба да се нагласи дека нормалното ткиво генерално дејствува како физичка бариера против туморската инвазија, поради што е потребно создавање на нова туморска строма, која се вметнува во интерцелуларните простори, природните процепи и ткивни површини со најмала отпорност, односно ткивни компоненти изградени само од растресито сврзно ткиво [36].

Туморската строма базично ја сочинуваат немалигни клетки како што се карцином-асоцираните фибробласти, специјализирани мезенхимални клетки различни за секое ткивно опкружување, имуни клетки на вродениот и стекнат имунитет, крвни садови со ендотелни клетки и перицити и екстрацелуларен матрикс (ЕЦМ). ЕЦМ содржи структурни протеини, колаген и еластин, специјализирани протеини, фибрилини, фибронектин, еластин и протеогликани.

Генетските алтерации за време на развојот на карциномот кои водат до појава на малигни клетки, последовно ќе ја променат и стромата на домаќинот. Помеѓу епителните клетки и стромата во нормалното ткиво постои размена на информации (molecular crosstalk), посредувана преку контактот на клетките меѓусебно или преку секретирани молекули [77]. Истиот процес се одвива и во процесот на создавањето на малигните неоплазми. За време на раната фаза на развој на карциномот, по деградирање на базалната мембрана, туморските клетки доаѓаат во контакт со стромата, по што следи нова размена на информации, сега помеѓу малигно трансформираната клетка и компонентите на стромата. Како резултат на овој процес стромата се активира, а активираната строма е здружена во создавање на повеќе фибробласти, зголемена васкуларност и зголемена продукција на ЕЦМ [78]. Поради интеракцијата помеѓу клетките и стромата, Стивен Пагет [81] го вовел терминот „семе и почва“, кој подоцна се развивал за да се дојде до идејата дека ракот всушност претставува „рана која никогаш не зарастува“, затоа што активираните фибробласти не изумираат по пат на апоптоза, како што тоа се случува со фибробластите во гранулационото ткиво при заздравување на рана [36,79-81]. Активираните фибробласти од гранулационото ткиво (реактивни миофибробласти), во реактивната туморска строма аналогно се наречени перитуморски фибробласти, карцином-асоцирани фибробласти (carcinoma-associated fibroblasts, CAFs), миофибробласти. Тие се хетерогени клетки за кои се смета дека потекнуваат од локалните фибробласти, или од перицитите и мазномускулните клетки од сидот на крвните садови, од мезенхимални клетки по потекло од коскената срцевина и од епителните и ендотелните клетки по пат на мезенхимална транзиција [36, 82,83].

Диференцијацијата од стромален фибробласт во миофибробласт е индуцирана од страна на паракрини сигнали кои се создаваат при процес на репарација и воспаление. Клучна улога во диференцијацијата има трансформиращкиот фактор на раст бета (TGF- $\beta$ ).

Миофибробластите при заздравување на рана ја модулираат стромата преку: а) директен контакт на клетка со клетка, б) секретирање на матрикс металопроотеинази, инхибитори на ММП (TIMP), компоненти на екстрацелуларниот матрикс, фактори на раст, цитокини, хемокини, липидни продукти и в) експресија на специфични рецептори [84-86].

Миофибробластите кај малигните неоплазми или се дефицитни или извршуваат други функции, како што е продукција на проинвазивни протеинази [84, 87-89]. Се смета дека миофибробластите во туморската строма се јавуваат во раната фаза на развојот на малигните неоплазми, а туморската строма ги регулира инвазијата и метастазирањето. Кај миофибробластите се најдени бројни промени во експресијата на рецептори и гени кои енкодираат секретирани протеини здружени со инвазијата [84,90,91]. Проинвазивната активност на миофибробластите е покажана во бројни истражувања на експериментални животни и култури на ткива *in vitro* [84,92-94].

Во услови на растење на туморот CAFs се активираат и стануваат високо продуктивни клетки кои синтетизираат и секретираат, покрај другото, и хепарин сулфат протеоглици, протеин богат со киселина и цистеин, сврзно-тквивни фактори на раст, матрикс металопроотеинази и плазминоген активатори. Матрикс металопроотеиназите го деградираат ЕЦМ и на тој начин промовираат туморски раст, инвазија, регрутирање на воспалителни клетки, ангиогенеза и метастазирање. Оттука произлегува дека стромалните миофибробласти имаат важна улога и во промовирањето на ангиогенезата [26, 95,96].

Како што е погоре кажано, **инвазијата и метастазирањето** се главни белези на малигните тумори. Со цел да се оствари одвојување на туморските клетки од главната туморска маса и да се оствари секундарен/метастатски туморски раст на оддалечено место, таа мора да помине низ серија на стапки наречени метастатска каскада. Таа грубо може да се подели во три главни процеси кои опфаќаат инвазија, интравазација и екстравазација.

Процесот на инвазија опфаќа пенетрација на малигните клетки во ЕЦМ и бројни интеракции со него. Инвазијата се одвива во неколку стапки (описани во поглавјето вовед), кои опфаќаат одвојување на туморските клетки една од друга, разградување на ЕЦМ, интеракција/прикачување за елементите од ЕЦМ и мигрирање. Овој процес опфаќа и секреција на супстанции за деградација на базалната мембрана и екстрацелуларниот матрикс, како и експресија на протеини инволвирани во контролата на мотилитетот и миграцијата. Интеракцијата на туморските клетки и околната строма е од особено значење за развојот на ангиогенезата, без која туморот не може да опстои и да се развива.

Новосоздадените крвни садови во непосредна близина на туморот претставуваат корито во кое одвоените малигни клетки навлегуваат во циркулацијата [97-100]. Епителните клетки се карактеризираат со поларизација на клеточната мембрана и тие се цврсто поврзани меѓу себе со атхезивни комплекси кои се движат од апикалната кон базалната мембрана и се состојат од „tight, adherens, gap” врски, дезмосоми и интегрини. Првиот настан во процесот на инвазијата претставува „олабавувањето” на туморските клетки, односно попуштањето и губитокот на клеточните врски помеѓу малигно трансформираниите клетки во кои веќе се наоѓа метастатски супклон.

Олабавувањето на туморските клетки настанува како резултат од мутирање на гени што резултира со, на пример, инактивирање на некои молекули, активирање на други или несоодветна експресија на транскрипциски фактори.

По олабавувањето на туморските клетки следи разградување на базалната мембрана и интерстициското сврзно ткиво.

Разградбата на ЕЦМ е резултат од зголемената протеолитична активност во пределот на инвазивниот фронт и предизвикува промени во околниот екстрацелуларен матрикс, при што ги менува неговите карактеристики [101].

Базалната мембрана претставува кондензирана структура на високо специјализиран дел од ЕЦМ, изграден од мрежа на колаген тип 4 (најзастапена компонента), специфични гликопротеини, како што се ламининот и протеин сулфат протеогликанот. Ламининот служи како лепило, има силен афинитет за

колагенот тип 4 и протеогликаните, но исто така се врзува за клеточната мембрана на епителните клетки преку клеточен рецептор кој се наоѓа на мембраната на епителните клетки и има висок афинитет за ламининот [102,103].

Кога ќе настане одвојување на туморските клетки една од друга, се смета дека процесот на инвазијата, поточно инвазијата на базалната мембрана се одвива во 3 чекора, и тоа: а) атхезија на малигната клетка за базалната мембрана, б) протеолитичка разградба на базалната мембрана, в) де-атхезија и запирање на протеолизата со учество на ткивните инхибитори на матрикс протеиназите.

Атхезијата на малигните клетки е посредувана од интегринските молекули.

Разградбата на базалната мембрана настанува под дејство на протеолитичните ензими кои може да ги лачат самите туморски клетки, или стромалните фибробласти и воспалителните клетки под индукција на туморските клетки. Туморските клетки содржат големо количество протеази локализирани во апикалните делови на нивните псевдоподии. Ензимите ММП, катепсин Д и урокиназниот плазминогенски активатор играат клучна улога во разградбата на базалната мембрана и ЕЦМ, а овозможуваат ослободување на факторите на раст, секвестрирани од ЕЦМ. Се смета дека ензимот ММП2 (тип 4 колагеназа, желатиназа А) претставува критичен медијатор на инавазијата.

Покрај протеолизата, матрикс металопроотеиназите играат улога и во растењето, сигнализирањето, ангиогенезата и имуните функции [97,104,105].

Де-атхезијата на малигната клетка, која се одвива под дејство на бројни молекули [106] овозможува таа да се најде под базалната мембрана, слободна за миграција под дејство на хемотаксата (продукти на разградба на ЕЦМ, колаген, ламинин, фактор на раст сличен на инсулин 1 и 2) и долж градиентот на хемоатрактантите врзани за ЕЦМ (хаптотакса) [97]. Шемата "атхерирање-деградација-движење" претставува општо прифатена шема за процесот на инвазија на малигните клетки [107, 108].

Откако малигната клетка ќе се најде во ЕЦМ, отцепувањето на колагенот 4 и ламининот од базалната мембрана под дејство на матрикс протеиназите



создава нови локации што ќе се врзат за рецепторите на туморските клетки и ќе стимулираат процес на миграција. Миграцијата вклучува процес на „атхезија-деатхезија“, засилена од дејството на автокрините фактори на подвижност и бројните цитокини. Туморските клетки имаат способност да ја менуваат својата форма, со што создаваат услови за движење низ ЕЦМ и имаат способност за ремоделирање на околното ткиво со што си го формираат миграцискиот пат.

Krakhmal и соработниците во 2015 година опишале неколку типови на миграција на поединечни и групи на клетки од тип на амебоидна и мезенхимална (слична на фибробласт) миграција. При мезенхималната транзиција епителните малигни клетки ја менуваат својата форма, наликуваат на фибробласти и добиваат нови молекуларни и морфолошки карактеристики, поради што трансформацијата на оваа мигрирачка инвазивна клетка е наречена „епително мезенхимална транзиција“ [108]. Мигрирањето е сложен процес кој вклучува многу семејства на рецептори и сигнални протеини кои конечно влијаат врз актинскиот цитоскелет и ја овозможуваат прогресијата на инвазијата кон васкуларната мрежа [97, 108].

Ангиогенските фактори, како што е VEGF фамилијата, се клучни за појавување на активираниот стромат. Иако VEGF може да биде ослободен од малигните клетки, главни негови извори претставуваат фибробластите и воспалителните клетки. VEGF индуцира неоангиогенеза и микроваскуларна пропустливост што води до екстравазација на плазма протеини, каков што е фибриногенот, кои последовно привлекуваат фибробласти, воспалителни и ендотелни клетки. Овие клетки продуцираат ЕЦМ со што се создава дезмоплазија, која повторно ја зајакнува ангиогенезата [95].

**Ангиогенеза** или **неоангиогенеза** претставува процес на формирање нови крвни садови од постојните нормални капилари.

Многу истражувања се посветени на утврдување на влијанието на ангиогенезата врз развојот и прогресијата на туморот. Фенотипот на туморот ја одредува природата на туморската васкуларизација. Исто како нормалните ткива, така и малигното ткиво има потреба од соодветна крвна васкуларизација. Инфламацијата, метаболичкиот стрес и хипоксијата се трите

клучни услови кои ја поттикнуваат ангиогенезата. Како расте бројот на малигните клетки во туморот, така недостатокот на хранливи продукти и кислород поттикнуваат создавање на нови крвни садови. Неоваскуларизацијата е од витално значење за растот на туморот, за неговото одржување, прогресија како и за отстранување на разградните продукти на метаболизмот.

Кожата кај луѓето е орган кој е богато васкуларизиран. Васкуларизацијата потекнува од два сплета: површински сплет кој е сместен под епидермисот и длабок сплет од крвни садови сместени на границата помеѓу дермисот и супкутаното масно ткиво. Двата сплета се меѓусебно поврзани и играат битна улога во физиолошките процеси во кожата како што се: исхрана, контрола на приливот на имуни клетки, растот на влакната, терморегулација и многу други функции.

Развитокот на васкуларната мрежа во човечкото тело е комплексен процес кој започнува интраутерино, кога прогениторните клетки од мезенхимот, наречени ангиобласти се диференцираат во ендотелни клетки.

Овие, соединувајќи се, ги формираат првите крвни садови во ембрионот во процесот наречен **васкулогенеза**. Овие ембрионални васкуларни канали се основа за разраснување на нови крвни садови по пат на разгранување и ртење, што претставува **ангиогенеза**. Во понатамошниот процес тие се издолжуваат, се зголемуваат, зреат или стагнираат, а процесот е наречен васкуларно ремоделирање во зависност од стимулациите. Сите овие случувања се битни во текот на развитокот на ембрионот, но повеќето се отсутни кај возрасните лица. Кај возрасните лица васкуларната мрежа е мирна, ендотелните клетки се стабилни и мирни. Отстапување од ова правило се случува кај женскиот репродуктивен систем и кај процесите на заздравување на рани. Во овие физиолошки ситуации на ангиогенеза, новонастанатите крвни садови брзо созреваат и стануваат стабилни благодарение на рамнотежата помеѓу про- и анти-ангиогенските сигнали.

Во здравата човечка кожа крвните садови се главно пасивни и неоваскуларизацијата генерално не се забележува, освен фоликуларната ангиогенеза која е вклучена во поединечните фази во циклусот на влакната [4].

Папиларниот дермален матрикс, реткото сврзно ткиво сместено во дермалните папили на здравата човечка кожа, се простира под базалната мембрана и функционира како природен инхибитор на ангиогенезата, обезбедувајќи пасивност на крвните садови во здравата кожа.

Новите современи податоци од васкуларната биологија идентификуваат некои клучни фактори кои го контролираат васкуларниот раст и се дел од хипотезата дека во нормалните ткива постои васкуларна неактивност, што се должи на доминантното влијание на ендогените ангиогенски инхибитори наспроти ангиогенските стимулатори.

Во здравата кожата, васкуларизацијата е контролирана преку доминантното влијание на главните физиолошки инхибитори на кожната ангиогенеза - ендогените тромбоспондин-1 (TSP-1) и тромбоспондин-2 (TSP-2). Тие се членови на фамилијата матриксни гликопротеини и се депонирани во дермоепидермалната базална мембрана, со што промовираат ангиогенска бариера преку одвојување на аваскуларниот епидермис од васкуларниот дермис. Овие ендогени инхибитори, заедно со ендостатинот, ангиостатинот, вазостатинот и интерлеукинот 12 (IL-12), се идентификувани како инхибитори на туморската ангиогенеза и туморскиот раст *in vivo* [4,5].

Кај туморите, заради изгубената рамнотежа помеѓу позитивните и негативните контролни механизми, крвните садови не се мирни; структурно се со нарушена архитектура, неправилно обликувани, проширени, варикозни и со слепи завршетоци. Не се организирани во венули, артериоли и капилари, туку хаотично се делат. Постојат пукнатини во сидовите со присутна хеморагија. Периваскуларните клетки се во близок контакт со ендотелот, лабаво поврзани и помалку присутни.

Кај некои тумори присутни се прекурзорни ендотелни клетки по потекло од коскената срцевина. Крвта не струи низ крвните садови постојано; бавно се движи и протокот е осцилирачки. Ова води до дисфункционалност на капиларите.

Во кожната ангиогенеза како потентни проангиогенски фактори се спомнуваат: васкуларен ендотелен фактор за раст А (vascular endothelial growth factor VEGF-A), базичен фибробластен фактор за раст 2 (basic fibroblast growth

factor, bFGF-2) и интерлеукин-8 (interleukin, IL-8). VEGF-A е главниот ангиогенски фактор за раст кој се врзува за два типа тирозински рецептори, VEGFR-1 и VEGFR-2, кои ги има на васкуларните ендотелни клетки.

VEGF-A се секретира од туморските клетки и влијае врз ослободување на матрикс металопротеиназите (MMPs) од ендотелните клетки. Ослободените MMP-2 и MMP-9 го деградираат екстрацелуларниот матрикс (ЕЦМ) трасирајќи патека за инвазија на ендотелните клетки во околното ткиво. Дополнително MMPs го разградуваат и ЕЦМ со што се ослободуваат нови концентрации на bFGF-2 и VEGF-A [4,5,15,18,26]. Во ситуации на нарушена рамнотежа, кога се зголемува секрецијата на ангиогенските стимулатори, а се намалува регулацијата на ендогените ангиогенски инхибитори, се создаваат предуслови за туморска ангиогенеза [5,12,13].

Туморите со висока ангиогенска активност се вбројуваат во категоријата на многу агресивни тумори со лоша прогноза за пациентите. Се смета дека туморите кои имаат повеќе крвни садови во однос на другите се ангиогенски, но се поставува прашањето која количина на крвни садови ги прави нив да бидат репрезентативни. Туморските клетки, стромалните и тумор-асоцирачките макрофаги секретираат про-ангиогенски молекули кои поттикнуваат пролиферација на ендотелни клетки, нивна миграција и матурација со формирање на васкуларни канали. Формирањето на нови крвни садови главно се случува на периферијата на туморот, додека внатрешните партии кои го градат најголемиот волумен на туморот се со намален број крвни садови [47].

Васкуларните канали се нерамномерно дистрибуирани внатре во туморите. Постојат регии со максимална васкуларна концентрација, таканаречени „жешки точки“ „hot spot“ кои се секогаш доминантни во надворешноста на туморот, т.е. во зоната на интеракција на туморот и нормалното ткиво.

Добивајќи пристап до васкуларниот систем на домаќинот прогресијата на туморот зависи од рамнотежата помеѓу анти-ангиогенските молекули од една страна и про-ангиогенските молекули на спротивната страна. Дали ангиогенскиот прекинувач ќе се вклучи зависи од јачината на експресија на про-ангиогенските молекули како поттикнувачи на туморската ангиогенеза.

Хипоксијата е стимул кој што е резултат од зголемената туморска маса, но и од онкогената активација, или настанатата тумор-супресорна мутација. Овој ангиоген прекинувач/вклучувач може да се активира во различните етапи на туморската прогресија што зависи од типот на туморот и средината во која тој се развива. Истражувањата покажале дека премалигните лезии можат да иницираат неоангиогенеза и понатамошно прогредирање на процесот [35].

Концептот дека ангиогенезата е потребна за експанзија од туморската маса го покренала прашањето во кој период од прогресијата на туморот се јавува неоангиогенезата - дали е тоа едноставно само неопходност за надминување на големината, или е тоа поврзано со одредена фаза во животниот циклус на туморот? Постојат докази од испитувањата кај различни хумани тумори и експериментални испитувања на глувци дека ангиогенезата може да се вклучи во различни фази на прогресијата на туморот, во зависност од природата на туморот и микросредината. Истражувањата покажале дека постојат две фази одвоени меѓу себе со „ангиогенски прекинувач“. Првата е аваскуларна и одговара на мали лезии со големина од 1-2 мм во дијаметар. Овие лезии остануваат неактивни со стабилна состојба помеѓу пролиферацијата и апоптозата. Такви биле откриени при обдукциски наод кај лица починати од друга причина. Податоците зборуваат дека мал број од таквите „заспани“ тумори влегуваат во втора васкуларна фаза во која туморот расте. Истото се однесува и на метастазите.

На местата на активна туморска клеточна инвазија феноменот на ангиогенеза се гледа паралелно со феноменот на строматогенеза. Создадената едематозна растресита строма е поволна за ендотелна клеточна миграција и лесна пенетрација на туморските клетки.

Таквата фиброваскуларна пролиферација (строматогенеза/ангиогенеза) заедно со инвазивните туморски клетки формираат добро организирано туморско клеточно поле [72]. Различни цитокини и фактори на раст се идентификувани како одговорни за почетокот на формирање на нови крвно-садовни формации, а движечката сила за строматогенеза сè уште не е сосема јасна [22]. Можеби истите фактори се одговорни за двата феномена, или пак

ангиогенските стимули индуцираат фибробластична пролиферација на паракрин начин [23,24].

Новите крвно-садовни формации и строматогенеза се случуваат истовремено со туморската клеточна инвазија и се блиску поврзани со туморското клеточно метастазирање [33].

Условите во микроопкружувањето на туморот не се засекаде еднакви. Хипоксијата, ацидитетот, недостаток на нутриенти се доминантните специфики во „срцето“ на туморот, предизвикувачи на васкуларното и туморско преживување. Ситуацијата се влошува ако се наруши пролиферативниот /апоптозен баланс, кога со фаворизирање на апоптозата доаѓа до редукција на крвно-садовно ремоделирање и преживување.

Фаворизирање на хипоксијата и ацидозата ја редуцира ендотелната активација и пролиферација, без оглед на континуираната продукција на ангиогенски фактори од страна на туморските клетки. На периферијата од туморот инвазивните малигни клетки и новоформираните крвни садови во содејство со немалигното ткиво се привилегирани од нормалната васкуларна и лимфна мрежа.

Во внатрешноста на туморот условите на микроопкружувањето се неповолни во однос на неговата надворешност. Ендотелните клетки и туморските клетки во внатрешните партии на туморот се подложни на редуцирана пролиферација и зголемена апоптоза во однос на туморската надворешност. Спротивно на ова, ангиогенските и анти-апоптотичните стимули, кои се всушност васкуларни фактори на преживување, се ослободуваат од неопластичните и ненеопластичните клетки (стромални клетки и тумор-асоцирачки макрофаги) [117,116]. Наспроти несоодветните услови туморот во внатрешната регија се развива со тоа што внатре во сржта на туморот малигните клетки заедно со младите крвни садови толерираат хипоксија преку активација на гликолитичниот анаеробен пат. Внатрешната циркулација толерира ниска концентрација на кислород преку активација на ангиогенските фактори (VEGF, VEGF/KDR, TP, bFGF) и инхибитори на ендотелната апоптоза (VEGF, bcl-2). VEGF е одговорен не само за формирање на нови крвни садови туку и за инхибирање на ендотелната клеточна апоптоза.

Исто така, VEGF интерферира со тромбоцитната агрегација со тоа што се засилува антитромботичниот ефект со што се поддржува функционалната интратуморска васкуларизација [34,35].

Крвните садови кои ја васкуларизираат периферијата се типични крвни капилари, а внатрешноста поседува крвни садови со дефектни сидови. Диференцијацијата на квалитетот помеѓу периферниот и централниот дел на васкуларниот систем го поставува прашањето која е всушност примарната улога на тумор-асоцирачките крвни садови - дали е тоа транспорт на кислород и хранливи материи од периферијата кон центарот на туморот во служба на малигните клетки или транспорт на малигни клетки од срцето на туморот кон периферијата, односно овозможување на движење на малигните клетки кон крвните садови на домаќинот преку кои би се остварил процесот на метастазирање [42]. Се смета дека дефектните сидови на крвните садови кои припаѓаат на новосоздадената васкуларна мрежа фаворизираат побрза пенетрација на малигни клетки [109,113,114].

Конечно, се смета дека ангиогенезата почнува на периферијата на туморот [43]. Се појавува во исто време кога има клеточна инвазија и строматогенеза, т.е. кога се формира растресита и едематозна строма погодна за ендотелна миграција и туморска клеточна инвазија. Туморската клеточна инвазија не е можна без строматогенеза, како што далечните метастази не се моќни без ангиогенеза.

Туморската ангиогенеза во неопластичниот процес пројавува низа од настани, кои опфаќаат повеќе чекори [36,37]. Малигните тумори првенствено растат во вид на мали групации од клетки, користејќи ги постојните крвни садови на домаќинот. Ангиогенските стимулации индуцирани од туморските и стромални клетки поттикнуваат ендотелна пролиферација најверојатно поради хипоксичниот стрес, иако во текот на карциногенезата како резултат на генетски случувања се појавува и хипоксично независна ангиогенеза.

Строматогенезата ја овозможува инвазијата. Новата строма е едематозна, растресита, приемлива за пенетрација на ендотелни и туморски клетки. Таквата структура се формира на инвазивниот туморски фронт [45,47].

Строматогенезата се појавува паралелно со ангиогенезата на периферијата од туморот, веројатно како порака испратена од малигните клетки.

Под континуираната продукција на ангиогенски и строматогенетски фактори, новите крвни садови и новоформираната строма создаваат услови за понатамошна инвазија на туморски клетки [38,47,]. Подоцна, со прогресија на инвазијата, туморските крвни садови и стромата ќе бидат постепено инкорпорирани во повнатрешните, односно до највнатрешните подрачја на туморот. Тоа е всушност таканаречениот модел на „**штафетна трка**”, т.е. модел за тумор/васкуларен раст и инкорпорирање во внатрешноста на туморот.

Процесот продолжува понатаму со понатамошно ширење на инвазијата, со постојано повторување [40,57]. Како што веќе е погоре кажано, во центарот на туморот преовладуваат неповолни услови. Не постои соодветна лимфна мрежа, ткивото е хипоксично, а средината е кисела (ацидна).

Пролиферативно/апоптотичната рамнотежа се поместува кон спречување на апоптозата со анти-апоптотични механизми. Дефектната васкулатура може да ја помогне туморската клеточна инвазија и метастазирање [39]. Ваквиот штафетен модел на туморски васкуларен раст и регресија може да ја објасни хистолошката слика на високиот ангиогенски фронт и сиромашната, помалку васкуларизирана внатрешна туморска маса [115].

Сите тумори не се ангиогенски од почетокот на појавата на туморот. Ангиогенското активирање е одраз на капацитетот на туморот и на воспалителните клетки за секреција на ангиогенските фактори во туморското микроопкружување.

Во 1970 година Фолкман (Folkman) ја навел претпоставката дека инхибиција на ангиогенезата кај туморите можеби би довела до забавен туморски раст, намалена туморска маса и туморска регресија. Инхибиција на ангиогенезата би вклучила: инхибиција на продукција на ангиогенски фактори за раст, зголемена продукција на инхибитори на ангиогенеза или инхибиција на активноста на рецепторите и сигнализирањата во крвните садови.

Клиничките и експерименталните податоци за формирање на туморите под влијание на хемиски канцерогени супстанции потврдуваат дека туморската прогресија настапува со активирањето на преодот од преваскуларна во



васкуларна фаза. Првите податоци за ангиогенскиот потенцијал на премалигните лезии потекнуваат од Folkman-овата лабораторија каде била прикажана транзицијата од хиперплазија во неоплазија [39,40,110].

Премалигни лезии можат да се најдат кај сите епителни органи и се одликуваат со нарушена пролиферација, губење на клеточна униформност и архитектонска организација. Некои од промените се реверзибилни, но некои напредуваат понатаму кон карцином *in situ*, а потоа во инвазивен карцином [111,112,116].

Многу автори ја истражувале длабочината на инвазијата на малигните неоплазми како фактор кој влијае врз туморската прогресија, појавата на рецидиви, појавата на метастази и преживувањето на пациентите кај различни типови малигни неоплазми и во различни органи, како што се малигниот меланом на кожа [119], карцином на анус [120], карцином на желудник [121], карцином на дебело црево [122], карцином на ендометриум [123], карцином на јазик [124], карцином на грло на матка [47] и други.

Литературните податоци за прогностичките фактори кај карциномот на кожата, вклучувајќи ја и длабочината на инвазијата, се релативно ретки. Платоцелуларниот карцином на кожата, иако е втор најчест кожен тип на карцином што има способност да метастазира, релативно ретко метастазира, а преживувањето во случаите без метастази е добро во однос на другите малигни тумори на други органи. Од овие причини во деведесеттите години од минатиот век Брунингер и соработниците направиле микростејџинг на платоцелуларниот карцином во студија во која биле анализирани кожни карциноми (на глава, ушна школка, труп и екстремитети) и долна усна, користејќи ги како параметри клиничката големина, односно најголемиот дијаметар на лезијата, длабочината на инвазијата, туморската дебелина и текот на болеста следена 5 години. Во студијата како еден од значајните параметри кои влијале на појавата на метастази кај сквамозниот карцином, освен дебелината на туморот, бил длабочината на инвазијата подлабока од супкутис (перихондриум, периост, мускулатура) [41].

Ризикот од смртност кај кожниот карцином е пресметуван во однос на повеќе параметри, вклучувајќи ги оние од ТНМ системот и други, како што се

појавата на локални рецидиви, големината на лезијата, диференцијацијата на неоплазмата, инвазијата која го пробива супкутаното ткиво, периневралната инвазија и длабочина на инвазијата, при што е потврдено дека големината над 4 cm, периневралната и длабоката инвазија се поврзани со преживувањето [125].

Карактеризацијата на кожни планоцелуларни карциноми со најголема тенденција за метастазирање покажала дека степенот на диференцијација, присуството на мали туморски гнезда, инфилтративни туморски ленти, инфилтрација на поедини клетки, периневралната инфилтрација, акантолизата, рецидивите и нивото на Кларк (длабочина на инвазија), се силно поврзани со појавата на метастази [126]. Како прогностички фактори за преживувањето на пациентите со планоцелуларен карцином на кожата се утврдени и ТНМ стадиумот и хистолошката диференцијација, големината на туморот и брзиот раст [127].

Анализирани се и дезмопластичниот раст, хоризонталната големина, мултипните планоцелуларни карциноми и имunosупресијата. Поголемата дебелина на туморот, имunosупресијата, локализацијата на уво и зголемената хоризонтална димензија се покажале како прогностички фактори за појава на метастази [128]. Анализата на повеќе објавени студии потврдила и дека преживувањето на пациентите со кожен планоцелуларен карцином зависи од опсегот на нодалното зафаќање [129].

Во однос на оралниот планоцелуларен карцином, појавата на метастази е почеста и поради тоа е од собена важност проценката на ризиците за нивно појавување и влијанието на одредени клинички и патолошки параметри врз преживувањето на пациентите [14,62]. Во студија насловена „Како длабочината на инвазијата влијае на одлуката да се направи вратна дисекција кај клинички N0 канцер на оралната шуплина“ авторите утврдиле дека длабочината на инвазијата кај примарниот тумор треба да се смета за предиктор за појава на рани метастази кај пациенти со ран стадиум на планоцелуларен карцином на оралната шуплина [130]. Истиот заклучок, дополнет со фактот дека длабочината на инвазијата на примарниот тумор има и клиничко значење во

лекувањето на пациентите со орален планоцелуларен карцином, е објавен и во студијата на Shariat-Madar B и Lui JC [131].

Длабочината на инвазијата на карциномот на долната усна како параметар кој влијае на појавата на цервикалните лимфни јазли ја анализирале повеќе автори, кои утврдиле дека таа значајно влијае во појавата на метастази во вратните лимфни јазли [132-136].

Покрај длабочината на инвазијата на туморот како предиктивен и прогностички фактор, кај карциномите на долна усна се анализирани и големината на туморот, хистолошкиот градус, максималната дебелина, периневралното ширење и други, при што е утврдено дека дијаметарот на лезијата поголем од 2 cm, градусот G3-G4 и дебелината поголема од 6 cm, ДНК анеуплоидија и високата експресија на PCNA се параметри од висок ризик за појава на вратни нодални метастази [137].

Микроваскуларната густина на неоплазмите претставува уште еден од хистолошките елементи кој е истражуван кај планоцелуларниот карцином и кај други малигни неоплазми, во правец на предикција на развој на метастази и прогноза за пациентите со малигноми. Зголемената интратуморска микроваскуларна густина во полиња со најинтензивна неоваскуларизација како лош прогностички фактор е потврдена кај пациентки со напреднат оваријален карцином [138]. Микроваскуларната густина во полиња со најинтензивна неоваскуларизација е потврдена како независен и високозначаен прогностички индикатор за вкупното преживување и појава на рецидив и кај пациентки со карцином на града во ран стадиум [139]. Таа е потврдена како независен прогностички фактор за рецидив на болеста кај пациентки со рак на градата и кај пациентки со и кај пациентки без нодални метастази [140,141].

За разлика од горенаведените студии, други автори не успеале да најдат поврзаност помеѓу интратуморската васкуларна густина и појавата на метастатска болест кај ракот на градата [142], ниту да најдат поврзаност со исходот и појавата на нодални метастази кај пациенти со малиген меланом [143], или пак да најдат поврзаност со појава на нодални метастази кај карцином на јазикот [144].

Кај туморите од оралната празнина е утврдено дека микроваскуларната густина (МВГ) не се разликува значајно меѓу оралната мукоза и епителната дисплазија, но значајно е покачена кај туморското ткиво. Исто така, утврдено е и дека нема експресија на ангиогенските фактори во оралната мукоза, а е изразена во туморското ткиво и е во корелација со микроваскуларната густина, Т статусот, диференцијацијата на туморот и степенот на инвазија [145]. Во повеќе студии во кои е испитувана МВГ во туморот, утврдено е дека таа е повисока во туморското ткиво отколку во контролните групи; понатаму дека таа претставува ризик-фактор за појава на метастази [146], дека има клучна улога кај SCC и е во корелација со градусот и појавата на нодални метастази [39], дека неоангиогенезата се случува во раната фаза на развој и дека е паралелна со туморската прогресија [37]. Во друга објавена студија која го анализираше оралниот планоцелуларен карцином во кој МВГ била одредувана имунохистохемиски, не била најдена поврзаност на МВГ со локализацијата на туморот, Т статусот, диференцијацијата на туморот и присуството на метастази во цервикалните лимфни јазли [147].

Hollingsworth HC и сор. ги испитувале параметрите одбрани за прогресијата на туморот: длабочината на инвазијата и васкуларната густина, кои ги споредиле со елементи од pTNM класификацијата како потврдени елементи со прогностичко значење за развој на метастази и со влијание врз преживувањето на пациентите [138]. Докажале дека pTNM класификацијата ги опфаќа клиничките карактеристики на туморот со кои се овозможува прогнозата као и можноста за компарација на резултати [138].

Кај кожниот планоцелуларен карцином (ако се исклучи крацином *in situ*), туморите во категоријата pT се делат на тумори помали од 2 cm (pT1) и тумори поголеми од 2 cm (pT2), а потоа се додаваат и тумори кои поплатко или подлабоко се шират во околните ткива (pT3 и pT4). Кај планоцелуларниот карцином на долната усна туморите исто така се делат на помали и поголеми од 2 cm (pT1 и pT2, соодветно) и потоа на поголеми од 4 cm и тумори кои се шират во коска. Според Alkaisy A и соработниците туморите на долна усна кои достигнуваат 2 cm се екстремно големи тумори [136].

Поради горе наведеното [136,138] , ние во оваа наше истражување како референтни параметри ги вклучивме : pT параметарот од TNM класификацијата на AJCC, као и градусот (степенот) на хистолошката диференцијација. Кај повеќето автори од литературата се потврдени како предиктивни фактори за прогресија кај планоцелуларниот карцином како и за појавата на метастази во регионалните лимфни јазли. Поаѓајќи од фактот дека во литературата нема доволно студии кои ги испитувале планоцелуларните карциноми на долната усна (специфично) заедно со кожните планоцелуларни карциноми, а заради актуелноста на ова поле на истражување, ние во нашата студија токму на тоа се осврнавме. Беше анализирана и егзактно измерената длабочината на инвазијата со цел одредување на нејзината предиктивна вредност.

Анализата беше направена во однос на локалниот раст и диференцијација на туморот кај кожните карциноми, како и во однос на појавата на вратни метастази кај карциномот на долната усна. Резултатите добиени во ова истражување покажаа дека длабочината на инвазијата кај кожниот планоцелуларен карцином е во значајна корелација со pT статусот и градусот на неоплазмата(G), а се во согласност со цитираната литература. Во ова истражување ние покажавме дека длабоката инвазија беше присутна кај неоплазмите со димензии поголеми од 2 cm (pT2) и со лоша хистолошка диференцираност (G3), во однос на оние со големина до 2 cm (pT1), кои беа добро или умерено диференцирани (G1 и G2).

Кај карциномите на долната усна беше најдена значајно подлабока инвазија во стромата на планоцелуларниот карцином кај пациентите кои имаа метастатски депозити во вратните лимфни јазли во однос на оние кои беа без метастази во вратните лимфни јазли. Оттука произлегува дека длабочината на инвазијата на примарната неоплазма може да се користи како предиктивен параметар за појава на метастази во вратните лимфни јазли кај пациенти со планоцелуларен карцином на долна усна. Овој наод е исто така во согласност со цитираната литература .

Анализата на густината на неоангиогенезата во оваа студија покажа дека постои значајна разлика во густината на васкуларизацијата помеѓу нормалната кожа и планоцелуларните карциноми на кожа и помеѓу туморите со различна

диференцираност. Кај карциномите на долна усна густината на неоваскуларизацијата беше значајно различна помеѓу здравото и карциномското ткива, помеѓу туморите со различен pT статус и различен степен на диференцираност (G). Неоваскуларизацијата во оваа студија беше и значајно повисока кај пациенти со примарен планоцелуларен карцином на долната усна со присутни метастатски депозити во цервикалните лимфни јазли во споредба со оние без метастази.

Од горенаведеното, како и во случаите со длабочината на инвазијата, произлегува дека густината на неоваскуларизацијата на примарната неоплазма може да се користи како предиктивен параметар за појава на метастази во вратните лимфни јазли кај пациентите со планоцелуларен карцином на долната усна, наод кој исто така е во согласност со поголемиот број автори кои ја истражувале оваа област.

Резултатите добиени од ова истражување покажуваат дека хистолошките параметри, **длабочината на инвазија** и **васкуларната густина** може да имаат апликативно значење при носење на одлука за понатамошно лекување на пациентите со планоцелуларен карцином. Неопходно е да се развиваат нови терапевтски модалитети и стратегии, особено кај пациентите со планоцелуларен карцином на долната усна и да се земат во предвид овие податоци при планирањето на оперативните и онколошки третмани кај овие пациенти. Вклучувањето на овие два параметри би овозможиле подолго преживување кај голем број на пациенти.

Разбирањето на комплексните параметри кои ги регулираат интеракциите помеѓу неоплазмата и васкуларните структури ќе помогнат во подобрување на анти-ангиогенските стратегии не само во третманот на карциномите, туку и во спречувањето на нивното повторно појавување.

## **8. ЗАКЛУЧОЦИ**

### 1. Паноцелуларниот карцином на кожата:

1.1. Има статистички значајно подлабока туморска инвазија кај карциномите со pT2 статус во однос со неоплазмите со pT1 статус.

1.2. Има статистички значајна подлабока стромална инвазија кај карциномите со повисок градус (G).

1.3. Во стромата на инвазивниот фронт содржи статистички значајно поголем број на крвни садови одошто во дермисот на здравата кожа.

1.4. Има статистички значајна поголема васкуларна густина кога неоплазмите се со T2 статус во однос со неоплазмите со pT1 статус.

1.5. Има статистички значајна поголема васкуларна густина кај неоплазмите со повисок градус (G).

### 2. Неоваскуларизацијата во инвазивниот фронт на паноцелуларниот карцином на кожата е во позитивна корелација со длабочината на инвазијата на неоплазмата во дермисот, односно, колку е подлабока инвазијата толку е погуста неоваскуларната мрежа во инвазивниот фронт на неоплазмата.

### 3. Паноцелуларниот карцином на долна усна:

3.1. Има статистички значајно подлабока стромална инвазија кај карциномите со T2 статус во однос со неоплазмите со pT1 статус.

3.2. Има статистички значајно подлабока стромална инвазија кај неоплазмите со повисок градус (G).

3.3. Во стромата на инвазивниот фронт содржи статистички значајно поголем број на крвни садови одошто во дермисот на здравата кожа.

3.4. Има статистички значајна поголема васкуларна густина кај неоплазмите со T2 статус во однос со неоплазмите со pT1 статус.

3.5. Има статистички значајно поголема васкуларна густина кај неоплазмите со повисок градус (G)

4. Неоваскуларизацијата во инвазивниот фронт на планоцелуларниот карцином е во позитивна корелација со длабочината на инвазијата на неоплазмата во дермисот на долната усна, односно колку е подлабока инвазијата толку е погуста и неоваскуларната мрежа во инвазивниот фронт на неоплазмата.

5. Кај примарниот планоцелуларен карцином на долната усна со метастатски депозит во вратните лимфни јазли:

5.1. Длабочината на туморската инвазија е статистички значајно поголема во споредба со неоплазмите без метастази во вратните лимфни јазли.

5.2. Густината на неоваскуларизацијата е статистички значајно поголема во споредба со неоплазмите без метастази во вратните лимфни јазли.

5.3. Појавата на метастази во вратните лимфни јазли е во статистички значајна позитивна корелација со диференцираноста на неоплазмата.

6. Длабочината на инвазијата на планоцелуларниот карцином на кожата и планоцелуларниот карцином на долна усна во стромата и неоваскуларната густина во инвазивниот фронт на неоплазмата се параметри кои имаат улога во прогресијата на неоплазмата и претставуваат предиктивни фактори за појава на вратни метастази кај планоцелуларниот карцином на долна усна.



## **9. ЛИТЕРАТУРА**

1. Fabbrocini G, Triassi M, Maurello CM, Torre G, Annunziata CM, De Vita V, Pastore F, D'Arco V, Monfrecola G. Epidemiology of skin cancer: role of some environmental factors. *Cancers (Basel)*. 2010;2:1980-1989.
2. Lebowitz M. Actinic keratosis: epidemiology and progression to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003;149:31-33.
3. Elder ED, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF, Xu X, editors. *Lever's histopathology of skin*. 10th edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2009. p. 817-823.
4. Yan W, Wistuba II, Emmert-buck RM, Erickson SH. Squamous cell carcinoma—similarities and differences among anatomical sites. *Am J Cancer Res* 2011; 1(3):275-300.
5. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. *J Am Acad Dermatol* 1992;26(6):976-990.
6. Le Boit EPH, Burg G, Weedon D, Sarasin A, editors. *Pathology and genetics of skin tumors*. Lyon: IARC Press; 2006. p. 20-25.
7. Brougham NDLS, Dennett ER, Camerom R. Tan ST. The Incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *J Surgl Oncol* 2012;106(7):811-815.
8. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, et al. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis* 1999;5:185–195.
9. Khuder SA. Etiologic clues to lip cancer from epidemiologic studies on farmers. *Scand J Work Environ Health* 1999;25:125–130.
10. Moretti A, Vitullo F, Augurio A, Pacella A, Croce A. Surgical management of lip cancer. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2011; 31(1): 5–10.
11. Vartanian JG, Carvalho AL, Araujo Filho, et al. Predictive factors and distribution of lymph node metastasis in lip cancer patients and their implications on the treatment of the neck. *Oral Oncology*. 2004;40:223–227.
12. Zitsch RP. Carcinoma of the lip. *Otolaryngol Clin North Am* 1993;26:265–277.
13. Rodolico V, Barresi E, Di Lorenzo R, Leonardi V, Napoli P, Rappa F, Di Bernardo C. Lymph node metastasis in lower lip squamous cell carcinoma in relation

to tumour size, histologic variables and p27Kip1 protein expression. *Oral Oncology* 2004 ;40( 1):92–98.

14. Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O'Sullivan B. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a meta-analysis of reported studies. *Cancer* 2009;115(7):1489-97.

15. Gassen NT, Mignens SAQ, Costantin V, Machado SMS, Silva AN, Hernandez PAG. Expression of biological markers in oral squamous cell carcinomas. *Stomatos* 2012;18(35):40-45.

16. Lacina L, Dvorankova B, Smetana K, Gabius HJ. Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *Int J Radiat Biol.* 2007;(11-12):837-848.

17. De-Assis EM, Pimenta LGGS, Costa-e-Silva E, Souza PEA, Horta MCR. Stromal myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bukal.* 2012;17(5):733-738.

18. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FI, Trotti A. Cancer staging handbook: from the AJCC cancer staging manual. AJCC editors, 7th edition. New York: Springer; 2010. p.359-375.

19. Kolonin MG, Evans KW, Mani SA, Gomer RH. Alternative origins of stroma in normal organs. *Stem Cell Res* 2012;8:312-323.

20. Hinz B, Phan HS, Thannickal JV, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, Wever De O, Mareel M, Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology. Paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* 2012;180(4):1340-1355.

21. Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:463-471.

22. Gijatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis M. The pathology of tumor stromatogenesis. *Cancer Biol Ther* 2007;6(5):639-64.

23. Bremnes RM, Donnem T, Al-Said S, Al-Shibly K, Andersen S, Sirera R, Camps C, Marinez I, Busund LT. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis. *J Thorac Oncol* 2011;6:209-217.

24. Koukourakis M, Gijatromanolaki A, Bougioukas G, Sivridis E. Comparative study of metabolism related protein expression in cancer cell and tumor associated stroma. *Cancer Biol Ther* 2007;6(9):1476-1479.

25. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997;6(5):199-213.
26. Kessenbrock K, Plakss V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141:52-67.
27. Kawashiri SH, Tanaka A, Nugushi N, Hase T, Nakaya H, Ohara T, Kato K, Yamamoto E. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2009; 31:1346-1353.
28. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, Shirasuna K. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:315–323.
29. Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol* 2002; 20:189–194.
30. Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, Vesterlund E, Alexander JP, Overall CM, Sorsa T, Salo T. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1-2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1998; 77(12):2239-2245.
31. Porto LPA, Ramalho LMP, Paraguassú GM, Borba FC, dos Santos JN, Barros AC. Myofibroblasts immunoprofile in the stroma of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2013;49(1):131-132.
32. Kacar A, Arikok AT, Kokenek Unal TD, Onder E, Hucumenoglu S, Alper M. Stromal expression of CD34,  $\alpha$ -smooth muscle actin and CD26/DPPIV in squamous cell carcinoma of the skin: a comparative immunohistochemical study. *Pathol Oncol Res* 2012;18(1):25-31.
33. Velasco P, Lange-Asschenfeldt B. Dermatological aspects of angiogenesis. *Br J Dermatol* 2002;147:841-852.
34. Gijatromanolaki A, Koukourakis M, Sivridis E, Thore PHE, Brekken RA, Konstantinos S, Fountzilias G, Gatter KC, Haris AL. Tumor specific activation of the VEGF/KDR angiogenic pathway in a subset of locally advanced cell head and neck carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:313-319.
35. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401-410.

36. Gijatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis M. Tumour angiogenesis: vascular growth and survival. *APMIS* 2004;112:431-440.
37. Florence MEB, Massuda JY, Bröcker EB, Metze K, Cintra ML, De Souza EM. Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(3):465-468.
38. Loggini B, Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Camacci T, De Jeso K, Cervadoro G, Pingitore R, Barachini P, Leocata P, Fontanini G. CD34 microvessel density and VEGF expression in basal and squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 2003;199(11):705-712.
39. Ascani G, Balercia P, Messi M, Lupi L, Goteri G, Filosa A, Stramazotti D, Pieramici T, Rubini C. Angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2005;25(1)13-17.
40. Shivamallappa SM, Venkatraman NT, Shreedhar B, Mohanty L, Shenoy S. Role of angiogenesis in oral squamous cell carcinoma development and metastasis: an immunohistochemical study. *Int J Oral Sci* 2011;3(4):216-224.
41. Breuninger H, Black B, Rassner G. Microstaging of squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1990;94(5):624-7.
42. Vermeulen PB, Gasarini G, Fox SB, Toi M, Martin M, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dittix Y. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2474-2484.
43. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008;23:601-607.
44. Strieth S, Hartschuh W, Pilz L, Fusening NE. Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinomas of human skin. *Br J Cancer* 2000; 82(3):591-600.
45. Tan WJ, Chia CS, Tan HK, Soo KC, Iyer NG. Prognostic significance of invasion depth in oral tongue squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2012;74(5):264-70.
46. Emerson RE, Ulbright TM, Eble JN, Geary WA, Eckert GJ, Cheng L. Predicting cancer progression in patients with penile squamous cell carcinoma: The importance of depth of invasion and vascular invasion. *Mod Pathol* 2001;14(10):963-968.

47. Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B, Tropé C, Bryne M. Tumor size, depth of invasion, and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999;74(2):245-251.
48. Leoit, EP, Gunter B, Weedon D, Sarasin A. Pathology & Genetics Skin Tumours. WHO Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2006.
49. Yuspa SH. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis-thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1994;54(5):1178-89.
50. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma *PNAS* 1991;88 (22):10124-10128.
51. Farhadieh RD, Salardini A, Yang JL, Russell P, Smee R. Diagnosis of second head and neck tumors in primary laryngeal SCC is an indicator of overall survival and not associated with poorer overall survival: a single centre study in SCC highlights and insights in 987 patients. *J Surg Oncol* 2009;101:72-77.
52. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002; 23:65-81.
53. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002;97:72-81.
54. Joshi PC. Copper (II) as an efficient scavenger of singlet molecular oxygen. *Indian J Biochem Biophys* 1998;35:208-215.
55. NguyenP, Vin-Christian K, Ming ME, Berger T. Aggressive squamous cell carcinoma in persons infected with the human immunodeficiency virus. *Arch Dermatol* 2002;138:758-763.
56. Turner RJ, Leonard N, Malcolm AJ, Lawrence CM, Dahl MG. A retrospective study of outcome of Mohs' micrographic surgery for cutaneous squamous cell carcinoma using formalin fixed sections. *Br J Dermatol* 2000;142:752-757.
57. Lund HZ. How often does squamous cell carcinoma of the skin metastasize? *Arch Dermatol* 1965; 92:635-637.
58. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous cell carcinoma. *N Engl Med* 2001;334:957-983.
59. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Arch Iran Med* 2015;18(5):314-319.

60. Moreti A, Vitullo F, Augurio A, Pacella A, Croce A. Surgical management of lip cancer *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2011;31(1):5-10.
61. Luna-Ortiz K, Güemes-Meza A, Villavicencio-Valencia V, Mosqueda-Taylor A. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. *Oral Oncol* 2004;40(10):992-999.
62. Rodolico V, Barresi E, Di Lorenzo R, Leonardi V, Napoli P, Rappa F, Di Bernardo C. Lymph node metastasis in lower lip squamous cell carcinoma in relation to tumour size, histologic variables and p27Kip1 protein expression. *Oral Oncol*. 2004;40(1):92-8.
63. Vartanian JG, Carvalho AL, Araujo Filho, et al. Predictive factors and distribution of lymph node metastasis in lip cancer patients and their implications on the treatment of the neck. *Oral Oncology* 2004;40:223–227.
64. Plzák J, Lacina L, Chovanec M, Dvoránková B, Szabo P, Cada Z, Smetana K Jr. Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties. *Anticancer Res* 2010;30(2):455-62.
65. Breitkreutz D, Mirancea N, Nischt R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol* 2009;132:1-10.
66. Singh M, Jha R, Melamed J, Shapiro E, Hayward SW, Lee P. Stromal androgen receptor in prostate development and cancer. *Am J Pathol* 2014;184(10):2598-2607.
67. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005;13:7–12.
68. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003;200:500–503.
69. Fromiguet O, Louis K, Dayem M, Milanini J, Pages G, Tartare-Deckert S, Ponzio G, Hofman P, Barbry P, Auburger P, Mari B. Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. *Oncogene* 2003;22:8487-8497.
70. Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin Jr EW, de la Chapelle A, Frankel WL. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004;23:366-377.
71. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999;59:5002-5011.

72. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. "Stromatogenesis" and tumour progression. *Int J Surg Pathol* 2004;12:1-9.
73. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1776–1784.
74. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–674.
75. Yang F, Tuxhorn JA, Ressler SJ, McAlhany SJ, Dang TD, Rowley DR. Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Res* 2005;65:8887–8895.
76. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006;124:263–266.
77. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003;200:429–447.
78. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 1996;76:69–125.
79. Desmouliere A, Redard M, Darby I, et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995;146:56–66.
80. Eyden B, Banerjee SS, Shenjere P, et al. The myofibroblast and its tumours. *J Clin Pathol* 2009;62:236–249.
81. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3:453–458.
82. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:666–671.
83. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007;170:1807–1816.
84. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 2008;123(10):2229–2238.
85. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors. I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G2–G7.

86. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007;127:526–37.
87. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990;348:699–704.
88. Dimanche-Boitrel MT, Vakaet L, Jr, Pujuguet P, Chauffert B, Martin MS, Hammann A, Van Roy F, Mareel M, Martin F. In vivo and in vitro invasiveness of a rat colon cancer cell line maintaining E-cadherin expression. An enhancing role of tumor-associated myofibroblasts. *Int J Cancer* 1994;56:512–521.
89. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:1392–1400.
90. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 2004;6:17–32.
91. Micke P, Kappert K, Ohshima M, Sundquist C, Scheidl S, Lindahl P, Heldin C-H, Botling J, Ponten F, Ostman A. In situ identification of genes regulated specifically in fibroblasts of human basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2007;127:1516–23.
92. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335–348.
93. Beppu H, Mwirerwa ON, Beppu Y, Dattwyler MP, Lauwers GY, Bloch KD, Goldstein AM. Stromal inactivation of BMPRII leads to colorectal epithelial overgrowth and polyp formation. *Oncogene* 2008;27:1063–1070.
94. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL. TGF- $\beta$  signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 2004;303:848–851.
95. Bremnes RM, Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, Camps C, Marinez I, Busund LT. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *Thorac Oncol* 2011;6(1):209-217.
96. Boire A, Covic L, Agarwal A, et al. PAR1 is a matrix metalloprotease- 1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 2005;120:303–313.



97. Liotta AL. Adhere, Degrade, and Move: the three-step model of invasion. *Cancer Res* 2016; 76(11):3115–3117.
98. Martin TA, Ye L, Sanders AJ, et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.
99. Brooks PC. Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:187–194.
100. Folkman J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* 1996;275:150–154.
101. Pauli BU, Schwartz DE, Thonar EJM, Kuettnner KE. Tumor invasion and host extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev* 1983;2:129-152.
102. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* 2009;122:159-163.
103. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123(24):4195–4200.
104. Veidal SS, Karsdal MA, Nawrocki A, Larsen MR, Dai Y, Zheng Q, Hägglund P, et al. Assessment of proteolytic degradation of the basement membrane: a fragment of type IV collagen as a biochemical marker for liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011;4:22.
105. Xu X, Wang Y, Chen Z, Sternlicht MD, Hidalgo M, Steffensen B. Matrix metalloproteinase-2 contributes to cancer cell migration on collagen. *Cancer Res* 2005;65(1):130-6.
106. Zhimin L, Guoqiang J, Blume-ensen P, Hunter T. Epidermal Growth Factor-Induced Tumor Cell Invasion and Metastasis Initiated by Dephosphorylation and Downregulation of Focal Adhesion Kinase. *Mol. Cell. Biol* 2001;21:4016-4031.
107. Madsen C, Sahai E. Cancer Dissemination-Lessons from Leukocytes. *Developmental Cell* 2010;19:13–26.
108. Matus DQ, Lohmen LL, Kelly LC et al. Invasive Cell Fate Requires G1-Cell Cycle Arrest and Histone Deacetylase-Mediated Changes in Gene Expression. *Developmental Cell* 2015;35:162–174.
109. Fox SB, Harris AL. Histological quantitation of tumor angiogenesis. *APMIS* 2004;112:413-30.
110. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenetic process. *Curr Mol Med* 2003;3:643-651.

111. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* 2009;45:1924-1934.
112. Abulafia O, Triest We, Sherer DM. Angiogenesis in squamous cell carcinoma in situ and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1996;88(6):927-32.
113. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 2007;100:782-794.
114. Gerhart H, Betsholtz CH. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:15-23.
115. Weidner N. Measuring intratumoral microvessel density. *Methods Enzymol* 2008;444:305-23.
116. Zatterstrom UK, Brun E, Willen R, Kjellen E, Wennerberg J. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1995;17(4):312-318.
117. Auguste P, Lemiere S, Lahargue FL, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;54:53-63.
118. Krakhmal NV, Zavyalova MV, Denisov EV, Vtorushin SV, Perelmuter VM. Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae* 2015;7(2):17-28.
119. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172(5):902-908.
120. Schraut WH, Wang CH, Dawson PJ, Block GE. Depth of invasion, location, and size of cancer of the anus dictate operative treatment. *Cancer* 1983;51:1291-1296.
121. Seto, Y, Shimoyama S, Kitayama J, et al. Lymph node metastasis and preoperative diagnosis of depth of invasion in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2001;4:34.
122. Ishiguro A, Uno Y, Ishiguro Y, Munakata A, Takayuki Morita T. Correlation of lifting versus non-lifting and microscopic depth of invasion in early colorectal cancer. *Cancer* 1999;50(3):329-333.
123. Creasman WT, Morrow CP, et al. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer *Cancer* 1987;60:2035-2041.
124. Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura Sh. Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Cancer* 1997;19(3):205-210.

125. Clayman GL, Lee JJ, Holsinger C, Zhou X, Duvic M, El-Naggar AK, et al. Mortality Risk From Squamous Cell Skin Cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:759-765.
126. Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg*. 2002;28(3):268-73.
127. Endo Y, Tanioka M, Miyachi Y. Prognostic Factors in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Is Patient Delay in Hospital Visit a Predictor of Survival? *ISRN Dermatol* 2011; 2011:285289. doi: 10.5402/2011/285289.
128. Brantsch KD, Meisner C, Schönfisch B, Trilling B, JörgWehner-Caroli, Röcken M, Breuninger H. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol* 2008;9(8):713-720.
129. Weinberg AS, Ogle CA, Shim EK. Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: an update. *Dermatol Surg* 2007;33(8):885-899.
130. Kuan EC, Mallen-St Clair J, Badran KW, St John MA. How does depth of invasion influence the decision to do a neck dissection in clinically N0 oral cavity cancer? *Laryngoscope* 2016;126(3):547-548.
131. Shariat-Madar B, Lui JC. Role of Depth of Invasion in Evaluation and Management of Early-stage Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Int Head Neck Surg* 2017;8(2):84-88.
132. Haksever M, Inach HM, Tuncel U, Kukcuoglu SS, Uyar M, Genc O, Irkkan C. The effects of tumor size, degree of differentiation, and depth of invasion on the risk of neck node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Ear Nose Throat J* 2012;91(3): 130–5.
133. Kane SV, Gupta M, Kakade AC, D Cruz A. Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinoma of the oral cavity. *J Surg Oncol* 2006;32(7):795–803.
134. Woolgar JA, Triantafyllou A. Pitfalls and procedures in histopathological diagnosis of oral and orolaryngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis. *Oral Oncol* 2009;45(4–5):361–85.
135. Popovich-Monevska D, Janevska V, Naumovski S, Popovski V, Benedetti A, Bozovich S, Ismani A. Multiple pathohistological parameters influencing prognosis and survival of oral cancer patients. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 2013; 34(2):169-74.
136. Alkaisi A, Zaidan HA, Al Kabtan IAH. The Predictive Value of Tumor Depth for Cervical Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma - Prospective and Retrospective Study in Iraq. *J Cancer Sci Ther* 2014;6:253-257.

137. Daniele E, Rodolico V, Leonardi V, Tralongo V. Prognosis in lower lip squamous cell carcinoma: assessment of tumor factors. *Pathol Res Pract* 1998;194(5):319-324.
138. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995;147:33.
139. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(24):1875-87.
140. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993;55(3):371-374.
141. Costello P, McCann A, Carney DN, Dervan PA. Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma. *Hum Pathol* 1995;26(11):1181-1184.
142. Fall NR, Fish DE, Hunt N, Goldin RD, Guillou PJ, Monson JRT: Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real? *Surg Oncol* 1992;1:223-229.
143. Carnochan P, Briggs JC, Westbury G, Davies AJ. The vascularity of cutaneous melanoma: a quantitative histologic study of lesions 0.85-1.25 mm in thickness. *Br J Cancer* 1991;64:102-107.
144. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JI. Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:417-422.
145. Li C, Terakado N, Klosek SK, Ishikawa T, Nakashiro K, Hamakawa H. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;34(5):559-565.
146. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, Battistutti W, Hönigschnabl S. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med* 2003;32:455-460.
147. Moriyama S, Kumagai S, Kawashiri K, Kojima K, Kakihara E, Yamamoto M. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997;33(5):369-374.