УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ” ВО СКОПЈЕ
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ
ЈЗУ УК за Хирургија на лице, вилици и врат - Максилофацијална хирургија

Санела Селим Идоска

ЕВАЛУАЦИЈА НА ФИБРОБЛАСТИ – АСОЦИРАНИ СО КАРЦИНОМ (CAFs) и ТУМОР – АСОЦИРАНИ МАКРОФАГИ (TAMs) КАЈ ОРАЛЕН ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ (OSCC): ИМУНОХИСТОХЕМИСКА СТУДИЈА

Докторски труд

Скопје, 2022

Докторанд:
САНЕЛА СЕЛИМ ИДОСКА

Тема:

ЕВАЛУАЦИЈА НА ФИБРОБЛАСТИ - АСОЦИРАНИ СО КАРЦИНОМ (CAFs) И ТУМОР – АСОЦИРАНИ МАКРОФАГИ (TAMs) КАЈ ОРАЛЕН ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ (OSCC): ИМУНОХИСТОХЕМИСКА СТУДИЈА

Ментор:
Проф. д-р. ДАНИЦА ПОПОВИЌ – МОНЕВСКА
Катедра за Максилофацијална хирургија
Стоматолошки факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје

Научна област:
МАКСИЛОФАЦИЈАЛНА ХИРУРГИЈА

Санела Идоска

ЕВАЛУАЦИЈА НА ФИБРОБЛАСТИ - АСОЦИРАНИ СО КАРЦИНОМ (CAFs) И ТУМОР – АСОЦИРАНИ МАКРОФАГИ (TAMs) КАЈ ОРАЛЕН ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ (OSCC): ИМУНОХИСТОХЕМИСКА СТУДИЈА

- А п с т р а к т -

Вовед: CAFs и TAMs се асоцирани со туморска прогресија кај различни канцери. Бидејќи преживувањето кај пациентите со орален планоцелуларен карцином (OSCC) е ниско, а смртноста е висока се наметнува потребата од идентификација на клинички апликабилни маркери за стратификација на пациентите со неповолна прогноза.
Цел: Целта на студијата е утврдување на поврзаност на густината на CAFs и TAMs со клиничко-патолошките параметри на OSCC, рецидивантноста на туморот (DFS) и вкупното преживување (OS). Исто така ја евалуиравме прогностичката вредност на локализацијата на макрофагите во TS и TN.
Методи: Вкупно 55 ткивни примероци од пациенти со OSCC беа вклучени во студијата. CAFs беа идентификувани во TS со имунохистохемиско боење со моноклонално антитело α-SMA, а TAMs во TS и TN беа идентификувани со моноклонално антитело CD68, а потоа ја проценивме нивната прогностичка сигнификантност.
Резултати: Постои сигнификантна асоцијација на T, N, и стадиумот на болеста со густината на CAFs. Не утврдивме сигнификантна разлика помеѓу густините на TAMs во TS и TN и клиничко-патолошките параметри. При појава на локален рецидив процентуалната застапеност на пациентите кои имаа CAFs беше сигнификантно поголема споредено со пациентите кои немаа CAFs.
Регистрирана е сигнификантна линеарна позитивна корелација на TAMs во TS со бројот на вратни LNM. Густината на CAFs и TAMs нема прогностичка сигнификантност за DFS и OS.
Заклучок: CAFs и TAMs сеште не може да се користат како сигнификантни поволни или неповолни прогностички фактори. При анализа на инфилтрација со TAMs важно е да се анализира нивната локација во TS и TN.
Клучни зборови: Орален планоцелуларен карцином (OSCC), CAFs, TAMs, α-SMA,

EVALUATION OF CARCINOMA - ASSOCIATED FIBROBLASTS (CAFs) AND TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES (TAMs) IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA (OSCC): IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

- A b s t r a c t –

Introduction: CAFs and TAMs are associated with disease progression in various cancers. Due to low overall survival and high mortality rate the need arises for identifying clinically applicable markers for stratification of patients with an unfavorable prognosis.
Aim: The aim of the study was to determine the relationship between the density of CAFs and TAMs with the clinicopathologic parameters, tumor recurrence (DFS), and overall survival (OS) of oral squamous cell carcinoma. We also evaluated the prognostic value of macrophage localization in TS and TN.
Methods: A total of 55 tissue specimens from OSCC patients were included in the study. CAFs were identified in TS by immunohistochemical staining with α-SMA monoclonal antibody, and TAMs in TS and TN were identified by monoclonal antibody CD68. Then we assessed their prognostic significance. In adition we assessed the impact od macrophage localization within the tumor stroma (TS) and tumor nest (TN).
Results: There is a significant association of T, N, and disease stage with the density of CAFs. We did not find a significant difference between the densities of TAMs in TS and TN and the clinical-pathological parameters. At the onset of local recurrence, the percentage of patients who had CAFs was significantly higher compared to patients who did not have CAFs.
Significant linear positive correlation of TAMs in TS with the number of neck LNMs was registered. The density of CAFs and TAMs has no prognostic significance for DFS and OS.
Conclusion: CAFs and TAMs can not yet be used as significant favorable or unfavorable prognostic factors. When analyzing infiltration with TAMs it is important to analyze their location in TS and TN.
Keywords: Oral squamous cell carcinoma (OSCC), CAFs, TAMs, α-SMA, CD68

Изјавувам дека докторскиот труд е оригинален труд што го имам изработено самостојно.

Своерачен потпис на докторандот
Санела Идоска с.р.

Изјавувам дека електронската верзија на докторскиот труд е идентична со отпечатениот докторски труд.

Потпис на авторот,

СОДРЖИНА

1. Вовед 8
1.1.CAFs и TAMs во TME на OSCC 8
1.2. Преоперативна евалуација на пациент со OSCC 11
1.2.1. Одредување клинички стадиум 11
1.2.2. Одредување патолошки стадиум 13
1.3.Третман на орален планоцелуларен карцином 16
1.3.1.Хируршки третман на примарен тумор 16
1.3.2.Хируршки третман на N0 и N+ врат за LNM 18
1.3.3.Постоперативен адјувантен третман 19
2. Преглед на научните достигнувања поврзани со предметот на истражување 20
2.1. CAFs, имунохистохемиски маркери за идентификација, улога во раст и прогресија на OSCC и прогностичка сигнификантност 20
2.2. TAMs, имунохистохемиски маркери за идентификација, типови, улога во раст и прогресија на OSCC и прогностичка сигнификантност 23
2.3. Меѓусебна поврзаност на CAFs и TAMs и улога во прогресија на OSCC 25
2.4. Патолошки параметри за агресивност на OSCC и нивна прогностичка улога 26
3. Образложение на работните хипотези 28
4. Применети научни методи и начин на работа 29
4.1. Карактеристики на пациентите, инклузиони и ексклузиони критериуми 29
4.2. Транспорт и чување на ткивни примероци 30
4.2.1.Подготовка на примероците и постапка на работа 30
4.2.2. Имунохистохемиска дијагностичка метода за ин-витро боење со антитела 30
4.2.3. Dako Pt Link инструкции за депарафинизација и Target Retrieval 31
4.2.4. Autostainer Link 48 31
4.3. Интерпретација и бодирање на резултати 32
4.4. Статистичка анализа 40
5. Добиени резултати и нивно значење 41
5.1.Генерални карактеристики и CAFs 42
5.1.1.Демографски параметри и CAFs 44
5.1.2.Клиничко-патолошки параметри и CAFs 48
5.1.3.Клиничко-патолошки параметри и TAMs 58
5.2. Корелација на CAFs и TAMs со селектирани параметри 72
5.3. Меѓусебна корелација на CAFs и TAMs 77
5.4. Преживување од OSCC и поврзаност на CAFs, TAMs и други параметри со смртен исход 79
5.4.1. Вкупно преживување од OSCC 79
5.4.2. Преживување од OSCC и CAFs 80
5.4.3. Преживување од OSCC и TAMs 82
5.4.4. Cox Proportional Hazard модел – OSCC преживување 84
5.5. Предиктивна улога на CAFs, TAMs и други параметри за морталитет од OSCC 86
5.6. Преживување без болест (DFS) 89
5.6.1. Преживување без болест (DFS) и CAFs 89
5.6.2. Преживување без болест (DFS) и TAMs 91
5.7. Дискусија 92
5.7.1. Клиничко-патолошки параметри и CAFs 92
5.7.2. Клиничко-патолошки параметри и TAMs 98
5.7.3. Корелација на CAFs и TAMs со селектирани параметри 100
5.7.4. Преживување од OSCC и поврзаност на CAFs, TAMs и други параметри со смртен исход 102
5.7.5. Cox Proportional Hazard модел – OSCC преживување 103

5.7.6. Предиктивна улога на CAFs, TAMs и други параметри за морталитет од OSCC 105
5.7.7. Преживување без болест (DFS) и CAFs и TAMs 106

6. Примена на резултатите од истражувањето 107
7. Заклучок 108
8. Користена литература 110
9. Кратенки 119

1. ВОВЕД

1.1. CAFs и TAMs во туморска микросредина (TME) на орален планоцелуларен карцином (OSCC)

Планоцелуларниот карцином на орална мукоза (OSCC) е малигнитет со многу висока инциденца и морталитет што претставува сериозен здравствен проблем во светот (1). И покрај најновите сознанија за молекуларната биологија, достигнувањата во дијагностиката и третманот, вклучително и мултимодалната анти -туморска терапија, сепак смртноста останува многу висока како и пред 30 години, а преживувањето е помало од 50%. Високата смртност се должи на релапсот на болеста, пред се заради локални/локорегионални рецидиви и метастазирањето на карциномот во регионалните лимфни јазли на вратот и далечните органи. Биолошкото однесување на оралниот SCC е непредвидливо, голем дел од нив покажуваат агресивно биолошко однесување уште во иницијалниот стадиум на болеста давајќи рани регионални вратни метастази и смрт. Од друга страна, напреднати тумори во моментот на дијагностицирање може да се развиваат споро, да дадат доцни метастази, пациентите немаат рецидив на болеста долго време по терапијата, а времето на преживување е подолго (2).Оваа варијабилност во туморската прогресија е мотивација повеќе за истражувачите да се фокусираат на факторите кои може да влијаат на прогнозата.

До неодамна причината за прогресија на карциномот се должеше на кумулативните генетски промени во оралниот епител, но овој модел кој се базира исклучиво на алтерациите во оралниот епител доживува промени. Предложен е нов модел во кој туморската микросредина (TME) има сигнификантен придонес во прогресијата на карциномот. Разбирањето на придонесот на стромата во канцерската прогресија има прогностичка, но и терапевтска важност. Уште во 1889 година, Paget ја предложил хипотезата на "семето и почвата", во која инвазијата со неопластично ткиво се објаснува со фактот дека канцерите индуцираат промени во соседните стромални клетки (3). Планоцелуларните карциноми (SCC) се малигни епителни неоплазми со атипично аранжирани епителни клетки со различен степен на диференцијација. Онкогенетски мутираните епителни клетки инвадираат низ базалната мембрана предизвикувајќи промени во микросредината, а кои микроскопски се забележуваат како промени во стромата.

SCC се состои од две различни и меѓусебно зависни компоненти: туморски епителни клетки и строма, во која тие се дисперзирани. TME или таканаречена "строма" (TS) е комплексен систем сочинет од клеточна и не-клеточна компонента. Клеточната компоненета не само што ги содржи малигните клетки, но содржи и клетки од мезенхимално и хематопоетско потекло. Мезенхимални клетки се фибробластите (NFs) и миофибробластите (MFs), мезенхимални стем клетки (MSCs), адипоцити и ендотелни клетки. Хематопоетски клетки се лимфоидните клетки (Т-клетки, В-клетки, и природни клетки-убијци (NK)), и миелоидните клетки (макрофаги, неутрофили, и миелоидни супресорни клетки (MDSCs)). Не-клеточната компоненета од TME е екстрацелуларниот матрикс (ECM) кој се состои од колаген, протеогликани и

гликопротеини. Во ваква средина, туморските клетки ги ре-програмираат околните стромални клетки за туморигенеза, прогресија на карциномот и инвазија на околното ткиво. За разлика од канцерските клетки, стромалните клетки во TME не се подложни на мутации и нивното однесување е модулирано од неколку цитокини (4). Во тек на карциногенезата не се менуваат само туморските клетки туку и стромата, исто така. Интеракциите меѓу инвадирачките туморски клетки и ECM на домаќинот се критични настани кои креираат средина погодна за раст и метастазирање на неопластичните клетки (5).

Морфолошките знаци за стромални алтерации – асоцирани со канцер се дезмоплазија, ангиогенеза и инфилтрација со инфламаторни клетки. Дезмоплазијата е резултат на зголемена синтеза на протеините од екстрацелуларниот матрикс (ECM) и колагенот, од страна на стромалните клетки. Се смета дека дезмоплазијата е реакција на ткивото на домаќинот кон инвазивните канцерски клетки. Густата строма превенира пенетрација на Т-клетки и макрофаги во туморските нодули формирајќи механичка и имунолошка бариера. Биосинтезата на колаген ја регулираат инфламаторните клетки и тоа преку регулација на растот и пролиферација на фибробластите кои ја вршат синтезата на колагенот. Подгрупа на фибробласти наречена фибробласти – асоцирани со карцином (CAFs) има критична улога во канцерска иницијација, прогресија, инвазија и метастазирање (6).

CAFs во TS имаат различно потекло. Локалните NFs се главниот извор на CAFs кои се разликуваат од NFs според нивната уникатна особина за поддршка на карциномот. Сепак, механизмот на транзиција на NFs во CAFs во OSCC сеуште е недоволно разјаснет. Многумина сметаат дека настануваат од NFs кај кои туморските клетки предизвикуваат епигенетски промени и ги мутираат во CAFs. Трансдиференцијацијата на NFs во CAFs ја раководат цитокини кои потекнуваат од карциномот, како што е TGF-β. Но, исто така, CAFs може да настанат со епително-мезенхимална транзиција (EMT) на епителните клетки, од стем клетки на коскена срцевина кои поминале низ EMT, или од транс-диференцирани клетки како што се адипоцити, перицити или мазни мускулни клетки (7).

Како знак дека се активирани, CAFs продуцираат неколку мезенхим - специфични протеини меѓу кои и alpha-smooth muscle actin (α-SMA). α-SMA ја рефлектира експресијата на CAFs во туморскиот мезенхим и е најчест маркер на CAFs. NFs не манифестираат експресија на α-SMA. CAFs кои претежно се α-SMA-позитивни фибробласти наречени MFs, се едни од главните клеточни конституенси на TS.

Стромалните фибробласти не се активираат само во трауматизирано ткиво, но и во канцерско ткиво каде клетките на канцерот ги активираат NFs.

За разлика од промените кои се случуваат во процесот на зараснување на рана, фибробластите во непосредна близина на туморот остануваат активирани исто како во хронично воспаление. Во OSCC, CAFs се препознаени како многу важен фактор кој промовира туморигенеза, инвазија, метастазирање преку стимулација на ангиогенеза и реконструкција на ECM правејќи подготовки за метастазирање уште во раниот стадиум на болеста. Исто така, промовира рецидивантност на туморот антиципирајќи лоша прогноза на болеста (8, 9).

Вкрстената комуникација помеѓу неопластичните и стромалните клетки, ја модифицира диференцијацијата на туморот, пролиферативниот капацитет и инвазивниот капацитет на туморските клетки. Епително – мезенхималните интеракции им ги пренесуваат мезенхималните особини на канцерските клетки, генерирајќи својства кои се асоцирани со малигнитети како што се отпорност на апоптоза, инвазија преку побрзо и подобро движење низ ECM, и способност за метастазирање.

Иако иницијално канцерската инвазија предизвикува дезмопластична реакција со формирање на нов ECM преку активација на стромалните клетки, подоцна со прогресија на туморот заради механичкиот притисок и протеолизата предизвикани со растот на туморот, резултира со деградација на колагенот со што се олеснува туморската инвазија. Дезинтеграција на колагенските влакна се должи на дејството на ензимот колагеназа и металопротеиназа (MMP) кои ги лачат туморските клетки, неинхибирана пролиферација на туморските клетки кои вршат секреција на абнормален матрикс, интратуморска хипоксија, но и на CAFs кои продуцираат алтериран колаген и го деградираат ECM што резултира со дезорганизирана абортивна строма (10).

Организмот на домаќинот кој се бори против туморот праќа најразлични имуни клетки до туморското ткиво вклучително и макрофаги за да го индуцираат и водат анти - туморскиот имун одговор. Од нив, макрофагите се најброен тип на тумор-инфилтрирачки имуни клетки и се наречени макрофаги - асоцирани со туморот (TAMs). Во солидните тумори овие клетки сочинуваат 5-40 % од туморската маса (4, 11).

TAMs се мешана популација на макрофаги и се состојат од два парадоксални типови: M1 и M2 макрофаги, но воглавно од M2 кои се "регрутирани" и "едуцирани" од канцерските клетки (12). M1 се одговорни за анти - туморски одговор преку нивната туморицидна активност и продуцирање на про - инфламаторни цитокини (13). Наспроти нив, M2 имаат про - туморска улога преку нивната имуносупресивна функција, стимулација на ангиогенеза и поддржување на инвазија на канцерските клетки. Многубројни фактори кои ги ослободуваат CAFs и туморските клетки во TME, се главни детерминанти на поларизацијата на TAMs. (13). Исто така, in vitro студиите покажале дека во зависност од факторите, поларизацијата од M1 во M2 може да се поништи или пак, да се преусмери (14).

Макрофагите потекнуваат од CD34+ прекурсори на незрелите моноцити од коскената срцевина и се клучни компоненти на инфламаторните клетки во TS. Под влијание на TNF-α и некои хемотаксички фактори, моноцитите мигрираат до туморското ткиво и се диференцираат во TAMs. Тие имаат важна улога во туморскиот раст, прогресија, инвазија, метастазирање, мезенхимална ремоделација, формирање на нови крвни и лимфни садови, како и стекнување имуноотпорност на туморот. Познати се неколку механизми преку кои TAMs ја остваруваат својата улога, и тоа: 1. Вршат секреција на фактори на раст кои директно го помагаат растот на туморските клетки; 2. вршат секреција на васкуларни фактори на раст кои помагаат во туморската ангиогенеза; многубројни студии демонстрирале сигнификантна поврзаност на експресија на TAMs и ангиогените фактори во туморот, укажувајќи дека нивната синергија креира драматичен про - ангиоген фенотип на туморот (15, 16). 3. TAMs

вршат секреција на фактори на раст и ги стимулираат туморските клетки да вршат секреција на фактори на раст кои го помагаат образувањето на лимфните садови; 4. вршат секреција на протеолитички ензими - металопротеинази (MMP) кои ја уништуваат базалната мембрана, го дезинтегрираат ECM и ја олеснуваат инвазијата и метастазирањето на туморските клетки; и 5. TAMs го супримираат имуниот систем кој резултира со имуноотпорност на карциномот (17). Потенцијален механизам преку кој TAMs ја зголемуваат агресивноста на туморот е алтерирана антигенска презентација. Резултатите на Troy et al. (18) сугерираат дека TAMs ја менуваат TME на таков начин да опаѓа или отсуствува заштитната активација на антиген презентирачките клетки, а туморот станува поагресивен.

За идентификација на TAMs во туморското ткиво се користи панмакрофагниот маркер CD68, независно од фенотипот (19). Туморските клетки може да влијаат на преусмерување на поларизацијата на макрофагите кон алтернативно активираниот M2 фенотип. M2 фенотипот, за возврат, ја интензивира имуносупресијата и туморската прогресија, ангиогенезата, но и отпорноста кон третманот (4).

Степенот на позитивната експресија на CD68 во маргиналните зони на SCC е поголем отколку во централната зона, и ова можеби се должи заради високиот степен на инфламираност и нео-васкуларизација во маргиналната зона. Green et al. (20) го откриле colony-stimulating factor (CSF)-1 како главен хемоатрактант за макрофагите, сугерирајќи дека овие клетки се привлечени кон деловите од туморот кои активно се инвадирани, но не и кон хипоксичното јадро на туморската маса. Нивните наоди сугерираат модел каде нормоксичните туморски клетки ослободуваат CSF-1 за да ги регрутираат макрофагите кон туморската периферија, кои потоа ќе вршат секреција на фактори кои би го усмериле и олесниле нивното движење, инвазијата и метастазирањето. Макрофагите, пак, вршат секреција и на ангиогени фактори кои го поддржуваат туморскиот продор и раст.

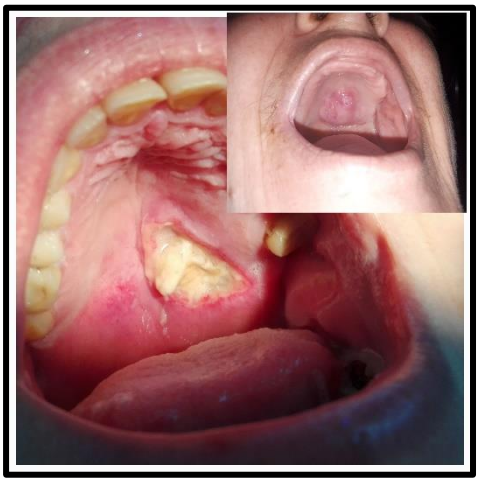
1.2. Преоперативна евалуација на пациент

Одредување на стадиумот на болест во кој се наоѓа пациентотот е важно за проценка на ризикот од релапс на болеста, времето на преживување на пациентот и смртниот исход. За OSCC може да се добијат робустни информации за клиничкиот и патолошкиот стадиум на болеста.

1.2.1. Одредување клинички стадиум

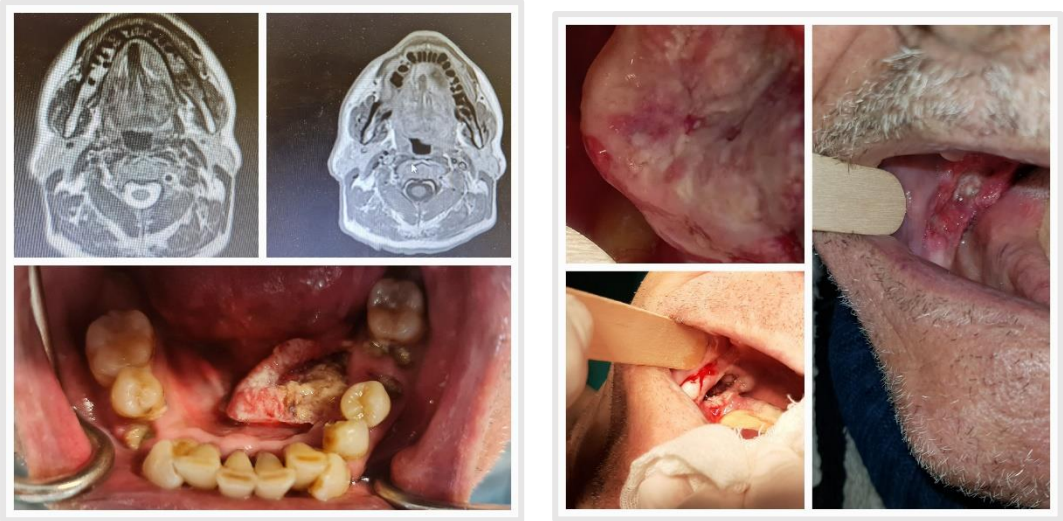
Пред да се отпочне со хируршкиот и онколошкиот третман на OSCC се одредува клиничкиот или хируршкиот стадиум на болеста. Зафатеноста со карциномот во времето на поставување на дијагнозата е клучен фактор кој се користи за дефинирање на третманот и проценување на шансите за успешен исход од третманот. Најшироко употребуван систем за одредување на стадиумот на болеста меѓу клиничарите е TNM системот воспоставен од American Joint Committee on Cancer (AJCC) и International Union for Cancer Control (UICC). Овој систем ги кодира

големината на примарниот тумор (Т-статус), метастазите во регионалните лимфни јазли (N-статус), и далечните метастази (М-статус), а потоа ги групира во 4 нумерички стадиуми (TNM1, TNM2, TNM3 и TNM4). Од овие причини опишани се одделни клинички (cTNM) и патолошки (pTNM) системи (21, 22).



Слика 1 . OSCC на тврдо непце и под на усна шуплина. cT4 лезија.

Клиничкиот стадиум се одредува преку клинички преглед на усната шуплина и вратот при што се прави проценка на примарниот тумор и вратните лимфни јазли (Слика 1). Дијагностичкиот протокол се надополнува со имиџинг дијагностика и тоа компјутеризирана томографија (КТ) или магнетна резонанца (МРИ) со која се евалуира екстензијата на примарниот тумор и се одредува статусот на вратните лимфни јазли (Слика 2). Во случаи кога туморот е напреднат, потребен е скрининг за можни далечни метастази. ПЕТ/КТ се препорачува за проценка на степенот на зафатеност со орален SCC особено во напреднати стадиуми, бидејќи е супериорен во однос на традиционалните КТ или МРИ при откривање на регионални/далечни метастази и втор примарен карцином, а исто така е корисен и за исклучување на инвазија на мандибуларна коскена срцевина.



Слика 2 . Клинички изглед и МРИ на пациент со примарен OSCC на под на усна шуплина и ретромоларна регија

Предоперативно типот на примарниот тумор мора да биде потврден хистолошки со инцизиона или ексцизиона хируршка ткивна биопсија. Инцизиона биопсија е индицирана во случаи кога примарниот тумор е поголем од 1 цм во најголемиот дијаметар или е на локализација која е високо ризична. Ексцизиона биопсија е индицирана кога лезијата е помала од 1 цм во најголемиот дијаметар. Сите клинички, радиолошки и патолошки информации кои ги имаме на располагање пред првиот третман се користат за одредување на клиничкиот стадиум (Слика 5).

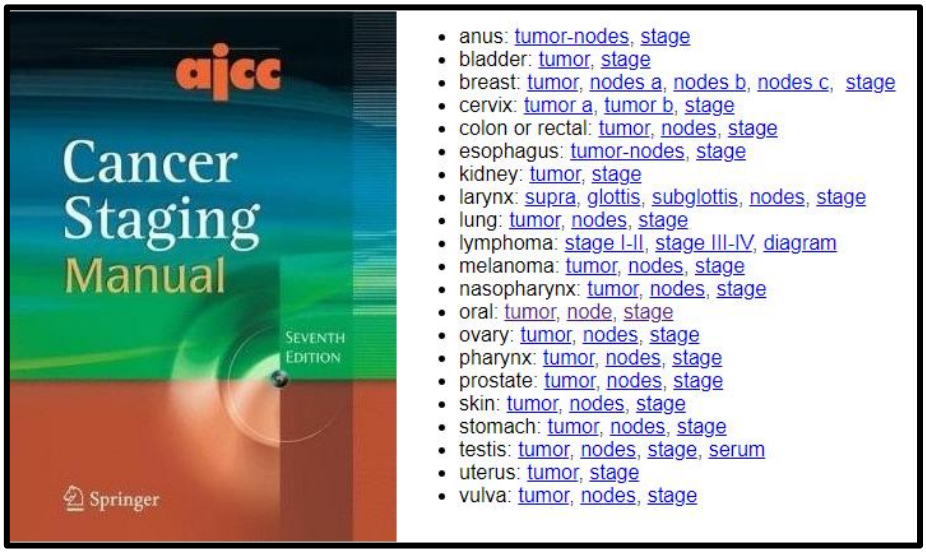
1.2.2. Одредување патолошки стадиум

Одредување на патолошкиот стадиум се базира на карактеристиките на туморот во патолошкиот извештај. По комплетна ресекција на примарниот тумор и/или вратна дисекција на регионалните лимфни јазли следува патолошко испитување на ресецираните примероци. Во далечната 1968 година UICC го публикува своето прво издание на прирачникот за утврдување на TNM стадиумот на болест, додека AJCC својот прв прирачник го издаде неколку години подоцна и тоа во 1977 година. AJCC и UICC периодично го ажурираат системот за одредување на стадиумот на карциномот. Ревизијата ефективна за карциномите дијагностицирани на или по 1 (први) Јануари 2010 година е 7-та Едиција на Прирачникот за стадиуми на канцерот на AJCC/UICC (21, 23). Слика 3.

Историски, одредување на стадиумот на карциномот и планот на третман се базира исклучиво на анатомската зафатеност со карциномот. Одредување на стадиумот на болеста врз основа на анатомската зафатеност е исклучително важна, а анатомската зафатеност со карциномот и понатаму е клучниот прогностички фактор.

Револуцијата во разбирањето на биологијата на карциномот ни обезбедува прогностички информации кои во некои случаи се со поголема релевантност од анатомската зафатеност. Воспоставување на прецизен систем кој би го дефинирал

анатомскиот стадиум и истовремено би ги инкорпорирал и биолошките прогностички информации е клучен предизвик за AJCC/UICC. Клучните не-анатомски прогностички фактори се класифицирани во 2 групи: оние кои се неопходни за дефинирање на стадиумот и оние кои се неоходни за дефинирање на третманот. Клучна карактеристика при употреба на не-анатомските фактори е што тие се користат за модифицирање на анатомското групирање во стадиуми, но не и за дефинирање на T, N и M. Со елиминација на "MX" во класификацијата за непознат статус на метастатската болест, секој случај без клиничка или патолошка потврда на далечни метастази треба да се класифицира како клинички M0 (cM0) (21, 23).



Слика 3. TNM стадиуми на OSCC според AJCC. Поглавје за усна шуплина. Превземено од Edge, S.B., Compton, C.C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. Ann Surg Oncol 17, 1471–1474 (2010).

Публикувањето на 8-та едиција на унифицираната шема за определување на стадиумот на оралниот карцином на AJCC/UICC во 2017 година доведе до сериозна пресвртница во одредување на патолошкиот стадиум на OSCC (24, 25, 26, 27).
Се препорачуваат понатамошни модификации на последното 8-мо издание од причина што во одредување на стадиумот, освен хистопатолошката анализа сеуште не се инкорпорирани биомаркерите и новините од молекуларните студии за OSCC (28).

Оценувањето на хистолошкиот степен на малигниот тумор за прв пат беше воведено од Broders за SCC на усна и се базираше на разликите во степенот на диференцираност на малигните епителни клетки на туморот (Слика 4).

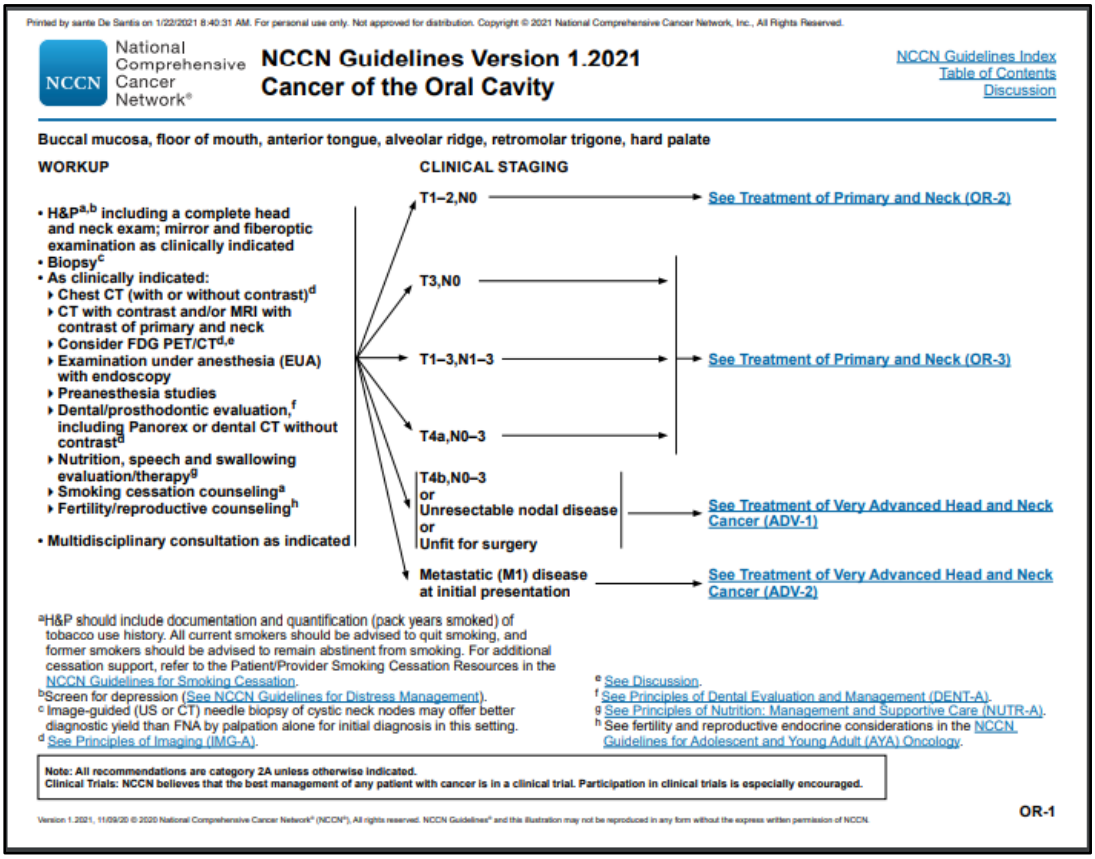
Well differentiated (Grade I)	=	<25% undifferentiated cells
Moderately differentiated (Grade II)	=	<50% undifferentiated cells
Poorly differentiated (Grade III)	=	<75% undifferentiated cells
Anaplastic / pleomorphic (Grade IV)	=	>75% undifferentiated cells

Слика 4. Broder's grading system (Descriptive system) (Преземено од: Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. J Oral Maxillofac Pathol. 2011 May;15(2):168-76.

Подоцна Jakobsson et al. (29), Aneroth et al. (30) и Bryne et al.(31) предложиле многу посложени системи за оценување на хистопатолошкиот степен на OSCC. Овие мултифакториелни системи ги земаа во обзир пред се карактеристиките на туморот како што се степен на диференцираност на малигните епителни клетки, моделот на туморска инвазија и реакциите на домаќинот односно инфламаторниот одговор кон туморот, и се основа за стандардизиран хистопатолошки извештај. Светската Здравствена Организација (World Health Organization (WHO) која не ги прифатила мултифакториелните системи во стандардизираниот хистопатолошки извештај, го поддржува едноставниот систем на степенување кој се базира на Broders - овите критериуми делејќи ги OSCC само на добро-, умерено, и слабо- диференцирани варијанти (G) (32).

Thode et al. (33) на основа на своите резултати предложил ажурирање на овие системи со воведување на карактеристиките на α-SMA+ CAFs.

Во студијата на Arora et al. (34) мултипли карактеристики во хистопатолошкиот извештај имаат прогностичка сигнификантност во предвидување на прогнозата и преживувањето. Редоследно од најголема кон најмала сигнификатност се: DOI, моделот на инвазија, перинеурална инвазија (PnI), лимфоваскуларна инвазија (LVI), лимфоиден одговор на "спојот" домаќин - тумор, и туморското пупење. Малку се знае за улогата на лимфатичната (LI) и васкуларната инвазија (VI) во OSCC. Со вклучување на LI и VI во постоечките патолошки системи за одредување на стадиумот, може да се унапреди стратификацијата на ризиците за неповолен исход, и консекутивно одредување на оптималниот третман. LVI се неповолни прогностички фактори кај многу малигнитети, а кај OSCC се два воспоставени елементи во стандарден патолошки извештај кои корелираат со напреден стадиум, локо-регионален рецидив, вратни и далечни метастази и мало преживување (35, 36, 37, 38). Во 2018 година National Comprehensive Cancer Network panel (NCCN) ги публикува новитетите на NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) и NCCN Drugs & Biologics Compendium (NCCN Compendium) за глава и врат, и индицира адјувантна радиотерапија кај пациенти со PnI/VI/LI по хируршка ресекција дури и на T1-T2, N0 туморска лезија. Сеопшт е заклучокот дека присуство на PnI е индикација за поагресивен третман на OSCC. По хируршкиот третман, вратната дисекција (ND) и адјувантната PORT се мандаторни (39).



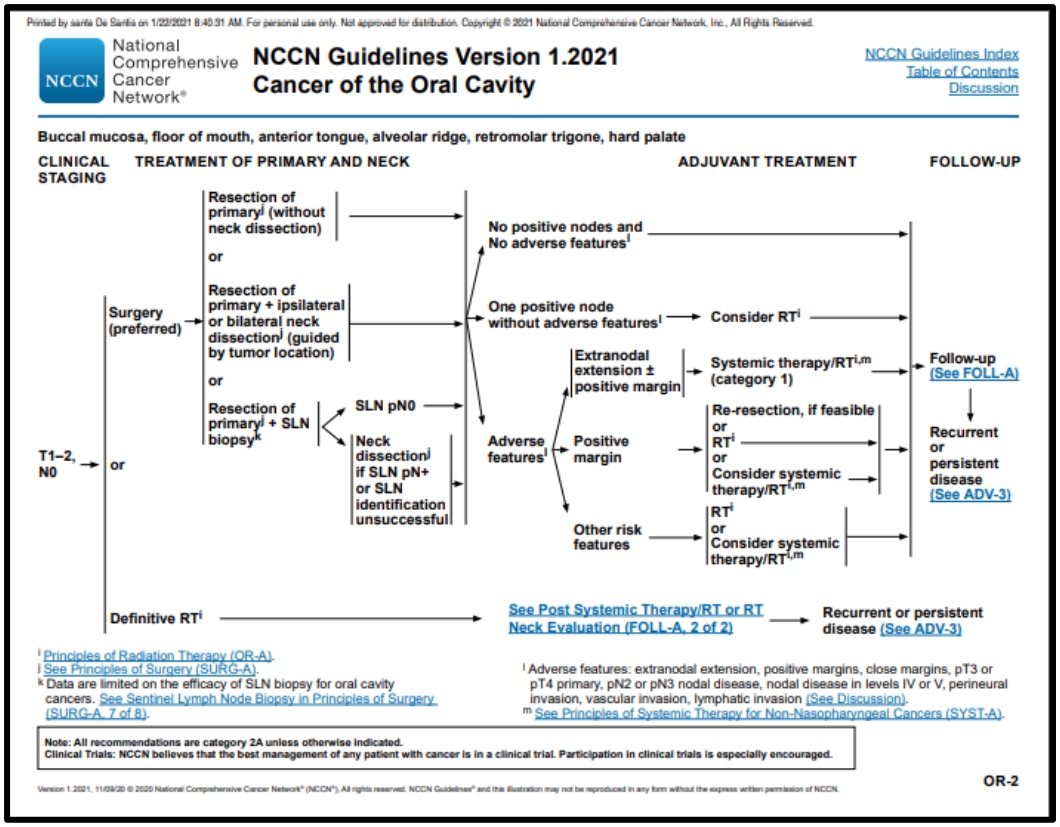
Слика 5 . Дијагностички протокол за OSCC. Превземено од: National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Head and neck cancer.Version 1.2021.Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/ https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/ (Accessed on January 29, 2020).

Традиционалните пристапи во хистопатолошкото оценување сеуште се фокусирани на туморот сам по себе, наместо на интеракциите помеѓу стромата и домаќинот. Иако предложените Мултифакториелни системи се обиделе да направат подобрувања, во моментов истражувањата за карциномот се насочени кон испитување на улогата на ТМЕ во прогресијата на туморот.

1.3.Третман на орален планоцелуларен карцином

1.3.1. Хируршки третман на примарен тумор

Одлуката за типот на третман на OSCC се донесува на основа на клиничките и патолошките параметри на карциномот. Таа воглавно зависи од локализацијата на примарниот тумор, стадиумот на болест, патолошките параметри и општиот статус на пациентот (Слика 6).

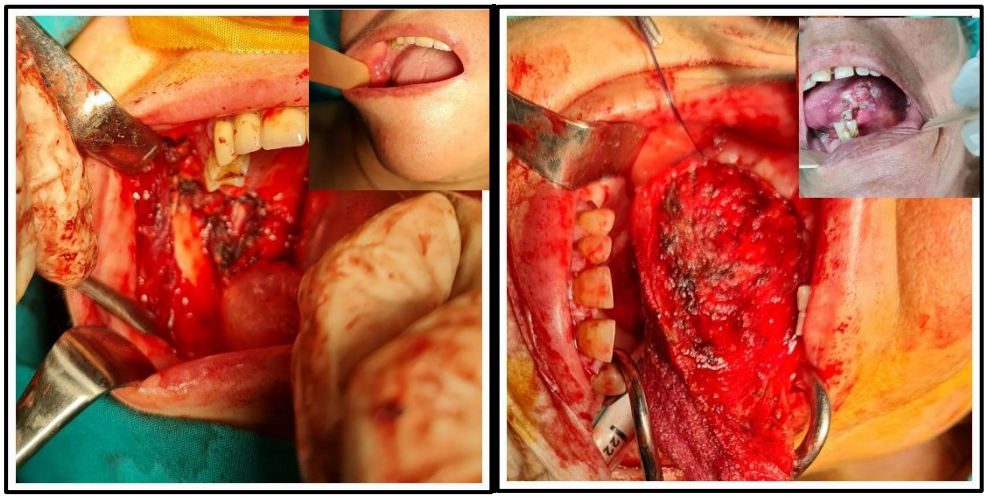


Слика 6. Терапеутски протокол според стадиум на OSCC. Превземено од: National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Head and neck cancer.Version 1.2021.Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/ https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/ (Accessed on January 29, 2020).

Бидејќи OSCC се помалку сензитивни на радиотерапија (RT) и хемотерапија (CTX), примарен третман на OSCC е хируршкиот третман (Слика 7). Во раните стадиуми на болеста се користи еден модалитет во третманот, по можност хируршки, додека напредната ресектабилна лезија се третира со комбиниран модалитет – хирургија консеквентно со адјувантна радиотерапија (RT) или хеморадиотерапија (CRT) (40).

Хируршкиот третман треба да овозможи „чисти“ хируршки маргини односно негативни ресекциони маргини (R0) ослободени од туморско ткиво, верификувани микроскопски. Макроскопски маргината треба да биде најмалку 10 мм оддалечена од клинички видлив раб на тумор. Доколку микроскопски се идентификува резидуален тумор или блиска маргина, индицирана е повторна ресекција или адјувантна терапија. Патолозите и клиничарите ги дефинирале како инволвирани маргините кои се поблиску од 1 мм до туморското ткиво (R1), а како блиски маргини оние од 5 мм или помалку. Како „чисти“ маргини се дефинираат маргините кои се оддалечени од работ на туморот повеќе од 5мм (R0). Дебелината на туморот е тесно поврзана со локалниот рецидив и метастазирањето во вратните лимфните јазли, и заради тоа императив во хируршкиот третман не се само „чисти“ периферни, но исто така и „чиста“ длабока ресекциона маргина. Проценката за опсегот на операцијата (маргинална наспроти

сегментална или хемимандибулектомија) и планот за „чисти“ и сигурни периферни маргини се важни заради онколошката сигурност. Во принцип, позитивна ресекциона ивица на коска инволвирана со канцер го зголемува ризикот од морбидитет и води до неповолна прогноза на болеста (41, 42).



Слика 7. Радикална ексцизија на примарен OSCC на образ и јазик

1.3.2. Хируршки третман на N0 и N+ врат за LNM

Голем број пациенти со OSCC имаат тумори во напреднат стадиум во времето на дијагностицирање и тие се менаџираат со агресивен, мултимодален третман кој предизвикува значителен морбидитет и морталитет (43). Заради разликата во појава на регионални окултни вратни метастази меѓу поедини локализации во усната шуплина, тешко е да се се даде униформна препорака за елективната вратна дисекција (END) кај пациенти со карцином во ран стадиум, освен кај карцином на јазик и база на усна шуплина (FOM). Во студија која ги споредува дебелината на туморот кај карциномот на јазик и фрекфенцијата на метастазите во вратните лимфни јазли, кај 26% од пациентите со дебелина на туморот = 2мм > се појавиле окултни LNM. Од овие причини се препорачува профилактичка ND кај сите карциноми на јазик освен кај суперфициелните.

За останатите локализации се препорачува елективна вратна дисекција (END) за категорија T2 од причина што вратните LNM се очекуваат кај лезии од T2 до T4. Заради влијанието на DOI на ширење на окултните метастази, строга препорака за END постои кога DOI > 4mm. Антеро - постериорна селективна вратна дисекција (SND) се нарекува уште и супраомохиоидна вратна дисекција, е стандарден елективен хируршки третман за пациенти со OSCC, од причина што нема разлика во OS меѓу пациенти со селективна вратна дисекција и модифицирана радикална вратна дисекција (39).

Метастазите во вратните лимфни јазли се еден од најважните прогностички фактори кај пациентите со орален карцином (44). Изборот на вратната дисекција зависи од инволвираните нивоа на клинички позитивните вратни јазли. Според

студијата на Shah et al. (45) кај напреднати орални карциноми најчесто се инволвирани I, II и III вратно ниво, а ретко нивоата IV и V. Заради високата стапка на регионални рецидиви кај пациенти со SND, дисекцијата на нивоата I, II и III треба да се прошири на нивоа IV и V т.е кај N+ врат индицирана е радикална (RND), модифицирана радикална вратна дисекција (MRND) или екстендирана RND (39, 46) (Слика 8).

Слика 8. Радикална вратна дисекција (RND) и вратна дисекција на N3 метастатски депозит со сегментална ресекција на мандибула

1.3.3. Постоперативен адјувантен третман

Пациентите со напреднат стадиум на болест постоперативно примаат адјувантна RT или RTCx. Индикациите за адјувантен третман се определени од карактеристиките наведени во хистопатолошкиот извештај кој вклучува G-степен, модел на раст, DOI и статус на ресекциони маргини (R), LI / VI / PnI, коскена инволвираност, N-статус, ENE, и TNM стадиум кои се асоцирани со лоша прогноза (28). Неколку студии ја покажале сигнификантноста на патолошките наоди како што се CAFs, TAMs, тип на инвазија, инфламаторен одговор, стромални компоненти, ткивна еозинофилија и туморско пупење. Интеракцијата помеѓу епителните туморски клетки и асоцираната строма е моќна врска која може да влијае на иницијација и прогресија на болеста (47).

2. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНИТЕ ДОСТИГНУВАЊАТА ПОВРЗАНИ СО ПРЕДМЕТОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕ

Разноликоста во туморската прогресија е мотив повеќе за истражувачите да се фокусираат на факторите кои ја менуваат прогнозата. Факторите се поврзани со пациентот, туморот (локализација, стадиум на болест, хистолошки степен, PnI, LI, VI, дебелина на тумор, DOI, ENE, експресија на одредени молекуларни маркери), и со третманот (тип на третман, ресекциони ивици, адјувантна или нео-адјувантна терапија). Со анализа на овие фактори се добиваат повеќе информации за биолошкото однесување на туморот, и соодветно на тоа се прави индивидуален план за специфична стратегија во третманот. Агресивна терапија може да се даде само на пациенти кои се со ризик за најлоша прогноза.

Пожелна е идентификација на клинички применливи маркери на туморската агресивност, со цел индивидуализирање на третманот. Ваквите патолошки маркери би можеле да бидат CAFs и TAMs.

2.1. CAFs, имунохистохемиски маркери за идентификација, улога во раст и прогресија на OSCC и прогностичка сигнификантност

Johanssen et al. (48) во 2008 год во својата студија укажува дека различните клетки во туморот покажуваат енормен степен на пластицитет кога се изложени на коктелот од факторите кои туморот ги продуцира, а кои кои влијаат на фенотипот и функцијата на резидентните клетки во туморот. На пример, канцерските клетки се здобиваат со нови својства кои им овозможуваат преживување, експанзија и зајакнување на нивните малигни својства. Но, во зависност од типот на стимулација, исто така, и клетките од TME присвојуваат различни состојби на активација кои фенотипски се рангираат од туморска стимулација до туморска супресија.
Chaudhary et al. (49) и Kapse et al. (50) ја испитувале улогата на CAFs во прогресија на премалигни лезии во OSCC, и утврдиле дека α-SMA како маркер на дистрибуција на CAFs е откриен во примероците на премалигни лезии, а е отсутен во епителот на нормална орална мукоза (NOM), а зголемувањето на густината на CAFs корелира со прогресија на нормална мукоза епителна дисплазија во орален карцином.
Неколку студии се спроведени со цел да дадат одговори на долго поставуваното прашање дали дистрибуцијата на стромалните клетки во карциногенезата е случајна или нивната дистрибуција е поврзана со инвазивното однесување на туморот. Клучот за оваа мистерија се обидел да ја даде Gupta и соработниците во студија спроведена на 60 ткивни примероци од OSCC, NOM, орална леукоплакија (OL) и орална субмукозна фиброза (OSMF). Студијата ја евалуирала застапеноста на CAFs во туморската строма на орални карциноми со различен степен на диференцијација и ја компарирале со NOM, OL и OSMF. Добиените резултати укажале сигнификантна разлика во застапеноста на CAFs во OSCC и останатите примероци. Тие сугерирале за важната улога на CAFs во креирање пермисивна средина за туморска инвазија во OSCC,а нивната густина во стромата ја апострофирале како прогностички маркер (51).
Најчесто за детекција на CAFs во туморската строма се користи α-SMA маркерот кој е специфичен маркер за миофибробласти (52). Inoue et al. (53) во својата имунохистохемиска студија во која опфатил 69 примарни и 29 кореспондирачки метастатски лезии во лимфните јазли, ја сугерира употребата на podoplaninot како друг, понов маркер за CAFs, кој има прогностичка сигнификантност за OSCC. Подопланинот е маркер на лимфни садови, но и канцерските клетки можат да вршат негова

експресија. Исто така, експресија на PDGFRβ вршат и перицитите, па соодветно на ова следува заклучокот дека е многу тешко да се прочистат CAFs само на база на маркери од останатите клетки како што се адипоцитите, ендотелните клетки, или перицитите кои исто така вршат експресија на овие протеини. Од овие причини многу студии кои ги проучуваат ефектите на CAFs во карциномот, и кои во своите студии тврдат дека се тоа CAFs – специфични ефекти, а се потпираат на употреба на споделени маркери, имаат недостатоци заради инклузија на други типови клетки (54).

За да се корелираат епителните промени со квантитативна експресија на α-SMA во стромалните клетки, Cintorino et al. (55) спроведел имунохистохемиска студија на примероци од нормална, инфламирана и неопластична мукоза на грло на матка. Оваа актинска изоформа е типична за мазни мускулни клетки (smooth-muscle cells), но исто така привремено се појавува во фибробластите во тек на зараснување на рана и трајно во тек на фиброконективни болести и стромална реакција кон епителни тумори. Резултатите многу јасно покажале дека, додека позитивните стромални клетки отсуствувале во нормално и воспалено грло на матка, тие се акумулирале соодветно на туморскиот развој. Бројот на α-SMA-позитивни клетки и интензитетот на боење биле поврзани со пораст на степенот на цервикалната интра-епителна неоплазма. Нивните резултати го наметнале заклучокот дека α-SMA е маркер на реакција на стромални клетки кон развивање на неопластична лезија, а евалуацијата на α-SMA во стромалните клетки на грло на матка може да биде корисно дополнување на дијагностичките критериуми на интраепителна неоплазма на грлото на матката и може да помогне во подобро разбирање на механизмот на мезенхимално-епителните интеракции во неоплазмите.

Генерално е прифатено дека CAFs покажале про-туморски ефект стимулирајќи туморски раст и прогресија. Но, скорешни студии демонстрираат тумор-инхибиторен ефект на CAFs сугерирајќи дека тие покажуваат сличен степен на пластицитет како и останатите стромални клетки. Реципрочните интеракции со туморското опкружување и различните извори на потекло се појавуваат како два важни фактори кои ја поткрепуваат хетерогеноста на CAFs. Оваа студија го нагласува неодамнешниот напредок во нашето разбирање на биологијата на CAFs и предлага да се прошири терминот на клеточна "поларизација" кој е претходно воведен за да се опишат различни состојби на активирање на CAFs со што би се потврдила нивната фенотипска разновидност (54).

Во однос на густината и дистрибуцијата на CAFs во туморите се користи различна методологија. Во студиите тие се одредуваат квантитативно според стромалниот позитивитет, одредување на густина кој а е класифицирана во степени, акко и одредување на нивна дистрибуција. Степенот на густина во студиите е најразлично класифициран, но воглавно во 2 до 5 групи. Kellerman et al. (8, 56) го класифицирал присуството на CAFs во 3 степени и тоа на негативно, ретко и обилно, додека Vered et al. (57) го проценил бројот на CAFS на скала со 5 бода, а потоа и дополнително ги стратифицирал во групи со ниски и високи вредности. Fujii et al.(43) го додава Степен 2 (фокално) со што оваа класификацијата всушност е модификација на методот на Kellerman, која освен концентрацијата на CAFs го дефинира и моделот на нивната дистрибуција, дефинирајќи го Степен 2 како фокален, а Степен 3 како дифузен.

Jia Chang-Chang et al. (58) во студија за хепатоцелуларен карцином докажале дека CAF ја супримираат активацијата на NK создавајќи фаворибилни услови за прогресија на карциномот, а со вториот механизам ја зголемуваат пропорцијата на Ki-67 (+) малигни

клетки превенирајќи нивна некроза преку директната стимулација со сигналите кои тие ги произведуваат.

Карциномите вршат инвазија преку мигрирање на поединечни клетки или како мултиклеточни агрегати, а при тоа клетките на карциномот ги задржуваат своите епителни карактеристики. Но, инвазија и метастазирање може да се случат и со процес на епително-мезенхимална трансформација (EMT). Marilen Vered et al. (59) во студијата за CAFs и EMT кај метастатски OSCC на јазик, вклучила 19 кореспондирачки пара примарни тумори и метастатски тумори во регионалните лимфни јазли. Преку користење на панел имунохистохемиски маркери за идентификација на CAFs и EMT, утврдила дека со EMT се губи епителниот фенотип на карциномот, а се стекнуваат карактеристиките асоцирани со мезенхим потребни за туморска инвазија и метастазирање. EMT им овозможува на епителните малигни клетки кои поминале низ EMT да се здобијат со поголем мигратoрен капацитет и инвазивност, зголемена отпорност кон апоптоза, значително поголема продукција на компонентите од екстрацелуларниот матрикс како и негова модификација, и олеснување на дисеминацијата на туморските клетки вклучително и метастазирање. Поради тоа, EMT привлекува големо внимание заради блиската поврзаност со инвазијата и метастазирање на карциномите во регионот или во далечните места.

Резултатите на Etemad-Moghadam et al. (60) на ткивни примероци од OSCC, орална епителна дисплазија и NOM, покажале позитивно имунобоење за CAFs во TS на сите примероци на OSCC, но тие не биле потврдени во примероците со епителна дисплазија ниту пак во примероците на NOM. Понатаму, резултатите не покажале сигнификантна разлика помеѓу G и густината на CAFs.

Можноста за употреба на стромалните α-SMA+ CAFs како маркери за инвазија и LNM во OSCC е евалуирана во студијата на Sowmya J. et al. (61) во 2017 година. Тие не утврдиле статистичка сигнификантност на вредноста на CAFs помеѓу групите со pN0 и pN+ статус.

Некои автори во своите студии за OSCC не нашле сигнификантна корелација на густините на CAFs со ниту еден од испитуваните клиничко патолошките параметри како што се возраст, пол, T-статус, N- статусот, pTNM и G (43, 56).

Улогата на стромалните миофибробласти (MFs) во карциногенезата и како предиктивни маркери за метастазирање во лимфните јазли ја потврдиле Smitha et al. (62) Нивните резултати демонстрирале сигнификантно поголем број на α-SMA+ CAFs кај N+ статус споредено со N0 статус, потврдувајќи позитивна корелација меѓу голема густина на CAFs и N-статусот кај пациенти со OSCC.

Со идеја да ја расветлат поврзаноста на CAFs со OSCC, заклучоците од студијата на Vered et al. (63) и Lim et al. (64) укажале дека нивната густина ги рефлектира биолошките својства на туморот. Соодветно, поголема густина укажува на поагресивен тумор, со поголема моќ за рецидивантност и полоша прогноза.

Kaplan – Meyer анализата на преживување во студија за OSCC открила сигнификантно пониска стапка на преживување и најголема смртност кај пациентите со Степен 2 споредено со останатите степени на густина. Тие забележале дека се издвојува влијанието на Степен 2 "фокална дистрибуција" на CAFs врз преживувањето. Тоа го објасниле со раштрканата дистрибуција на CAFs во Степен 2 која им

овозможува на канцерските клетки и TAMs да мигрираат помеѓу CAFs , а интеракциите помеѓу овие клетки придонесуваат за малата стапка на преживување (43).

Некои клиничко-патолошки студии демонстрираа дека густината на CAFs во TS на OSCC сигнификантно корелираат со N-статусот, VI, LI, метастазирањето во лимфните јазли и со ECE, сугерирајќи дека CAFs асистираат во метастазирањето, додека изобилното присуство на CAFs во инвазивниот туморски фронт корелира со PnI и со пократко време на преживување т.е. обилното присуство на CAFs во нивната студија било показател за постоење на биолошки поагресивен карцином (8). Akrish et al. (65) демонстрира силна асоцијација на CAFs со PnI и T-статусот кај OSCC на букална лигавица, палатум и гингива.

De Wever (66) ја опишува улогата на туморската строма во инвазијата на карциномот, потенцирајќи ја улогата на MFs кои ја помагаат инвазијата на ECM со канцерски клетки, PnI, мускулната инвазија и трансендотелната миграција.

2.2. TAMs, имунохистохемиски маркери за идентификација, типови, улога во раст и прогресија на OSCC и прогностичка сигнификантност

Од досегашните опсежни истражувања станува јасно дека TAMs можат да поседуваат широк опсег на различни состојби на активација меѓу M1 и M2, и да вршат експресија на M1 и M2 маркери (67, 68).

Обемна студија која користела имунохистохемија и која вклучила 108 пациенти со OSCC, 24 орални дисплазии и 5 примероци од NOM, не ја докажала асоцијацијата меѓу инфилтрација со CD68+TAMs и развој на вратни LNM во OSCC (43).

Наспроти неговите резултати, Liu et al.(69) и Marcus et al.(70), користејќи имунохистохемиска метода за идентификација на TAMs, исто така, демонстрираат значајна асоцијација меѓу густината на TAMs и развој на клинички позитивни лимфни јазли кај орален и оро-фарингеален SCC. Marcus et al. (70), воедно, објавува резултати кои демонстрираат силна асоцијација на степенот на инфилтрација на TAMs со метастазирање во LN и екстракапсуларното ширење (ECS), кои се два различни и статистички сигнификантни негативни прогностички фактори за OSCC. Исто така тој ја потврдил и силната асоцираност на степенот на инфилтрација на TAMs со понапредни стадиуми на болеста. Од неговите резултати произлегол и заклучокот дека густината на TAMs е независен прогностички фактор за метастазирање во LN.

Анализите на Liu et al. (69) укажале на сигнификантна корелација на бројот на TAMs со T- и N- статус, и висока асоцираност на бројот на TAMs со интегритетот на васкуларните структури. Земајќи ги во обзир резултатите, тие заклучуваат дека канцерските клетки ги индуцираат TME и TAMs, а TAMs пак за возврат придонесуваат за малигното однесување на истите тие канцерски клетки. Заради тоа присуството на крвни садови кои се "обложени со туморски клетки" и висок број на TAMs може да се сметаат како потенцијални маркери за лоша прогноза на пациентите со OSCC.

Сеуште не е јасна клиничката релевантност на макрофагните субпопулации кај карциномот. Неодамнешните студии покажаа дека висок степен на инфилтрација на туморот со TAMs е асоцирана со лоша прогноза кај многу малигнитети како што е лимфомот, карцином на грло на матка, на мочен меур и на града (71).
Chen et al. (72) нашол дека поголем број на CD68+ и CD163+ TAMs (M1/M2 TAMs) во примероците на панкреатичен дуктален аденокарцином (PDAC) се асоцирани со зголемен ризик за LNM и PnI. Но, само бројот на M2 TAMs (CD163+ TAMs) може да биде потенцијален маркер за евалуирање на прогнозата кај овој тип на карцином. Униваријантната Cox регресиона анализа кај инвазивниот карцином на града (IBC) откри дека поголемите тумори, TAMs во TN, и N+ статус се независни прогностички фактори за OS, додека мултиваријантната анализа го издвои N+ статус како независен прогностички фактор за OS (73).

Една од ретките студии која нашла сигнификантна разлика помеѓу густината на TAMs и хистолошкиот степен на карциномот во TS и TN е онаа на Jeong и соработниците (73) за инвазивниот карцином на града. Нивните резултати укажале дека повисок број на TAMs е асоциран со повисок степен на диференцираност т.е. со полошо диференциран тумор, но не се асоцирани со останатите клиничко патолошки карактеристики на пациентите како што се возраст, пол, T- и N-статус на пациентите (73).

Во студијата на Sun et al. (74) глотичен и субглотичен карцином како сублокализации на ларингеален SCC, авторите не потврдија постоење на поврзаност на инфилтрација на TAMs со локализација на туморот. Но, утврдија дека степенот на експресија на CD68 е сигнификантно поголем во групата пациенти со позитивни LNM наспроти групата без LNM, и тоа речиси двојно повеќе. Исто така, утврдил дека позитивната експресија на CD68 корелира со патолошкиот стадиум на болеста (TNM), но не корелира со хистолошкиот степен на туморот (G- степенот).

Marcus et al. (70) Prognostic sig.) но, и други автори во студиии за OSCC со Мултиваријантната анализа на преживување користејќи го Cox Proportional hazards regression модел покажале дека возраста, T- и N-статусот, и CD163+ TAMs се сигнификантни и независни прогностички фактори , но не и CAFs и CD68+ TAMs, иако поголема густина на CAFs била асоцирана со лоша прогноза(43).
Chen et al. (72). укажал дека голем број на CD68+ TAMs и CD163+ TAMs (M1 и M2 макрофаги, редоследно) во примероците на панкреатичен дуктален аденокарцином (PDAC) се асоцирани со зголемен ризик за метастазирање во лимфните јазли и појава на PnI.
Густината на перитуморските $CD68^+$ TAMs била сигнификантно повисока кај пациентите со рецидив на супраглотичен карцином и кај пациентите со летален исход, во студијата на Lin et al. (17).
Faustino Suarez-Sanchez (4) потврдил дека инфилтрацијата со CD68+TAMS не е асоцирана со ниту еден од испитуваните клиничко-патолошки параметри (пол, возраст, патолошки стадиум, диференцираност на тумор, локализација и рекурентност, сепак утврдил дека поголем број TAMs клетки ја инфилтрираат TS на поголемите тумори (T3/T4), оние во понапреднатите стадиуми на болеста (pTNM3/pTNM4) и полошо диференцираните тумори (G2/G3). Fujii со соработниците (43) потврдува дека нивниот

број сигнификантно корелира единствено со pTNM и начинот на канцерска инвазија, но не утврдил корелација со останатите демографски и клиничко патолошки параметри како што се пол, возраст, степен на диференцијација на канцерски клетки, T- и N – статусот и не утврдиле корелација помеѓу големата густина на CD68+ TAMs и преживувањето. Голема густина во TN корелира со неповолно OS, нашле Jeong et al. (73) и Jensen et al. (75) во инвазивниот карцином на града и во малигниот меланом.
Lin et al. (17) објавиле резултати кои покажале дека густината на перитуморските CD68+ TAMs била сигнификантно повисока кај пациентите со рецидив на супраглотичен карцином, и кај пациентите со летален исход. Мултиваријантната анализа покажала дека T-статусот и бројот на интратуморските TAMs се независни прогностички фактори за севкупното преживување (OS).Тие препорачале да се користи степенот на густина на TAMs како ран, сензитивен прогностички индикатор и доколку се идентификува густа инфилтрација со интратуморски или перитуморски TAMs, индициран е експандиран опсег на вратните дисекции дури и кај пациентите во ран стадиум на болеста и добра диференцијација.
Студии кои вклучуваат големи кохорти спроведена од Nguyen N et al. (76) потврдиле дека позитивната експресија на CD68 не е сигнификантно асоцирана со преживувањето на пациентите со OSCC.
Ni YH et al. (77) нашле дека инфилтрацијата на туморската строма со CD68+ TAMs корелира со повисоки степени на диференцијација на канцерските клетки и со N-статусот кај OSCC. Иако поголема густина на TAMs корелира со пократко севкупно преживување (OS), сепак CD68+ TAMs не се независен предиктивен фактор.

2.3. Меѓусебна поврзаност на CAFs и TAMs и улога во прогресија на OSCC

Mendoza et al. (78) се осврнал на двојната улога на стромалните клетки како што се TAMs и CAFs во сигналната комуникација со канцерските клетки на начин на кој ќе ги поддржат инвазивните особини на канцерските клетки, а од друга страна ќе придонесат за деградација на матриксот и фаворизација на метастазите.
Fujii et al. (43) не утврдиле поврзаност на CAFs со TAMs во стромата на OSCC, и не утврдиле сигнификантни разлики во бројот на TAMs помеѓу различните степени на густини на CAFs. Многу студии кај други канцери ја опишале очигледната поврзаност помеѓу густината на CAFs и M2 TAMs. Студијата кај карцином на простата објавила дека постои реципроцитет во таа врска, т.е. дека M2 TAMs влијае на трансдиференцијацијата на резидентни ткивни фибробласти во CAFs кои се пореактивни, а за возврат CAFs олеснува регрутација на моноцитите, диференцијација на макрофагите и M2 поларизација, а потоа CAFs и TAMs во заедничка соработка промовираат туморигенеза, туморска прогресија и метастазирање. Оваа колаборација , исто така, е верификувана кај канцер на мочен меур, колоректален канцер, карцином на дојка, и неуробластом (79-82).

TAMs не само што учествуваат во клучните процеси во туморската прогресија, тие можат, исто така да ја засилат или антагонизираат анти - туморската ефикасност на

цитотоксичната хемотерапија (CTx), таргетните антитела против канцерските клетки, и имунотерапиите, зависно од типот на третман и туморскиот модел. Исто така TAMs се одговорни за репараторните механизми во туморот по радиотерапијата (RT) или третманот со агенси кои ја таргетираат неоваскуларизацијата. Во некои студии се дискутира за биолошката сигнификантност и клиничките импликации на TAMs, со акцент на понови агенси кои ефективно ги таргетираат TAMs, со цел подобрување на ефикасноста на онколошкиот третман (11). Стратегиите во имунотерапијата треба да се насочат кон превенирање и блокирање на интеракциите меѓу канцерските клетки и TS. Потенцијалните третмани кои ја таргетираат стромата би можеле да вклучат: инхибиција на транс-диференцијација на NFs во MFs, индукција на апоптоза кај MFs, анти - ангиогени фактори и MMP - инхибитори. Вредно е да се напомене дека, дезмопластичниот одговор ја превенира пенетрацијата на терапевтските агенси во солидниот тумор, па колагенот е идентификуван како потенцијален таргет на третманот со цел да се подобри пенетрацијата на антитуморските лекови (11).

2.4. Патолошки параметри за агресивност на OSCC и нивна прогностичка улога

Иако бројни истражувања демонстрирале дека T-статус, N-статус, G-степен, и PnI се користат за предвидување на рецидивантноста на карциномот и преживувањето на пациентите со OSCC, сепак сеуште не е расветлено влијанието на LI и VI на прогнозата и преживувањето на овие пациенти. До 2015 година не постоела ниедна студија која ги проучува LI и VI како посебни ентитети во однос на прогнозата и преживувањето на пациентите со OSCC. Во 2015 година Adel et al. (83) демонстрираа сигнификантна асоцијација на LI и VI со клиничко-патолошките параметри (T- и N-статусот, ECE, PnI и G-степен), но не влијаеле на локалните или вратните рецидив, ниту пак на појава на далечни метастази. Иако LI покажала значајна асоцијација со полошо севкупно преживување (OS), сепак не се покажала како независен прогностички фактор на OS кај пациентите со OSCC.

Thomas(84) со своите соработници во кохортна студија и користејќи ја (SEER) базата на податоци на Националниот Институт за рак во САД, ја тестирал хипотезата дека степенот на диференцијација на туморските клетки (G-степен) е независен прогностички фактор кај OSCC. Произлезените заклучоци се во насока дека степенот на диференцијација има независна прогностичка вредност за OSCC како и T- статусот, N-статусот и присуството на далечни метастази (M-статусот).

Проспективната рандомизирана студија на Yang et al. (36) го идентификувале PnI како непроценлив независен прогностички фактор за вратни LNM, локален рецидив, и релапс на вратни метастази. Добиените резултати покажале дека нема бенефит од елективната вратна дисекција (END) во ран стадиум на PnI-позитивен орален карцином, и дека со END не сезголемува контролата на вратните LNM и преживувањето, давајќи препорака за дополнителни истражувања за оптимизација на процедурите во менаџментот на вратот. Позитивниот наод на PnI кај OSCC корелирал сигнификантно со поголем број локални рецидиви, појава на регионални и далечни метастази, и со лошото преживување во студијата на Spoerl et al. (85), а апликација на

адјувантна радио или радиохемотерапија кај пациентите со потврден PnI не влијаела на OS споредено со пациентите без PnI. Исто така, во својата студија тој не потврдил асоцираност на LI со OS.

Дека вратните метастази (LNM) и позитивните ресекциони ивици (R1) се прогностички фактори кои најмногу влијаат на преживувањето на пациентите го потврдил и Montoro со соработниците (2). Во ретроспективно дизајнирана студија тие утврдиле дека преживување било најмало кај пациентите кои имале најагресивни тумори, односно кај пациенти со вратни LNM и позитивни ресекциони ивици (R1). Како дополнување на заклучокот стои и објаснувањето дека веројатно малото преживување се должело на големиот број пациенти со вратни метастази опфатени во студијата и заради тоа што најмногу примероци биле со локализација на јазик и под на уста, а тоа се карциноми кои најтешко се контролираат (2).

Униваријантната анализа на параметрите во истражувањето на Fang et al. (86) за OSCC покажаа дека на преживувањето на пациентите влијаат зголемувањето на T-статусот, доцниот клинички стадиум, повеќе од два позитивни вратни LNM, екстракапсуларна екстензија (ECE), и LVI. Сепак, мултиваријантната анализа открила дека растечкиот T-статус, и присуство на ECE биле сигнификантно асоцирани со пократко OS кај OSCC.

Постоечките студии за влијанието на туморската микросредина, и CAFs и TAMs на растот и прогресијата на оралниот планоцелуларен карцином имаат извесна хетерогеност. Хетерогеноста е поврзана со разноликоста во податоците во и помеѓу избраните студии, како на пример различен број на пациенти вклучени во истражувањата, различни дизајни на студиите, методологија, различни периоди на следење, нејасна интерпретација на статистичките резултати, неконзистентност во дискусијата во однос на добиените резултати. На мнение сме дека досегашните студии имаат низа ограничувачки елементи кои создаваат потешкотии во споредувањето на резултатите. Во досегашните студии кои ја третираат туморската микросредина и нејзиното влијание врз биолошкото однесување на карциномот, недостасува стандардизирање во секоја фаза од истражувањето наметнувајќи нужност од унифицирано прибирање на податоци и нивно складирање во централна база на податоци, со цел добивање релевантни и прецизни резултати.

3. ОБРАЗЛОЖЕНИЕ НА РАБОТНИТЕ ХИПОТЕЗИ

Во оваа докторска дисертација ќе се потврди или отфрли следнава хипотеза:
Хипотеза 1. Густината на CAFs и TAMs во TME на орален планоцелуларен карцином (OSCC) е асоцирана со клиничко-патолошките параметри на OSCC, рецидивантноста на туморот т.е со (DFS disease free survival time) и вкупното преживување (OS – overall survival).
Од хипотезата произлегуваат следните цели на нашето истражување:

1. Утврдување на густината на CAFs и TAMs во TME на орален планоцелуларен карцином

2. Утврдување на асоцираност на густината на CAFs и TAMs со клиничко-патолошките параметри на пациентите со орален планоцелуларен карцином

3. Утврдување на асоцираност на густината на CAFs и TAMs со рецидивантност на туморот т.е. со времето од кога болеста е дијагностицирана до времето на појава на првиот локален рецидив или новодијагностицирана метастаза (DFS - disease free survival time)

4. Утврдување на асоцираност на густината на CAFs и TAMs со вкупното преживување т.е. времето од моментот кога е дијагностицирана болеста па до време на настапување на смрт или крајот на студијата или (OS – overall survival).

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

4.1. Карактеристики на пациентите

Студијата беше дизајнирана како ретроспективно – проспективна контролирана студија. Беа вклучени вкупно 55 ткивни примероци и тоа: во ретроспективниот дел од студијата беа вклучени примероци од 35 пациенти со хистолошки потврден примарен орален планоцелуларен карцином,, хируршки третирани на ЈЗУ "УК за Хирургија на лице, вилици и врат – Максилофацијална хирургија" при Универзитетски клинички центар „Мајка Тереза“, во Скопје, во период од 2016-2019 година. Во проспективниот дел беа вклучени 10 пациенти оперирани во период од 2020-2021 година на нашата клиника, и 10 ткивни примероци ја сочинуваа контролната група.

Инклузиони критериуми: Само пациенти за кои постоеја потполни податоци во болничките истории беа земени во истражувањето. Нивните патолошките извештаи беа стандардизирани и ги исполнуваа критериумите за одредување на стадиумот и хистолошкиот степен на туморот. Исто така, ги содржеа сите параметри кои се предмет на нашата анализа.

Ексклузиони критериуми: Од студијата беа исклучени пациенти кои пре - оперативно примиле радиотерапија (RT) и/или хемотерапија (CTx), и со непотполни податоци во болничките истории и нестандардизирани патолошки извештаи.

Од 10 –те пациенти оперирани на нашата клиника во периодот 2020/2021 година добивме писмена согласност за учество. Истите беа информирани за мотивите и целите на студијата. Спроведувањето на студијата беше одобрено од Етичката комисија при Стоматолошкиот факултет, УКИМ, Скопје – Република Северна Македонија.

Од пациентите во контролната група, интраоперативно беа земени 10 ткивни примероци од ипсилатерална соседна нормална мукоза оддалечена 10-15 мм од хируршките маргини.

Податоците за пациентите како и клиничко-патолошки параметри кои ги анализиравме (пол, возраст, локализација, pT, pN, pTNM, G-степен на диференцијација, LI, PnI, R0/R1, време на дијагностицирање на болеста и времето на настапување на смртта, број и вид на релапси, и време на дијагностицирање на прв релапс се добиени од болничките истории, патолошките извештаи, како и од електронскиот систем за евиденција на пациентите.

Примероците од вкупно 35 пациенти вклучени во ретроспективниот дел од студијата со хистопатолошки потврден планоцелуларен карцином на орална мукоза беа земени од архивата на Институтот за Патолошка анатомија при Универзитетски клинички центар „Мајка Тереза“, во Скопје. Од проспективниот дел на студијата 20 ткивни примероци, од кои 10 од контролната група, беа подготвени и анализирани на Институтот за Патолошка анатомија.

Патолошкиот стадиум на болеста (pTNM) беше одреден според критериумите на 7-то издание на UICC/AJCC Cancer Staging System за орален планоцелуларен карцином од 2010 година (21-23). Туморската диференцијација беше класифицирана во 4 степени: добро, умерено, лошо, недиференцирани (анапластични) карциноми според Broder’s – овата хистолошка класификација на диференцијација на туморските клетки (Broder’s grading descriptive system) (30, 87).

4. 2. Транспорт и чување на ткивни примероци

Ткивните примероци се фиксираат во 10% неутрален пуфериран формалин. Оптимално време на фиксација е 12 часа, но времето на фиксација може да варира во интервал не пократок од 6 часа и не подолг од 72 часа.
Фиксацијата на примероците треба да започне најдоцна 1 час по нивно земање или најдоцна 6-12 часа доколку семплираниот материјал се собира и се чува во фрижидер на температура од 4 °C.

4. 2. 1. Подготовка на примероците и постапка на работа

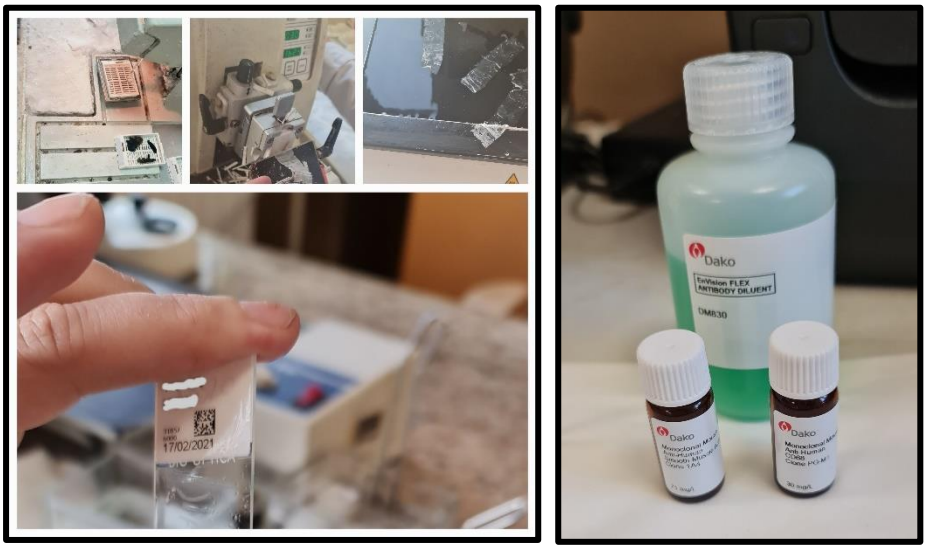
Пресеците од ткивото фиксирано во формалин и вкалапено во парафин подлегнуваат на претретман – постапка за депарафинизација и хидрација која што се врши во соодветен апарат за топлинско индуцирање за разоткривање на епитопите (HIER), на површината на целните клетки во фиксираното ткиво.Оваа постапка предизвикува боење со модификација на молекулата, конформација на таргет протеините преку експозиција на примерокот на ткиво нанесен на предметно стакло ставен во соодветен загреан пуфер.

- Парафинизираните ткива, калапи кои претходно се фиксирани во формалин се сечат на микротом со дебелина од 5 микрони (максимум) и се ставаат на предметни (полилизински стакла) кои се користат специјално за имунохистохемиските боења.
- Тенкиот пресек исечен на микротомот се става во врела вода на 59 °C, плива на површината на врелата вода и со помош на стакленце се аплицира на неговата површина.
- Веќе добиените стакла со парафинизирано ткиво се ставаат во термостат добро да се исушат и депарафинизираат, на температура од 59 °C (59 це точката на топење на парафинот) 20 часа (ден, пред да се започне со постапката на Dako EnVision методата за боење на ткивото.
- Откако ќе се заврши со постапката на депарафинизација во термостат, стаклата се редат на соодветни држачи (дел од Dako Pt Link апаратот кој собира вкупно 48 стакла), и потоа се потопуваат во двете кадички на апаратот. Кадичките се исполнети со дестилирана вода во која се става Target Retrieval solution low (ниска) pH или high (висока) pH, во зависност од антителата кои се аплицираат, кој се разредува 50X.

4. 2. 2. Имунохистохемиска дијагностичка метода за ин-витро боење со антитела

Имунохистохемијата е лабораториска техника која се користи во секојденвната дијагностика како составен дел од хистопатолошката дијагноза, во класификацијата на туморите, како и во дефинирање на експресијата на маркери кои се поврзани со таргетирана терапија. Методата се изведува на пресеци од ткиво кое е претходно фиксирано во формалин и вкалапено во парафин.Овој систем користи anti-α-SMA и anti-CD68 примарни моноклонални антитела од глушец за идентфикација на CAFs иTAMs, а реакцијата се визуелизира со Dako EnVision Flex системот за детекција. Се користат EnVision flex+mouse реагенси за амплификација на сигналот од примарното антитело соодветно од стаорец во крајниот резултат на боење со хромогенот. EnVision-

flex реагенсите се наменети за употреба на ткива фиксирани во формалин и вкалапени во парафин. Dako EnVision flex системот на детекција дава флексибилност и оптимално боење во автоматски апарати за боење и се употребува според протоколот кој што е препорачан од производителот (Слика 9).



Слика 9. Фази во подготовка на ткивни примероци за хистопатолошка анализа. Парафински блокчиња, микротом, работни стакленца. Dako Примарни моноклонални антитела од глушец: Anti – Human Smooth Muscle Actin и Anti – Human CD68

4. 2. 3. Dako Pt Link инструкции за депарафинизација и Target Retrieval

Кадичките се полнат со раствор за Target Retrieval (антигенско пронаоѓање) и се поставуваат во апаратот Dako Pt Link на 97 °C 20-40 мин., се продолжува со циклус на ладење, па предгреење на температура од 65 °C за да растворот Dako Retrievel ја достигне одбраната температура. Потоа се отвора капакот од апаратот и се потопуваат држачите за стакленцата на кои се поставени ткивните пресеци исушени во печка (фиксирани во формалин, парафинизирани, но може да се користат и конвенционално депарафинизирани пресеци), се затвора капакот, апаратот ќе грее до избраната температура и кога ќе ја достигне ќе почне да одбројува за циклусот на растворот за пронаоѓање. Кога циклусот е готов капакот се отвора автоматски. Брзо се префрлаат држачите со стакленца во кадичката за перење која е наполнета со разреден Dakowash Buffer, се оставаат 1-5 минути, а потоа се продолжува со боењето не дозволувајќи стакленцата да се исушат.

4. 2. 4. Autostainer Link 48

Autostainer Link 48 е компактен систем за имунохистохемиски боења кои се контролирани со протоколи во Dako Link софтверот. Кога ќе заврши циклусот ан претретман во Pt Link, следува протокол на обработка во Autostainer Link 48.
Фази/чекори:

- Се поставуваат потребните реагенси во апаратот
- Се префрлаат предметните стакла со носачот во апаратот
- Се стартува програмата
- Апаратот започнува со скенирање на препаратите и реагенсите

- Се потврдува протоколот и започнува процесот на работа
- По завршување се вадат носачите на стакла
- Следува процес на дехидратација и покривање на стакла во Coverslipper

Пред да се почне со работа потребно е сите реагенси да бидат внесени во системот, соодветните антитела со соодветно разредување и протоколите за работа. (Слика 10).

Слика 10. Dako Autostainer Link 48

4.3. Интерпретација и бодирање на резултати

Анализата на предметните стакла се врши со дигитален светлосен микроскоп Nikon 80

- Се одредува локализацијата на позитивниот сигнал
- Се проценува присуство на сигнал во нормално ткиво (доколку е присутно), кое служи како нормална внатрешна контрола
- Се цени интензитетот на сигналот

CAFs се гледаа како големи вретеновидни фибробласти со елонгиран нуклеус кои вршат експресија на α-SMA (43) (Слика 12, 13, 16, 19, 21). За одредување на густината на CAFs ја користевме модификацијата на класификациониот систем на Kellerman et al. (8, 56) и Fujii et al. (43). Степените на густина беа категоризирани во 4 категории:

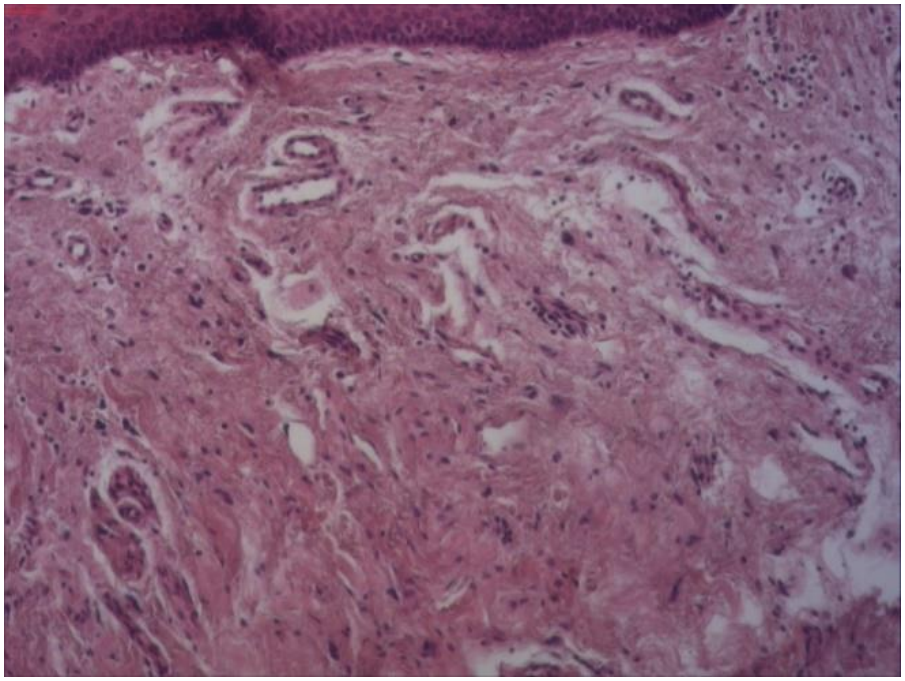
- Степен 0 (Негативно)
- Степен 1 (Ретко)
- Степен 2 (Фокално)
- Степен 3 (Обилно)

Примероци каде не се идентификувани CAFs или помалку од 1% MFs се обоени со α-SMA се класифицирани како негативни; примероци кои покажаа спорадично присуство на расфрлани CAFs низ стромата се класифицирани како ретко; оние со фокален распоред кој се гледаше како ирегуларно концентрирано обојување се класифицирани како фокално (43); додека примероците кои покажаа бројни и густо

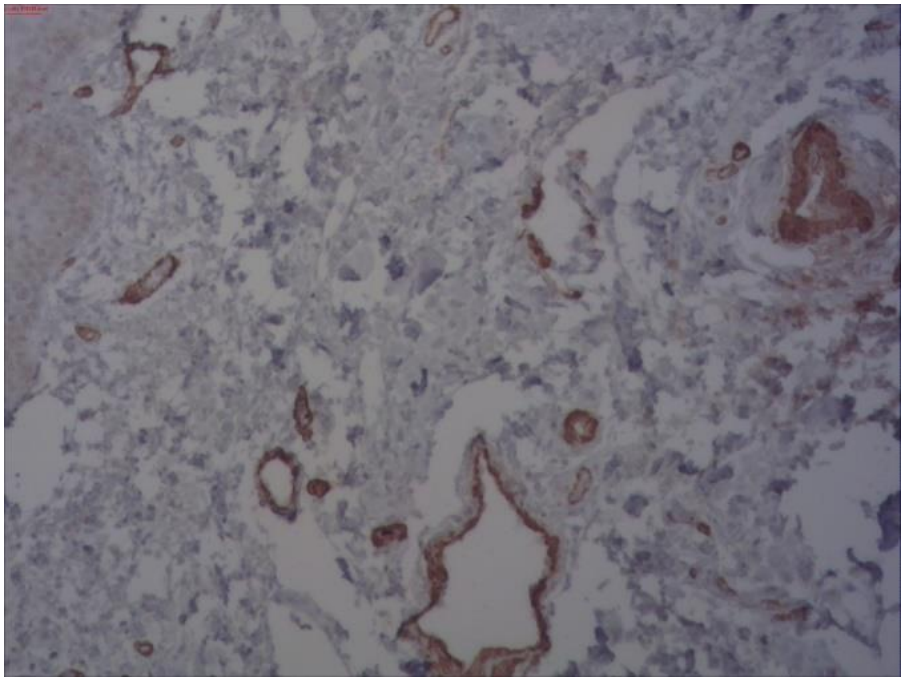
аранжирани CAFs се класифицирани како обилно. α-SMA имунореактивитет опсервиран во ендотелните клетки во зидовите на крвните садови се користеше како внатрешна позитивна контрола (55), и не беше вклучен во калкулацијата (43).

Позитивната експресија на CD68 –TAMs во цитоплазмата на макрофагите се гледаше како жолтеникаво - кафеави до кафеави гранули (Слика 14, 17, 18, 22). TAMs беа дефинирани како клетки со дијаметар поголем од 10 μm и кои вршат експресија на CD68; беа броени во инвазивните регии на примероците на OSCC. Секој дел беше прикажан на мало видно поле (МВП) на зголемување од 100X за да се идентификуваат областите со најголема густина на TAMs (топли точки), а потоа макрофагите се броеја во три полиња на големо видно поле (ГВП) со зголемување од 400X и оценет е нивниот просечниот (73).

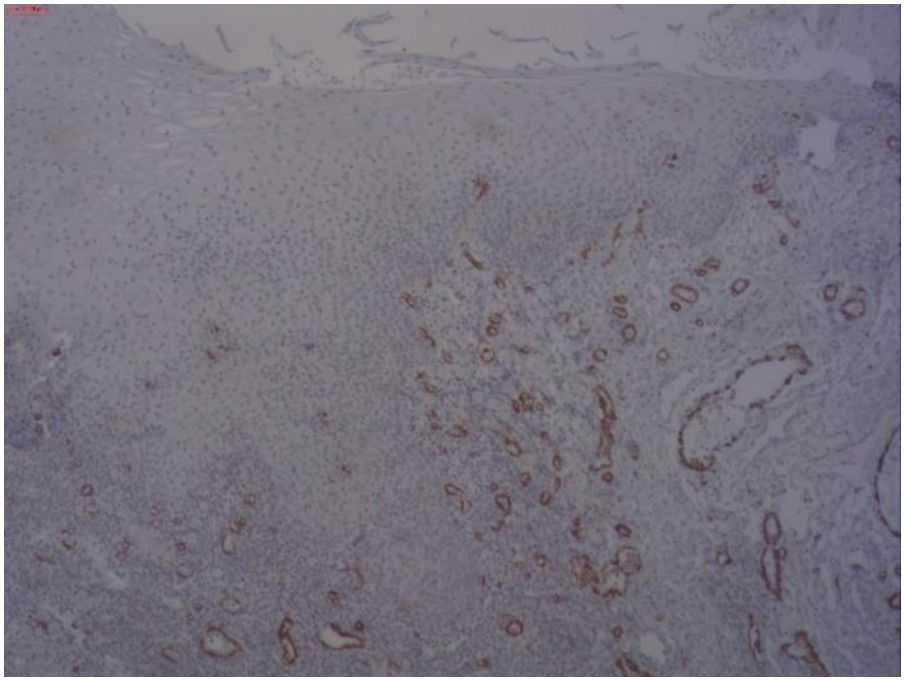
Дополнително, го проценивме бројот на TAMs во туморската строма (TS, перитуморски) и туморските гнезда (TN, интратуморски) (73).



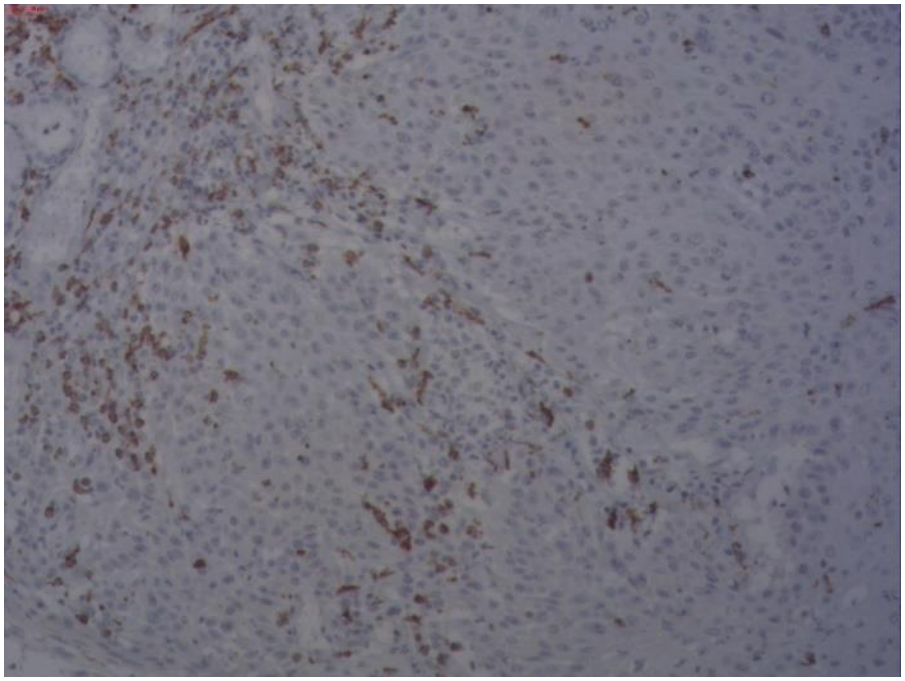
Слика 11. Пациент со хистопатолошки наод за регуларна орална лигавица. H&E боење. .



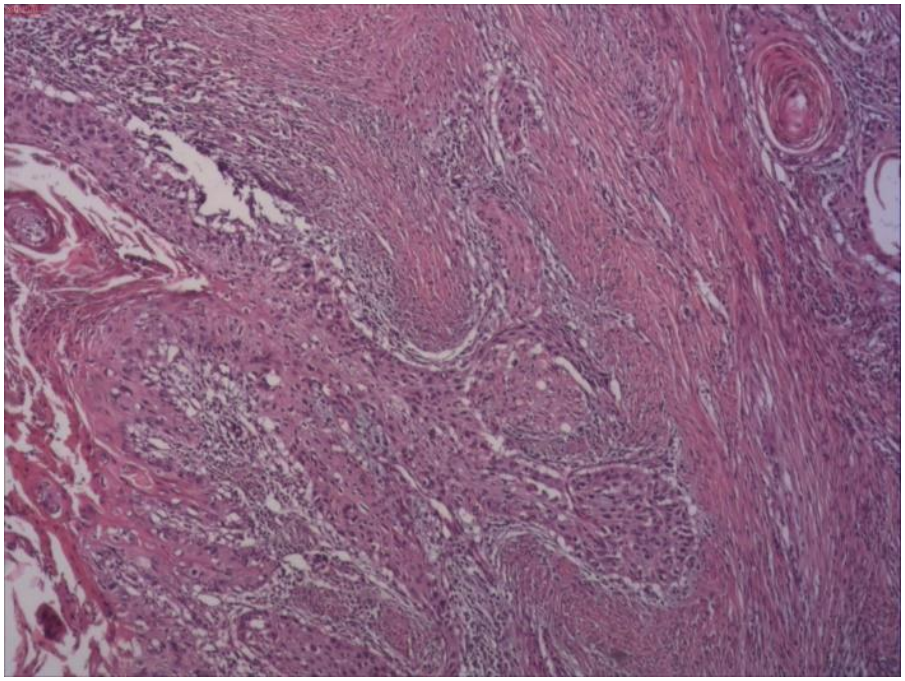
Слика 12. Експресија на α-SMA <1%.



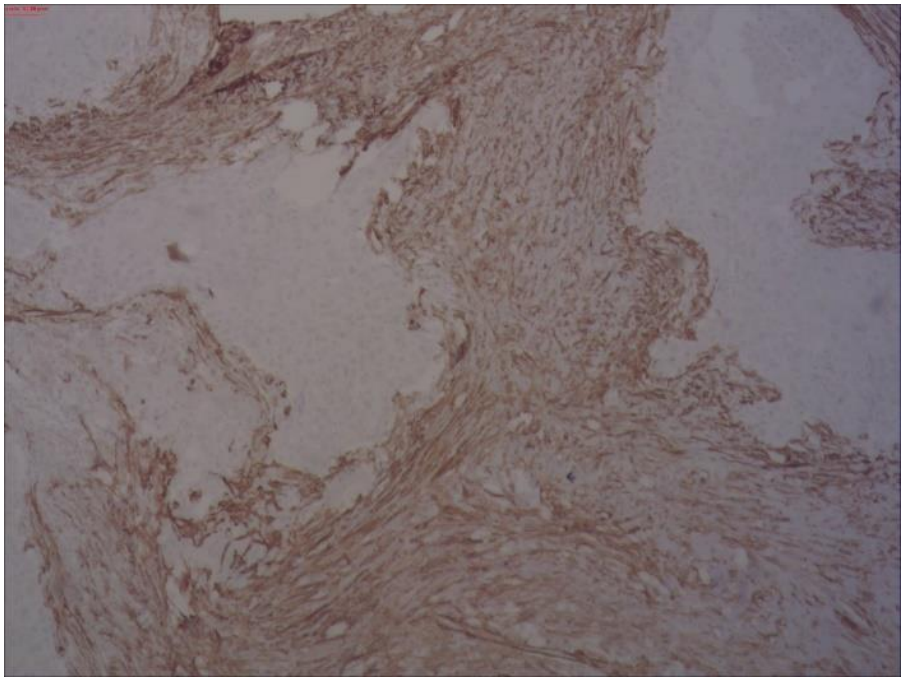
Слика 13. Примерок од инцизиона биопсија. Пациент со OSCC на јазик. α-SMA+ околу артериски крвни садови (<10%). pTNM=pT1 Nx Mx L0.



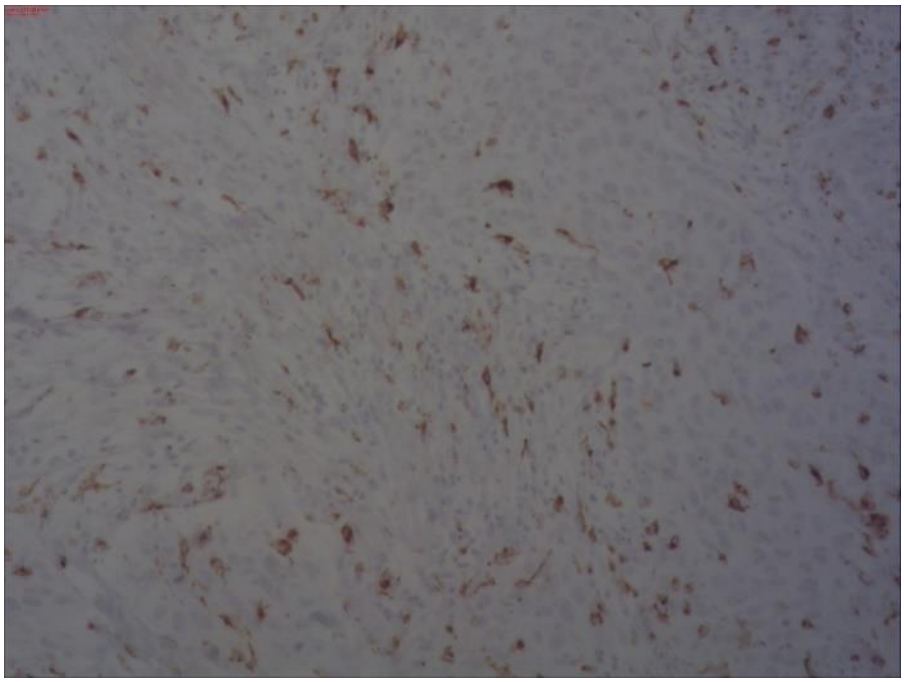
Слика 14 . Примерок од инцизиона биопсија. Пациент со OSCC на јазик. 30-40 CD68+ TAMs во строма и 9-10 клетки во туморски плажи. pTNM=pT1 Nx Mx L0.



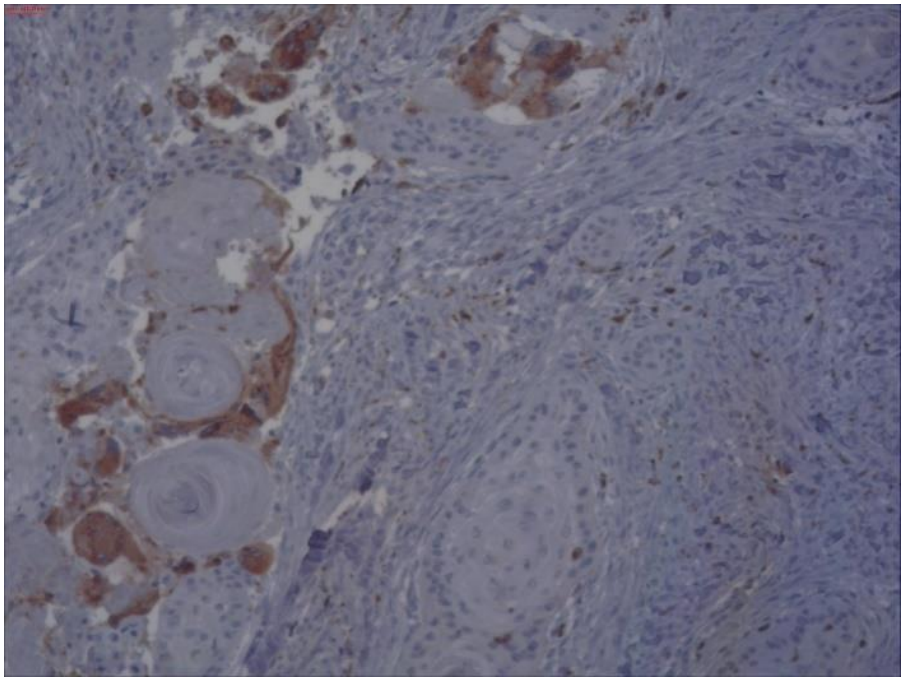
Слика 15. Пациент бр. 15. H&E боење. OSCC локализиран на под на усна шуплина. pTNM=pT3 pN2b Mx L1 Stage IVA.



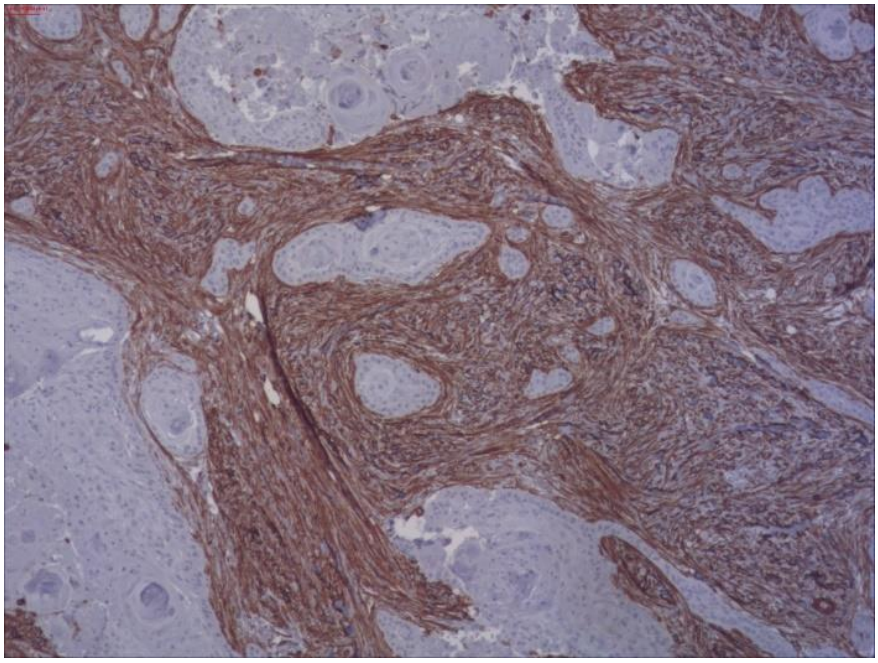
Слика 16. Пациент бр. 15. Обилна (Степен 3) експресија на α-SMA во туморска строма на OSCC локализиран на под на усна шуплина. pTNM=pT3 pN2b Mx L1 Stage IVA.



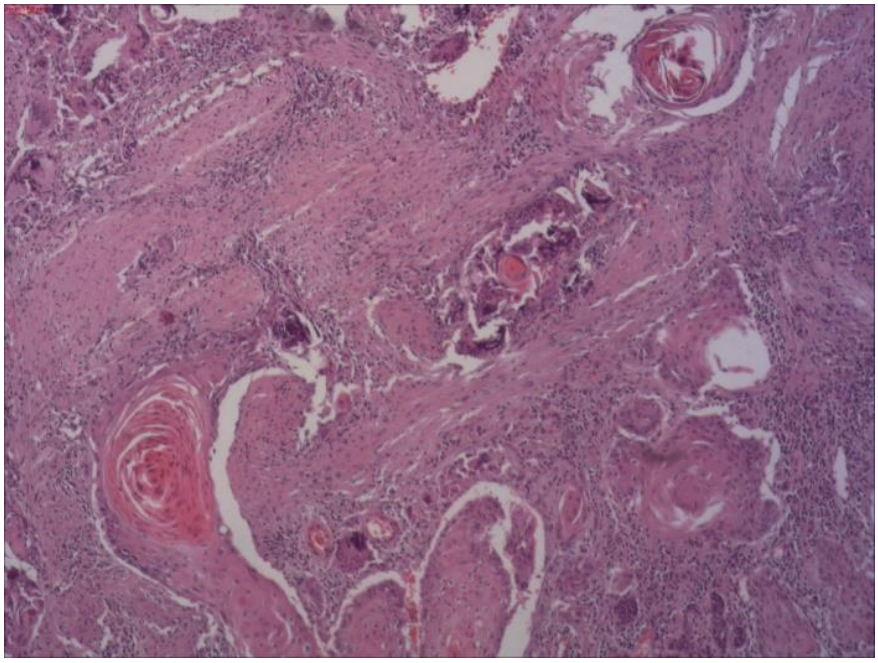
Слика 17. Пациент бр. 15. Експресија на CD68 во OSCC локализиран на под на усна шуплина. 100-150 CD68+TAMs во туморска строма и 30-50 клетки во туморско гнездо. pTNM=pT3 pN2b Mx L1 Stage IVA.



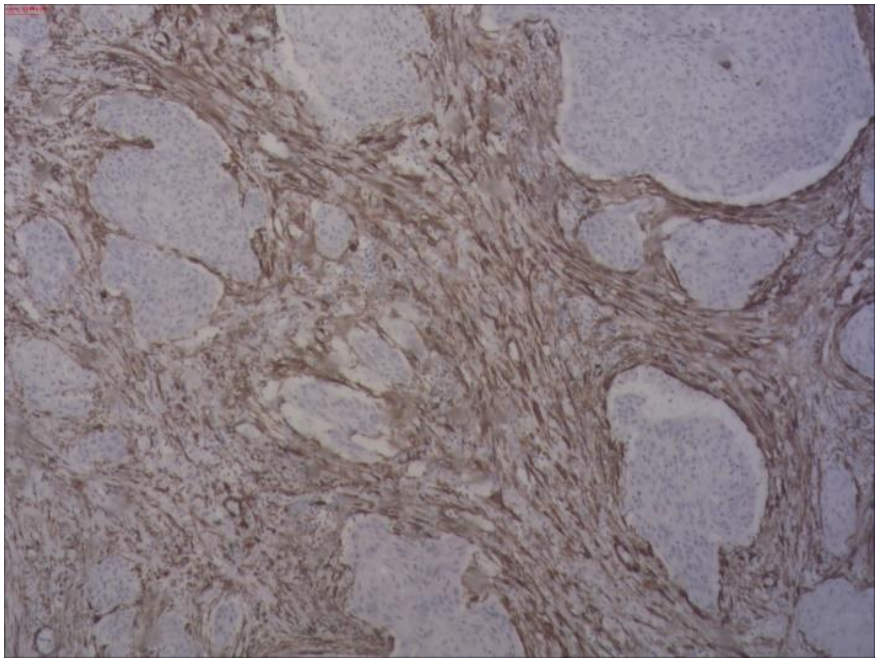
Слика 18. Пациент бр. 12. Експресија на CD68. OSCC на гингива на мандибула. 8-10 гигантски клетки во фронт на раст во туморска строма. CD68+TAMs не се пронајдени во туморско гнездо. pTNM=pT4A pN0 pMX G2 L1 Stage IVA.



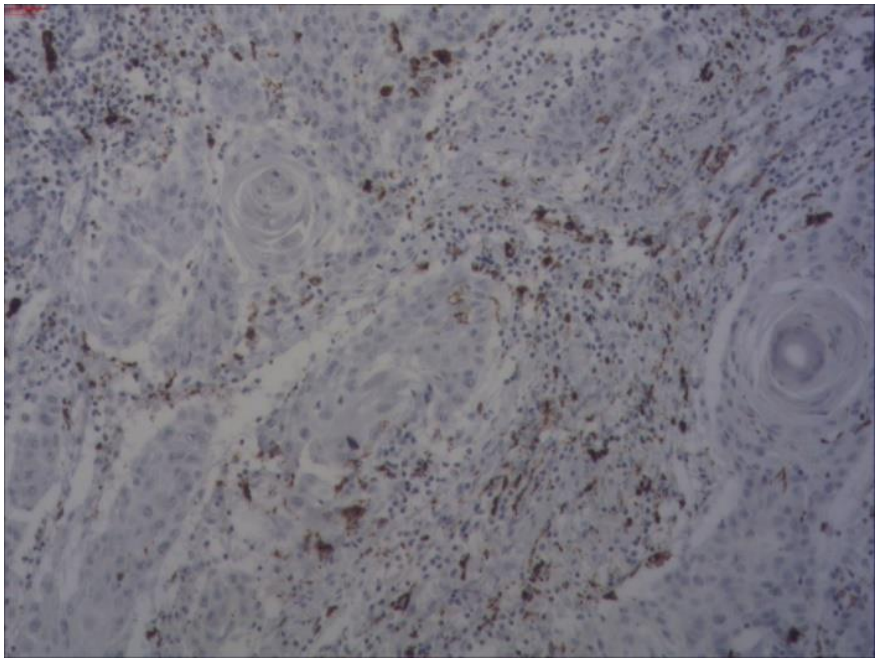
Слика 19 . Пациент бр. 12. Обилна (Степен 3) експресија на α-SMA во туморска строма на OSCC на гингива на мандибула. pTNM=pT4A pN0 pMX G2 L1 Stage IVA.



Слика 20. Пациент бр. 16. H&E боење. OSCC на под на усна шуплина. Зголемување 50X. pTNM=T3 N2C Mx Stage IVA.



Слика 21. Пациент бр. 16. Експресија на α-SMA во туморска строма на OSCC на под на усна шуплина. Зголемување 100X. α-SMA+ Степен 3 (обилно). pTNM=T3 N2C Mx Stage IVA.



Слика 22 . Пациент бр. 16. Експресија на CD68 во OSCC на под на усна шуплина. Зголемување 100X. CD68+ во туморска строма (топли точки) 150 клетки (HPF). CD68+ во туморски гнезда (топли точки) 25 клетки (HPF). pTNM=T3 N2C Mx, Stage IVA.

4. 4. Статистичка анализа

Податоците добиени во текот на истражувањето беа статистички обработени со користење на SPSS software package, version 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Анализата на антрибутивните (квалитативни) серии беше правена преку одредување на коефициент на односи, пропорции и стапки, а истите беа прикажани како апсолутни и релативни броеви. Нумеричките (квантитативни) серии беа анализирани со употреба на мерките на централна тенденција (просек, медијана, минималми вредности, максимални вредности), како и со мерки на дисперзија (стандардна девијација, стандардна грешка). Shapiro-Wilk W тест беше користен за утврдување на правилноста на дистрибуцијата на фреквенцијата на испитуваните варијабли.

Pearson Chi square test, Fisher exact test и Fisher Feeman Halton test беа користени за утврдување на асоцијацијата меѓу одредени атрибутивни дихотомни белези. Person correlation и Spearman rang correlation беа употребувани за утврдување на поврзаноста помеѓу нумеричките варијабли со правилна односно неправилна дистрибуција на фреквенциите. За тестирање на значајноста на разликата меѓу повеќе независни нумерички параметри со правилна дистрибуција беше користена One-way analysis of variance (ANOVA), а кај неправилна дистрибуција на фреквенции беа користени непараметарски тестови за два независни примероци (Mann Whitney U тест) и за повеќе независни примероци (Kruskal-Wallis H test). Факторите на ризик беа квантифицирани преку користење на однос на веројатности (Odd ratio – OR) и интервалите на доверба - confidence intervals (CI). За споредба на пропорциите беше користен Difference test.

Униваријантна и мултипла логистичка регресиона анализа беше употребена за одредување и квантифицирање на независните значајни предиктори за морталитет од планоцелуларен карцином во усна шуплина. Преживувањето беше прикажано со Kaplan-Meier крива. Униваријантен и мултиваријантен Cox Proportional модел беше користен за утврдување на асоцираноста на одредени параметри на времето на преживување. Споредбата на времето на преживување помеѓу две групи беше тестирана со Log Rank test. Дијагностична ефикасност на селектирани параметри за морталитетот беше проценета согласно ROC анализата. За утврдување на статистичка значајност користена беше двострана анализа со ниво на сигнификантност од $p<0,05$. За DFS беа употребени криви на преживување Prism 8 статистичка програма.

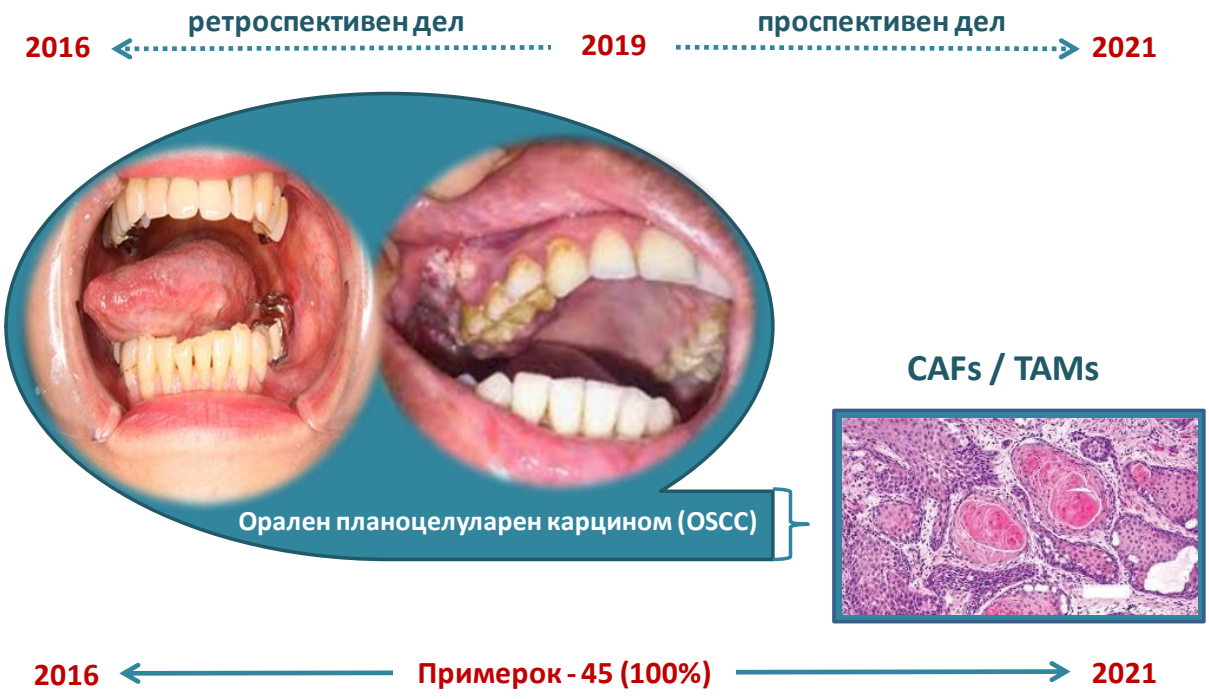
5. ДОБИЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НИВНО ЗНАЧЕЊЕ

Истражувањето претставуваше рандомизирана клиничка студија која беше спроведена во период од 2016 - 2021 година на Универзитетска клиника за хирургија на лице, вилици и врат – Максилофацијална хирургија, Универзитетски клинички центар „Мајка Тереза“, во Скопје.

Согласно поставените инклузиони и ексклузиони критериуми, испитаниците во примерокот беа пациенти со хистопатолошки потврден орален планоцелуларен карцином (OSCC), без преоперативна радиотерапија или хемотерапија.

Примарниот OSCC беше локализиран на јазик, гингива на алвеоларен гребен на горна и долна вилица, под на усна празнина, букална мукоза, мукоза на непце и ретромоларен триаголник.

Селекцијата на испитаниците беше направена со користење на метод на прост случаен избор (Random Sampling).



Слика 1. Алгоритам на истражувањето

За собирање на податоците за студијата беше користен ретроспективно-проспективен приод. Беше истражувана густината на клеточните популации CAFs и TAMs. Присуството на CAFs и TAMs во туморската микросредина (TME) беше утврдувано со примена на имунохистохемиска метода. Беше следена и рецидивантноста на туморот (DFS - disease free survival time), како и вкупното преживување (OS – overall survival).

5. 1. Генерални карактеристики и CAFs

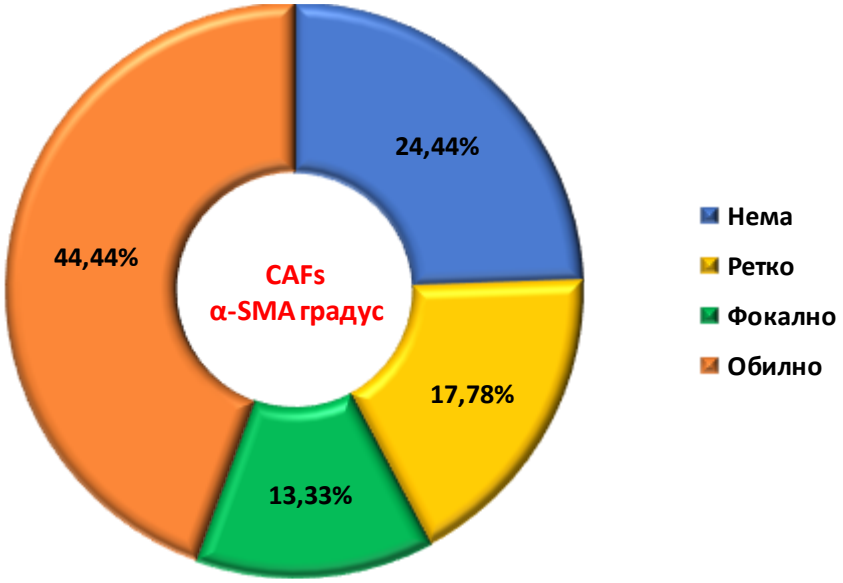
Кај пациентите со OSCC, присуството на α-SMA+CAFs односно α-SMA позитивни CAFs беше утврдено само во туморска строма. Се смета дека главната улога на CAFs е обезбедување на поволна микросредина за раст и пролиферација на туморски клетки. Зголемената продукција на α-SMA, генерално корелира со лоша прогноза на болеста.

Табела 1. Дистрибуција на пациенти со OSCC според степени на густина на CAFs α-SMA

Орален планоцелуларен карцином - OSCC (N=45)		
CAFs α-SMA градус	**N (%)**	**[1]p**
CAFs 0 - нема	11 (24,44%)	Н /Р – p=0,4421 Н / Ф - p=0,1806 Н / О - p=0,0471* Р / Ф - p=0,5617 Р / О - p=0,0066* Ф / О - p=0,0012*
CAFs 1 - ретко	8 (17,79%)	
CAFs 2 - фокално	6 (13,33%)	
CAFs 3 - обилно	20 (44,44%)	
[1]Difference test	*сигнификантно за p<0,05	

Присуството т.е. густината на CAFs базирано на имунохистохемија (α-SMA градус) беше класифицирано во 4 категории и тоа: а) нема – 11 (24,4%); б) ретко – 8 (17,8%); в) фокално – 6 (13,3%) и г) обилно – 20 (44,4%). Во примерокот на пациенти со OSCC – 45 (100%), присуство на CAFs беше согледано кај вкупно 34 (75,5%), додека кај 11 (24,4%) тие не беа најдени (Табела 1 и График 1).

График 1. Дистрибуција на пациенти со OSCC според CAFs α-SMA градус



Процентуалната разлика во застапеноста на CAFs α-SMA градус – обилно, за p<0,05, беше сигнификантно поголема за (Табела 1): а) обилно/нема - Difference test: 20% [(0,38-37,63) 95% CI]; p=0,0471; б) обилно/ретко - Difference test: 26,65% [(7,52-43,35) 95% CI]; p=0,0066; и в) обилно/фокално - Difference test: 31,11% [(12,47-47,13) 95% CI]; p=0,0012. За p>0,05, не беше согледана сигнификантна разлика во процентуалната застапеност на α-SMA градусите нема/ретко (p=0,4421), нема/фокално (p=0,1806) и ретко/фокално (p=0,5617).

5.1.1. Демографски параметри и CAFs

Направена беше анализа на CAFs α-SMA градус на пациентите со OSCC според пол и возраст и тоа како поединечно по категории така и вкупно за целиот примерок на испитаници во истражувањето (Табела 2 и График 2-3).

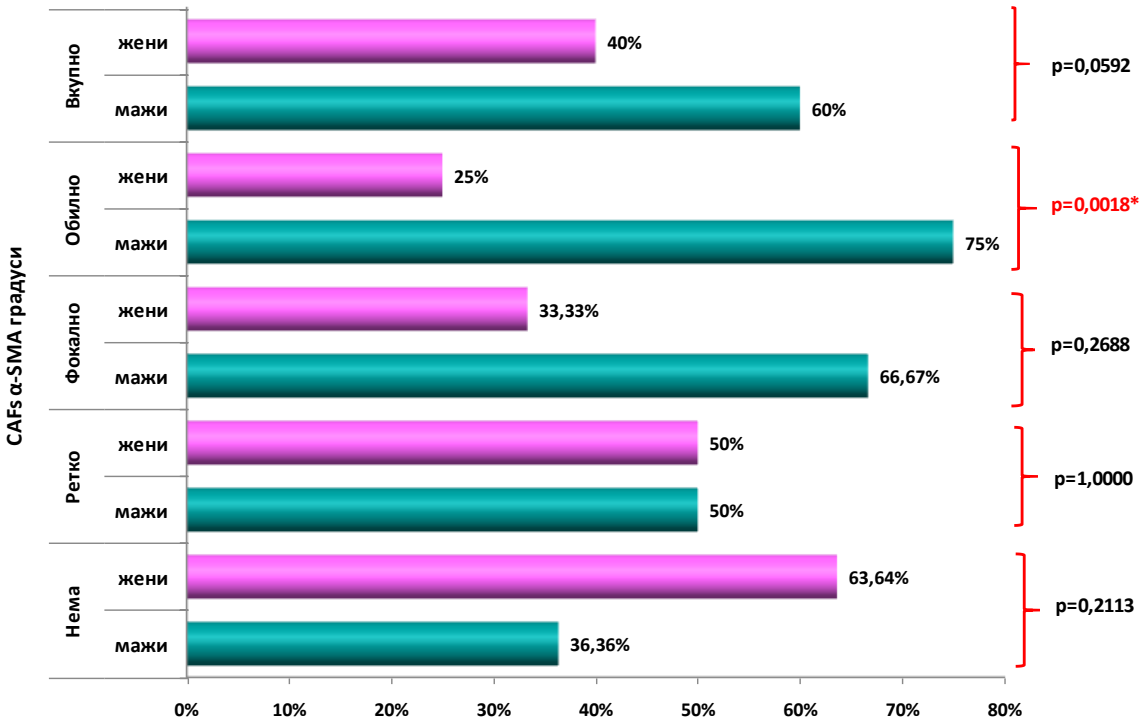
Табела 2. Анализа на пол и возраст на пациенти со OSCC според CAFs α-SMA градус

CAFs		N (%)	[1]p
α-SMA градус - пол			
CAFs 0 N=11	**Мажи**	4 (36,36%)	p=0,2113
	Жени	7 (63,64%)	
CAFs 1 N=8	**Мажи**	4 (50%)	p=1,0000
	Жени	4 (50%)	
CAFs 2 N=6	**Мажи**	4 (66,67%)	p=0,2688
	Жени	2 (33,33%)	
CAFs 3 N=20	**Мажи**	15 (75%)	p=0,0018*
	Жени	5 (25%)	
Вкупно N=45	**Мажи**	27 (60%)	p=0,0592
	Жени	18 (40%)	
α-SMA градус - возраст			
CAFs 0 N=11	**Mean±SD**	70,73±9,90	F=0,652; df=3; p=0,5860
	Min/Max	51 / 88	
	Median (IQR)	69 (66-76)	
	95% CI of Mean	64,08 – 77,38	
CAFs 1 N=8	**Mean±SD**	65±10,72	
	Min/Max	48 / 82	
	Median (IQR)	63,5 (59,5-72,1)	
	95% CI of Mean	56,04- 73,96	
CAFs 2 N=6	**Mean±SD**	66,83±5,15	
	Min/Max	63 / 76	
	Median (IQR)	65 (63-76)	
	95% CI of Mean	61,42 – 72,24	
CAFs 3 N=20	**Mean±SD**	66,35±10,46	
	Min/Max	41 / 82	
	Median (IQR)	67 (59-74,5)	
	95% CI of Mean	61,45 – 71,24	
Вкупно N=45	**Mean±SD**	67,24±9,75	
	Min/Max	41 / 88	
	Median (IQR)	67 (61-75)	
	95% CI of Mean	45,02 – 47,60	

CAFs0 = нема; CAFs1 =ретко; CAFs2 = фолано; CAFs3 = обилно
[1]Difference test F-One way ANOVA *сигнификантно за p<0,05

Пол - Направена беше анализа на процентуалната разлика во застапеност на испитаниците според пол во секој од четирите CAFs α-SMA градуси поединечно како и вкупно за целиот примерок (Табела 2 и График 2). Дистрибуцијата според пол во целиот примерок на пациенти изнесуваше 27 960%) мажи vs. 18 (40%) жени со однос помеѓу половите од 1,5:1. За p>0,05, немаше сигнификантна разлика во застапеноста на половите во целиот примерок на пациенти со OSCC (p=0,0592).

График 2. Дистрибуција на пол на пациенти со OSCC според CAFs α-SMA градус



Поединечната анализа на секој од четирите CAFs α-SMA градуси укажа дека, за p>0,05, немаше сигнификантна разлика во процентуалната застапеност на половите кај три градуси и тоа: а) "нема" - p=0,2113; б) "ретко" - p=1,0000; и в) "фокално" - p=0,2688. За p<0,05, статистички сигнификантна процентуална разлика во застапеноста на половите беше утврдена само за CAFs α-SMA градусот "обилно" во прилог на сигнификантно поголема застапеност на испитаниците од машки пол - Difference test: 50% [(19,07-69,53) 95% CI]; p=0,0018).

Возраст - вредностите за возраста на пациентите укажаа на правилна дистрибуција на фреквенциите (Shapiro-Wilk W=0,9844; p=0,7966) согласно што во понатамошната анализа беа применети параметарски тестови. Просечната возраст во целиот примерок изнесуваше 67,24±9,75 [95% CI of Mean (45,02 – 47,60)] години со мин/мак возраст од 41/ 88 години и 50% испитаници помлади од 67 година за Median (IQR)= 67 (61-75) (Табела 2 и График 3).

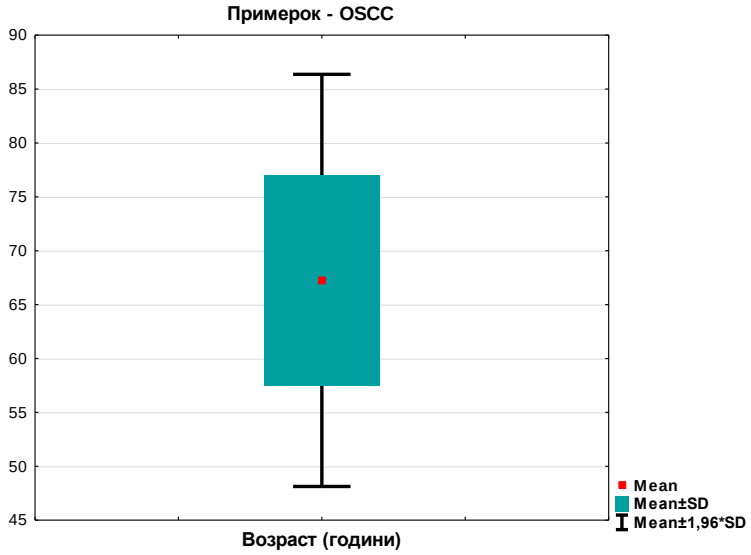


График 3. Дистрибуција на пациенти со OSCC според возраст (години)

Возраста на пациентите во години во секој од четирите CAFs α-SMA градуси поединечно изнесуваше за (Табела 2 и График 4):

а) нема - 70,73±9,90 [95% CI of Mean (64,08 – 77,38)] години со мин/мак возраст од 51/ 88 години и 50% испитаници помлади од 69 година за Median (IQR)=69 (66-76);

б) ретко - 65±10,72 [95% CI of Mean (56,04- 73,96)] години со мин/мак возраст од 48/ 82 години и 50% испитаници помлади од 63,5 година за Median (IQR)=63,5 (59,5-72,1);

в) фокално - 66,83±5,15 [95% CI of Mean (61,42 – 72,24)] години со мин/мак возраст од 63/ 76 години и 50% испитаници помлади од 65 година за Median (IQR)=65 (63-76);

г) обилно - 66,35±10,46 [95% CI of Mean (61,45 – 71,24)] години со мин/мак возраст од 41/ 82 години и 50% испитаници помлади од 67 година за Median (IQR)=67 (59-74,5).

Анализата на варијанса, за p>0,05, не укажа на статистички сигнификантна разлика меѓу пациентите од четирите CAFs α-SMA градуси и возраста во години (One way ANOVA: F=0,652; df=3; p=0,5860).

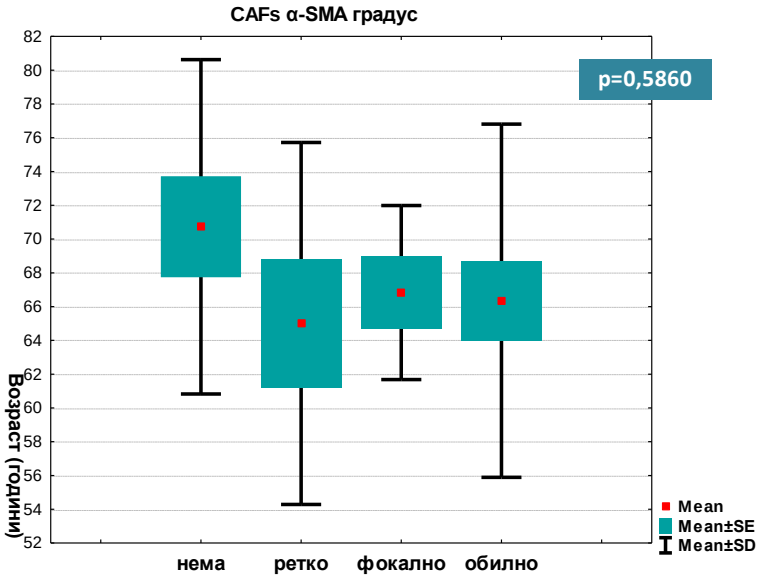


График 4. Дистрибуција на пациенти со OSCC според CAFs α-SMA градус и возраст

Направена беше и дополнителна анализа на примерокот на пациентите со OSCC според две возрасни групи и тоа ≤65 години и >66 години (Табела 3). Пропорцијата на испитаници во групата ≤65 години беше 17 (37,8%), а во групата >65 години беше 28 (62,22%). Процентуалната застапноста на пациентите од групата ≤65 години за p<0,05, беше сигнификантн помала споредено со пропорцијата на оние >65 години – Difference test: 24,44% [(3,81-42,36) 95% CI]; p=0,0211). Не беше утврдена сигнификантна асоцијација на CAFs α-SMA градусот (CAFs0→CAFs3) и возраста на пациентите ≤65/>66 години (Fisher Freeman Halton Exact test: p=0,4354).

Табела 3. Анализа на возрасни групи на пациенти со OSCC според CAFs α-SMA градус

Возрасни групи	CAFs α-SMA градус					[1]p
	CAFs 0 N=11	CAFs 1 N=8	CAFs 2 N=6	CAFs 3 N=20	Вкупно N=45	
≤ 65 години	2 (18,18%)	4 (50%)	3 (50%)	8 (40%)	17 (37,78%)	p=0,4354
> 65 години	9 (81,82%)	4 (50%)	3 (50%)	3 (50%)	28 (62,22%)	

CAFs0 = нема; CAFs1 =ретко; CAFs2 = фолано; CAFs3 = обилно
[1]Fisher Freeman Halton Exact test *сигнификантно за p<0,05

5. 1. 2. Клиничко-патолошки параметри и CAFs

Осум клиничко-патолошки параметри кај пациенти со OSCC беа анализиран во однос на CAFs α-SMA градусот (CAFs0→CAFs3) (Табела 4а-б и График 5-8).

Табела 4а. Анализа на селектирани клиничко-патолошки параметри според CAFs α-SMA градус

Параметри	CAFs α-SMA градус				p
	CAFs 0 N=11	CAFs 1 N=8	CAFs 2 N=6	CAFs 3 N=20	
T - статус					
T1 (N=12)	9 (75%)	2 (16,67%)	0 (0%)	1 (8,33%)	T1→T4 / H+P→Ф+O †p=0,0006*
T2 (N=16)	1 (6,25%)	4 (25%)	2 (12,5%)	9 (56,25%)	
T3 (N=8)	0 (0%)	2 (25%)	2 (25%)	4 (50%)	
T4 (N=9)	1 (11,11%)	0 (0%)	2 (22,22%)	6 (66,67%)	
T – статус (група)					
T1→T2 (N=28)	10 (35,71%)	6 (21,43%)	2 (7,15%)	10 (35,71%)	†p=0,0491*
T3→T4 (N=17)	1 (5,88%)	2 (11,76%)	4 (23,53%)	10 (58,82%)	
N - статус					
N0 (N=31)	10 (32,26%)	6 (19,35%)	1 (3,23%)	14 (45,16%)	N0→N1 / H→O †p=0,0255*
N1 (N=11)	1 (9,09%)	2 (18,18%)	4 (36,36%)	4 (36,36%)	
N2 (N=3)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,33%)	2 (66,67%)	-
N – статус (група)					
N0 (N=31)	10 (32,26%)	6 (19,35%)	1 (3,23%)	14 (45,16%)	†p=0,0164*
N1→N2 (N=14)	1 (7,14%)	2 (14,29%)	5 (35,71%)	6 (42,86%)	
TNM - статус					
TNM1 (N=10)	8 (80%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	TNM1→TNM4 / H→P+Ф+O †p=0,00001*
TNM2 (N=12)	1 (8,33%)	4 (33,33%)	0 (0%)	7 (58,33%)	
TNM3 (N=11)	1 (9,09%)	2 (18,18%)	3 (27,27%)	5 (45,45%)	
TNM4 (N=12)	1 (8,33%)	0 (0%)	3 (25%)	8 (66,67%)	
TNM – статус (група)					
TNM 1→TNM2 (N=22)	9 (40,91%)	6 (27,27%)	0 (0%)	7 (31,82%)	††p=0,0165*
TNM 3→TNM4 (N=23)	2 (8,70%)	2 (8,70%)	6 (26,09%)	13 (56,52%)	
Локализација					
Сублингвинално (N=8)	0 (0%)	0 (0%)	1 (12,50%)	7 (87,50%)	-
Јазик (N=20)	6 (30%)	5 (25%)	1 (5,00%)	8 (40%)	†††p=0,0125*
Образ (N=7)	2 (28,57%)	2 (28,57%)	3 (42,86%)	0 (0%)	†††p=0,1224
Гингива (N=8)	3 (37,50%)	0 (0%)	1 (12,50)	4 (50%)	†††p=0,3329
Ретромоларно (N=1)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	-
Непце (N=1)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	-

CAFs0 = нема; CAFs1 =ретко; CAFs2 = фолано; CAFs3 = обилно
T- статус (големина на туморска лезија): T1= ≤ 2cm во најголем дијаметар; T2= >2 - ≤4cm; T3= >4cm; и T4= >4cm
N- статус (метастази во нодус): N0=нема зголемени линфонодули; N1=ипсилатерални, <3cm; N2=солитарни 3-6cm/ мултипли <6cm ипсилатерални/ контралатерални или билатерални <6cm; и N3=метастатски депозит >6cm
TNM - клинички стадиум на болеста
нема+ретко/фокално+обилно = H+P→Ф+O
†Fisher Freeman Halton Exact test † † CAFs градус: нема/има – Fisher exact test
†††Difference test (CAFs нема/има) *сигнификантно за p<0,05

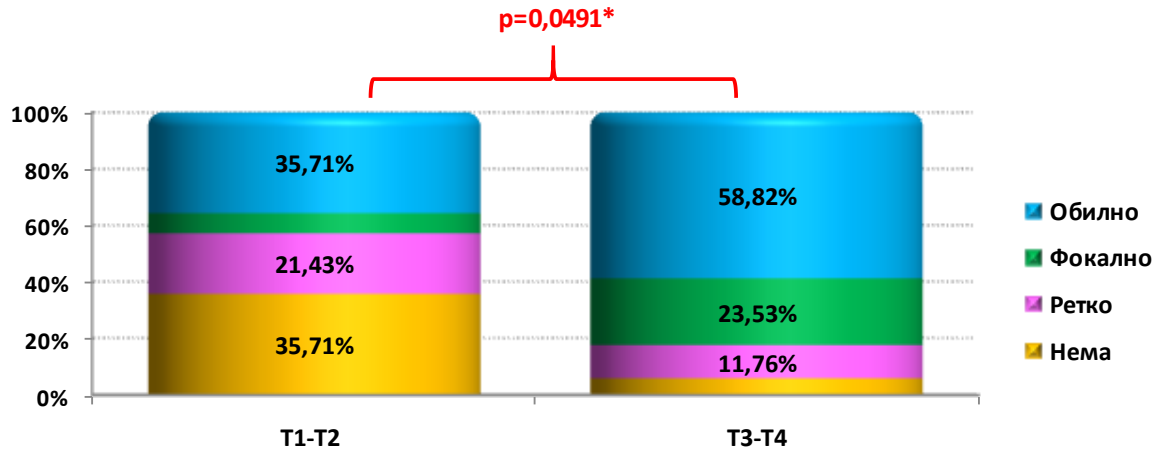
Опфатени беа следните 9 параметри: 1) Т-статус (големина на туморска лезија); 2) N–статус (нодален статус т.е. метастази во регионални линфни јазли); 3) TNM - клинички стадиум; 4) локализација; 5) степен на диференцијација на туморски клетки; 6) L - лимфатичен продор; 7) Pn - перинеурална инвазија; 8) релапс на болест; и 9) вид на релапс на болест (Табела 4а-б и График 5-8).

Т-статус и CAFs α-SMA градус – Кај пациентите со OSCC, направена беше анализа во однос на Т статусот класифициран во 4 категории и тоа: а) T1= ≤ 2cm во најголем дијаметар; б) T2= >2 - ≤4cm; 3) T3= >4cm; и 4) T4= >4cm со зафаќање на околни структури. Во целиот примерок на пациенти најзастапен беше T2 - 16 (35,5%) следено со T1- 12 (26,7%), T4- 9 (20%) и најмалку T3- 17,8%. Анализирана беше асоцираноста на CAFs α-SMA градусот со Т статусот на пациентите класифициран во 4 односно во 2 категории (Табела 4а и График 5).

Најголема пропорција од пациентите со T1 статус, и тоа 9 (75%), имаа CAFs градус "нема", а само кај 1 (8,3%) беше утврден CAFs градус "обилно". Спротивно на тоа, CAFs градус "нема" беше утврден само кај по 1 пациент од T2 и T4 и кај ниеден од T3, а CAFs градус "обилно" беше утврден во најголема пропорција кај пациентите со T4 - 6 (66,7%), следено со T2– 9 (56,2%), и T3– 4 (50%). За $p<0,05$, постоеше сигнификантна асоцијација на Т статусот (T1→T4) со CAFs градусот нема+ретко→фокално+обилно (Fisher Freeman Halton Exact test: p=0,0006) - повисокиот Т-статус (поголемата туморска лезија) сигнификантно асоцираше со поголемо присуство на CAFs (фокално односно обилно).

Дополнително, беше направено групирање на Т-статусот во две категории и тоа T1→T2 - 28 (62,2%) и T3→T4 - 17 (37,8%) пациенти. Согледано беше дека пропорцијата на CAFs градус "нема" односно "обилно" изнесува консеквентно во T1→T2 - 10 (35,7%) vs. 10 (35,7%), а во T3→T4 - 1 (5,9%) vs. 10 (58,8%). Кај пациентите со OSCC, за $p<0,05$, имаше сигнификантна асоцијација на Т-статусот (T1→T2 / T3→T4) и CAFs α-SMA градусот (Fisher Freeman Halton Exact test: p=0,0491). Поголемата туморска лезија (T3-T4 статусот) на пациентите со OSCC сигнификантно асоцираше со поголемо присуство на CAFs (градус "фокално" односно "обилно") (Табела 4а и График 5).

График 5. Анализа на Т – статус според CAFs α-SMA градус кај пациенти со OSCC



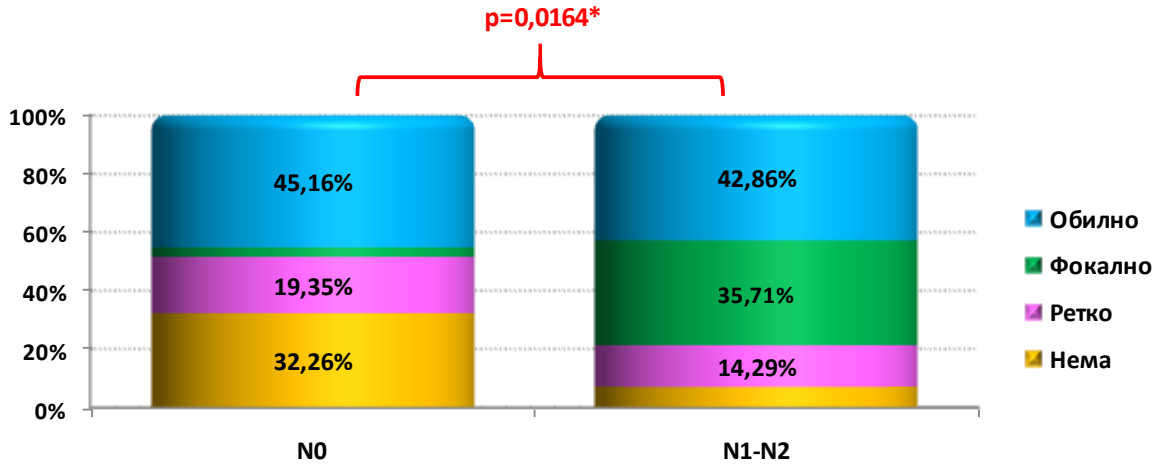
N-статус и CAFs α-SMA градус – Пациентите со OSCC, беа анализирани во однос на N статусот кој укажува на метастази во регионалните линфни јазли, класифициран во 4 категории и тоа: 1) N0=нема зголемени линфонодули; 2) N1=ипсилатерални, <3cm; 3) N2=солитарни 3-6cm/ мултипли <6cm ипсилатерални/ контралатерални или билатерални <6cm; и 4) N3=метастатски депозит >6cm. Анализирана беше асоцираноста на N статусот во 4 категории со CAFs α-SMA градусот. Во примеокот на нашето инстражување не беа регистрирани пациенти со N3 статус. Анализирана беше асоцираноста на CAFs α-SMA градусот со N статусот на пациентите класифициран во 3 односно во 2 категории (Табела 4а и График 6).

CAFs α-SMA градус "нема" имаа третина или 10 (32,3%) од пациентите со N0 статус, и само 1 (9,01%) од оние со T1 статус. Кај пациентите со N2 статус не беше регистран ниеден пациент со CAFs градус "нема" односно "ретко". Најголемиот дел од пациентите со N0→N2 статус имаа CAFs градус "обилно" и тоа консеквентно кај N0-14 (45,16%) vs. N1- 4 (36,36%) vs. N2- 2 (66,67%). За p<0,05, постоеше сигнификантна асоцијација на N статусот (N0-N1) со CAFs градусот (H→O) (Fisher Freeman Halton Exact test: p=0,0255) - N1 статусот сигнификантно асоцираше со поголемо присуство на CAFs (фокално односно обилно).

Дополнително, направено беше групирање на N-статусот во две категории и тоа N0 - 31 (68,9%) и N1→N2 - 14 (31,1%). Согледано беше дека пропорцијата на CAFs градус "нема" изнесува во N0 - 10 (32,3%), а во N1→N2 - 1 (7,1%). CAFs α-SMA градус "фокално" односно "обилно" изнесуваше консеквнетно 1 (3,2%) vs. 14 (45,2%) во N0 и 5 (35,7%) vs. 6 (42,9%) во N1→N2. Кај пациентите со OSCC, за p<0,05, имаше

сигнификантна асоцијација на N-статусот (N0 / N1→N2) и CAFs градусот (Fisher Freeman Halton Exact test: p=0,0164). N1→N2 статусот на пациентите со OSCC сигнификантно асоцираше со CAFs градус "фокално" односно "обилно" (Табела 4 и График 6).

График 6. Анализа на N – статус според CAFs α-SMA градус кај пациенти со OSCC



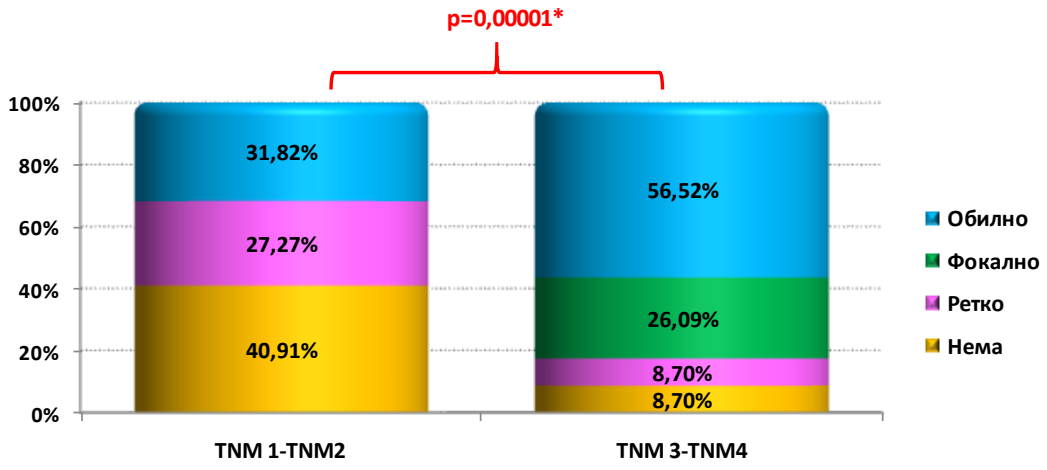
TNM-статус и CAFs α-SMA градус – направена беше анализа на пациентите со OSCC, во однос на TNM статусот (клинички стадиум на болеста) класифициран во 4 категории и тоа од TNM1→ TNM4. Во примерокот на пациенти најзастапени беа клиничките стадиуми TNM2 и TNM4 кај по 12 (26,7%) следено со TNM3 кај 11 (24,4%) и TNM1 кај 10 (22,2%). Анализирана беше асоцираноста на CAFs α-SMA градусот со TNM статусот на пациентите класифициран во 4 односно во 2 категории (Табела 4а и График 7).

Најголема пропорција од пациентите со TNM1 статус, и тоа 8 (80%), имаа CAFs градус "нема", а кај ниеден пациент со овој статус немаше CAFs градус "фокално" односно "обилно". Спротивно на тоа, кај пациентите со TNM2→ TNM4 беше утврден CAFs градус "нема" само кај по 1 пациент, а CAFs градус "обилно" кај консеквентно 7 (53,3%) vs. 5 (45,4%) vs. 8 (66,7%). За p<0,05, постоеше сигнификантна асоцијација на TNM статусот (TNM1→ TNM4) со CAFs градусот нема/ има (Fisher Freeman Halton Exact test: p=0,00001) - повисокиот TNM-статус (понапреднатиот клинички стадиум на болеста) сигнификантно асоцираше со поголемо присуство на CAFs.

Дополнително, беше направено групирање на TNM -статусот во две категории и тоа TNM1→TNM2 кај 22 (48,9%) и TNM3→ TNM4 кај 23 (51,1%) пациенти. Согледано

беше дека пропорцијата на CAFs градус "нема" односно "обилно" изнесува консеквентно во TNM1→TNM2 - 9 (40,9%) vs. 7 (31,8%), а во TNM3→ TNM4 – 2 (8,7%) vs. 13 (56,5%). Кај пациентите со OSCC, за p<0,05, имаше сигнификантна асоцијација на TNM-статусот (TNM1→ TNM2/ TNM3→ TNM4) и CAFs α-SMA градусот (нема/има) (Fisher Exact test: p=0,0165). Понапреднатиот клинички стадиум (TNM3→ TNM4) на пациентите со OSCC сигнификантно асоцираше со присуство на CAFs (Табела 4а и График 7).

График 7. Анализа на TNM– статус според CAFs α-SMA градус кај пациенти со OSCC



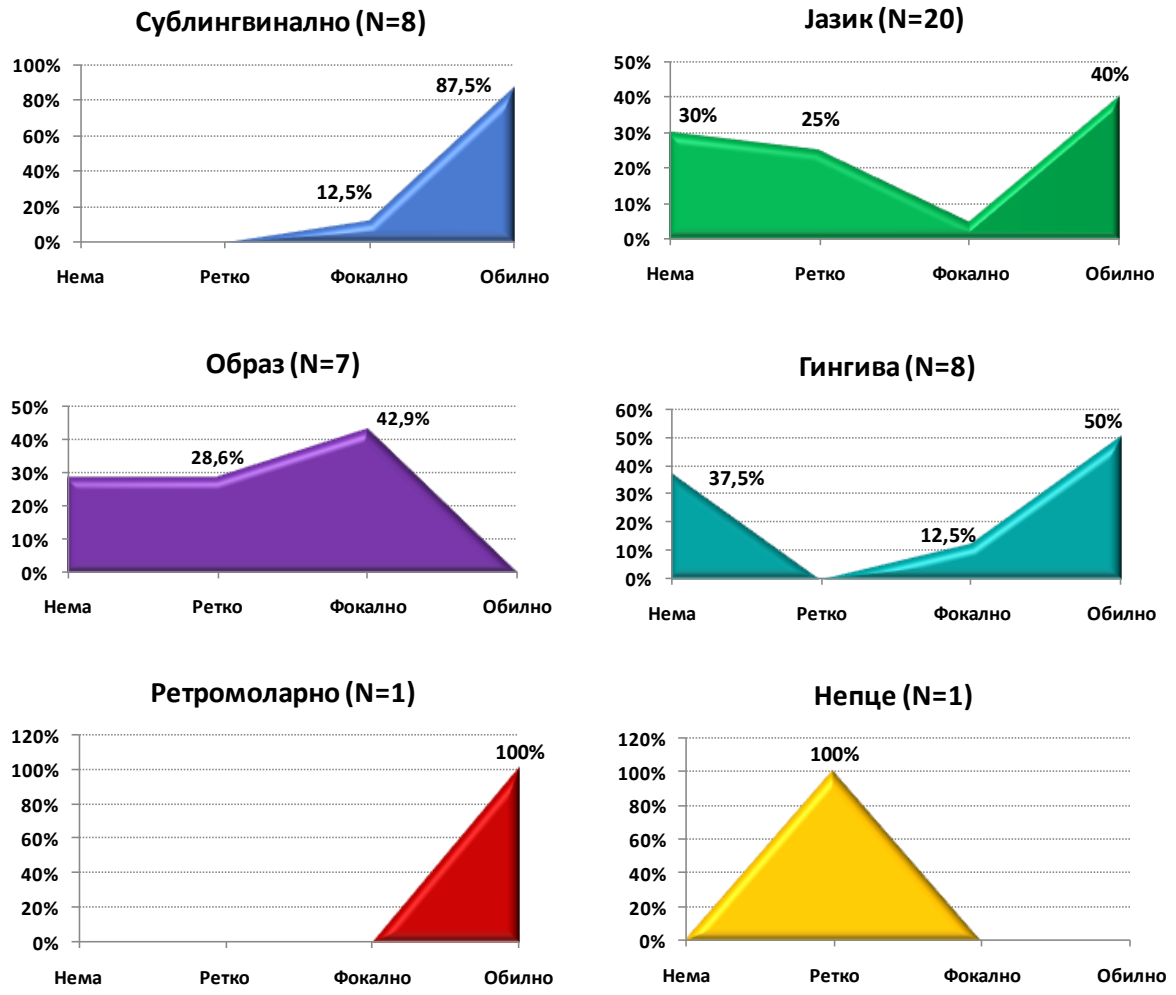
Локација и CAFs α-SMA градус – во целиот примерок на пациенти со OSCC согледани беа 6 локации на туморот и тоа најмногу на јазик застапено кај 20 (44,4%) пациенти следено со по 8 (17,8%) сублингвинално и на гингива, потоа 7 (15,6%) на образ и по 1 (2,2%) на ретромоларно и на непце. Анализата во однос на отсуство/ присуство на CAFs α-SMA укажа дека на локацијата (Табела 4а и График 8):

а) јазик, процентуалната застапеност на пациентите со присутен CAFs беше сигнификантно поголема споредено оние каде CAFs беше отсутен за Difference test: 40% [(9,03-61,85) 95% CI]; p=0,0125);

б) образ и гингива поединечно, немаше сигнификантна разлика во застапеноста на пациентите со отсутен односно присутен CAFs за консеквентно p=0,1224 vs. p=0,3329;

в) сублингвинално, кај сите пациенти беше утврдено присуство на CAFs и тоа градус "фокално" кај 1 (12,5%) односно "обилно" кај 7 (87,5%). Кај иеден од пациентите со оваа локација не беше утврдено отсуство на CAFs.

График 8. Анализа на локација на OSCC според CAFs α-SMA градус



Степен на диференцијација на туморски клетки (G) и CAFs α-SMA градус – степенот на диференцијација на туморските клетки на пациентите со OSCC беше анализиран во 4 категории и тоа од G1→ G4 (G1-добро; G2-умерено; G3-лошо; G4-недиференцирано односно анапластичен карцином). Најзастапени беа пациентите со G2 – 28 (63,6%) следено со G3 – 10 (22,7%) и G1 – 6 (13,6%). Ниеден од пациентите немаше G4 диференцијација на туморски клетки. Анализирана беше асоцираноста на CAFs α-SMA градусот со степенот на диференцијација на туморските клетки во 3 и во 2 категории (Табела 4б и График 9).

CAFs градус "нема", беше регистриран кај пациентите со G1 и G2 и тоа консеквентно 2 (33,3%) vs. 9 (32,1%), и кај ниеден од пациентите со G3. CAFs градус "фокално" односно "обилно" имаше консеквентно во G1 – 0 (0%) vs. 2 (33,3%), G2 – 4 (14,3%) vs. 12 (42,9%), и G3 – 2 (20%) vs. 5 (50%). За p>0,05, немаше сигнификантна

асоцијација на степенот на диференцијација на туморот (G1→G3) со CAFs градусот нема+ретко/ фокално+обилно (Fisher Freeman Halton Exact test: p=0,3573.

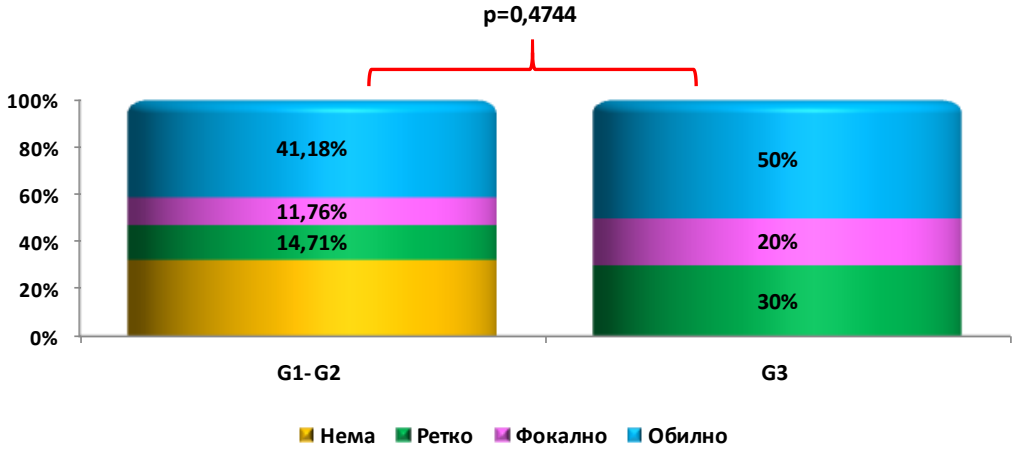
Направено беше и дополнително групирање на степенот на диференцијација на туморот (G1→G3) во две категории и тоа G1→G2 кај 34 (77,3%) и G3 кај 10 (22,7%) пациенти. За p>0,05, немаше сигнификантна асоцијација на G-статусот (G1→ G2/ G3) и CAFs α-SMA градусот (нема+ретко/ фокално+обилно) (Fisher Exact test: p=0,4744) (Табела 4б и График 9).

Табела 4б. Анализа на селектирани клиничко-патолошки параметри според CAFs α-SMA градус

Параметри	CAFs α-SMA градус				p
	CAFs 0 N=11	CAFs 1 N=8	CAFs 2 N=6	CAFs 3 N=20	
G - Степен на диференцијација на туморски клетки					
G1 (N=6)	2 (33,33%)	2 (33,33%)	0 (0%)	2 (33,33%)	G1→G3 / Н+Р→Ф+О †p=0,3573
G2 (N=28)	9 (32,14%)	3 (10,71%)	4 (14,29%)	12 (42,86%)	
G3 (N=10)	0 (0%)	3 (30%)	2 (20%)	5 (50%)	
G статус - Степен на диференцијација на туморски клетки (група)					
G1→ G2 (N=34)	11 (32,35%)	5 (14,71%)	4 (11,76%)	14 (41,18%)	††p=0,4744
G3 (N=10)	0 (0%)	3 (30%)	2 (20%)	5 (50%)	
L - Линфатичен продор					
Нема (N=28)	9 (32,14%)	6 (21,43%)	3 (10,71%)	10 (35,71%)	†p=0,2609
Има (N=17)	2 (11,76%)	2 (11,76%)	3 (17,65%)	10 (58,82%)	
Pn - Перинеурална инвазија					
Нема (N=37)	11 (29,73%)	6 (16,22%)	3 (8,11%)	17 (45,95%)	нема→има / Н+Р→Ф+О ††p=0,4355
Има (N=8)	0 (0%)	2 (25%)	3 (37,50%)	3 (37,50%)	
R - Позитивна ресекциона ивица					
Нема (N=23)	6 (26,09%)	4 (17,39%)	5 (21,74%)	8 (34,78%)	†p=0,3646
Има (N=20)	5 (25%)	3 (15%)	1 (5%)	11 (55%)	
Неможна потврда (N=2)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	-
RB - Релапс на болест					
Нема (N=17)					
Има (N=27)					
VRB - Вид на рилапс на болест					
VRB1 (N=5)	3 (60%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (20%)	†††p=0,5485
VRB2 (N=18)	3 (16,67%)	5 (27,78%)	1 (5,56%)	9 (50%)	†††p=0,0001*
VRB3 (N=4)	2 (50%)	0 (0%)	1 (25%)	1 (25%)	†††p=1,000

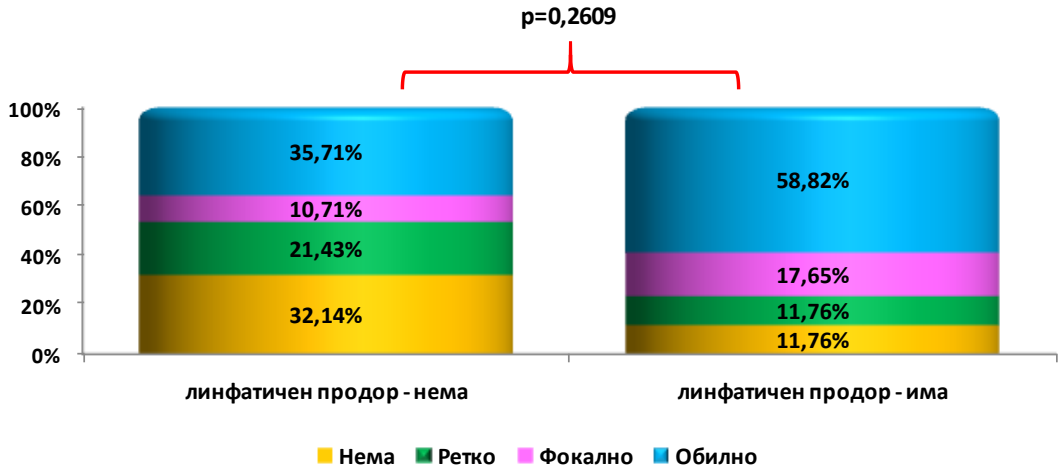
CAFs0 = нема; CAFs1 =ретко; CAFs2 = фолано; CAFs3 = обилно
G1-добро; G2-умерено; G3-лошо; G4-недиференцирано (анапластичен карцином)
VRB1-метастази; VRB2-локален/локорегионален рецидив; VRB3-метастази и локален рецидив
†Fisher Freeman Halton Exact test † † CAFs градус: нема+ретко/фокално+обилно – Fisher exact test
†††Difference test (CAFs нема/има)
*сигнификантно за p<0,05

График 9. Анализа на степен на диференцијација на туморски клетки според CAFs α-SMA градус



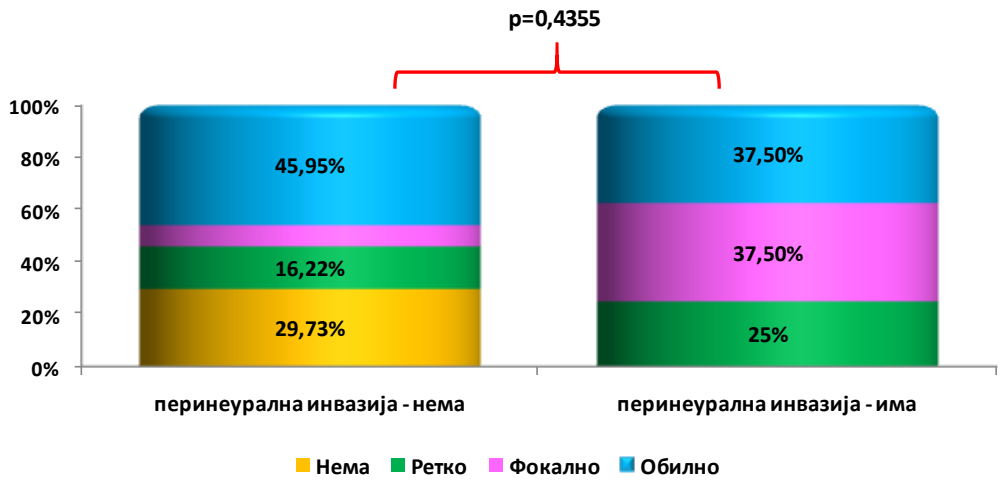
Линфатичен продор - L и CAFs α-SMA градус – лимфатичен продор немаше кај 28 (62,2%) од пациентите со OSCC, а истиот беше најден кај 17 (37,8%) од нив. За p>0,05, немаше сигнификантна асоцијација на линфатичниот продор (нема→има) со CAFs α-SMA градусот нема→обилно (Fisher Freeman Halton Exact test: p=0,2609) (Табела 4б и График 10).

График 10. Анализа на линфатичен продор според CAFs α-SMA градус



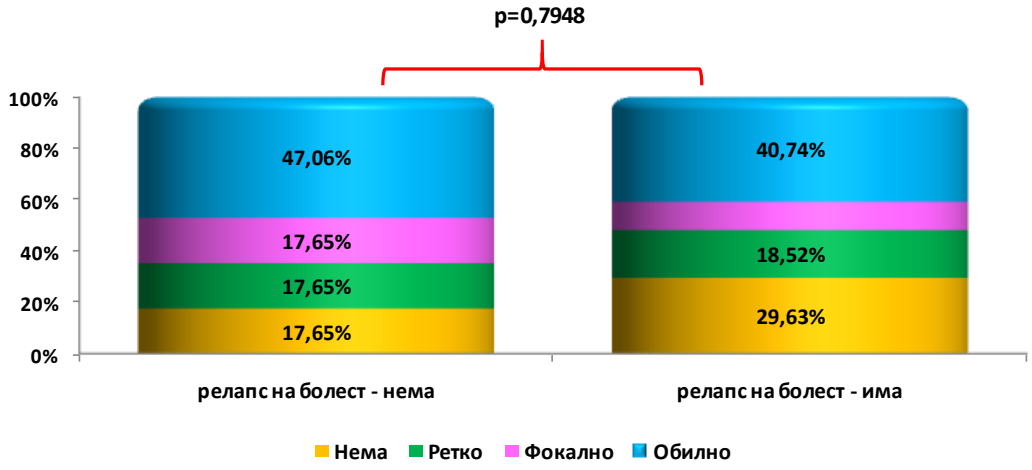
Перинеурална инвазија - Pn и CAFs α-SMA градус – перинеурална инвазија имаше кај 8 (17,8%) од пациентите со OSCC во примерокот, а истата не беше утврдена кај 37 (82,2%). За p>0,05, немаше сигнификантна асоцијација на перинеуралната инвазија (нема→има) со CAFs α-SMA градусот нема+ретко/ фокално+обилно (Fisher Exact test: p=0,4355) (Табела 4б и График 9).

График 11. Анализа на перинеурална инвазија според CAFs α-SMA градус



Релапс на болест - RB и CAFs α-SMA градус – нема/има релапс на болест кај консеквнетно 17 (38,6%) vs. 27 (61,4%) од пациентите со OSCC во примерокот. За p>0,05, немаше сигнификантна асоцијација на релапс на болеста (нема→има) со CAFs градусот нема→обилно (Fisher Freeman Halton Exact test: p=0,7948) (Табела 4б и График 13).

График 13. Анализа на релапс на болест според CAFs α-SMA градус



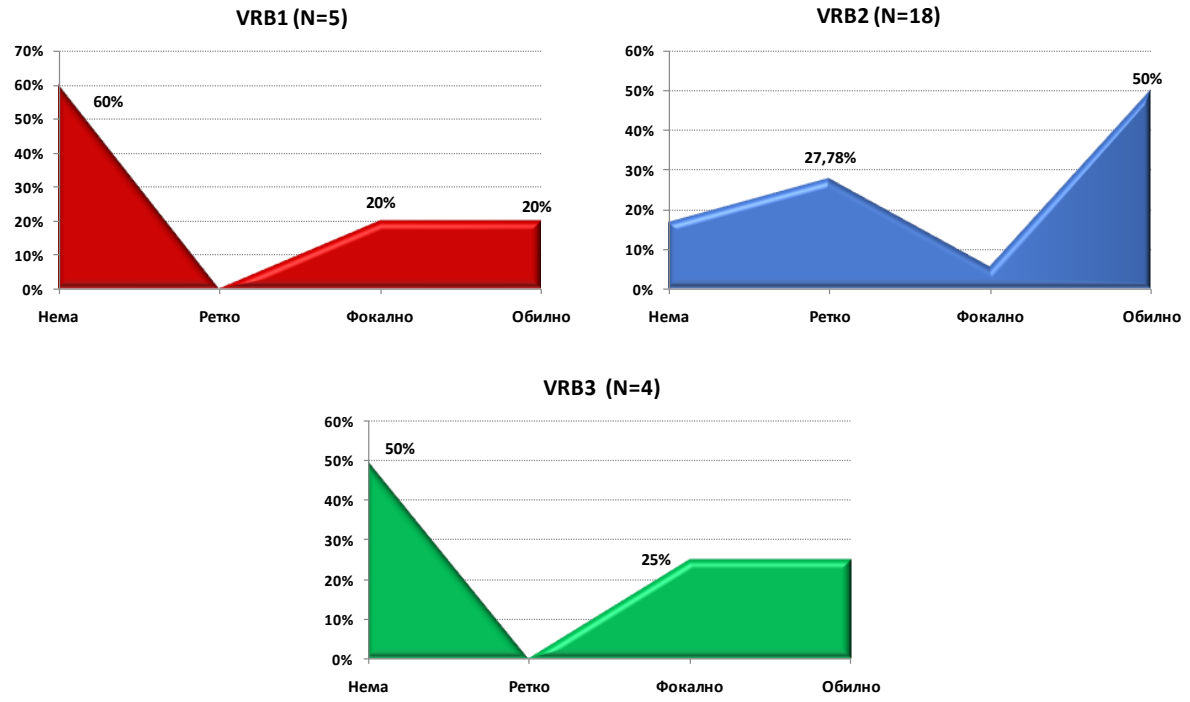
Вид на рилапс на болест - VRB и CAFs α-SMA градус – видот на рилапс на болест беше анализиран како VRB1– метастази утврдени кај 5 (18,5%) од пациентите, VRB2– локален/ локорегионален рецидив кај 18 (66,7%), и VRB3– метастази и локален рецидив утврден кај 4 (14,8%) од пациентите. Анализата во однос на отсуство/ присуство на CAFs α-SMA укажа дека (Табела 4б и График 14) кај:

а) VRB1– при релапс на болеста во вид на метастази немаше сигнификантна разлика во процентуалната застапеност на пациентите со отсутен/ присутен CAFs за p=0,5485;

б) VRB2– при релапс на болеста во вид на локален/ локорегионален рецидив, процентуалната застапеност на пациентите со присутен CAFs беше сигнификантно поголема споредено оние каде CAFs α-SMA беше отсутен за Difference test: 66,66% [(34,76-81,98) 95% CI]; p=0,0001);

в) VRB3– при релапс на болеста во вид на метастази и локален/локорегионален рецидив не беше утврдена сигнификантна разлика во процентуалната застапеноста на пациентите со отсутен/присутен CAFs α-SMA за p=1,000 (нивните пропорции беа подеднакви);

График 14. Анализа на VRB - рилапс на болест според CAFs α-SMA градус



5. 1. 3. Клиничко-патолошки параметри и TAMs

Овој дел од истражувањето, се однесува на макрофаги асоцирани со туморот – TAMs кои беа докажани со анти-CD68 антитело во имунохистохемија. (CD68+TAMs=CD68 позитивни TAMs). Тие имаат важна улога во туморскиот раст, прогресија, инвазија и метастазирање, а со тоа и во лоша прогноза.

Табела 5а. Анализа на селектирани клиничко-патолошки параметри според TAMs

Параметри	TAMs					
	CD 68 TS		CD 68 TN		CD 68 TS+TN	
	Mean±SD	Median (IQR)	Mean±SD	Median (IQR)	Mean±SD	Median (IQR)
Пол						
Мажи (N=17)	73,52±43,1	65 (35-115)	9,81±13,22	5 (2-10)	83,33±50,41	72 (38-135)
Жени (N=28)	70,44±48,25	54 (40-98)	13,11±16,06	6 (0-25)	83,55±53,78	70,5 (40-130)
p	Z=0,278; p=0,7809		Z=-0,371; p=0,7109		Z=-0,069; p=0,9446	
Возраст						
≤ 65 години (N=27)	75,47±43,94	65 (45-101)	13,88±16,37	6 (2-25)	89,35±53,71	77 (48-150)
> 65 години (N=18)	70,36±45,79	57,5 (35-107)	9,46±12,99	5 (2-10)	79,82±50,22	69,5 (38,5-123,5)
p	Z=-0,374; p=0,7079		Z=-0,854; p=0,3928		Z=-0,573; p=0,5663	
T - статус						
T1→T2 (N=28)	71,32±44,87	56 (37,5-107,5)	10,03±13,90	5 (1-10)	81,36±50,73	64 (39,5-126)
T3→T4 (N=17)	73,88±45,66	75 (35-101)	12,94±15,29	7 (2-15)	86,82±53,28	77 (48-130)
p	Z=-0,175; p=0,8606		Z=-1,088; p=0,2763		Z=-0,386; p=0,6993	
N – статус (група)						
N0 (N=31)	68,35±42,42	57 (35-101)	11±13,25	6 (3-13)	79,35±48,84	67 (39-117)
N1→N2 (N=14)	81±49,81	75 (46-125)	11,43±17,06	2 (2-15)	92,43±56,85	84,5 (48-157)
p	Z=-0,748; p=0,4546		Z=0,723; p=0,4695		Z=-0,748; p=0,4546	
TNM – статус (група)						
TNM 1→TNM2 (N=22)	73,14±43,38	57,5 (40-115)	11,91±15,11	5 (2-23)	85,04±49,99	73,5 (40-135)
TNM 3→TNM4 (N=23)	71,48±46,82	65 (30-101)	10,39±13,86	6 (2-13)	81,87±53,35	72 (30-130)
p	Z=0,238; p=0,8115		Z=0,045; p=0,9638		Z=0,227; p=0,8204	
Локализација						
Сублингвинално (N=8)	64,37±48,06	37,5 (32,5-100)	10,75±14,59	3 (1-19)	75,12±60,55	44 (34-121)
Јазик (N=20)	90,25±45,06	97,5 (54-125)	11,50±14,29	5,5 (2-16,5)	101,75±50,89	106,5 (56,5-150)
Образ (N=7)	63,57±45,04	58 (28-75)	17,28±20,24	6 (3-35)	80,86±49,82	61 (33-130)
Гингива (N=8)	49,37±33,44	52,5 (16,5-75)	8,00±9,43	6,5 (3-7,5)	57,37±37,78	61,5 (20-91,5)
Ретромоларно (N=1)	48,0±0,0	48 (48-48)	-	-	48,0±0,0	48 (48-48)
Непце (N=1)	45,0±0,0	45 (45-45)	-	-	45,0±0,0	45 (45-45)
p	$X^2_{(5)}$=6,201; p=0,2872		$X^2_{(3)}$=5,007; p=0,4151		$X^2_{(5)}$=5,503; p=0,3576	

TS=строма; TN=гнездо; TS+TN=строма + гнездо
T- статус (големина на туморска лезија): T1= ≤ 2cm во најголем дијаметар; T2= >2 - ≤4cm; T3= >4cm; и T4= >4cm
N- статус (метастази во нодус): N0=нема зголемени линфонодули; N1=ипсилатерални, <3cm; N2=солитарни 3-6cm/ мултипли <6cm ипсилатерални/ контралатерални или билатерални <6cm; и N3=метастатски депозит >6cm
TNM - клинички стадиум на болеста (**TNM1→TNM4**)
X^2=Kruskal-Wallis H test; Z=Mann-Whitney U Test; *сигнификантно за p<0,05

Во примерокот на пациенти со OSCC, направена беше анализа на два демографски (пол и возраст) и 9 клиничко-патолошки параметри во однос на TAMs CD68 TS (CD68 строма) и CD68 TN (CD68 гнездо) (Табела 5а-б и График 15-26).

Вредностите добиени за TAMs имаа неправилна дистрибуција на фреквенциите и тоа за CD68 TS (Shapiro-Wilk W=0,9241; p=0,0059) и CD68 TN (Shapiro-Wilk W=0,7487; p=0,0001) согласно што во анализата (Табела 5а-б) беа применети непараметарски тестови. Анализата укажа на следните согледувања:

Пол и TAMs – анализата на полот на испитанииците според TAMs во CD68 TS и CD68 TN укажа на просечна и медијална вредност од консеквентно кај: а) мажите - 73,52±43,1 со IQR=65 (35-115) vs. 9,81±13,22 со IQR=5 (2-10) и кај б) жените - 70,44±48,25 со IQR=54 (40-98) vs. 13,11±16,06 со IQR=6 (0-25)

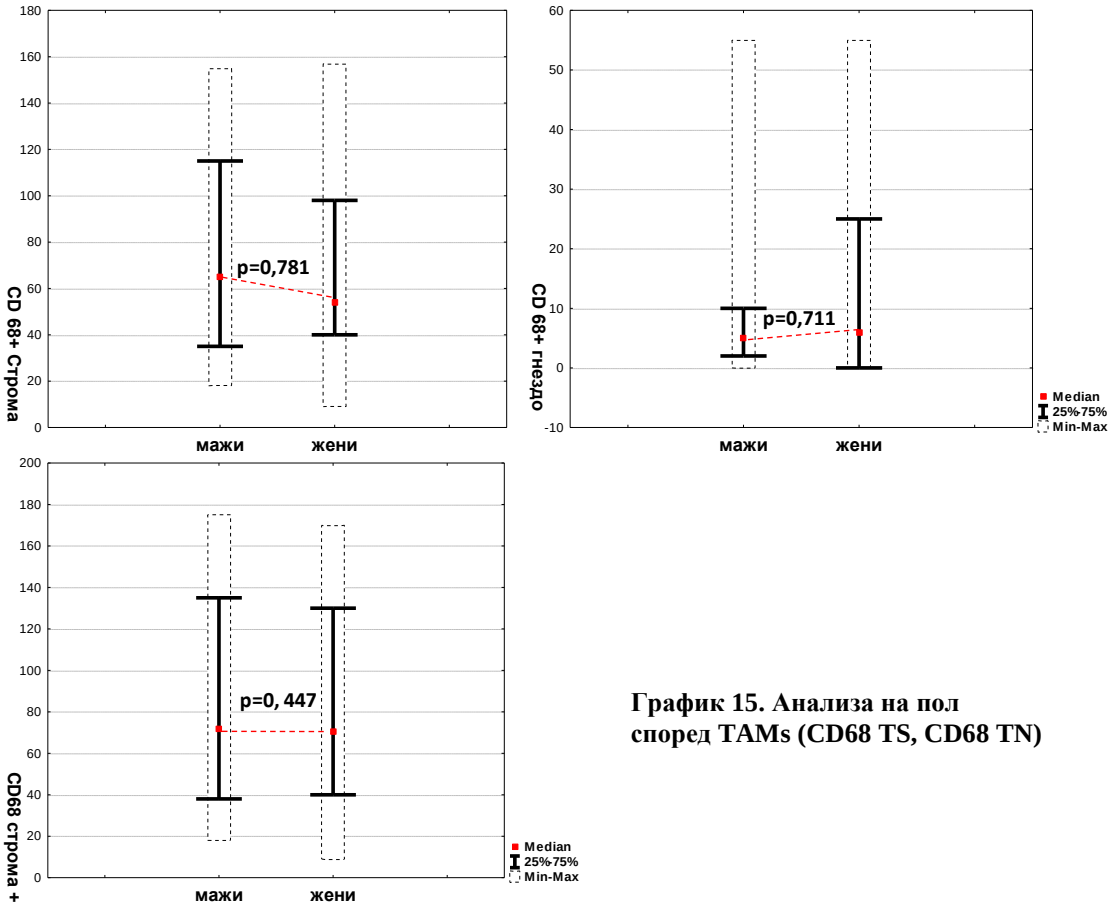


График 15. Анализа на пол според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

За p>0,05, немаше сигнификантна разлика помеѓу половите во однос на TAMs во CD68 TS и CD68 TN за консеквентно Mann-Whitney U Test: Z=0,278; p=0,7809 vs. Z=-0,371; p=0,7109 (Табела 5а и График 15).

Возраст и TAMs – анализата на возраста на испитанииците (≤65 години / > 65 години) според TAMs во CD68 TS и CD68 TN укажа на просечна и медијална вредност од консеквентно кај: а) ≤65 години - 75,47±43,94 со IQR=65 (45-101) vs. 13,88±16,37 со IQR=6 (2-25) и б) >65 години - 70,36±45,79 со IQR=57,5 (35-107) vs. 9,46±12,99 со IQR=5 (2-10).

За p>0,05, немаше сигнификантна разлика помеѓу испитаниците од двете возрасни групи (≤65 години / > 65 години) во однос на TAMs во CD68 TS и CD68 TN за консеквентно Mann-Whitney U Test: Z=-0,374; p=0,7079 vs. Z=-0,854; p=0,3928 (Табела 5а и График 16).

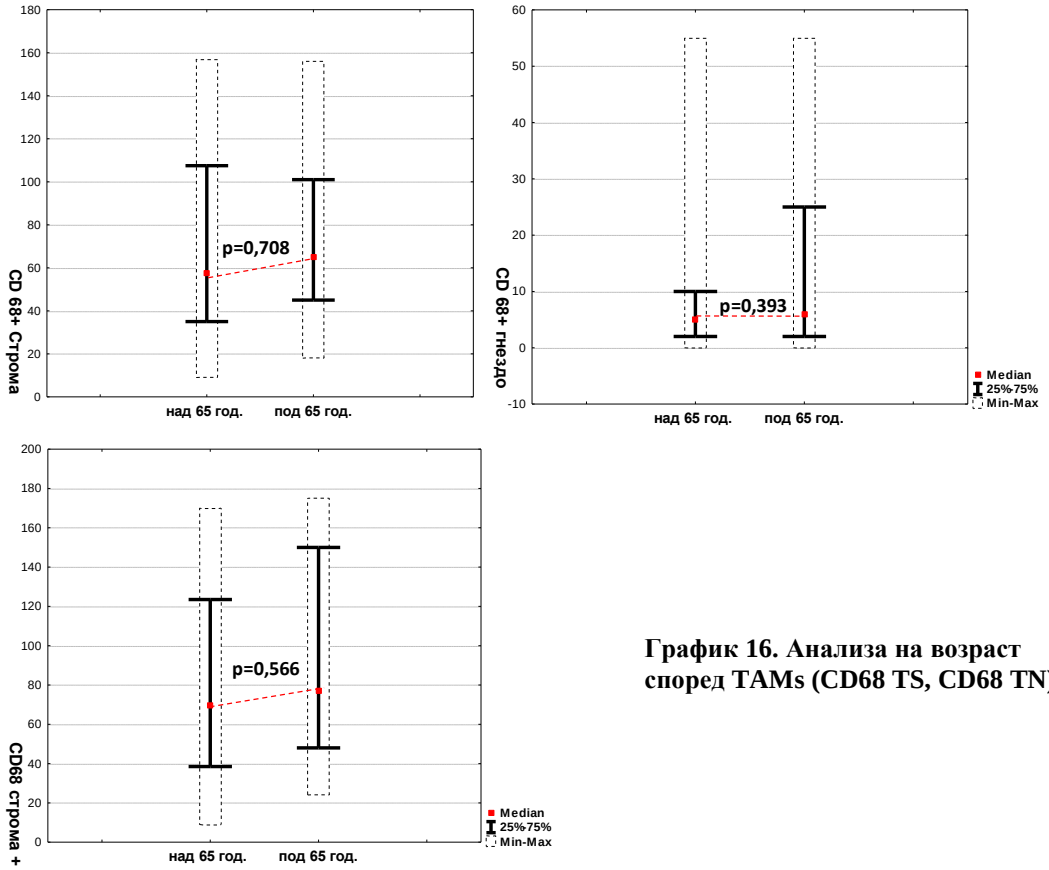


График 16. Анализа на возраст според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

Т-статус и TAMs – просечната и медијалната вредност на TAMs според Т-статусот (T1→T2/ T3→T4) изнесуваат консеквентно во: а) CD68 TS - 71,32±44,87 со IQR=56 (37,5-107,5) vs. 73,88±45,66 со IQR=75 (35-101); и б) CD68 TN - 10,03±13,90 со IQR=5 (1-10) vs. 12,94±15,29 со IQR=7 (2-15).

За p>0,05, немаше сигнификантна разлика помеѓу пациентите со различен Т-статус (T1→T2/ T3→T4) во однос на TAMs во CD68 TS и CD68 TN за консеквентно Mann-Whitney U Test: Z=-0,175; p=0,8606 vs. Z=-1,088; p=0,2763 (Табела 5а и График 17).

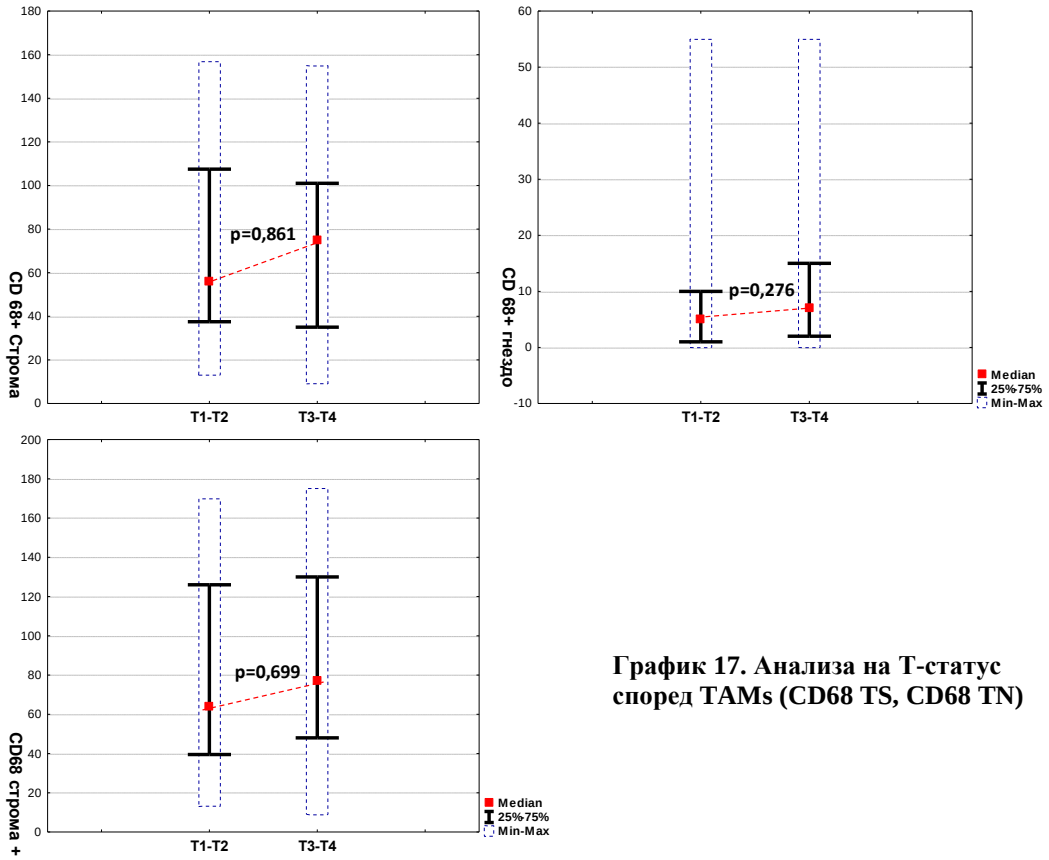


График 17. Анализа на Т-статус според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

N-статус и TAMs – просечната и медијалната вредност на TAMs според N-статусот (N0/ N1→N2) изнесуваат консеквентно во: а) CD68 TS - 68,35±42,42 со IQR=57 (35-101) vs. 81±49,81 со IQR=75 (46-125) и б) CD68 TN - 11±13,25 со IQR=6 (3-13) vs. 11,43±17,06 со IQR=2 (2-15).

За p>0,05, немаше сигнификантна разлика помеѓу пациентите со различен N-статус (N0/ N1→N2) во однос на TAMs во CD68 TS и CD68 TN за консеквентно Mann-Whitney U Test: Z=-0,748; p=0,4546 vs. Z=0,723; p=0,4695 (Табела 5а и График 18).

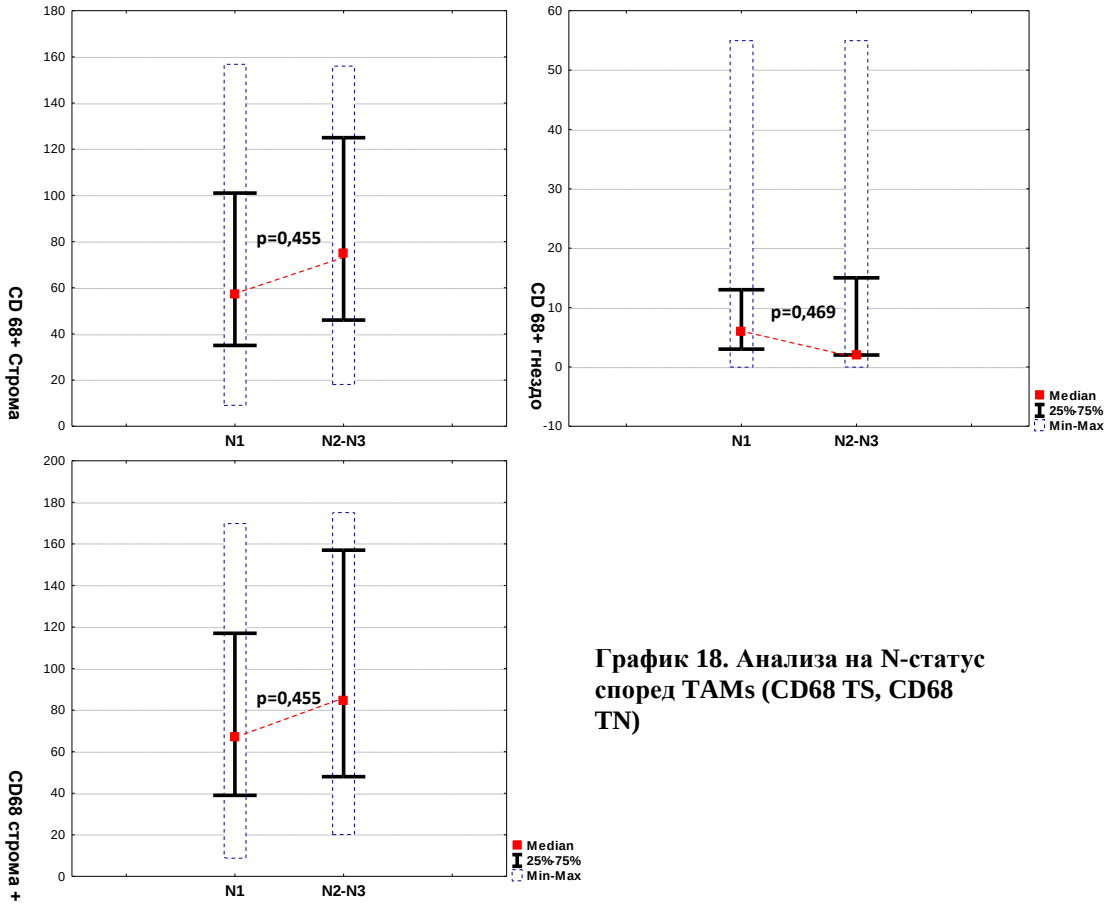


График 18. Анализа на N-статус според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

TNM-статус и TAMs – просечната и медијалната вредност на TAMs според TNM-статусот (TNM1→TNM2/ TNM3→TNM4) изнесуваат консеквентно во: а) CD68 TS - 73,14±43,38 со IQR=57,5 (40-115) vs. 71,48±46,82 со IQR=65 (30-101); и б) CD68 TN - 11,91±15,11 со IQR=5 (2-23) vs. 10,39±13,86 со IQR=6 (2-13).

За p>0,05, немаше сигнификантна разлика помеѓу пациентите со различен TNM-статус (TNM1→TNM2/ TNM3→TNM4) во однос на TAMs во CD68 TS и CD68 TN за

консеквентно Mann-Whitney U Test: Z=0,238; p=0,8115 vs. Z=0,045; p=0,9638. Табеларниот и графичкиот приказ е даден во Табела 5а и График 19.

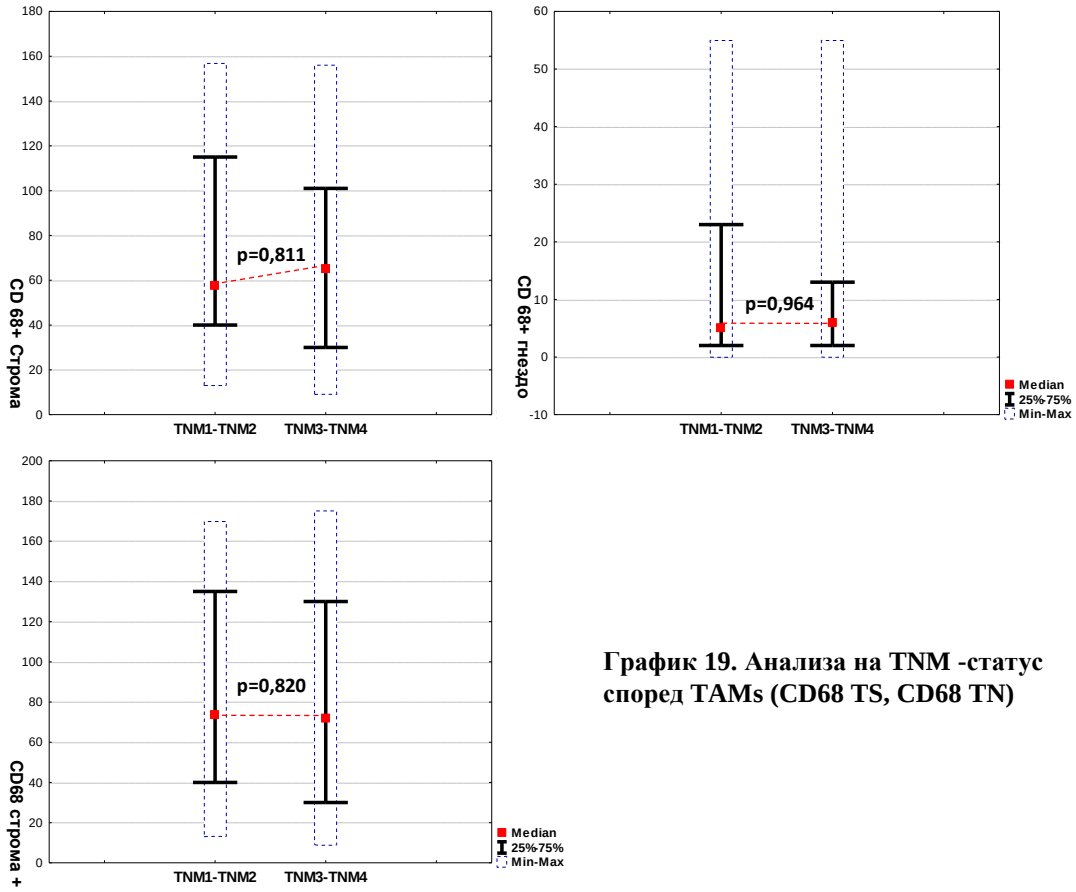


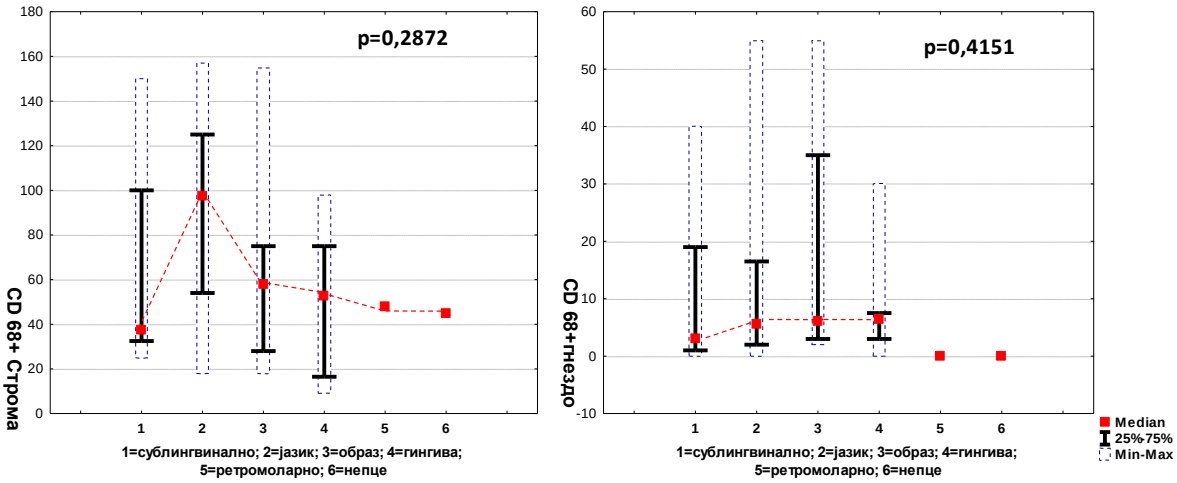
График 19. Анализа на TNM -статус според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

Локализација на OSCC и TAMs – просечната и медијалната вредност на TAMs (CD68 TS/CD68 TN) беше анализирана според 6 локализации на OSCC (Табела 5а и График 20).

Највисока просечна и медијална вредност на TAMs CD68 TS беше согледана на јазик за 90,25±45,06 со IQR=97,5 (54-125), следено со образ за 63,57±45,04 со IQR=58 (28-75) и сублингвинално за 64,37±48,06 со IQR=37,5 (32,5-100). Останатите локации на OSCC како гингива, ретромоларно и непце имаа меѓусебно слични но пониски просечни и медијални вредности за TAMs CD68 TS. За p>0,05, немаше сигнификантна разлика меѓу шестте локации на OSCC во однос на TAMs CD68 TS (Kruskal-Wallis H test: $X^2_{(5)}$=6,201; p=0,2872).

Највисоки просечни и медијални вредности на TAMs CD68 TN беа утврдени на образ за 17,28±20,24 со IQR=6 (3-35), следено со јазик за 11,50±14,29 со IQR=5,5 (2-16,5),

сублингвинално за 10,75±14,59 со IQR=3 (1-19), и гингива за 8,00±9,43 со IQR=6,5 (3-7,5). На ретромоларна локација и непце не беа идентификувани TAMs CD68 TN. За p>0,05, немаше сигнификантна разлика меѓу четирите локации на OSCC во однос на TAMs CD68 TN (Kruskal-Wallis H test: $X^2_{(3)}$=5,007; p=0,4151).



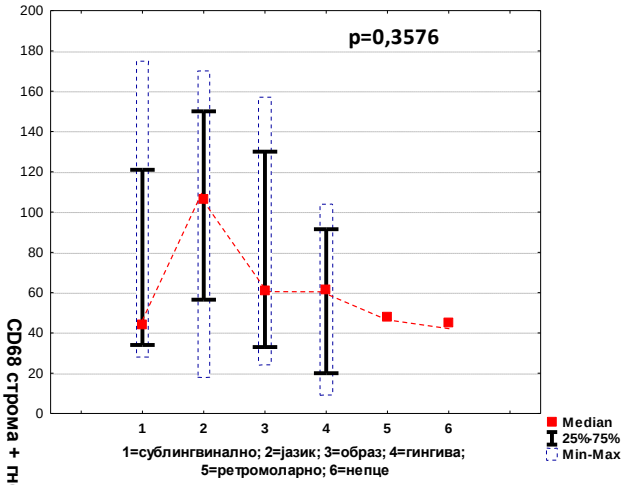


График 20. Анализа на локација според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

За примерокот на пациенти со OSCC, во Табела 5б, прикажана е анализата на дополнителните 5 клиничко-патолошки параметри во однос на TAMs CD68 TS и CD68 TN. (График 21-26).

Табела 5б. Анализа на селектирани клиничко-патолошки параметри според TAMs

Параметри	TAMs					
	CD 68 TS		CD 68 TN		CD 68 TS+TN	
	Mean±SD	Median (IQR)	Mean±SD	Median (IQR)	Mean±SD	Median (IQR)
G статус - Степен на диференцијација на туморски клетки (група)						
G1→ G2 (N=34)	71,03±45,68	56 (35-115)	9,68±11,05	6 (2-13)	80,70±50,96	64 (39-117)
G3 (N=10)	76,30±45,56	70 (45-100)	17,01±22,41	6 (2-35)	93,30±56,02	87 (45-150)
p	Z=-0,434; p=0,6642		Z=-0,462; p=0,6441		Z=-0,574; p=0,5659	
L - Линфатичен продор						
Нема (N=28)	70,43±45,29	56 (35-107)	11,53±14,32	5 (2-24)	81,96±52,35	64 (38,5-128)
Има (N=17)	75,35±44,80	75 (46-101)	10,47±14,79	7 (2-10)	85,82±50,66	77 (48-130)
p	Z=-0,479; p=0,6313		Z=-0,175; p=0,8606		Z=-0,339; p=0,7342	
Pn - Перинеурална инвазија						
Нема (N=37)	73,46±46,93	57 (35-117)	10,70±13,83	5 (2-13)	84,16±53,89	67 (40-140)
Има (N=8)	66,87±34,25	80 (33-95)	13,12±17,44	7,5 (4-12,5)	80,01±38,85	92,5 (44-106)
p	Z=0,133; p=0,8937		Z=-0,994; p=0,3199		Z=0,044; p=0,9645	
R - Позитивна ресекциона ивица						
Нема (N=23)	78,96±53,90	65 (28-125)	10,74±12,92	5 (2-23)	89,69±59,56	100 (30-155)
Има (N=20)	65,85±33,45	57,5 (42,5-87,5)	12,60±16,42	7 (3-11,5)	78,45±42,47	64 (48-102)
Неможна потврда (N=2)	60,01±21,21	60 (45-75)	1,00±1,41	1 (0-2)	61,02±22,63	61 (45-77)
p	$X^2_{(2)}$=0,203; p=0,9036		$X^2_{(2)}$=3,047; p=0,2180		$X^2_{(2)}$=0,371; p=0,8308	
RB - Релапс на болест						
Нема (N=17)	63,53±40,86	55 (35-85)	12,35±14,76	6 (4-15)	75,88±50,19	61 (38-93)
Има (N=27)	74,92±45,37	65 (40-115)	9,85±14,28	3 (0-10)	84,78±50,19	90 (45-130)
p	Z=0,831; p=0,4056		Z=-1,109; p=0,2675		Z=0,602; p=0,5468	
VRB - Вид на релапс на болест						
VRB1 (N=5)	93,60±56,27	117 (53-125)	7,00±9,85	3 (0-10)	100,60±62,25	135 (53,140)
VRB2 (N=18)	60,94±34,95	59 (35-90)	11,55±16,68	3 (0-13)	72,50±43,76	69 (40-104)
VRB3 (N=4)	114,50±53,44	128 (72,5-156)	5,75±2,87	6 (4-7,5)	120,25±54,65	132,5 (76,5-164)
p	$X^2_{(2)}$=4,395; p=0,1111		$X^2_{(2)}$=0,348; p=0,8403		$X^2_{(2)}$=3,659; p=0,1605	

G1-добро; G2-умерено; G3-лошо; G4-недиференцирано (анапластичен карцином)
VRB1-метастази; VRB2-локален/локорегионален рецидив; VRB3-метастази и локален рецидив
X^2=Kruskal-Wallis H test; Z=Mann-Whitney U Test; *сигнификантно за p<0,05

G-статус и TAMs – просечната и медијалната вредност на TAMs според степен на диференцијација односно G-статус (G1→G2/ G3) изнесуваат консеквентно во: а) CD68 TS - 71,03±45,68 со IQR=56 (35-115) vs. 76,30±45,56 со IQR=70 (45-100); и б) CD68 TN - 9,68±11,05со IQR=6 (2-13) vs. 17,01±22,41 со IQR=6 (2-35).

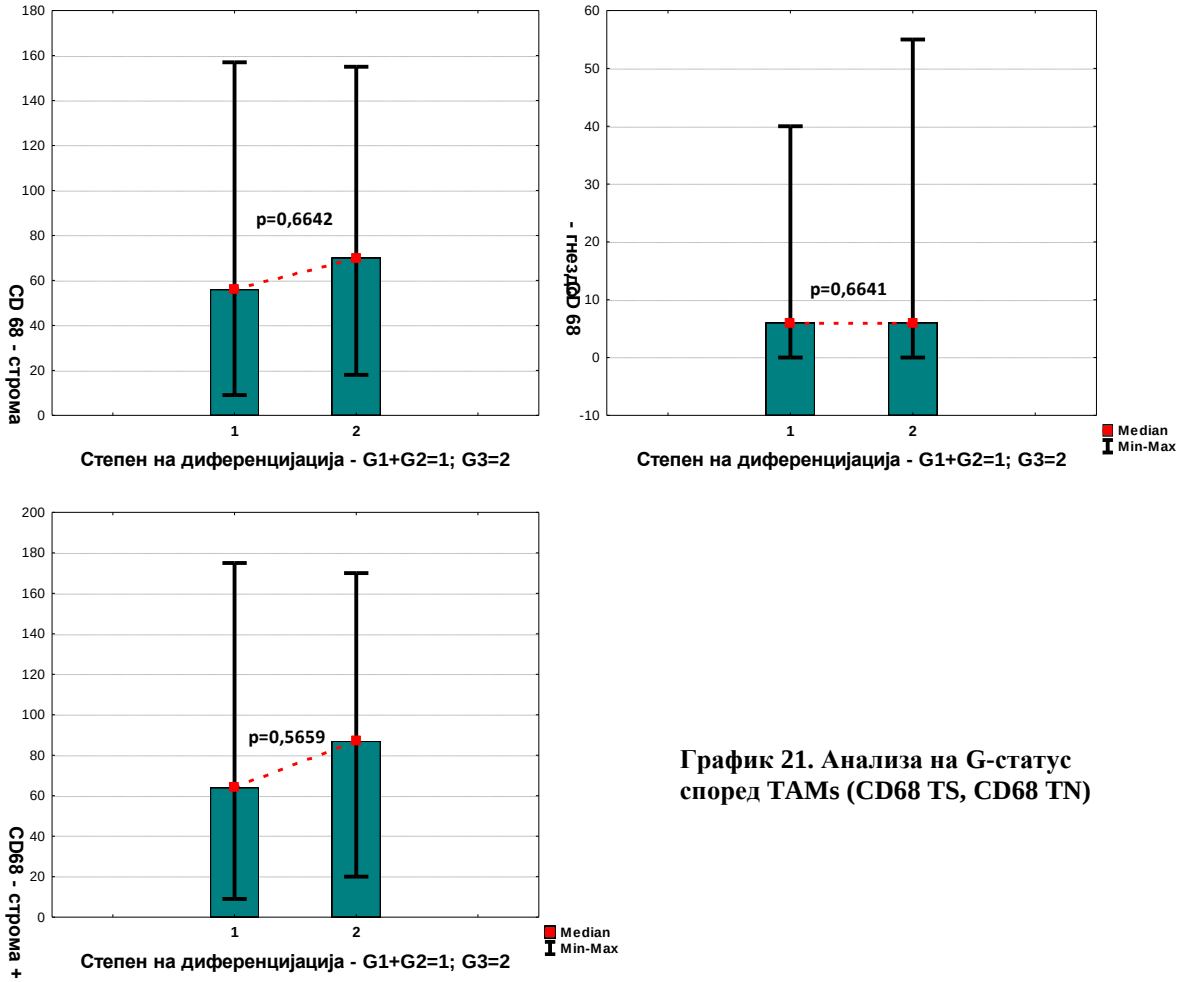


График 21. Анализа на G-статус според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

За p>0,05, немаше сигнификантна разлика помеѓу пациентите со различен G-статусот (G1→G2/ G3) во однос на TAMs во CD68 TS и CD68 TN за консеквентно Mann-Whitney U Test: Z=-0,434; p=0,6642 vs. Z=-0,462; p=0,6441 (Табела 5б и График 21).

Лимфатичен продор (LI) и TAMs – TAMs според лимфатичен продор (нема/има), има просечната и медијалната вредност од консеквентно во: а) CD68 TS - 70,43±45,29 со IQR=56 (35-107) vs. 75,35±44,80 со IQR=75 (46-101); и б) CD68 TN - 11,53±14,32 со IQR=5 (2-24) vs. 10,47±14,79 со IQR=7 (2-10).

За p>0,05, немаше сигнификантна разлика помеѓу пациентите кои немаат/имаат лимфатичен продор во однос на TAMs во CD68 TS и CD68 TN за консеквентно Mann-Whitney U Test: Z=-0,479; p=0,6313 vs. Z=-0,175; p=0,8606. (Табела 5б и График 22).

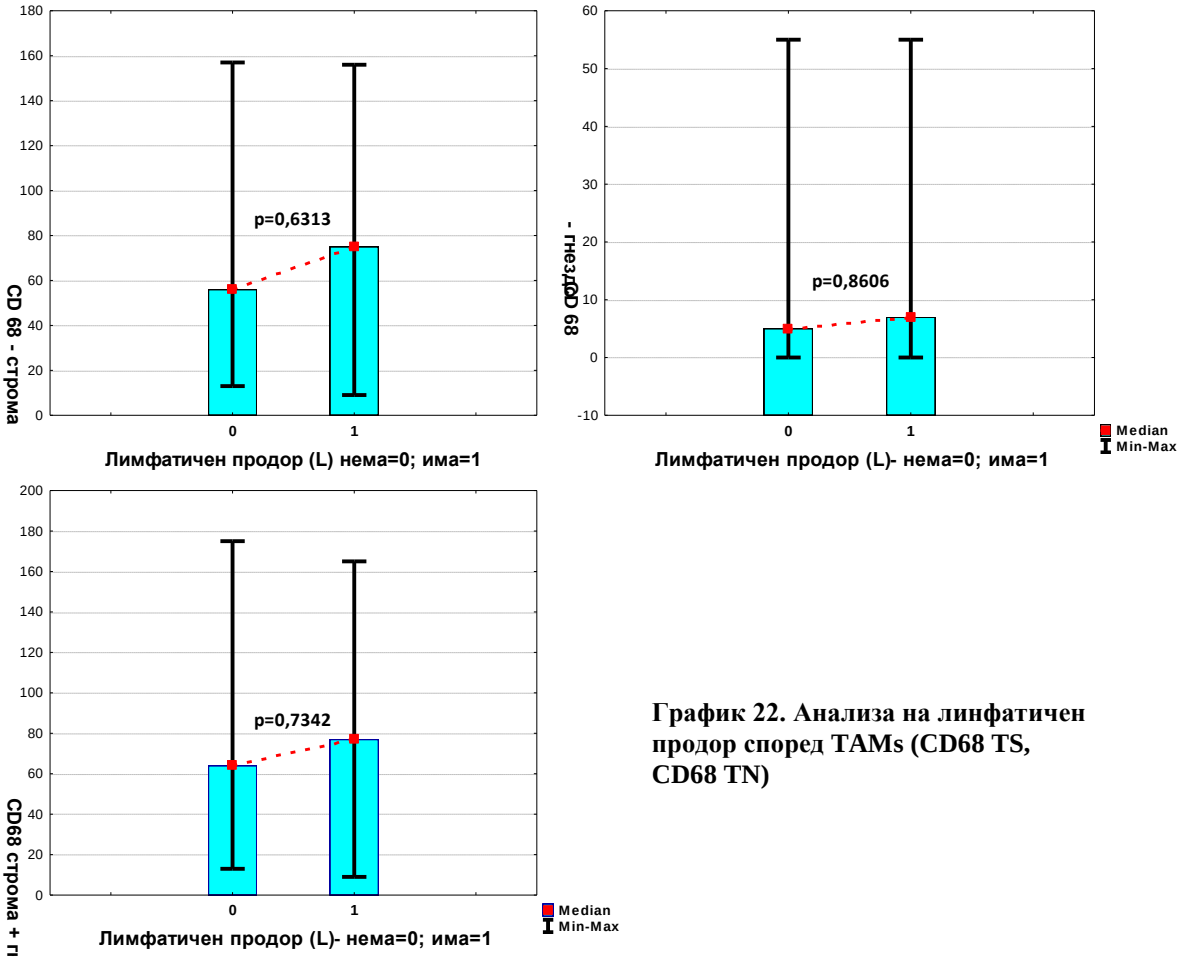


График 22. Анализа на линфатичен продор според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

Перинеурална инвазија (PnI) и TAMs – анализата на TAMs според перинеурална инвазија (нема/ има) укажа на просечната и медијалната вредност од консеквентно во: а) CD68 TS - 73,46±46,93 со IQR=57 (35-117) vs. 66,87±34,25 со IQR=80 (33-95); и б) CD68 TN - 10,70±13,83 со IQR=5 (2-13) vs. 13,12±17,44 со IQR=7,5 (4-12,5).

За p>0,05, не беше утврдена сигнификантна разлика помеѓу пациентите кои немаат/имаат перинеурална инвазија во однос на TAMs во CD68 TS и CD68 TN за консеквентно Mann-Whitney U Test: Z=0,133; p=0,8937 vs. Z=-0,994; p=0,3199 (Табела 5б и График 23).

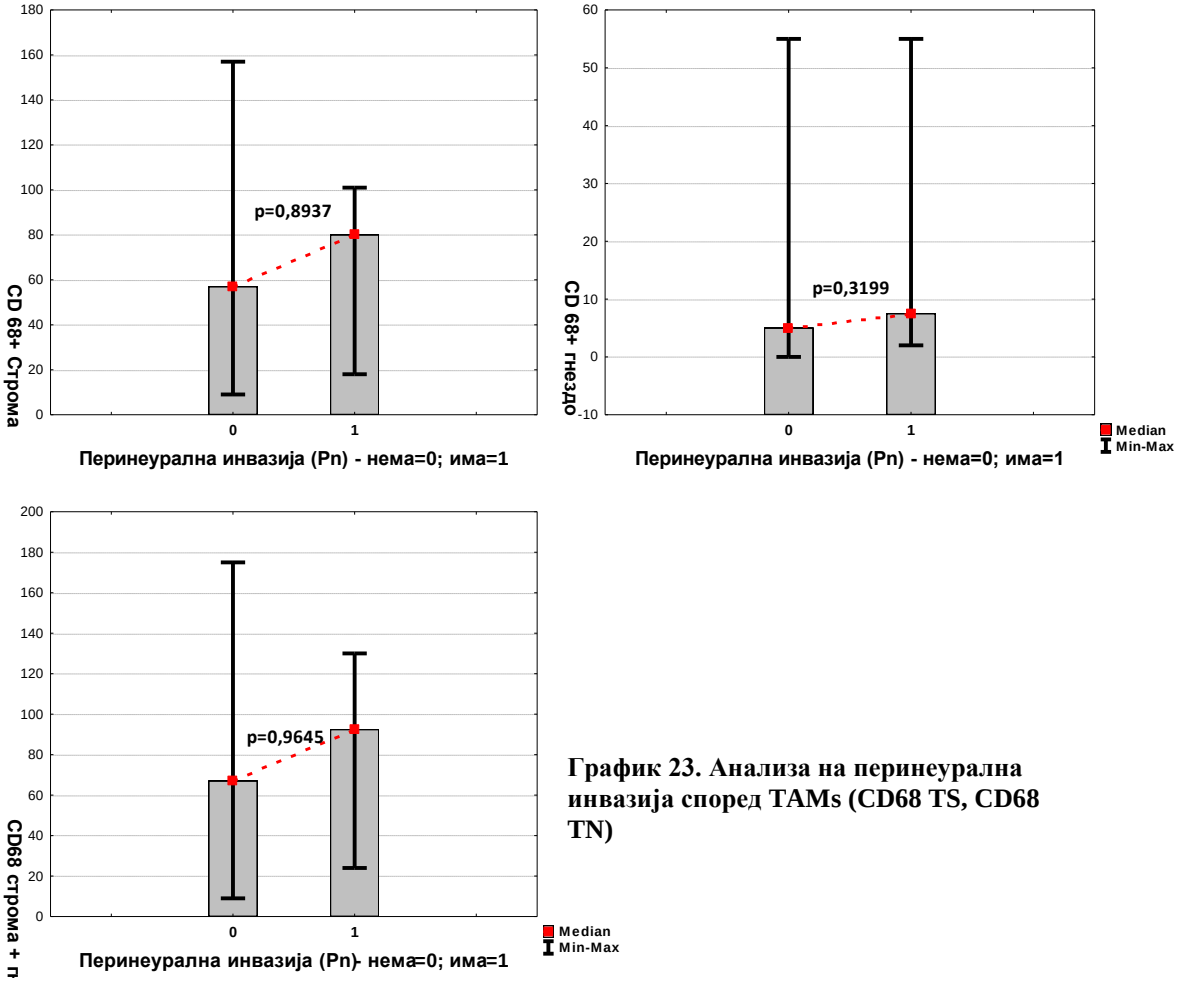


График 23. Анализа на перинеурална инвазија според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

Релапс на болест (RB) и TAMs – анализата на релапс на TAMs според болест (нема/ има), укажа на просечната и медијалната вредност од консеквентно во: а) CD68 TS - 63,53±40,86 со IQR=55 (35-85) vs. 74,92±45,37 со IQR=65 (40-115); и б) CD68 TN - 12,35±14,76 со IQR=6 (4-15) vs. 9,85±14,28 со IQR=3 (0-10).

За p>0,05, немаше сигнификантна разлика помеѓу пациентите кои немаат/имаат релапс на болест во однос на TAMs во CD68 TS и CD68 TN за консеквентно Mann-Whitney U Test: Z=0,831; p=0,4056 vs. Z=-1,109; p=0,2675 (Табела 5б и График 25).

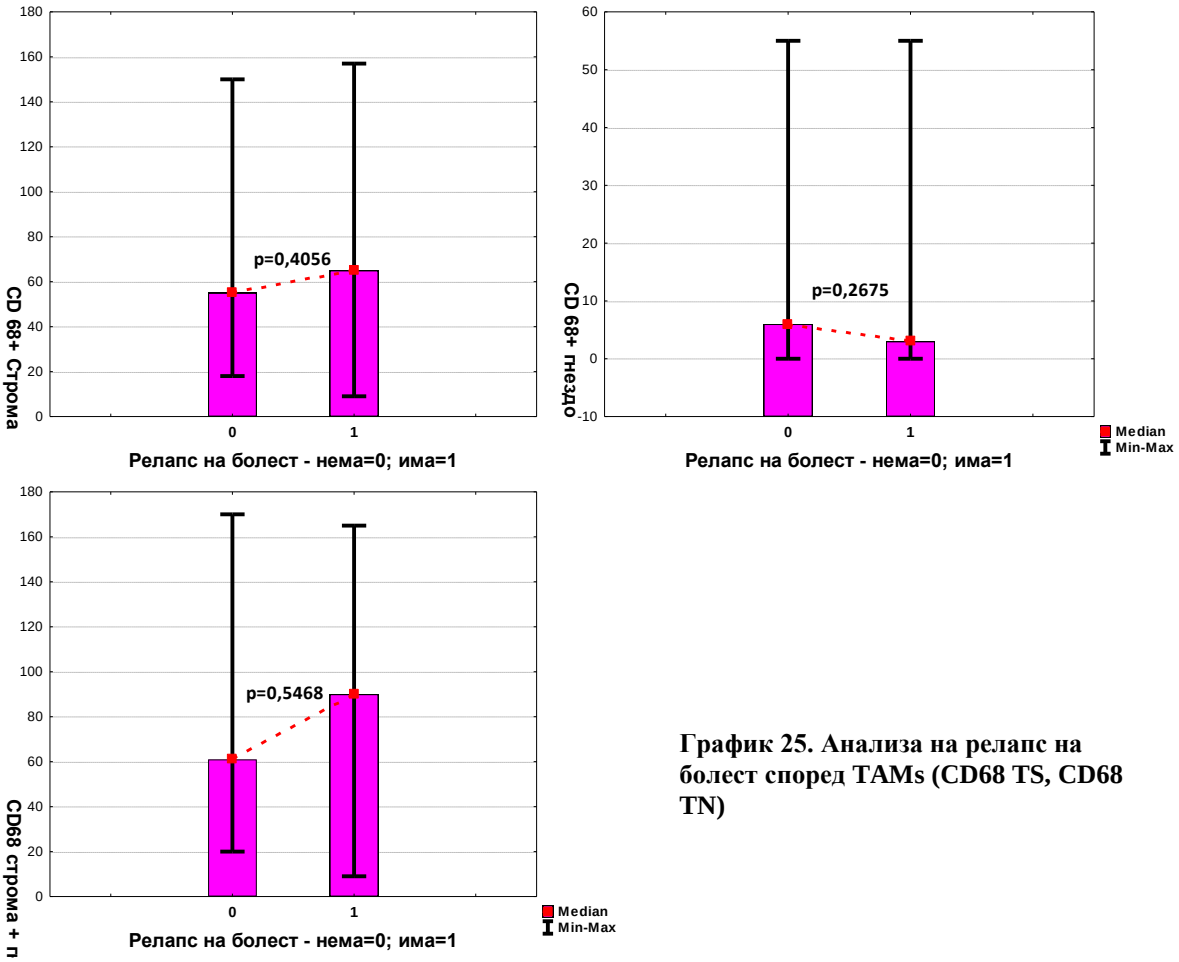


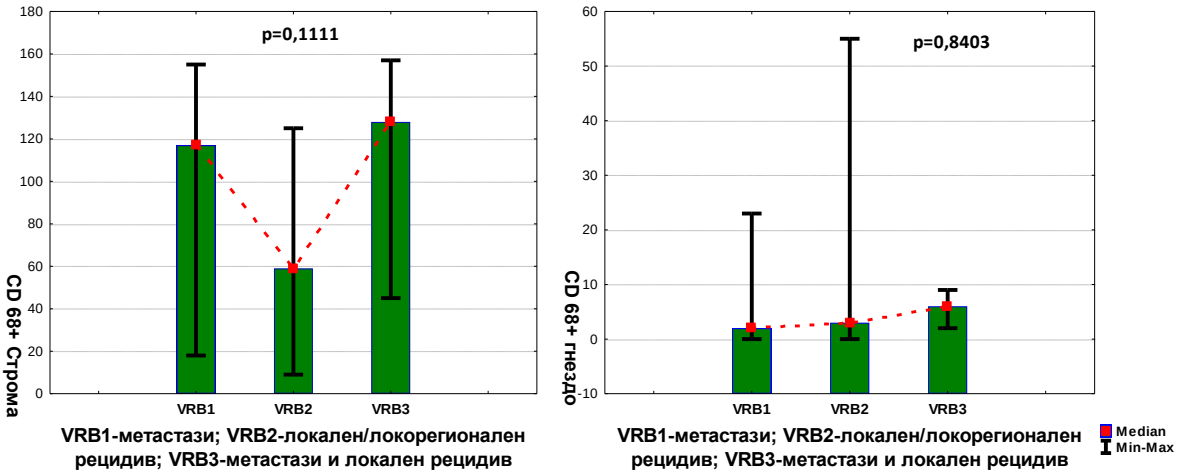
График 25. Анализа на релапс на болест според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

Видови релапс на болест и TAMs – просечната и медијалната вредност на TAMs (CD68 TS/ CD68 TN) беше анализирана според 3 вида на релапс на болест и тоа: VRB1-метастази; VRB2-локален/локорегионален рецидив; VRB3-метастази и локален рецидив) (Табела 5а и График 26).

Највисока просечна и медијална вредност на TAMs CD68 TS беше согледана кај VRB3 за 114,50±53,44 со IQR=128 (72,5-156), следено со VRB1 за 93,60±56,27 со IQR=117 (53-125) и најниска за VRB2 за 60,94±34,95 со IQR=59 (35-90). Сепак, за p>0,05, немаше сигнификантна разлика меѓу 3-те категории на релапс на болест во однос на TAMs CD68 TS (Kruskal-Wallis H test: $X^2_{(2)}$=4,395; p=0,1111).

Највисоки просечни и медијални вредности на TAMs CD68 TN беа утврдени на VRB2 за 11,55±16,68 со IQR=3 (0-13), следено со VRB1 за 7,00±9,85 со IQR=3 (0-10), и VRB3 за 5,75±2,87 со IQR=6 (4-7,5).

За p>0,05, немаше сигнификантна разлика меѓу 3-те категории на релапс на болест во однос на TAMs CD68 TN (Kruskal-Wallis H test: $X^2_{(2)}$=0,348; p=0,8403).



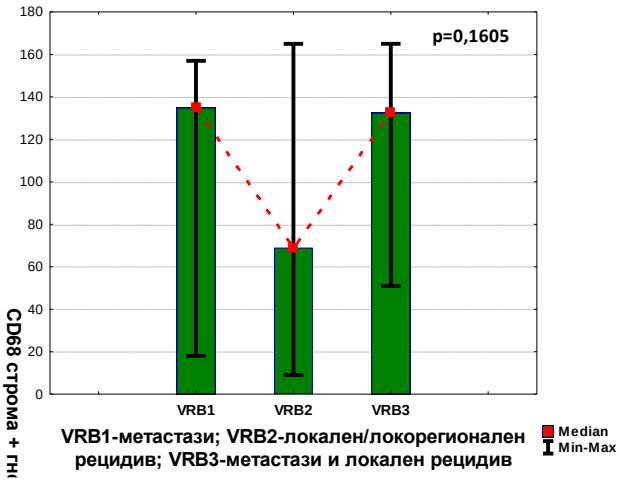


График 26. Анализа на видови релапс на болест според TAMs (CD68 TS, CD68 TN)

5. 2. Корелација на CAFs и TAMs со селектирани параметри

Кај пациентите со OSCC беше направена анализа на поврзаноста на CAFs α-SMA односно TAMs CD68 TS и CD68 TN со следни параметри како: 1) пол; 2) возраст; 3) T-статус (големина на туморска лезија); 4) N–статус (нодален статус т.е. метастази во регионални линфни јазли); 5) TNM - клинички стадиум; 7) G - степен на диференцијација на туморски клетки; 7) LI - лимфатичен продор; 8) PnI - перинеурална инвазија; 10) релапс на болест; 11) вид на релапс на болест; 12) број на локални рецидиви; и 13) број на метастази по прва операција.

Анализата со непараметарска корелација (Spearman Rank order coreallations) помеѓу CAFs α-SMA, TAMs CD68 TS и CD68 TN и 13-те селектирани параметри укажа дека (Табела 6 и График 27):

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и полот** - за $p<0,05$, помеѓу CAFs α-SMA и полот на пациентите (мажи/ жени) беше регистрирана сигнификантна линеарна негативна умерена корелација. Присуството на CAFs α-SMA сигнификантно се зголемуваше кај пациентите со OSCC од машки пол ($R_{(45)}=-0,323$; $p=0,0299$). За $p>0,05$, постоеше несигнификантна линеарна негативна кореалација на полот со TAMs CD68 TS ($R_{(45)}=-0,323$; $p=0,0299$) – TAMs CD68 TS несигнификантно растеше кај машкиот пол. Дополнително за $p>0,05$, беше утврдена несигнификантна линеарна, позитивна корелација помеѓу полот на пациентите со OSCC и TAMs CD68 TN ($R_{(45)}= 0,056$; $p=0,7137$), и TAMs CD68 TS+TN ($R_{(45)}= 0,010$; $p=0,9455$) - CD68 TN и CD68 TS+TN несигнификантно се зголемуваа кај пациентите од женски пол (Табела 6 и График 27).

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и возраст** - за $p>0,05$, постоеше несигнификантна линеарна негативна кореалација помеѓу возраста на пациентите и CAFs α-SMA ($R_{(45)}=-0,129$; $p=0,3981$), TAMs CD68 TS ($R_{(45)}=-0,058$; $p=0,7038$, TAMs CD68 TN ($R_{(45)}=-0,131$; $p=0,3896$), и TAMs CD68 TS+TN ($R_{(45)}=-0,088$; $p=0,5643$) - CD68. CAFs и TAMs несигнификантно се зголемуваа кај помладите пациенти со OSCC (Табела 6 и График 27).

Табела 6. Корелација на CAFs и TAMs со селектирани параметри

Параметри	Spearman Rank order coreallations (R)			
	CAFs	TAMs CD68 TS	TAMs CD68 TN	TAMs CD68 TS+TN
Пол (мажи / жени)	R (45)=-0,323; p=0,0299*	R (45)=-0,042; p=0,7844	R (45)=0,056; p=0,7137	R (45)=0,010; p=0,9455
Возраст (години)	R (45)=-0,129; p=0,3981	R (45)=-0,058; p=0,7038	R (45)=-0,131; p=0,3896	R (45)=-0,088; p=0,5643
T – статус (големина на туморска лезија)	R (45)=0,546; p=0,0001*	R (45)=0,026; p=0,8629	R (45)=0,165; p=0,2780	R (45)=0,058; p=0,2979
N – статус (нодален статус)	R (45)=0,159; p=0,2979	R (45)=0,113; p=0,4607	R (45)=-0,109; p=0,4731	R (45)=0,113; p=0,4608
TNM – статус (клинички стадиум)	R (45)=0,558; p=0,00007*	R (45)=-0,036; p=0,8146	R (45)=0,007; p=0,9642	R (45)=0,034; p=0,8233
G - статус (степен на диференцијација)	R (44)=0,187; p=0,2235	R (44)=0,066; p=0,6692	R (44)=0,071; p=0,6475	R (44)=0,087; p=0,5719
L - Линфатичен продор (нема/ има)	R (45)=0,279; p=0,0638	R (45)=0,072; p=0,6365	R (45)=0,027; p=0,8621	R (45)=0,051; p=0,7384
Pn - Перинеурална инвазија (нема/ има)	R (45)=0,099; p=0,5149	R (45)=-0,020; p=0,8965	R (45)=0,151; p=0,3226	R (45)=-0,006; p=0,9651
R - Позитивна ресекциона ивица (нема/ има)	R (45)=0,126; p=0,4093	R (45)=-0,067; p=0,6591	R (45)=0,006; p=0,9678	R (45)=-0,079; p=0,6060
RB - Релапс на болест (нема/ има)	R (44)=-0,114; p=0,4589	R (44)=0,127; p=0,4117	R (44)=-0,170; p=0,2694	R (44)=0,092; p=0,5529
VRB - Вид на релапс на болест	R (27)=0,088; p=0,6618	R (27)=0,075; p=0,7090	R (27)=0,113; p=0,5737	R (27)=0,072; p=0,7219
Број на локални рецидиви	R (44)=-0,021; p=0,8898	R (44)=0,055; p=0,7235	R (44)=-0,1179; p=0,4461	R (44)=0,040; p=0,7962
Број на метастази по прва операција	R (44)=-0,244; p=0,1101	R (44)=0,327; p=0,0304*	R (44)=-0,105; p=0,4968	R (44)=0,276; p=0,0701

TS=TS; TN=гнездо; TS+TN=строма + гнездо
T- статус (големина на туморска лезија): T1= ≤ 2cm во најголем дијаметар; T2= >2 - ≤4cm; T3= >4cm; и T4= >4cm
N- статус (метастази во нодус): N0=нема зголемени линфонодули; N1=ипсилатерални, <3cm; N2=солитарни 3-6cm/ мултипли <6cm ипсилатерални/ контралатерални или билатерални <6cm; и N3=метастатски депозит >6cm
TNM - клинички стадиум на болеста **(T1→T4)**
G1-добро; G2-умерено; G3-лошо; G4-недиференцирано (анапластичен карцином)
VRB (вид на релапс): VRB1-метастази; VRB2-локален/локорегионален рецидив; VRB3-метастази и локален рецидив
*сигнификантно за p<0,05

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и T-статус** - за p<0,05, помеѓу CAFs α-SMA и T-статусот на пациентите постоеше сигнификантна линеарна позитивна јака корелација. Присуството на CAFs α-SMA сигнификантно се зголемуваше со зголемувањето на туморската лезија ($R_{(45)}$=0,546; p=0,0001). За p>0,05, постоеше несигнификантна линеарна позитивна кореалација на T-статусот со TAMs CD68 TS ($R_{(45)}$=0,026; p=0,8629), CD68 TN ($R_{(45)}$=0,165; p=0,2780), и TAMs CD68 TS+TN

($R_{(45)}$=0,058; p=0,2979) – TAMs CD68 (TS/TN/TS+TN) несигнификантно се зголемуваше со растењето на туморската лезија (Табела 6 и График 27).

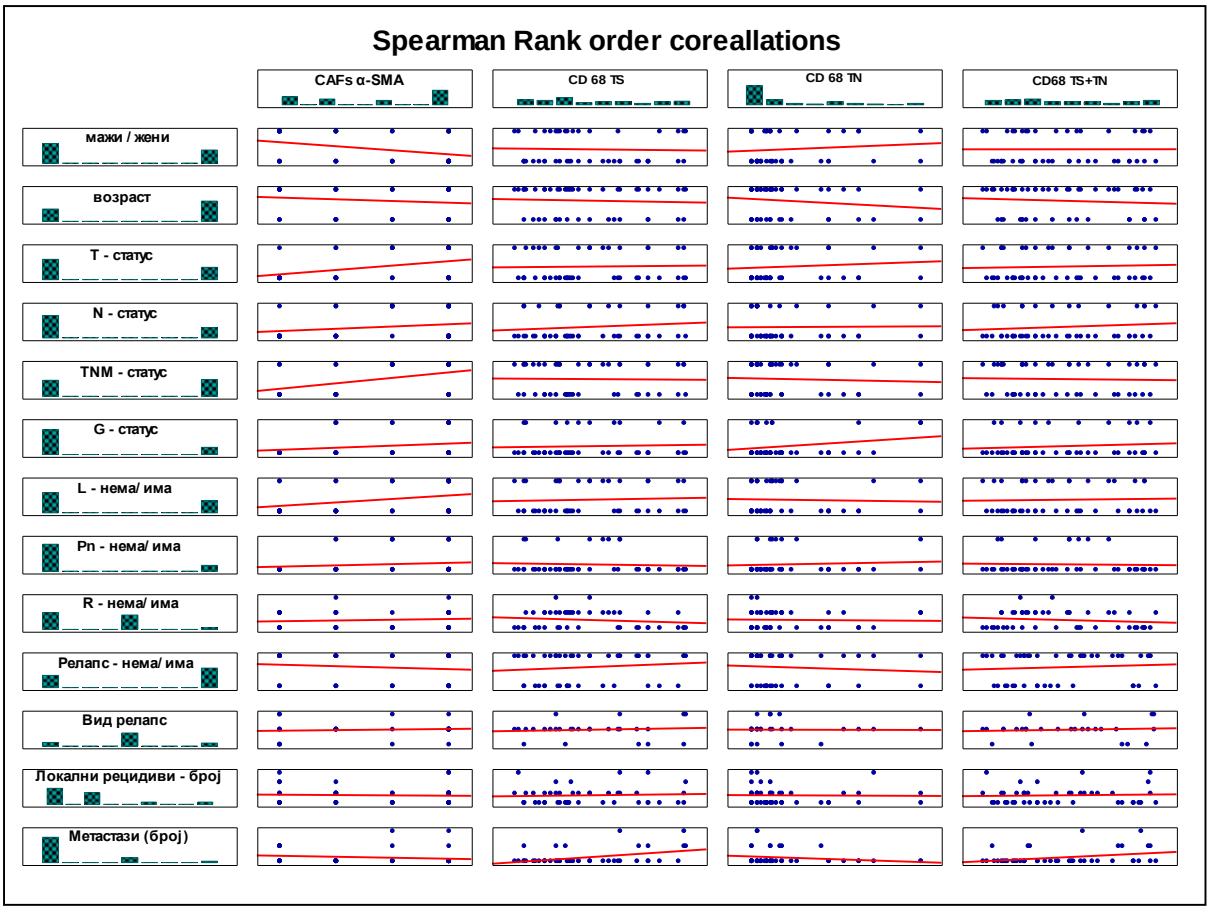
- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и N-статусот** - за p>0,05, постоеше несигнификантна линеарна позитивна кореалација помеѓу N-статусот на пациентите и CAFs α-SMA ($R_{(45)}$=0,159; p=0,2979), TAMs CD68 TS ($R_{(45)}$=0,113; p=0,4607, и TAMs CD68 TS+TN ($R_{(45)}$=0,113; p=0,4608) – тие несигнификантно се зголемуваа со влошувањето на нодалниот статус на пациентите. Помеѓу N-статусот и TAMs CD68 TN, за p>0,05, беше согледана несигнификантна негативна линеарна корелација ($R_{(45)}$=-0,109; p=0,4731) – влошувањето на N-статусот несигнификантно ги намалуваше TAMs CD68 TN (Табела 6 и График 27).

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и TNM статус** - за p<0,05, помеѓу CAFs α-SMA и TNM-статусот на пациентите постоеше сигнификантна линеарна позитивна јака корелација - присуството на CAFs α-SMA сигнификантно се зголемуваше со влошувањето на TNM-статусот ($R_{(45)}$=0,558; p=0,00007). За p>0,05, помеѓу TNM-статусот и: а) TAMs CD68 TS постоеше несигнификантна линеарна негативна кореалација ($R_{(45)}$)=-0,036; p=0,8146); додека за б) TAMs CD68 TN ($R_{(45)}$=0,007; p=0,9642), и TAMs CD68 TS+TN ($R_{(45)}$=0,034; p=0,8233 беше утврдена несигнификантна линеарна позитивна корелација (Табела 6 и График 27).

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и G статус** - за p>0,05, постоеше несигнификантна линеарна позитивна кореалација помеѓу G-статусот на пациентите и CAFs α-SMA ($R_{(44)}$=0,187; p=0,2235), TAMs CD68 TS ($R_{(44)}$=0,066; p=0,6692, TAMs CD68 TN ($R_{(44)}$=0,071; p=0,6475), и TAMs CD68 TS+TN ($R_{(44)}$=0,087; p=0,5719) – тие несигнификантно се зголемуваа со влошување на степенот на диференцијација на туморските клетки (Табела 6 и График 27).

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и лимфатичен продор** - кај пациентите со OSCC, за p>0,05, постоеше несигнификантна линеарна позитивна кореалација помеѓу линфатичниот продор и: CAFs α-SMA ($R_{(45)}$=0,279; p=0,0638), TAMs CD68 TS ($R_{(45)}$= 0,072; p=0,6365, TAMs CD68 TN ($R_{(45)}$=0,027; p=0,8621), и TAMs CD68 TS+TN ($R_{(45)}$=0,051; p=0,7384) – тие несигнификантно се зголемуваа со постоењето на линфатичен продор (Табела 6 и График 27).

График 27. Корелација на CAFs и TAMs со селектирани параметри



- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и перинеурална инвазија** - за p>0,05, помеѓу CAFs α-SMA односно TAMs CD68 TN и Pn постоеше несигнификантна линеарна позитивна корелација за консеквнетно ($R_{(45)}$=0,099; p=0,5149) vs. ($R_{(45)}$=0,151; p=0,3226) – тие несигнификантно растеа при присуство на перинеурална инвазија. Помеѓу TAMs CD68 TS односно TAMs CD68 TS+TN и Pn, за p>0,05, постоеше несигнификантна линеарна негативна корелација за консеквнетно ($R_{(45)}$=-0,020; p=0,8965) vs. ($R_{(45)}$=-0,006; p=0,9651) – тие несигнификантно растеа при отсуство на перинеурална инвазија (Табела 6 и График 27).

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и релапс на болест** - за p>0,05, помеѓу CAFs α-SMA односно TAMs CD68 TN и R постоеше несигнификантна линеарна негативна корелација за консеквнетно ($R_{(44)}$=-0,114; p=0,4589) vs. ($R_{(44)}$=-0,170; p=0,2694) – тие несигнификантно растеа при отсуство на релапс на болест. Помеѓу TAMs CD68 TS односно TAMs CD68 TS+TN и релапс на болест, за p>0,05, постоеше несигнификантна линеарна позитивна корелација за консеквнетно ($R_{(44)}$=0,127;

p=0,4117) vs. ($R_{(44)}$= 0,092; p=0,5529) – тие несигнификантно растеа при релапс на болест (Табела 6 и График 27).

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и вид на релапс на болест -** за p>0,05, постоеше несигнификантна линеарна позитивна кореалација помеѓу видот на релапс на болест кај пациентите со OSCC и, CAFs α-SMA ($R_{(27)}$= 0,088; p=0,6618), TAMs CD68 TS ($R_{(27)}$=0,075; p=0,7090, TAMs CD68 TN ($R_{(27)}$=0,113; p=0,5737), и TAMs CD68 TS+TN ($R_{(27)}$= 0,072; p=0,7219) – тие несигнификантно се зголемуваа со видот на релапс на болеста (метастази; локален/локорегионален рецидив; метастази и локален рецидив) (Табела 6 и График 27).

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и број на локални рецидиви -** за p>0,05, помеѓу CAFs α-SMA односно TAMs CD68 TN и бројот на локални рецидиви постоеше несигнификантна линеарна негативна корелација за консеквнетно ($R_{(44)}$=-0,021; p=0,8898) vs. ($R_{(44)}$=-0,1179; p=0,4461) – тие несигнификантно растеа со намалување на бројот на локални рецидви (Табела 6 и График 27). Помеѓу TAMs CD68 TS односно TAMs CD68 TS+TN и бројот на локални метастази, за p>0,05, постоеше несигнификантна линеарна позитивна корелација за консеквнетно ($R_{(44)}$=0,055; p=0,7235) vs. ($R_{(44)}$=0,040; p=0,7962) – тие несигнификантно растеа при растењето на бројот на локални рецидиви.

- **Корелација помеѓу CAFs/ TAMs и број на метастази по прва операција -** за p>0,05, помеѓу CAFs α-SMA односно TAMs CD68 TN и бројот на локални метастази по прва операција постоеше несигнификантна линеарна негативна корелација за консеквнетно ($R_{(44)}$=-0,244; p=0,1101) vs. ($R_{(44)}$=-0,105; p=0,4968) – тие несигнификантно растеа со намалување на бројот на метастази по прва операција. За p<0,05, помеѓу TAMs CD68 TS и број на метастази по прва операција постоеше умерена сигнификантна линеарна позитивна корелација за ($R_{(44)}$=0,327; p=0,0304) – со зголемувањето на бројот на метастази по прва операција согнификантно се зголемуваше и TAMs CD68 TS. За p>0,05, помеѓу TAMs CD68 TS+TN, и бројот на локални метастази по прва операција беше утврдена несигнификантна линеарна позитивна корелација ($R_{(44)}$=0,276; p=0,0701) – со растењето на бројот на метастази по прва операција сигнификантно се зголемуваше и бројот на TAMs CD68 TS+TN (Табела 6 и График 27).

5. 3. Меѓусебна корелација на CAFs и TAMs

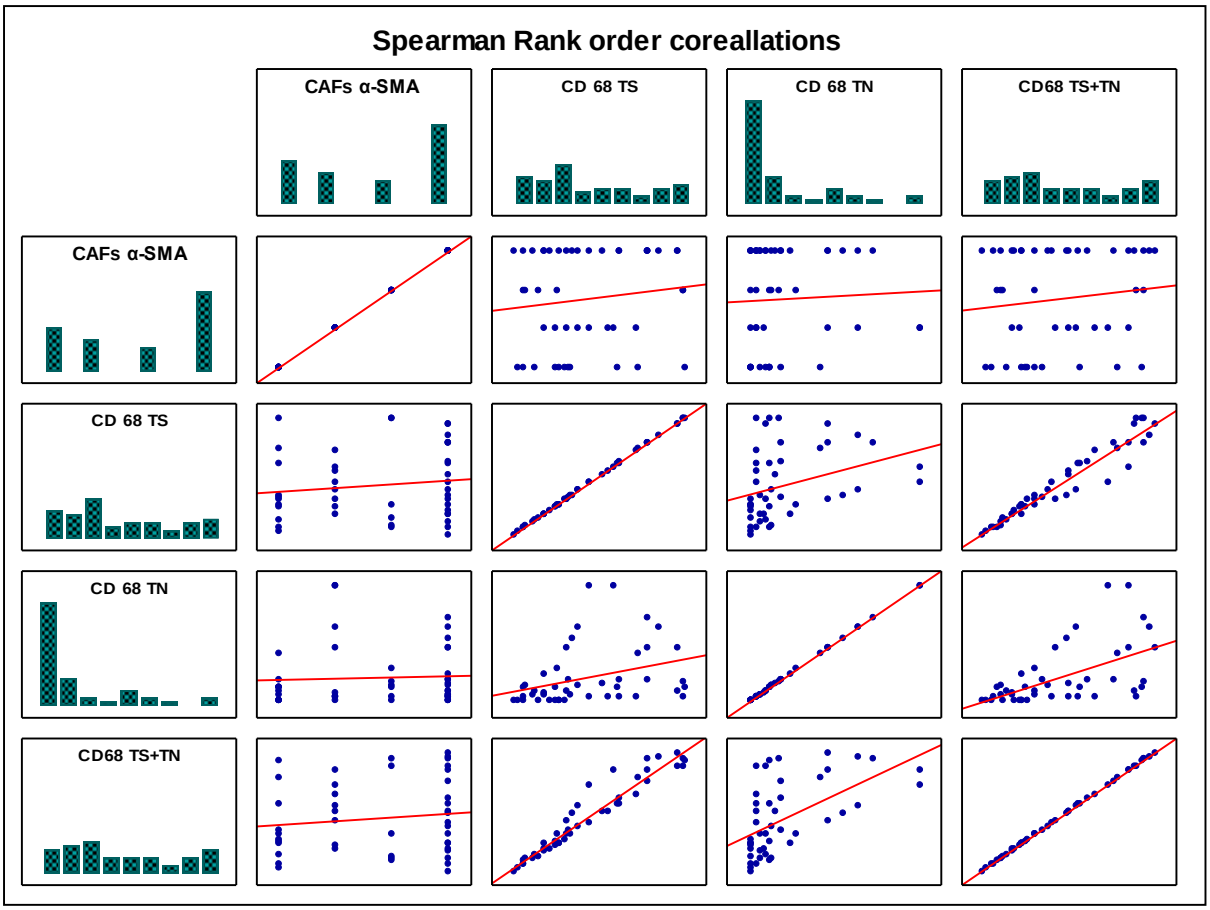
Во рамките на истражувањето беше направена анализа (Spearman Rank order coreallations) на меѓусебната поврзаност на карцином асоцирачките фибробласти - CAFs α-SMA, и тумор асоцирачките макрофаги - TAMs CD68 TS и CD68 TN. (Табела 7 и График 28).

Табела 7. Корелација помеѓу експресијата на CAFs и TAMs маркерите

Маркери	Spearman Rank order coreallations (R)			
	CAFs	TAMs CD68 TS	TAMs CD68 TN	TAMs CD68 TS+TN
CAFs	-	R (45)=0,122; p=0,4247	R (45)=0,134; p=0,3801	R (45)=0,116; p=0,4461
TAMs CD68 TS	R (45)=0,122; p=0,4247	-	R (45)=0,469; p=0,0011*	R (45)=0,978; p=0,00001*
TAMs CD68 TN	R (45)=0,134; p=0,3801	R (45)=0,469; p=0,0011*	-	R (45)=0,607; p=0,00001*
TAMs CD68 TS+TN	R (45)=0,116; p=0,4461	R (45)=0,978; p=0,00001*	R (45)=0,607; p=0,00001*	-
TS=строма; TN=гнездо; TS+TN=строма + гнездо *сигнификантно за p<0,05				

За p<0,05, анализата со непараметарска корелација укажа дека помеѓу TAMs CD68 TS и CD68 TN постои сигнификантна линеарна позитивна умерена корелација ($R_{(45)}$=0,469; p=0,0011). Со зголемувањето на експресијата на TAMs CD68 TS сигнификантно се зголемуваше и експресијата на CD68 TN.

График 28. Корелација помеѓу експресијата на CAFs и TAMs маркерите



За p>0,05, не беше утврдена сигнификантна линеарна корелација помеѓу CAFs α-SMA, и TAMs CD68 TS ($R_{(45)}$= 0,122; p=0,4247), односно CAFs α-SMA и CD68 TN ($R_{(45)}$= 0,134; p=0,3801). (Табела 7 и График 28).

5. 4. Преживување од OSCC и поврзаност на CAFs, TAMs и други параметри со смртен исход

Во овој дел од истражувањето направивме анализа на вкупното преживување од OSCC. Дополнително ја анализиравме поврзаноста на карцином асоцирачките фибробласти - CAFs α-SMA, и тумор асоцирачките макрофаги - TAMs CD68 TS и CD68 TN како и на други клиничко-патолошки параметри со смртниот исход кај пациентите со OSCC.

5. 4. 1. Вкупно преживување од OSCC

Анализата на вкупното преживување на целиот примерок од 45 (100%) пациенти со OSCC укажа дека, кај 22 (48,89%) имаше смртен исход и тоа помеѓу 2 - 42 месец од дијагностицирањето (најголема смртност помеѓу 2-12 месец). Кај 23 (51,11%) од пациентите со OSCC преживувањето беше подолго од 42 месеци (График 29).

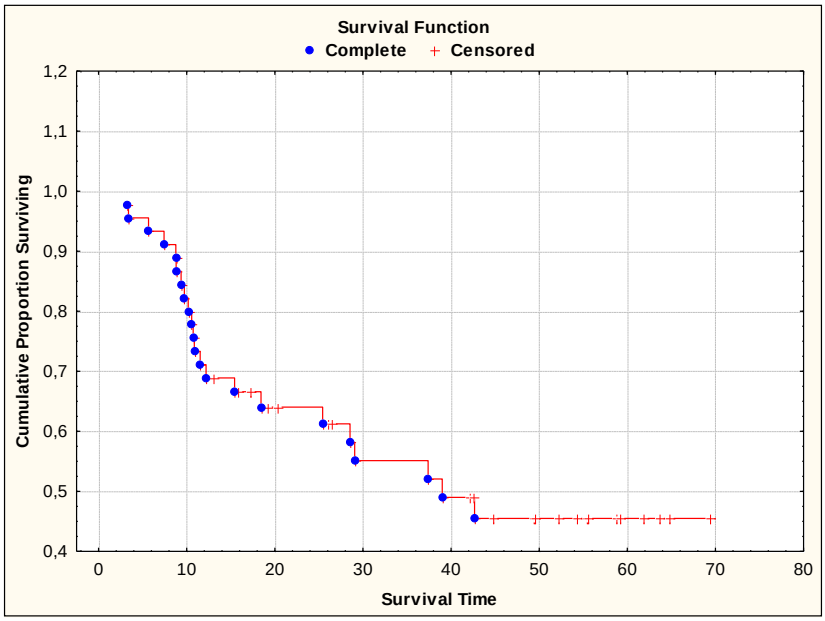


График 29. Kaplan-Meier крива на вкупно преживување од OCSS

Проценката за просечното време на преживување на пациентите со OSCC од примерокот, изнесуваше 41,298 [95% CI (33,04 – 49,55)] месеци. Кај 25% односно кај 50% од овие пациенти преживувањето беше пократко од консеквентно 10,77 vs. 38,48 месеци (Табела 8 и График 29),

Табела 8. Просек и медијана на вкупно преживување од OSCC, како и преживување според CAFs групиран во две и во четири категории

CAFs	[1]Просек (Mean)				Медијана (Median)			
	Проценка (месец) Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Проценка (месец) Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
CAFs - 2 категории								
CAFs нема	39,364	6,017	27,571	51,157	39,000	7,707	23,895	54,105
CAFs има	42,090	5,160	31,978	52,203	.	.	.	.
Вкупно	41,298	4,213	33,040	49,555	39,000	-	-	-
CAFs - 4 категории								
CAFs 0	39,364	6,017	27,571	51,157	39,000	7,707	23,895	54,105
CAFs1	40,750	10,082	20,990	60,510	29,000	.	.	.
CAFs2	33,167	10,600	12,391	53,942	12,000	.	.	.
CAFs3	42,586	6,509	29,828	55,345	.	.	.	.

[1]Проценката е лимитирана на најдолгото прикажано време на преживување
CAFs0 = нема; CAFs1 =ретко; CAFs2 = фолано; CAFs3 = обилно

5. 4. 2. Преживување од OSCC и CAFs

Беше направена анализа на преживување од OSCC според CAFs α-SMA статусот на пациентите. CAFs α-SMA статусот беше анализиран во две категории и тоа нема/ има (CAFs 0/ CAFS 1→CAFs 3) како и во 4 категории (CAFs 0→CAFs 3).

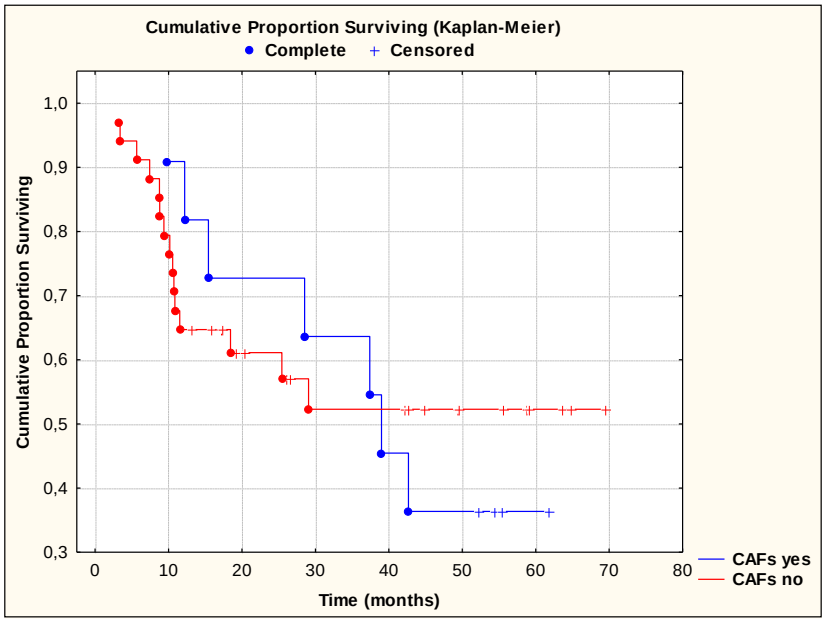


График 30. Kaplan-Meier крива на преживување од OCSS според CAFs (нема/има)

Смртен исход имаше кај 7 (63,64%) од групата “CAFs нема“ и кај 15 (44,12%) од групата “CAFs има“. Проценката на времето на преживување според CAFs нема/ има, укажа дека тоа изнесува консеквентно 39,36 [95% CI (27,57 – 51,16)] vs. 42,01 [95% CI (31,98 – 52,20)] месеци (Табела 8 и График 30). За p>0,05, споредбата помеѓу просечното време на преживување во однос на CAFs нема/ има, не укажа на сигнификантна разлика (Log Rank - Mantel-Cox: Chi-Square = 0,026; df=1; p=0,872).

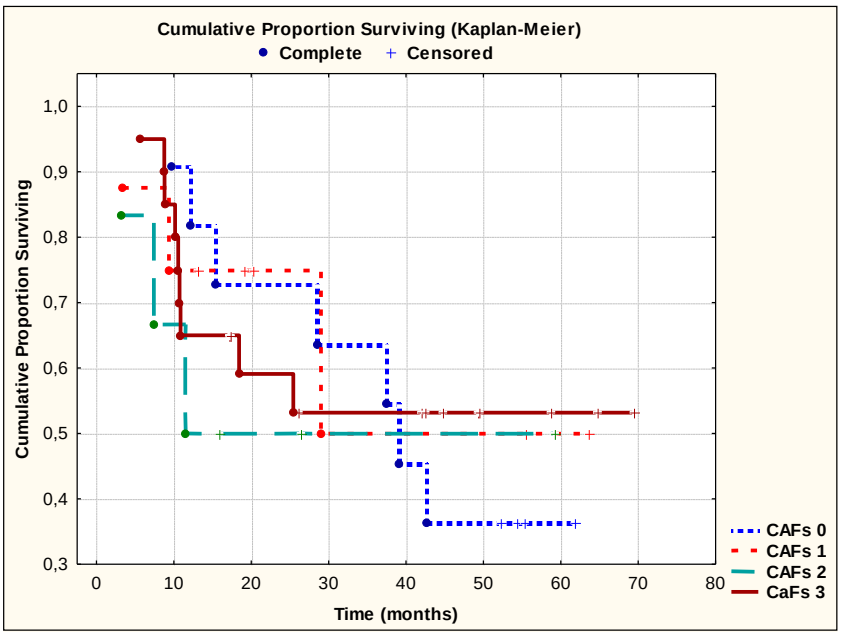


График 31. Kaplan-Meier крива на преживување од OCSS според CAFs scores

Дополнително, беше направена анализа на преживување од OSCC според CAFs α-SMA scores (CAFs0→CAFs3) каде CAFs0=нема/ CAFs1=ретко/ CAFs2=фокални/ CAFs3=обилно. Смртен исход, за време на имплементација на студијата, имаше кај 7 (63,64%) од CAFs0, 3 (62,5%) од CAFs1, 3 (50%) од CAFs2 и 9 (55%) од CAFs 3. Направена беше проценка на времето на преживување од OSCC според CAFs во 4 категории, и беше согледано дека тоа изнесува за: а) CAFs 0 - 39,36 [95% CI (27,6 – 51,1)]; б) CAFs 1 - 40,75 [95% CI (20,99 – 60,51)]; в) CAFs 2– 33,17 [95% CI (12,39 – 53,94)]; и г) CAFs 3 – 42,59 [95% CI (29,83 – 55,34)] (Табела 8 и График 31).

За p>0,05, споредбата помеѓу просечното време на преживување од OSCC според CAFs (CAFs0→CAFs3), не укажа на сигнификантна разлика (Log Rank - Mantel-Cox: Chi-Square = 0,520; df=3; p=0,915).

5. 4. 3. Преживување од OSCC и TAMs

Беше направена анализа на преживување на пациентите со OSCC според TAMs CD68 TS и CD68 TN. За добиените вредности за секој од двата маркери поединечно, согласно ROC анализа за максимална сензитивност и специфичност за преживување/смртен исход, беа одредени Cut off вредностите и тоа за CD68 TS: 57,5 (63,6% sensitivity и 39,1% specificity); и CD68 TN: 5,5 (50% sensitivity и 52,2% specificity). (Табела 9).

Табела 9. Просек и медијана на преживување од OSCC според TAMs CD68TS и CD68TN

CAFs	[1]Просек (Mean)				Медијана (Median)			
	Проценка (месец) Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Проценка (месец) Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
CD68 TS								
Low	44,291	5,523	33,466	55,116	29,000	-	-	-
High	35,923	5,566	25,013	46,833	39,000	8,737	11,875	46,125
CD68 TN								
Low	41,210	5,141	31,134	51,286	43,000	-	-	-
High	39,298	6,316	26,919	51,677	39,000	17,578	4,548	73,452
CD68 TS +TN								
Low	32,857	7,673	17,818	47,896	37,000	19,884	,000	75,973
High	41,976	4,609	32,943	51,009	43,000	-	-	-

[1]Проценката е лимитирана на најдолгото прикажано време на преживување
CAFs0 = нема; CAFs1 =ретко; CAFs2 = фолано; CAFs3 = обилно
CD68 TS ≤ / >57,5; CD68 TN ≤ / >5,5; CD68 TS+TN ≤ / >29;

За маркерот CD68 TS, смртен исход имаше кај 8 (36,36%) од Low и кај 14 (60,87%) од High. Проценката на времето на преживување според CD68 TS Low/ High, укажа дека тоа изнесува консеквентно 44,29 [95% CI (33,47 – 55,12)] vs. 35,92 [95% CI (25,01 – 46,83)] месеци (Табела 9 и График 32). За p>0,05, споредбата помеѓу просечното време на преживување од OSCC во однос на CD68 TS Low/ High, не укажа на сигнификантна разлика помеѓу двете групи (Log Rank - Mantel-Cox: Chi-Square = 2,505; df=1; p=0,114).

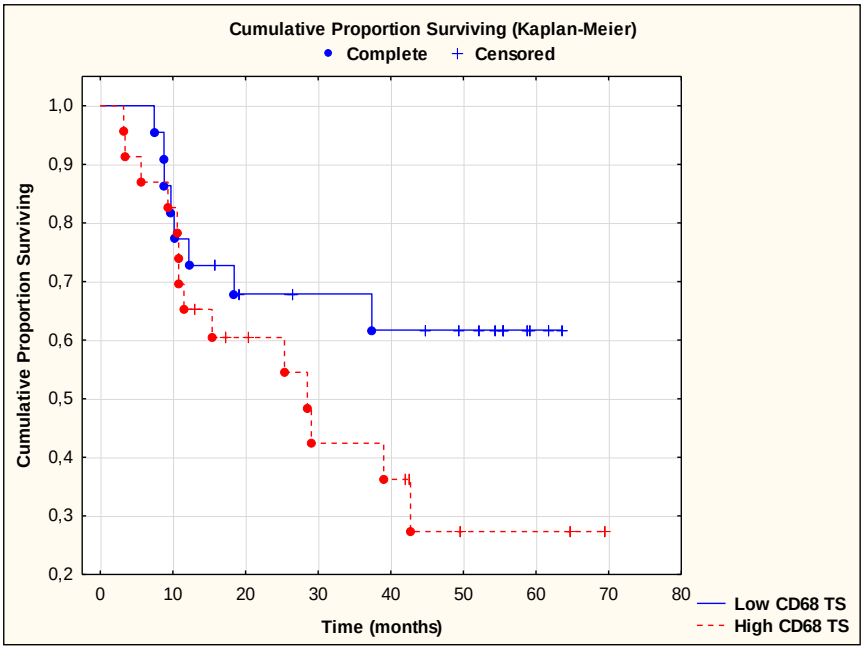


График 32. Kaplan-Meier крива на преживување од OCSS според CD68 TS

За маркерот CD68 TN, смртен исход имаше кај 11 (50%) од Low и кај 11 (47,83%) High. Проценката на времето на преживување од OSCC, според CD68 TN Low/ High, укажа дека тоа изнесува консеквентно 41,21 [95% CI (31,13 – 51,29)] vs. 39,29 [95% CI (26,92 – 51,68)] месеци. За p>0,05, споредбата помеѓу просечното време на преживување во однос на двете групи CD68 TN Low/ High, не укажа на сигнификантна разлика (Log Rank - Mantel-Cox: Chi-Square=0,285; df=1; p=0,594) (Табела 9 и График 33).

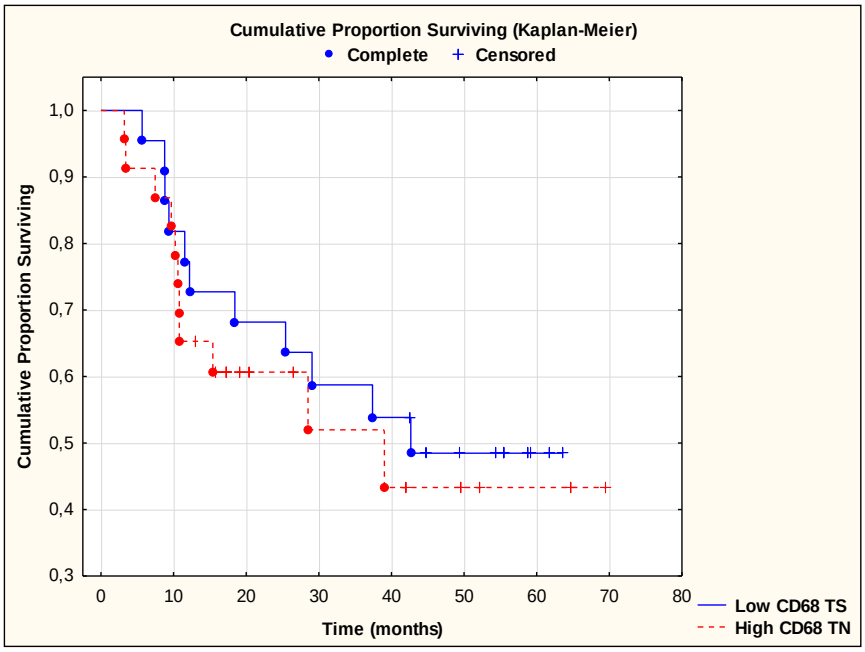


График 33. Kaplan-Meier крива на преживување од OCSS според CD68 TN

5. 4. 4. Cox Proportional Hazard модел – OSCC преживување

Униваријантен Cox Proportional модел - со овој модел беше анализирана асоцијацијата на преживување од OSCC со 17 селектирани параметри и тоа: 1) пол; 2) возраст; 3) T-статус (големина на туморска лезија); 4) N–статус (нодален статус т.е. метастази во регионални линфни јазли); 5) TNM-клинички стадиум; 6) G-степен на диференцијација на туморски клетки; 7) LI-лимфатичен продор; 8) PnI-перинеурална инвазија; 9) R1-позитивна ресекциона ивица; 10) RB-релапс на болест; 11) вид на RB-релапс; 12) број на локални рецидиви; 13) број на метастази по прва операција; 14) CAFs; 15) TAMs CD68 TS; и 16) TAMs CD68 TN.

Преживувањето од OSCC сигнификантно асоцираше со 3 од анализираните параметри и тоа RB-релапс на болест, број на локални рецидиви и број на метастази (Табела 9). Сите три параметри асоцираа со лоша прогноза.

Релапс на болест [Exp(B) (HR)=8,036] – репасот на болеста е лош прогностички знак, асоциран со лошо преживување. Единица релапс ја зголемува асоцираноста со лошо преживување за 703,6%.

Број на локални рецидиви [Exp(B) (HR)=1,583] – локалните рецидиви се лош прогностички знак, при што со единица зголемување на нивниот број, асоцираноста со лошо преживување се зголемуваше за 58,3%.

Број на метастази [Exp(B) (HR)=2,076] – метастазите се лош прогностички знак односно единица зголемување на бројот на метастази ја зголемува асоцираноста со лошо преживување за 107,6%.

Останатите 13 анализирани параметри, меѓу кои и маркерите CAFs, и TAMs CD68 TS / CD68 TN за $p>0,05$, не асоцираа сигнификантно со преживувањето на пацентите со OSCC (Табела 10).

Табела 10. Униваријантен Cox Proportional Hazard модел на преживување од OSCC според одредени параметри

Параметри	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B) (HR)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Пол (мажи / жени)	,079	,434	,033	1	,856	1,082	,462	2,533
Возраст (години)	(,089)	,461	,037	1	,848	,915	,371	2,257
T – статус	,671	,432	2,413	1	,120	1,956	,839	4,562
N – статус	,299	,460	,422	1	,516	1,349	,547	3,324
TNM – статус	,688	,436	2,486	1	,115	1,989	,846	4,677
G - статус	(,189)	,556	,116	1	,734	,827	,278	2,462
L – статус (- vs. +)	,696	,430	2,620	1	,106	2,006	,863	4,659
Pn – статус (- vs. +)	,586	,514	1,302	1	,254	1,797	,657	4,915
R – статус (- vs. +)	,264	,360	,539	1	,463	1,302	,643	2,637
RB (- vs. +)	4,382	1,773	6,106	1	,013*	8,036	2,476	8, 766
VRB – 0 (ref)	-	-	1,673	2	,433	-	-	-
VRB - 1	,166	,569	,085	1	,771	1,180	,387	3,600
VRB - 2	,850	,721	1,389	1	,239	2,339	,569	9,606
Број на лок. рецидиви	,459	,187	6,005	1	,014*	1,583	1,096	2,286
Број на метастази	,731	,310	5,541	1	,019*	2,076	1,130	3,815
CAFs (ref)	-	-	,499	3	,919	-	-	-
CAFs 1	(,211)	,692	,093	1	,761	,810	,209	3,146
CAFs 2	,297	,696	,182	1	,669	1,346	,344	5,262
CAFs 3	(,123)	,506	,059	1	,809	,885	,328	2,383
CD68 TS	,682	,445	2,347	1	,126	1,978	,827	4,734
CD68 TN	,227	,432	,276	1	,599	1,254	,538	2,923
CD68 TS+TN	-,226)	,553	,167	1	,682	,797	,270	2,359

T- статус (големина на туморска лезија): T1= ≤ 2cm во најголем дијаметар; T2= >2 - ≤4cm; T3= >4cm; и T4= >4cm
N- статус (метастази во нодус): N0=нема зголемени линфонодули; N1=ипсилатерални, <3cm; N2=солитарни 3-6cm/ мултипли <6cm ипсилатерални/ контралатерални или билатерални <6cm; и N3=метастатски депозит >6cm
TNM - клинички стадиум на болеста
G-статус (степен на диференцијација на туморски клетки: G1-добро; G2-умерено; G3-лошо; G4-недиференцирано (анапластичен карцином)
L-линфатичен продор
Pn – перинеурална инвазија
R-позитивна ресекциона ивица
RB – релапс на болест
VRB (вид на релапс): VRB1-метастази; VRB2-локален/локорегионален рецидив; VRB3-метастази и локален рецидив
CD68 TS ≤ / >57,5; CD68 TN ≤ / >5,5; CD68 TS+TN ≤ / >29;
TS=строма; TN=гнездо; TS+TN=строма + гнездо
Зависна варијабла – преживување во денови

* сигнификантно за p<0,05

Мултиваријантен Cox Proportional модел - Сите параметри кои во Униваријантниот Cox Proportional модел имаат сигнификантна асоцираност со лошо преживување од OSCC односно со настанот (смрт) од OSCC (RB-релапс на болест, број на локални рецидиви и број на метастази) беа обработени во мултиваријантен Cox Proportional модел (Табела 10).

Според овој модел на преживување, за p>0,05, за трите анализирани параметри беше утврден несигнификантен допринос во стапката на опасност (HR - hazard ratio) односно асоцираноста со настанот (смрт). Сепак забележливо е дека за двата параметри како број на локални рецидиви и број на метастази асоцираноста е гранична несигнификантна позитивна за консеквентно 45,2% (p=0,054) vs. 73,7% (p=0,082).

Табела 10. Мултиваријантен Cox Proportional модел на преживување од OSCC според одредени параметри

Параметри	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
RB - Релапс на болест	,050	,364	,019	1	,892	1,051	,514	2,147
Број на лок. рецидиви	,373	,193	3,725	1	,054	1,452	,994	2,119
Број на метастази	,552	,317	3,032	1	,082	1,737	,933	3,233
Зависна варијабла – преживување во месеци * сигнификантно за p<0,05								

5. 5. Предиктивна улога на CAFs, TAMs и други параметри за морталитет од OSCC

Во овој дел, кај пациентите од примерокот, ја анализиравме предиктивната улога на 16 параметри за морталитет од OSCC.

Униваријантната логистичка регресиона анализа, за p<0,05, укажа дека само два параметри и тоа бројот на локални рецидиви и бројот на метастази се јавуваат како сигнификантни независни предиктори за морталитетот од OSCC (Табела 11).

Табела 11. Униваријантна логистичка регресиона анализа на предиктивната улога на селектирани параметри за морталитет од OSCC

Параметри	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Пол (мажи / жени)	,074	,609	,015	1	,903	1,077	,327	3,551
Возраст (години)	,012	,031	,152	1	,697	1,012	,952	1,076
T – статус	,644	,623	1,068	1	,301	1,905	,561	6,464
N – статус	,065	,644	,010	1	,920	1,067	,302	3,770
TNM – статус	,630	,604	1,088	1	,297	1,878	,575	6,136
G - статус	-,405)	,731	,308	1	,579	,667	,159	2,793
L – статус (- vs. +)	,644	,623	1,068	1	,301	1,905	,561	6,464
Pn – статус (- vs. +)	,673	,801	,706	1	,401	1,961	,408	9,431
R – статус (- vs. +)	,463	,616	,566	1	,452	1,589	,475	5,310
RB (- vs. +)	22,684	9748,228	,000	1	,998	-	-	-.
VRB – 0 (ref)	-	-	-	-	-	-	-	-
VRB - 1	-,134)	1,254	,011	1	,915	,875	,075	10,210
VRB - 2	19,817	20096,485	,000	1	,999	-	-	-
Број на лок. рецидиви	1,413	,541	6,813	1	,009*	4,108	1,422	11,871
Број на метастази	2,276	1,083	4,415	1	,036*	9,737	1,165	81,349
CAFs (ref)			1,460	3	,691			
CAFs 1	-1,070)	,962	1,237	1	,266	,343	,052	2,261
CAFs 2	-,560)	1,029	,296	1	,587	,571	,076	4,297
CAFs 3	-,760)	,771	,972	1	,324	,468	,103	2,120
CD68 TS	-1,001)	,616	2,646	1	,104	,367	,110	1,228
CD68 TN	-,087)	,597	,021	1	,884	,917	,285	2,952
CD68 TS+TN	-,393)	,830	,224	1	,636	,675	,133	3,434

T- статус (големина на туморска лезија): T1= ≤ 2cm во најголем дијаметар; T2= >2 - ≤4cm; T3= >4cm; и T4= >4cm
N- статус (метастази во нодус): N0=нема зголемени линфонодули; N1=ипсилатерални, <3cm; N2=солитарни 3-6cm/ мултипли <6cm ипсилатерални/ контралатерални или билатерални <6cm; и N3=метастатски депозит >6cm
TNM - клинички стадиум на болеста
G-статус (степен на диференцијација на туморски клетки: G1-добро; G2-умерено; G3-лошо; G4-недиференцирано (анапластичен карцином)
L-линфатичен продор
Pn – перинеурална инвазија
R-позитивна ресекциона ивица
RB – релапс на болест
VRB (вид на релапс): VRB1-метастази; VRB2-локален/локорегионален рецидив; VRB3-метастази и локален рецидив
CD68 TS ≤ / >57,5; CD68 TN ≤ / >5,5; CD68 TS+TN ≤ / >29;
TS=строма; TN=гнездо; TS+TN=строма + гнездо
Зависна варијабла – жив/ мртов

* сигнификантно за p<0,05

Согледано беше дека (Табела 11):

- со единица зголемување на бројот на локални рецидиви сигнификантно се зголемуваше веројатноста за морталитет од OSCC за 4,108 пати [OR=4,108 (1,422-11,87) 95% CI; p=0,009].

- со зголемување на бројот на метастази за еден сигнификантно се зголемуваше веројатноста за морталитет од OSCC за 9,737 пати [OR=9,737 (1,165-81,349) 95% CI; p=0,036].

За p>0,05, ниеден од останатите 14 анализирани параметри, меѓу кои и маркерите CAFs, TAMs CD68 SN и CD68 TN не беа потврдени како сигнификантни предиктори за морталитет од OSCC (Табела 11).

Табела 12. Мултипла логистичка регресиона анализа за предиктивна улога на селектирани параметри за морталитет од OSCC

Параметри	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Број на лок. рецидиви	1,898	,706	7,225	1	,007*	6,676	1,672	26,651
Број на метастази	2,974	1,228	5,862	1	,015*	19,564	1,762	217,227
Зависна варијабла – жив/мртов * сигнификантно за p<0,05								

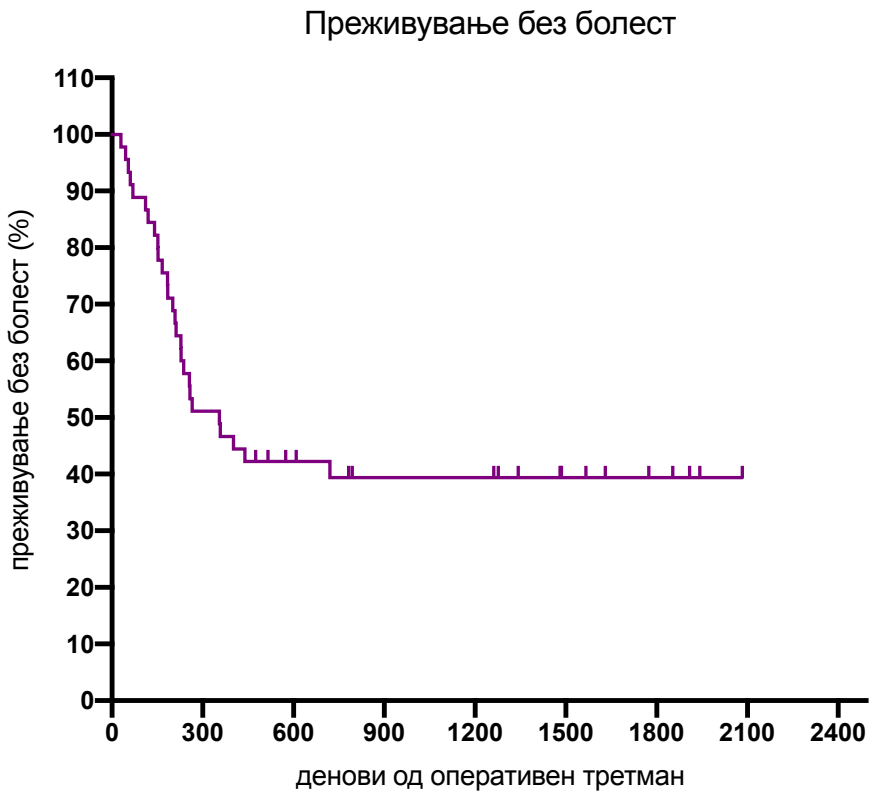
Двата параметри кои со униваријантната логистичка регресиона анализа се покажаа како сигнификантни предиктори (број на локални рецидиви и број на метастази) за морталитет од OSCC беа анализирани со мултипла логистичка регресија. За p<0,05, и број на локални рецидиви и број на метастази беа издвоени како независни предиктори за морталитет од OSCC при што (Табела 10):

- со единица зголемување на бројот на локални рецидиви сигнификантно се зголемуваше веројатноста за морталитет од OSCC за 6,676 пати [OR=6,68 (1,67-26,65) 95% CI; p=0,007].
- со единица зголемување на бројот на метастази сигнификантно се зголемуваше веројатноста за морталитет од OSCC за 19,564 пати OR=19,56 (1,76-217,23) 95% CI; p=0,015,].

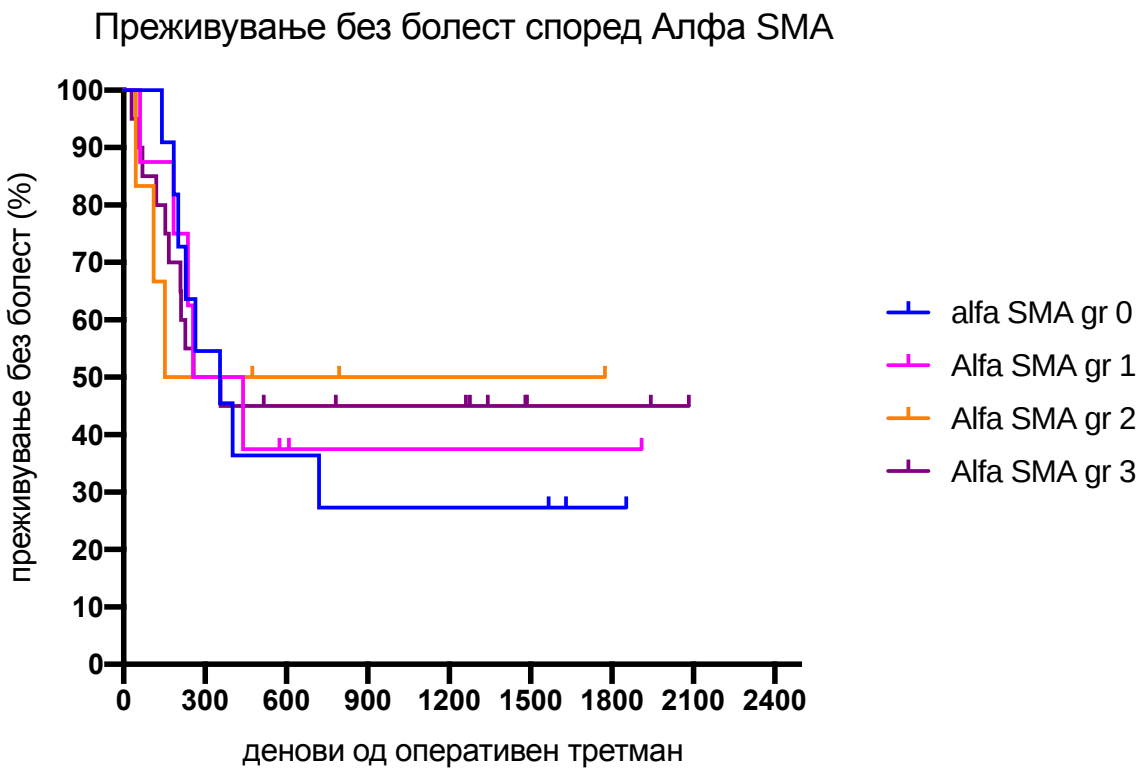
5.6. Преживување без болест (DFS)

Преживувањето без болест (Disease free survival) беше анализирано според степените на густина на CAFs и TAMs. DFS е времето во денови по прва операција па се до првиот релапс (локален рецидив или вратна метастаза).

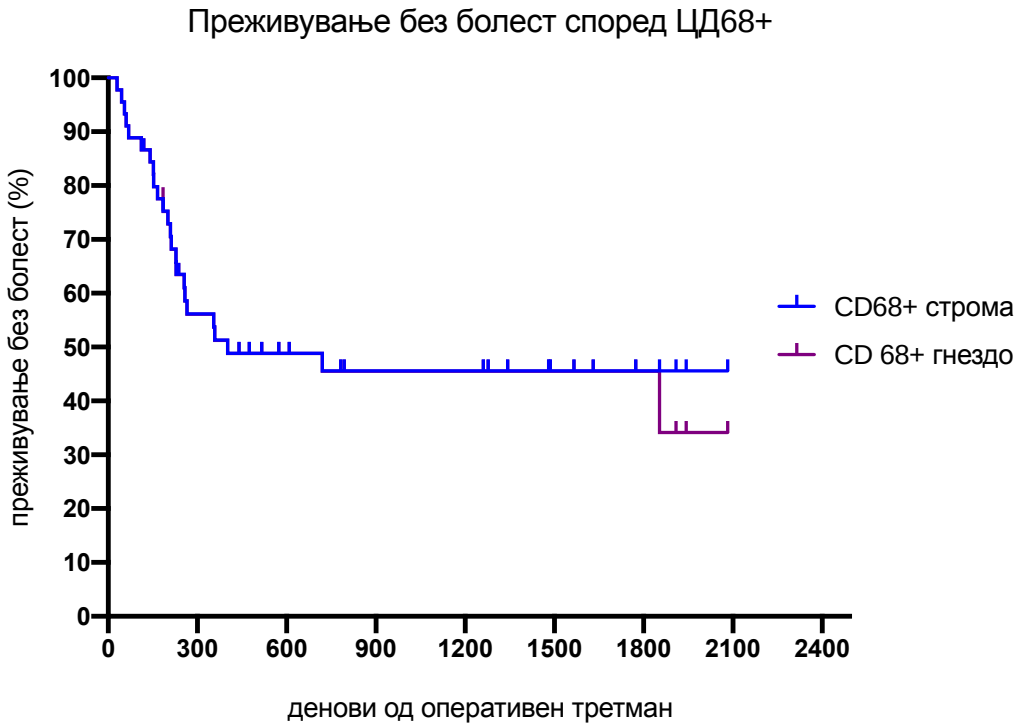
5.6.1. Преживување без болест (DFS) и CAFs α-SMA



Средно преживување без болест во анализираната група на 45 пациенти беше 42,2% на период од 5 години по оперативниот третман. Средно преживување без болест според CAFs α-SMA не покажа статистичка значајност во однос на градусот на CAFs α-SMA во анализираната група на пациенти. (Табела 1 и 2).


Преживување без болест според Алфа SMA
преживување без болест (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
300
600
900
1200
1500
1800
2100
2400
денови од оперативен третман
alfa SMA gr 0
Alfa SMA gr 1
Alfa SMA gr 2
Alfa SMA gr 3

5.6.2. Преживување без болест (DFS) и TAMs CD68 TS и TN



Средно преживување без болест според CD68+ TAMs TS изнесуваше 45,5% на 5 години од оперативниот третман, а за CD6 +TAMs TN изнесуваше 34,1% на 5 години од оперативниот третман. Компарацијата меѓу CD68+ строма и CD68+ гнездо не покажа статистичка значајност во однос на преживување без болест по оперативниот третман (p=0,8831).

5.7. Дискусија

5.7.1. Клиничко-патолошки параметри и CAFs

CAFs се појавуваат во туморската строма каде се во меѓусебна интеракција со канцерските клетки. Нивната густина е варијабилна (56), и може да се зголеми со феномен кој ги афектира карциноматозните компоненти на малигните тумори (60). In vitro студии објавиле значајно зголемување на експресија на α-SMA во оралниот карцином при трансдиференцијација на NFs во CAFs посредувана со стумулација на TGF-β1 (56).

Во нашата студија, густината на CAFs ја класифициравме во 4 степени, користејќи нова дефиниција за "фокален" распоред (43). Имунобоењето со α-SMA во OSCC во некои студии демонстрирале дека степените 2 и 3 се концентрирани во инвазивниот фронт на туморот и сугерираат дека интеракцијата на CAFs со канцерските клетки се случува токму во инвазивниот фронт на туморот што е конзистентен резултат со претходните студии за карцином на града и колоректален карцином (43, 88).

CAFs не беа идентификувани во сите 45 примероци со орален карцином. Тие беа пронајдени кај 75% орални карциноми. Нашите резултати не се во согласност со студии кои објавиле дека 98%, 97%, 100% , 100% и 100% од туморите редоследно, покажале позитивна експресија на CAFs (49, 57, 60, 62, 63). Но, нашите резултати се во согласност со резултатите на истражувачи демонстрирале помала позитивна експресија на α-SMA во туморските строми и тоа кај само 60%, 67% и 70% од туморите, редоследно (56, 89, 50). Во однос на дистрибуцијата, анализата покажа дека сигнификантно најзастапен беше Степен 3, но не согледавме сигнификантна разлика во меѓусебната застапеност на останатите степени. Хетерогеното присуство е објавувано и во други студии за орален карцином (8). Процентуално подеднаква застапеност на сите степени на густина на CAFs во орален карцином објавил de - Assis Eliene – Magda et al. (47).

Во нашата студија во која дополнително вклучивме ткиво на нормална орална мукоза (NOM) во близина на туморското ткиво како контролна група, имунохистохемијата не идентификува присуство на CAFs во ниту еден од десетте примероци. И во многу други студии, исто така, не се пронајдени CAFs во примероците на нормална орална мукоза, ниту пак во примероците со оралната леукоплакија (OL) која се карактеризира со епителна дисплазија од различен степен и е со висок ризик за малигна трансформација во орален карцином (43, 47, 60, 61, 62). Нивниот наод сугерира дека MFs не се присутни во стромата во тек на оралната карциногенеза дури ни во случаи на силно изразена епителна дисплазија, и уште еднаш ја потврдува хипотезата дека појавата на MFs во целост зависи од развојот на оралниот карцином, и дека е неопходен контакт меѓу канцерските клетки и стромата за да се индуцира миофибробластна трансдиференцијација (8). Земајќи го во обзир отсуството на MFs во примероците со нормален и диспластичен орален епител и нивното појавување во оралната субмукозна фиброза и орален карцином, се чини дека генетски алтерираниот епител т.н. карциноматозен епител можеби има индуктивен ефект на соседната строма за да продуцира CAFs (51).

Во литературата е објавено дека на други анатомски локализации како што е грло на матка, зголемувањето на бројот на CAFs било силно асоцирано со раст на степенот на епителна дисплазија (55).Зошто постои разлика меѓу усната шуплина и грло наматка би можело да биде тема за некое идно истражување, но неспорно е дека сеуште не е доволно познат патогенетскиот механизам на карциногенеза кај оралниот карцином.

Од значаен интерес е да се напомене дека иако примероците од контролната група и периферните региони од туморот покажаа комплетно отсуство на CAFs, сите примероци демонстрираа позитивитет за α-SMA во мазните мускули во зидовите на крвните садови, кои служеа како внатрешна позитивна контрола (55), а истиот наод го објавиле повеќе автори (56, 51, 90). Интригантен е податокот за високо полиморфен дуктален карцином in situ на града и не - инвазивен уротелијален карцином на мочен меур кај кои се идентификувани CAFs во туморската строма која ги опколува канцерските клетки, демонстрирајќи дека факторите кои потекнуваат од агресивните малигни епителни туморски клетки се способни да преминат низ базалната мембрана стимулирајќи трансформација на MFs (91). Chaudhary et al.(49), Kapse et al.(50) и Chauhan et al. (92) ја испитувале улогата на CAFs во прогресија на премалигни лезии во планоцелуларен карцином, и утврдиле дека α-SMA како маркер на дистрибуција на CAFs, е откриен во примероците на премалигни лезии, а е отсутен во епителот на нормалната орална мукоза. Исто така, зголемена дистрибуција на CAFs корелира со прогресија на нормална орална мукоза и потенцијално малигни лезии на оралната мукоза во инвазивен фенотип т.е. орален планоцелуларен карцином. Од добиените резултати е изведен заклучокот дека пролиферацијата на миофибробластите може да се користи како стромален маркер за премалигни и малигни лезии на оралната мукоза (49, 50). Различните резултати за присуството на CAFs во примероците со орален карцином, епителната дисплазија и нормалната мукоза во студиите кои ни беа достапни, сугерираат за потреба од понатамошни истражувања и расветлување на улогата на CAFs во карциногенезата на оралниот карцином.

Анализата утврди дека од 45 пациенти со орален карцином, 60% беа мажи, а 40% жени. Односот меѓу половите беше 1.5 : 1 во корист на мажите, но немаше сигнификантна разлика во нивната застапеност. Малата разлика во соодносот на половите значително се разликува од резултатите во литературата каде се забележуваат дури значителни дискрапанци на соодносот во корист на мажите (93). Разликата во малиот сооднос меѓу половите може да се должи на големината на испитуваниот примерок, како и случајниот избор на испитаници. Секако, 45-те пациенти од испитуваниот примерок не значат и вкупен број на пациенти со дијагностициран орален карцином во петгодишниот период во кој ја реализиравме студијата, но означува број на пациенти чии податоци беа достапни во архивата на нашата клиника и Институтот за Патолошка анатомија каде ја реализиравме имунохистохемиската анализа.

Анализата утврди сигнификантно најголема процентуална застапеност на Степен 3 кај мажите. Нашите истражувања низ литературата воочија спротивни резултати на нашите кои не потврдија асоцираност на CAFs со полот (43, 56).

Во однос на возраста, просечната возраст на пациентите со орален карцином беше 67 години, и при тоа најмладиот имаше 41, а најстариот 88 години. Вреди да се

напомене дека сепак нашиот податок е охрабрувачки, за разлика од објавените податоци за болните од орален карцином во блиското соседство каде средната возраст на нивните испитаници била 57,4 години, а најмладиот бил на возраст од 38 години (93). Но, важно е да напоменеме дека половината од пациентите во нашето истражување беа помлади од 67 години. Нашата анализа не утврди сигнификантна разлика во застапеноста на степените на густина на CAFs во било која возраст. Од ова би произлегол и заклучокот дека активација на CAFs не зависи од возраста на пациентот и може да се случи на било која возраст кај пациентите со орален карцином, а нивната активација веројатно зависи од некои други фактори. При групирање на пациентите во две возрасни групи и тоа помлади и постари од 65 години увидовме дека сигнификантно беше побројна групата постари од 65 години споредено со помлади од 65 години. Иако густината на CAFs не асоцираше сигнификантно со возрасните групи, сепак беше воочливо дека дури 82% од групата постари од 65 години немаат CAFs, и само 18% од групата помлади од 65 години немаат CAFs; иако несигнификантно, повисоките вредности на CAFs беа карактеристични за помладите пациенти што се потврди и со корелационите анализи.
До сега, во објавените трудови во литературата не воочивме асоцираност на CAFs со возраста, освен во студијата на Vered et al. (57) каде ниските вредности на CAFs беа карактеристични за постарите пациенти со планоцелуларен карцином на јазик, што е идентичен наод на нашиот.

Густината на CAFs беше анализирана според 8 патолошки параметри: големина на примарен тумор (T-статус), статус на вратни лимфни јазли (N-статус), патолошки стадиум на болест (TNM-стадиум), степен на диференцијација на туморски клетки или хистолошки степен на тумор (G-статус), перинеурална инвазија (PnI), лимфатична инвазија (LI), локализација и релапс на болест.

Анализата на T-статусот утврди најголема застапеност на туморите со големина од 2-4 цм (T2), а најмалку застапени беа туморите поголеми од 4 цм (T3). Ова можеби се должи на еден општ заклучок дека пациентите не се јавиле навремено за преглед во најраната фаза на болеста кога нема убедлива клиничка презентација на болеста или можеби во дијагностиката недостасува препознавање на клиничката слика на туморот во иницијалната фаза. Од друга страна, можеби значи отсуство на здравствена едукација, редовни систематски и превентивни прегледи на пациентите со висок ризик за OSCC. Исто така, анализата покажа голем процентот на оние кои доаѓаат на прв преглед со напредната големина на туморот (T4), а тоа се 20% од пациентите што земено севкупно е висок процент.
Најголем процент од пациентите (75%) со T1-статус немаа CAFs, а само мал процент (8,3%) имаа Степен 3. Најголем процент од пациентите со T4-статус (66,7%) имаа Степен 3, а само 1 пациент од нив немаше CAFs. Дополнително, при групирање на туморите во две групи T1/ T2 и T3/T4, согледано беше дека пациентите со мали тумори (T1/T2) подеднакво процентуално имаат Степен 0 и Степен 3. Додека, само мал процент од големите тумори (T3/T4) имаат Степен 0 (5,9%), но голем процент (58,8%) имаат Степен 3. Следствено на резултатите лесно може да заклучиме дека постои сигнификантна асоцијација на T-статусот со густината на CAFs, односно, колку што е поголема туморската лезија, толку е поголема густината на CAFs. Овој резултат не го

рефлектира само квантитативниот раст на бројот на CAFs со зголемување на димензиите на туморот, туку укажува и дека освен "обилниот" дифузен модел (Степен 3) и "фокалниот" модел (Степен 2) асоцира со понапредна големина на туморите (T3/T4). Фокалниот модел на дистрибуција не ја рефлектира само квантитативната разлика во концентрацијата на CAFs, туку и процесот на диференцијација на CAFs. Со други зборови, дифузниот модел на дистрибуција (Степен 3) можеби е финална фаза, додека фокалниот модел можеби се случува во иницијалната или интермедијарната фаза во процесот на диференцијација на CAFs (43, 56).

Растот на туморот и неговото напредување меѓу останатото, е патолошки процес на строматогенеза кој е условен со реципрочна интеракција на канцерските клетки и стромалните MFs. Во тек на инвазија туморските клетки се атхерираат за компонентите на ECM, асистирајќи во негово разградување со своите ензими металопротеинази (MMP). Механизмот на ремоделација на ECM оркестриран од CAFs им овозможува на канцерските клетки непречено движење нанапред низ разграденот матрикс, и зголемување на димензиите на туморот со инвазија на соседно здраво ткиво (94).

За разлика од нашите резултати, некои истражувачи не успеале да најдат поврзаност на густината на CAFs со големината на туморот (43, 56), но обемни студии утврдиле сигнификантна асоцијација помеѓу голема густина на CAFs и големите карциноми на јазик (95) и назофарингс (96).

Анализата на N-статусот, утврди отсуство на N3 метастатски депозит во вратот. 1/3 од пациентите со N0 немаа CAFs, додека најголем дел од пациентите со N0/N1/N2 имаа Степен 3, па утврдивме сигнификантна асоцијација на N-статусот со степените 0/3 (нема/обилно). Изненадува резултатот кој го добивме за пациентите со N0 и кој потврди дека 45% од нив имаат Степен 3.

Дополнителното групирање на пациентите во две групи со негативен врат (N0) и позитивен врат (N1/N2) укажа дека една третина од пациентите со негативен врат (N0) имаа Степен 0, а минимален број пациенти со позитивен врат (N1/N2) имаа Степен 0. Исто така, збирно фокално/обилно присуство на CAFs имаше кај речиси двојно повеќе пациенти со позитивен (N1/N2) врат во споредба со негативен (N0) врат, односно утврдивме сигнификантна асоцијација на N-статусот (негативен/позитивен врат) со густината на CAFs. Позитивен врат сигнификантно асоцираше со фокално/обилно присуство на CAFs. Идентичен резултат објавиле (62, 97), но објавени се и спротивни наоди на нашиот (43, 61).

Анализата на TNM, утврди најголема и подеднаква застапеност на TNM2 и TNM4. Забележливо е што кај најголем процент од пациентите (80%) во иницијалниот ран стадиум на болест TNM1 немаше CAFs, и ниту еден пациент во овој стадиум немаше Степен 2 и Степен 3. И обратно, само по еден пациент од останатите стадиуми (TNM2/TNM3/TNM4) немаа CAFs, а Степенот 3 беше најзастапен. Според горенаведеното, утврдивме сигнификантна асоцијација на стадиумот на болеста со густината на CAFs, и при тоа напреднати стадиуми на болеста сигнификантно асоцираа со поголемо присуство на CAFs, што се потврди дополнително со корелационите анализи. Со групирање на раните стадиуми во една група (TNM1/TNM2), и напреднати стадиуми на болест (TNM3/TNM4) во втора група, се

забележа дека во групата на рани стадиуми е поголем процентот на пациентите кои немаат CAFs, споредено со оние со Степен 3, и vice versa, во втората група на понапреднати стадиуми доминира Степен 3 наспроти минималниот број на пациенти кои имаа Степен 0 CAFs (8,7%). Од резултатите произлегува недвосмислениот заклучок дека стадиумот на болеста сигнификантно асоцира со густината на CAFs, т.е. напредните стадиуми на болеста имаат поголема густина на CAFs. Истиот наод го објавија и други автори (56, 95). Сепак, објавени се и дијаметрално спротивни резултати од нашиот (43), каде авторите не потврдиле поврзаност на густината на CAFs со ниту еден клиничко-патолошки параметар од испитуваните, а меѓу нив ниту со патолошкиот стадиум на болеста. Овие дискрапанци во резултатите можеби се должат на различната големина на групите испитаници вклучени во студиите, со што можеби се добиле различни статистички резултати, но и на различните системи кои се користеле во определување на патолошкиот стадиум на болеста. Така на пример, во студијата на Chen et al. (96) се користат критериумите на WHO (2000 World Health Organization System criteria), но во други студии се користат критериумите на UICC/AJCC системот за одредување на стадиумот на болеста кај карциномите (43).

Анализата на 6 –те локализации на оралниот карцином, покажа дека најзастапен беше карциномот на јазик, а потоа карциномите на под на усна шуплина и гингива со подеднакви пропорции, следени со образ. Ретромоларниот и карциномот на непце беа најмалку и подеднакво застапени. Се воочува предоминацијата на јазичниот карцином во однос на останатите карциноми, кој е двојно позастапен од карциномот на под на устакако втор по застапеност. Карциномот на јазик се разликува од карциномите на останатите локализации и според резултатот кој укажа дека сигнификантно е поголем бројот на пациентите со карцином на јазик кои имаат CAFs (70%) наспроти оние кои немаат CAFs . За разлика од овој карцином, сите пациенти со карцином на под на уста имаа CAFs, и при тоа дури 87,5% од нив имаа "обилна" (Степен 3) густина. Со оглед на добиените резултати, можеби CAFs се клучните играчи одговорни за фактот дека карциномите на овие две локализации најтешко се контролираат. Во однос на застапеноста на карциномите според локализација, податоците во литературата се разликуваат во однос на малата меѓусебна процентуална разлика во застапеноста на јазичниот и карциномот на подот на уста кои се најзастапени, па во некои студии минимално позастапен е оној на подот на уста (93). Според анализата на датабазата на Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database забележително е дека јазикот е најчеста локализација и е асоциран со повисок морталитет отколку орални карциноми на други локализации (28). Оралниот карцином на јазик е од посебен интерес во научно-истражувачките кругови од аспект на поврзаноста на CAFs со текот и исходот на болеста по третманот. Опишано е дека обилното присуство на CAFs кај оралниот карцином на јазик е сигнификантно асоцирано со локалните рецидиви и со севкупното преживување. Помладите пациенти и позитивните хируршки маргини се асоцирани со склоноста за локално рецидивирање и мало преживување кај овој агресивен малигнитет (57). Контроверзно е прашање дали карциномите на оралниот јазик се разликуваат според биолошкото однесување и клиничкиот исход од карциномите на другите локализации во усната шуплина.

Анализата на G параметарот, утврди најголема застапеност на умерена (G2) диференцијација на туморски клетки. Немаше анапластични карциноми (G4) во целиот примерок. 1/3 од пациентите со G1 немаше CAFs. Но, пак сите пациенти со лоша туморска диференцијација (G3) содржеа CAFs. Независно од хистолошкиот степен на диференцијација, сепак беше најзастапен Степен 3. Од резултатите произлезе и заклучокот дека нема сигнификантна разлика помеѓу G-степенот и густината на CAFs. Нашите резултати се во склад со добиените резултати со повеќето истражувачи (43, 51, 56, 60, 97). Овие наоди можеби сугерираат дека трансдиференцијацијата на MFs е индуцирана во инвазивната фаза на OSCC, а понатамошното губење на туморската диференцијација (повисок степен на диференцијација) не влијае на густината на овие клетки (56).

Лимфатичен продор и перинеурална инвазија не беше потврден кај 2/3 од пациентите, и при тоа немаше сигнификантна асоцијација на LI со густината на CAFs. Некои автори, за разлика од нас, нашле дека изобилството на CAFs низ целата туморска строма или во инвазивниот туморски фронт на OSCC сигнификантно корелира со LI (8), а изобилството на CAFs во OSCC корелира со PnI особено доколку е локализиран на букална лигавица, палатум и гингива (8, 65, 66,).

Кај пациентите со планоцелуларен карцином во усната шуплина *релапсот на болеста* се јавува во вид на локален рецидив, регионални метастази во вратните лимфни јазли (LNM), како комбинација од претходните два или далечни метастази (M1). Кај некои пациенти можни се повеќекратни релапси на карциномот. Анализата утврди релапсот кај речиси двојно повеќе пациенти споредено со пациентите кои немаа релапс. Нашиот резултат спореден со резултатите од другите истражувања за OSCC е со процентуално значително повисока вредност за релапс, па така споредено со студијата на Sharma et al. (40), кој своето истражување го фокусира на SCC на јазик како карцином кој тешко се контролира, релапсот на болеста процентуално бил речиси двојно понизок, и притоа кај најголем процент болеста се повторила во вид на локален рецидив.

Нашата анализа покажа дека релапсот во вид на локален рецидив се јави кај тројно повеќе пациенти (66,7%) споредено со појава на LNM, додека релапс на болеста во вид на комбинација од двата беше најмалку застапен. Односно, три и пол пати е поголем бројот на пациентите со локален рецидив споредено со бројот на оние со вратни LNM посттретмански, и четири и пол пати е поголем во споредба со комбинирана појава на локален рецидив / LNM. Голем број студии обезбедуваат се повеќе докази дека локалниот рецидив останува главна причина за неуспех во третманот на оралниот карцином. Оттука, голем напор треба да се вложи во идентификација на пациентите со висок ризик за локален рецидив на карциномот кај кои дополнителна терапија постоперативно во форма на адјувантна RT или CRT терапија би го подобрила крајниот исход (40).

Анализата на отсуство/присуство на CAFs во примарните тумори во однос на релапсот на болеста покажа дека нема сигнификантна разлика во процентуалната застапеност на пациентите кои немаа/имаа CAFs. Доминираше Степен 3 речиси подеднакво кај пациентите со релапс и без релапс. Но, иако крајно несигнификантно, сепак е забележливо дека Степен 3 е малку позастапен кај пациентите кои немаат

релапс на болеста,а истото беше потврдено со корелационите анализи кои укажаа на несигнификантен раст на густината на CAFs кај пациентите кои немаа релапс на болеста. При појава на локален рецидив процентуалната застапеност на пациентите кои имаа CAFs беше сигнификантно поголема споредено со пациентите кои немаа CAFs, што можеби укажува дека сигнификантно зголемувањето на нивниот број би укажало дека се појавува релапс на болеста во вид на локален рецидив. При појава на LNM не беше утврдена сигнификантна разлика во процентуалната застапеност на пациентите со отсутни/присутни CAFs, но изненадувачки е што кај комбиниран релапс од LNM / локален рецидив кој укажува на изразено агресивен тумор, не беше утврдена сигнификантна разлика во процентуалната застапеност на пациентите со отсутни/присутни CAFs т.е. нивните пропорции беа подеднакви.
Во студијата на Kellerman et al. (56) обилното присуство на CAFs во примарниот OSCC било сигнификантно асоцирано со N-статусот при иницијалната презентација и со појава на вратни LNM по третманот, односно високиот број укажал на постоење на изразито агресивни тумори кои прејавуваат склоност кон релапси и тоа во вид на вратни метастази. Оваа студија според нашите сознанија е прва досегашна евиденција дека голема густина на CAFs може да биде корисна во предвидување на прогнозата на пациентите со орален карцином, бидејќи вратните LNM се еден од најважните прогностички фактори за болеста. Наспроти нашите резултати, обилното присуство на CAFs во нивната студија не беше асоцирано со локалниот рецидив на болеста.

5.7.2. Клиничко-патолошки параметри и TAMs

Во нашата студија ја анализиравме густината на TAMs во 2 региони на туморот: интратуморски (TN, туморско гнездо) и перитуморски (TS, туморска строма). Некротичните регии во туморот не беа вклучени во анализата (20).

Идејата за проширување во нашето истражувањето за TAMs во туморското гнездо ја засновавме на тврдењата во литературата за можно влијание на инфилтрација со TAMs во гнездата на прогнозата на пациентите со орален карцином. Податоци во литературата укажуваат дека инфилтрацијата со TAMs во гнездата покажала позитивна корелација со намалена рецидивантност во ендометријалниот карцином, додека во инвазивниот карцином на града зголемена инфилтрација во гнезда корелира со пократко преживување односно со полоша прогноза. Доколку овие резулатати се земат во обзир, постои силна препорака кога се истражуваат TAMs во малигните тумори, освен нивно кавантитативно одредување, да се анализира и нивната локализација во стромата и гнездата (73).

Во нашите примероци, TAMs воглавно беа дистрибуирани во строма и многу помалку во гнезда. Кај некои пациенти гнездата не беа инфилтрирани со TAMs, но наспроти нив, во стромите кај сите пациенти беа идентификувани TAMs. Некои истражувачи не идентификуваа TAMs во стромата на сите пациенти вклучени во истражувањето (17), додека некои автори идентификуваа TAMs во стромите и гнездата кај сите примероци со карцином (73). Кај сите 10 пациенти од нашата контролна група со NOM, беа пронајдени TAMs во многу мал број и тоа од 2, 3 па до 4 или 6 клетки.

Идентичен наод со многу мал број идентификувани TAMs во контролната група прикажал Sun et al. (74), со таа разлика да не биле идентификувани TAMs во сите 20 контролни примероци со NOM во ларингеален планоцелуларен карцином.

Анализата на клиничко – патолошките параметри во однос на густината на TAMs во стромата и гнездата покажа дека нема сигнификантна разлика во густината на TAMs во строма и гнездо со пол, возраст, T, N, TNM, G, LI, PnI, локализација, релапс на болеста ниту пак со видот на реласот на болеста (локален рецидив и метастази во вратни лимфни јазли, и комбинација од двата).

Во однос на *полот и возраста* нашиот резултат е конзистентен со наодите на повеќето автори (17, 73, 74). Сепак постојат студии кои добиле поинакви резултати како што е студијата на Yahui Yu et al. (98) кои забележале значајно пониска експресија на TAMs во туморската строма на назофарингеален карцином во групата постари пациенти.

Во однос на *T статусот* нашиот резултат е идентичен на наодот на Lin et al. (17) и Jeong et al. (73). Marcus et al. (70) укажал на фактот дека бројот на TAMs во примарниот тумор е силен предиктор на агресивноста на OSCC, а механизмот на овој ефект се базира на стимулација на туморската ангиогенеза. Добро познато е дека тумори кои немаат способност за неоваскуларизација, ја немаат способноста за раст над критичната големина од 2-3 мм. Така, ангиогенезата и резултантниот туморски раст се есенцијални за субсеквентна метастаза. Во 1971 година Folkman публицирал во New England Journal of Medicine хипотеза дека туморскиот раст е ангиогено-зависен, а инхибицијата на ангиогенезата може да биде терапевтска опција (99). Клинички студии објавиле дека TAMs заедно со самиот тумор се извор на проангиогени цитокини, па инфилтрацијата со TAMs е важна за да туморот ја достигне критичната големина и да метастазира, што се потврдило во студии на анимални модели кои покажале дека малата инфилтрација на туморот со TAMs го инхибира туморскиот раст и метастазирањето (71).

Анализата на *N- статусот* во однос на TAMs покажа дека нема сигнификантна разлика помеѓу пациентите со негативен врат (N0) и пациентите со позитивен врат (N1/N2) за LNM во однос на густината на TAMs, пери или интратуморски, а истиот го потврдил и Jeong (73). Но, студии пронашле сигнификантно повисока густина на интратуморски TAMs само во примероците на пациентите со позитивен врат (N+ статус), односно бројот на интратуморските TAMs бил сигнификантно поврзан со N-статусот (17, 74).

Weber et al. (100) добил резултат на сигнификантно покачен број на TAMs во мали примарни тумори (T1/T2 статус) кај пациенти со позитивен врат (N+ статус) наспроти пациентите со N0-статус, и истиот индицира на централна улога на TAMs во прогресија и метастазирање на оралниот карцином. Корелационите анализи во нашиот примерок забележаа несигнификантен раст на перитуморските и несигнификантно опаѓање на бројот на интратуморските TAMs со влошување на нодалниот статус.

Резултатите од нашето истражување за *хистолошкиот степен* ги потврдуваат наодите во други студии (17, 74), но исто така и се спротивставени (73). Корелационите анализи за нашите пациенти покажаа дека TAMs несигнификантно се

зголемуваа пери- и интратуморски со влошување на степенот на диференцијација на туморските клетки.

Нашиот наод во однос на *стадиумот на болест (TNM)* е спротивен на резултати каде позитивната експресија на CD68 корелирала со стадиумот, т.е. густината на перитуморските TAMs растела во повисоките стадиуми на планоцелуларниот карцином на ларингс, орален и орофарингеален карцином (70, 74).

Chen et al. (72) објавил дијаметрално спротивни резултати во својата *анализа на LI и PnI* во однос на густината на TAMs во стромата и гнездата на панкреатичен дуктален карцином, и го предложил PnI како силен прогностички маркер.
Анализата на локализацијата не идентификува TAMs во гнездата кај карциноми локализирани ретромоларно и на непце. Иако несигнификантно, вредностите на TAMs беа највисоки во стромите на карциномите на јазик, а во гнездата кај карциномите на образ. Идентичен е резултатот на Sun et al. (74).

Иако несигнификантно, вредностите на TAMs во гнездото се повисоки кај пациентите кои немаат *релапс* на болеста, а во строма се повисоки кај пациентите кои имаат релапс. Истиот заклучок го објавиле и други автори (17).
Највисоките вредности на TAMs во строма беа согледани кај пациентите кај кои се враќаше болеста како комбиниран тип од локален рецидив / LNM, а најниски вредности беа запазени кај пациентите со локален рецидив, што е резултат спротивен на Lin et al. (17). И обратно, во гнезда вредностите беа највисоки во групата со локален рецидив, а најниски кај комбинација од локален рецидив / LNM.

5.7.3. Корелација на CAFs и TAMs со селектирани параметри

Корелационите анализи ја утврдуваа поврзаноста на CAFs и TAMs во строма и гнездо со сите клиничко-патолошки параметри како што се пол, возраст, T-статус, N-статус, TNM, G, LI, PnI, релапс на болест, вид на релапс на болест, број на локални рецидиви и број на вратни LNM по третманот.
Анализата со непараметарска корелација регистрира сигнификантни корелации на CAFs само со полот, T, и TNM. При тоа, постоеше сигнификантна линеарна негативна корелација помеѓу CAFs и полот, односно густината на CAFs сигнификантно се зголемуваше кај пациентите од машки пол, додека сигнификантна линеарна позитивна јака корелација беше регистрирана помеѓу CAFs со T и TNM, односно густината на CAFs сигнификантно се зголемуваше со зголемување на туморската лезија и TNM т.е. со влошување на.стадиумот на болест. Спротивни резултати нашле некои автори (43, 56).

Густината на CAFs несигнификантно растеше при отсуство на релапс на болест, со намалување на бројот на локални рецидиви и бројот на вратни метастази по терапијата. За разлика од нашите наоди, објавена е сигнификантна корелација на CAFs со локална рекурентност на планоцелуларен на јазик, а истите резултати се демонстрирани и кај колоректален карцином (59).

Густината на CAFs несигнификантно се зголемуваше со влошување на нодален статус. Фасцинантна е студијата на група автори кои демонстрираат дека моделот на дистрибуција на CAFs во примарните OSCC на јазик е сличен со неговиот пар кој е

метастатски депозит во вратните LN, со што потврдуваат силна асоцираност на CAFs со метастазирање на примарниот карцином во регионалните вратни LN (59).

Густината на TAMs во стромата несигнификантно растеше во почетните стадиуми на болеста, што е спротивставен на некои резулати во литературата (4, 43, 74). TAMs во строма сигнификантно се зголемуваат со зголемување на бројот на LNM што го потврдија и друг автори (72). Густината во стромата несигнификантно им се зголемуваше со зголемување на бројот на локалните рецидиви, димензиите на туморот, со влошување на N- статус, полоша диференцираност, со појава на LI и со релапс на болеста (69, 74, 4, 17). Не само кај оралниот карцином, истражувања со идентични резултатати како нашиот се добиени и за планоцелуларни карциноми на други локализации кои не покажале сигнификантност во корелационите анализи, па така на пр. сумираните податоци за назофарингеалниот карцином покажаа дека нема сигнификантна корелација меѓу нивото на експресија на CD68 и T и N статусот (98). Во однос на хистолошкиот степен, иако несигнификантно сепак пронајдовме позитивна корелација помеѓу степенот на диференцијација на малигните епителни клетки односно стромата на полошо диференцираните карциноми беше погусто инфилтрирана со TAMs, што е спротивен наод од повеќето студии (43, 74).

Во однос на поврзаноста на густината на TAMs во гнездата со клиничко-патолошките параметри, пронајдовме дека нивниот број несигнификантно растеше при отсуство на релапс на болеста. Корелација меѓу бројот на TAMs во гнезда и намалена рецидивност беше забележана и кај ендометријалниот карцином (101). Густината несигнификантно се зголемуваше кај жени со големи орални карциноми во понапреден стадиум на болеста, кои се полошо диференцирани и кај кои во патолошкиот извештај се потврдени LI и PnI.

Растот и инвазијата на карциномот се потпира на формирање нови крвни садови. Кај некои тумори кај човекот, TAMs ја помага ангиогенезата која има важна улога во туморскиот раст, прогресија и метастазирање, а со тоа влијае врз прогнозата на пациентите (102). Позитивната корелација со ангиогенезата и соодветно туморскиот раст и прогресија ја потврдиле и други автори (74).

Меѓусебната поврзаност на CAFs и TAMs беше сигнификантно линеарно позитивно умерена, односно кога растеа TAMs во стромата, сигнификантно растеа и TAMs во гнездата. За разлика од нив, немаше сигнификантна линеарна корелација помеѓу CAFs и TAMs ниту во строма, ниту пак во гнездото што е конзистентен резултат со други студии за орален карцином (43). Земајќи во предвид дека бројот на TAMs и CAFs се разликува од пациент до пациент со OSCC, малку е веројатно дека може да се одреди прецизниот број на овие клетки кој би ја детерминирал агресивноста на туморот и веројатноста да метастазира. *In vitro* студии покажале дека CAFs продуцираат ензими матриксни металопротеинази (MMP), а нивното присуство во оралниот карцином дополнително ги стимулира туморските клетки да ја зголемат продукцијата на MMP. Ткивната деструкција која ја вршат MMP е есенцијална за првата инвазија со канцерски клетки. Од друга страна, TAMs кои се индуцирани и активирани од страна на CAFs, продуцираат ангиогени фактори и инфламаторни цитокини кои ја помагаат туморската прогресија и метастазирањето. Експериментот на Wyckoff et al.(103) демонстрирал дека постои паракрина јамка помеѓу TAMs и

канцерските клетки. Тие објавиле дека TAMs не само што се индуцирани од colony-stimulating factor-1 чија секреција вршат канцерските клетки во карциномот на града, туку и самите тие вршат секреција на EGF кој ја помага инвазијата на канцерските клетки. Тие поставиле хипотеза дека, присуството на CAFs создава конструкција за канцерска инвазија, а преку интерактивната активација на M2 макрофагите и канцерските клетки активираните M2 ја зголемуваат продукцијата на цитокините и ангиогените фактори. Тие сугерирале дека постои силна корелација на CAFs со зголемен број на M2 TAMs (104). Спротивни на нашите резултати се и резултатите добиени кај малигни епителни тумори на други системи (79, 80, 81), но и кај малигни тумори со патогенетски механизам кој се засновува на епително-мезенхимална транзиција (EMT) како што е неуробластомот (82).

5.7.4. Преживување од OSCC и поврзаност на CAFs, TAMs и други параметри со смртен исход

Анализата на вкупното преживување покажа дека половина од пациентите (48,89%) починале до 42 месец по дијагностицирањето, и притоа најголемата смртност била помеѓу 2-12 месец. Останатата половина од пациентите (51,11%) живееле подолго од 42 месеци.

Неколку студии укажале на можноста CAFs да се користи како важен прогностички фактор кај разновидни тумори (104, 105), иако нивната клиничка сигнификантност во прогностички цели на орален планоцелуларен карцином е ретко објавувана.

Во нашата студија најмногу пациенти починаа од групата пациенти кои "немаа" CAFs и притоа тие имаа пократко време на преживување (39,3 месеци). И vice versa , помалку пациенти починаа од групата кои "имаа" CAFs и притоа тие имаа подолго време на преживување (42 месеци). Но,сепак немаше сигнификантна разлика на просечното време на преживување помеѓу двете групи кои "имаа" т.е. "немаа" CAFs. Иако утврдивме дека времето на преживување е најдолго кај пациентите со обилно присуство на CAFs (Степен 3), немаше сигнификантна разлика во просечното време на преживување помеѓу 4-те степени на густина. Исто така, доколку се исклучи Степен 2 (фокална дистрибуција) од анализата, и се анализираат само степените 0, 1 и 3 кои ја карактеризираат само густината, може да се забележи дека смртноста процентуално е најголема во Степен 0 и таа постепено опаѓа кон Степен 3 каде смртноста е најмала. Времето на преживување е најкратко во Степен 0 и тоа постепено расте кон Степен 3 каде пациентите имаат најдолго просечно време на преживување. Според тоа доколку ја цениме густината на CAFs, пациентите кај кои CAFs не се идентификувани најмногу умираат и најкратко живеат. Интересно е она што може дополнително да се воочи доколку го анализираме одвоено Степен 2 (фокална дистрибуција) е дека во овој степен смртноста е најмала, но пак и просечното време на преживување е најкратко. Спротивни резултати на нашите објавиле автори кои утврдиле асоцираност на високата густина на CAFs со лоша прогноза на пациентите кај орален карцином (33, 43, 64, 106). Клиничките студии демонстрирале силна асоцијација помеѓу инфилтрација на туморите со TAMs и лоша прогноза кај различни малигнитети, сугерирајќи дека силен инфламаторен одговор во TME е важен за прогресија на малигнитетот (107, 108).

Jung et al. (108) ја испитувале густината на TAMs во човечки ткива со microarray технологија од 14 различни типови на човечки карциноми и нормално ткиво од тироидна жлезда, бели дробови и града. Тие заклучиле дека канцерите со голема густина на TAMs како што се оној на панкреас, бели дробови, анапластичен тироиден карцином и жолчно ќесе, се асоцирани со мало преживување.

Нашите анализи покажаа дека поголема смртност и пократко време на преживување имаше кај пациентите во групата со високи вредности на TAMs во строма, како и во некои други студии (17), но немаше сигнификантна разлика на просечното време на преживување помеѓу групата со високи и ниски вредности (43, 73).

Во однос на TAMs во гнездото, смртноста процентуално е поголема кај пациентите во групата со ниски вредности, но и времето на преживување е подолго во таа група (73, 75). Споредбата меѓу просечното време на преживување во двете групи не укажа на постоење сигнификантна разлика.

Забележливо е дека, иако несигнификантно, просечното време на преживување е подолго кај пациентите од групите со ниски вредности на TAMS во строма и гнездо. Нашиот резултат е инверзен од оној кој го објавил Ohri и соработниците (109). Тој демонстрирал дека дека кај пациентите со non-small cell карциноми на бели дробови (NSCLC) со голема густина на TAMs во гнезда постои маркантна предност во подолго преживување. Целта на неговата студија била одредување на имунолошкиот фенотип на NSCLC – асоцирани макрофаги. Густината на CD68+ макрофаги кои вршат експресија на цитотоксичен M1 фенотип или не-цитотоксичен M2 фенотип била маркантно зголемена во гнездата во групата пациенти кои имале продолжено време на преживување, но предоминирал M1 цитотоксичен фенотипот. Предноста во преживувањето која се должела на големата инфилтрација на туморските гнезда со M1 фенотипот, веројатно се должела на нивната анти-туморска цититоксична активност.

5. 7. 5. Cox Proportional Hazard модел – OSCC преживување

Униваријантната анализа на преживување користејќи го Cox Proportional модел со кој ја анализиравме поврзаноста на преживувањето со 16 селектирани параметри (пол, возраст, T и N-статус, TNM, G, LI, PnI, ресекциона ивица (негативна R0/позитивна R1), релапс на болест (RB), вид на релапс на болест (VRB), број на локални рецидиви и број на LNM, CAFs, и TAMs во TS/TN, покажа дека од сите 16 параметри сигнификантна асоцијација на преживувањето постоеше само со RB, број на локални рецидиви и број на LNM. Притоа сите три параметри асоцираа со лоша прогноза односно се покажаа како лоши прогностички знаци.
Останатите параметри, меѓу кои и CAFs и TAMs не асоцираа сигнификантно со преживувањето на нашите пациенти, односно преживувањето не зависеше од присуството или отсуството на овие клетки, ниту пак од нивната густина. Овој наод е спротивен од наодите на многумина автори (36,43, 63, 64, 70, 73, 74, 77, 84, 86). Контроверзни се податоците во литературата во однос на прашањето како возраста влијае на преживувањето, односно дали прогнозата е различна за помладите и постарите пациенти (28).

Некои студии објавиле првични анализи за статистичка релевантност на вратните метастази и позитивните ресекционите ивици (R1) како параметри кои влијаат на лошото преживување на пациентите со OSCC (2, 44). Нашиот резултат е идентичен со резултатот на авторите кои потврдиле дека N+ вратен статус е најважен прогностички фактор за OSCC, при што кај овие пациенти се намалува стапката на преживување за 50%. Сеуште постојат контроверзи во литературата во однос на статусот на хируршките маргини (110, 111). Спротивно на нашата студија, Thomas et al. (84) докажал силна асоцираност помеѓу хистолошкиот степен и преживувањето кај пациентите во прв и втор стадиум на орален карцином, при што полошо диференцираните тумори дури и во раните стадиуми на карциномот се асоцирани со полошо преживување. Во неговата студија, хистолошкиот степен имал независна прогностичка вредност заедно со TNM. Врз основа на неговите резултати, тој препорачал дека треба да се земе во обзир хистолошкиот степен при донесување одлуки за третман, а мултиваријантните модели за преживување треба да го вклучат хистолошкиот степен како коваријабла за подобрување на прогностичката прецизност. Студии кои ја евалуирале PnI како прогностички онколошки фактор кај OSCC утврдиле асоцираност на PnI со преживувањето објаснувајќи дека позитивен наод во извештајот на патолозите укажува на постоење изразен ризик за рекурентност на туморот (85). Висока асоцираност на PnI и LI со лошото преживување објавиле и Arora et al. (34) и Ting et al. (35).

Сите три параметри и тоа релапс на болеста, број на локални рецидиви и број на вратни метатстази во мултиваријантниот пропорционален модел несигнификантно асоцираа со летален исход т.е. несигнификантно допринесуваа за летален исход. Но, сепак забележливо е дека бројот на локалните рецидиви и бројот на вратни метастази сепак гранично несигнификантно позитивно асоцираат со смртниот исход.
Troiano (112) спровел опсежен систематски преглед низ литературата и мета-анализа со цел да ги синтетизира сите достапни податоци од објавената литература за улогата на CD68+ и CD163+ TAMs во строма и гнезда како прогностички фактори за OS на пациентите со планоцелуларни карциноми на главата и вратот (SCCHN). Неговата анализа била спроведена согласно препораките на Прирачникот на Cochrane и на претпочитаните ставки за известување за систематски прегледи и мета-анализи (PRISMA). Наодите од оваа студија открија дека панмакрофагниот маркер CD68 немал прогностичка вредност кај пациентите со SCCHN, а со тоа и немал потенцијал за идна клиничка употреба, додека CD163+ M2 –TAMs е предиктор за лоша прогноза. Се подразбира дека се потребни понатамошни стандардизирани студии за да се потврдат неговите, но и нашите резултати во кои ја отфрламе предиктивната улога на CD68+ TAMs.

Анализа на преживувањето и Cox мултиваријантната анализа во студијата на Yahui Yu et al. (98) покажала дека ризик групата која се базира на ниво на експресија на α-SMA е независен предиктор за преживувањето на пациентите со назофарингеален карцином, но не и CD68. Одредувањето на независните предиктори на преживувањето е исклучително важно заради индивидуализирање на третманот на овие пациенти. Inoue et al. (53) во својата имунохистохемиска студија сугерира употребата на podoplaninot како други, понови маркери на CAFs кои имат прогностичка

сигнификантност кај оралниот планоцелуларен карцином. Досегашните маркери во употреба, сепак не се уникатни за овој тип на клетки од причина што и останатите клетки во туморот вршат нивна експресија, со што повторно се потврдува пластицитетот на стромалните клетки, а добиените резултати не се стандардизирани (54).

5.7.6. Предиктивна улога на CAFs, TAMs и други параметри за морталитет од OSCC

Униваријантната логистичка регресиона анализа со која ја анализиравме предиктивната улога на 16-те параметри за морталитет од орален карцином во нашето истражување, укажа дека само двата параметри и тоа бројот на локални рецидиви и бројот на вратни метастази се јавуваат како сигнификантни предиктори за морталитет од орален карцином. Ниеден од останатите параметри, меѓу кои и CAFs и TAMs, не беа потврдени како сигнификантни предиктори за морталитет од орален карцином.

Двата параметри, и тоа број на локални рецидиви и број на метастази, во мултипла логистичка регресија се издвоија како независни предиктори за морталитет од орален карцином. Анализата покажа дека со единица зголемување на локалните рецидиви сигнификантно се зголемуваше веројатноста за морталитет за 6 пати, а со единица зголемување на бројот на вратни метастази сигнификантно се зголемуваше веројатноста за морталитет за 19 пати.

Спротивни резултати од нашите во однос на предиктивната улога на CAFs објавиле автори кои демонстрирале дека α-SMA-позитивна строма е најсилен независен предиктор за морталитет од орален карцином (51, 104). Сепак, за разлика од нашиот метод за евалуација на CAFs, тие користеле друг метод за проценка на експресија на α-SMA според степенот на стромален позитивитет.Тие нашле дека високата стромална експресија на α-SMA која индицира миофибробластна трансдиференцијација, дава најсигнификантен допринос во стапката на опасност (HR-hazard ratio), односно асоцираност со смртта, независно од стадиумот на болеста. Функционалните испитувања покажале дека малигните клетки во оралниот карцином можат да ја модулираат миофибробластната трансдиференцијација и дека миофибробластите ја помагаат инвазијата на малигните клетки. Прогностичкиот модел во студијата на Marsh et al. (104) покажал дека само експресија на α-SMA, метастазите и возраста се прогностички сигнификантни, TNM стадиумите имаат лимитирана прогностичка вредност, а позитивната α-SMA строма е најсилен предиктор за морталитет кај орален карцином.

Врз основа на добиените резултати заклучивме дека, ниту интратуморските ниту перитуморските TAMs во примероците на OSCC на различни локализации, не се покажаа како независни прогностички фактори за севкупното преживување (OS) на пациентите со OSCC, и дека е потребно поопсежно истражување за да се потврди дали навистина овие предиктивни индикатори потврдени во нечии истражувања може да ги примениме во нашата клиничка пракса (17, 70). Корелацијата помеѓу инфилтрација со TAMs и прогнозата се разликува помеѓу туморите на различни локализации. Наодите на различни автори се инконзистентни, од предиктори на лоша прогноза кај карциноми на града, карцином на грло на матка, и карцином на жолчка, до предиктори на добра

прогноза при нивна идентификација во туморското ткиво на карциноми на простата, бели дробови или мозок (113-118).

Неколку имунохистохемиски маркери се достапни за евалуација на TAMs. CD68 е познат како пан-макрофаген маркер и помага во идентификација заедно и на M1 и на M2 макрофаги. Недостаток на сигурен маркер за M1 макрофагите претставува предизвик во студиите кои ги истражуваат макрофагите, и се чини дека една од причините заради инконзистентните резултати е што и M1 и M2 макрофагите имаат слична експресија на CD68 (119).

5.7.7. Преживување без болест (DFS) и CAFs и TAMs

Четири студии беа евалуирани за DFS во мета-анализата на Dourado и соработниците (120). Нивните резултати индицираа дека висока густина на CAFs демонстрира неповолен DFS, сугерирајќи дека CAFs може да се смета за корисен прогностички биомаркер и терапевтски маркер кај орален карцином. Инфилтрацијата на карциномот со голем број TAMs во TS не корелирала со DFS, но инфилтрацијата во TN корелирала со неповолен DFS, па макрофагите во туморското гнездо се покажале како независен прогностички фактор за DFS кај IBC (73). Кај назофарингеален карцином нивната густина и во TN и во TS се покажале како независни прогностички фактори за DFS (17). Во нашата студија средното преживување без болест (DFS) не покажа статистичка значајност во однос на густината на CAFs во строма, густина на TAMs во строма ниту пак во гнездо во анализираната група на пациенти.

Разбирањето на TME е важно за целосно разбирање на биолошките особини на карциномот, и откривање на потенцијалните таргети за уништување на туморот (121). Сознанието дека малигните клетки се во динамична состојба на менување на фенотипот кон мезенхимална диференцијација, се објаснува парцијалниот одговор на оралниот планоцелуларен карцином кон рутинскиот антиканцерски третман, имплицирајќи дека идните антиканцерски терапии треба да ги таргетираат стромалните конституенси, а не само да се фокусираат на „конвенционалните канцерски клетки“. Бидејќи многу студии сугерираат дека TAMs директно ја помага туморската прогресија и е асоциран со лошо преживување, претпоставуваме дека редуцирање на нивниот број или количината на TNF-α кој што го произведуваат може да биде ефективен третман за контрола на туморската прогресија (122). Исто така, откривање на агенси за блокирање на TAMs, или репрограмирање на TAMs од M2 (про – туморски) кон M1 (анти – туморски) фенотип би помогнало во контрола на болеста, зголемување на преживувањето, и намалување на смртноста (121, 122).

6. ПРИМЕНА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО

Сеуште е незадоволителен напредокот во истражувањата кој се однесува на биомаркерите специфични за оралниот планоцелуларниот карцином. Оттаму, се наметнува потребата од проспективни анализи за нивна идентификација заради скрининг и идентификација на индивидуи кои се во ризик за развој на примарен карцином и идентификација на агресивни тумори со рецидивантни особини кои имаат лоша прогноза.

Добиените резултати од нашата студија заедно со резултатите од другите студии даваат релевантни научни податоци за влијанието на елементите од туморската микросредина врз биолошкото однесување и агресивноста на оралниот планоцелуларен карцином, и покрај фактот што сеуште нема стандардизиран метод за нивна проценка. Воедно, ја испитувавме нивната меѓусебната поврзаност и меѓусебното влијание, но и влијание врз преживувањето и смртниот исход со останатите фактори кои се детерминирани како прогностички фактори на овој карцином.

Студирајќи ги внимателно истражувањата објавени низ достапната литература, ги воочивме нивните недостатоци, но и предности. Исто така, со висока доза на критичност и педантност ги потенцираме предностите и недостатоците на нашата студија.

Клиничката примена на нашите резултати ја гледаме како уште една потврда за потребата од радикалност во хируршкиот третман на OSCC.

Исто така, мноштвото добиени сигнификантни резултати за CAFs како конститутивен елемент на TME, ни даваат за право да дадеме високи препораки за понатамошни проспективни истражувања дизајнирани на начин на кој воочените недостатоци во студиите објавени во литературата и воочени во нашата студија би се отстраниле, а со нивно надминување би се добиле податоци кои несомнено би дале свој значаен придонес на ова поле на истражување и би внеле епски напредок во мултимодалниот менаџмент на оралниот планоцелуларен карцином.

7. ЗАКЛУЧОК

На основа на добиените резултати од истражувањето ги донесовме следниве заклучоци:

1. Не се идентификувани CAFs во сите примероци со орален планоцелуларен карцином. CAFs не се идентификувани во ниту еден примерок на нормална орална мукоза во контролната група.

2. Постои сигнификантна асоцијација на густината на CAFs со Т-статус, N-статус и стадиумот на болеста (TNM). Сигнификантно е поголем бројот на пациентите со карцином на јазик кои имаат CAFs наспроти оние кои немаат CAFs.

   Не утврдивме сигнификантна разлика помеѓу густините на TAMs во TS и TN и клиничко-патолошките параметри;

3. CAFs и TAMs не асоцираа сигнификантно со рецидивантноста на оралниот карцином (DFS). Сепак, при појава на локален рецидив сигнификантно беа позастапени пациентите кои имаа CAFs наспроти пациентите кои немаа CAFs, и постои сигнификантна линеарна позитивна корелација на TAMs во TS со бројот на вратни LNM по првиот третман.
4. CAFs и TAMs не асоцираа сигнификантно со преживувањето (OS).

Заклучоците донесени во студијата се во рамките на нејзините ограничувања и предности. Прво, лимитираноста на моделот на нашата студија се однесува на ретроспективниот дел од дизајнот што наметнува потешкотии во реализацијата. Второ, пациентите вклучени во студијата беа домицилно население во државата, но со различно етничко потекло без да имаме податоци дали етничкото потекло е асоцирано со одредени имунолошки карактеристики. Трето, хируршките интервенции не се реализирани од еден хирург, а кај некои пациенти отстапувањето од стриктниот оперативен протокол било одредено од општата здравствена состојба. Истото се однесуваше и на постоперативната онколошка адјувантна терапија. Четврто, експресијата на CD68 не може да ги диференцира подтиповите M1 и M2 на TAMs, па се наметнува потребата од понатамошни студии дизајнирани да употребат сигурни и специфични маркери за M1 и M2 заради попрецизна анализа. Петто слабостите на оваа студија можат да се должат и заради лажно позитивни/лажно негативни резултати при операционализација со ткивните примероци.

Јачината на оваа студија се огледа во строго почитување на инклузионите и ексклузионите критериуми, и стандардизиран хируршки третман на пациентите во еден центар кој е најголем центар за хируршки третман на орални планоцелуларни карциноми во нашата држава. Педантното собирање на податоци, и строгите

инклузиони и ексклузиони критериуми ја прават оваа студија високо релевантна во однос на резултатите и заклучоците.

Нашите заклучоци укажуваат дека локалниот рецидив и вратните метастази по третманот се главни причини за неуспех во третманот на пациентите со планоцелуларен карцином во усна шуплина, а бројот на релапсите ги зголемува шансите за смртен исход.

Исто така, заклучивме дека CAFs може да биде корисно дополнување на дијагностичките критериуми на OSCC и може да помогне во подобро разбирање на механизмот на прогресија и предвидување на агресивноста на карциномот, но сеуште не би можел да се предложи како патолошки параметар во стандардизиран патолошки извештај за орален планоцелуларен карцином. За да се добијат поверодостојни резултати, потребни се проспективни анализи и надминување на горенаведените недостатоци.

Напредокот во традиционалниот третман на OSCC (хируршки третман, радиотерапија, хемотерапија) не успеа да го подобри преживувањето на овие пациенти, а во исто време досегашните третмани се асоцирани со значителни несакани ефекти. Предвидување на прогнозата сеуште зависи од класични параметри, иако многу биомаркери се предложени како потенцијални прогнозери за OSCC.Низ годините, повеќе туморски биомаркери се предложени за предвидување на прогнозата на пациентите со OSCC, но имајќи ги во предвид недостатоците на студиите, овие молекули сеуште се во категоријата на потенцијални биомаркери.

Најновите истражувања ја предлагаат имунотерапијата како ефективна опција за третман на OSCC. Хипотезата за имунотерапијата се базира на теорија која е воведена пред еден век и која подразбира способност на имуниот систем да ги потисне канцерските клетки и да помогне во опоравок на пациентот. Потребата од развој на полето на канцерската имунотерапија беше предочена при доделувањето на Нобеловата награда за Физиологија и Медицина за развој на такви терапии во 2018 година. За OSCC, имунотерапијата беше прво одобрена за рекурентни/метастатски случаи (слично како за други канцери на глава и врат). Неоадјувантната имунотерапија администрирана преоперативно е неодамна воведена за пациенти со нетретиран OSCC. За да ја процениме успешноста на имунотерапијата во третманот на OSCC, важно е да се пронајде предиктивен имун биомаркер преку кој ќе го следиме одговорот на карциномот кон овој најнов третман на OSCC, а тоа несомнено ја наметнува потребата од дополнителни истражувања во подобро дизајнирани клинички студии.

8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. Int J Cancer. 2010 Dec 15;127(12):2893-917. doi: 10.1002/ijc.25516. PMID: 21351269.

2. Montoro JRMC, Hicz HA, de Souza L, Livingstone D, Melo DH, Tiveron RC, Mamede RCM. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Braz J Otorhinolaryngol. 2008 Nov-Dec;74(6):861-866. doi: 10.1016/S1808-8694(15)30146-4. Erratum in: Braz J Otorhinolaryngol. 2010 Feb;76(1):139.

3. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer Metastasis Rev. 1989 Aug;8(2):98-101.

4. Faustino Suárez-Sánchez FJ, Lequerica-Fernández P, Suárez-Canto J, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Domínguez-Iglesias F, García-Pedrero JM, de Vicente JC. Macrophages in Oral Carcinomas: Relationship with Cancer Stem Cell Markers and PD-L1 Expression. Cancers (Basel). 2020 Jul 2;12(7):1764.

5. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. Nat Rev Cancer. 2004;4(11):839–49.

6. Zainab H, Sultana A, Shaimaa. Stromal desmoplasia as a possible prognostic indicator in different grades of oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Pathol. 2019;23(3):338-343.

7. Bremnes RM, Dønnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, et al. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: Emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2011;6:209–17.

8. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Nishimoto I, Kowalski LP, Coletta RD Myofibroblasts in the stroma of oral squamous carcinoma are 9. associated with poor prognosis. Histopathology. 2007 Dec;51(6):849-53.

9. Wang Y, Jing Y, Ding L, Zhang X, Song Y, Chen S, Zhao X, Huang X, Pu Y, Wang Z, Ni Y, Hu Q. Epiregulin reprograms cancer-associated fibroblasts and facilitates oral squamous cell carcinoma invasion via JAK2-STAT3 pathway. J Exp Clin Cancer Res. 2019 Jun 24;38(1):274.

10. Zhang, JY., Zhu, WW., Wang, MY. et al. Cancer-associated fibroblasts promote oral squamous cell carcinoma progression through LOX-mediated matrix stiffness. J Transl Med 19, 513 (2021).

11. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies.Cancer Cell. 2013 Mar 18;23(3):277-86.

12. Xiao M, Zhang J, Chen W, Chen W. M1-like tumor-associated macrophages activated by exosome-transferred THBS1 promote malignant migration in oral squamous cell carcinoma. J Exp Clin Cancer Res. 2018;37(1):143. Published 2018 Jul 9.

13. Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. PLoS One. 2013 Nov 15;8(11):e80908

14. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski MA. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in Cryptococcus neoformans infection. mBio. 2013 Jun 18;4(3):e00264-13.

15. Li C, Shintani S, Terakado N, Nakashiro K, Hamakawa H. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2002 Nov-Dec;9(6):1219-23.

16. Polverini PJ. Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases. EXS. 1997; 79: 11– 28.

17. Lin JY, Li XY, Tadashi N, Dong P. Clinical significance of tumor-associated macrophage infiltration in supraglottic laryngeal carcinoma. Chin J Cancer. 2011 Apr;30(4):280-6.

18. Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 1998; 4: 585– 593.

19. Evrard D, Szturz P, Tijeras-Raballand A, Astorgues-Xerri L, Abitbol C, Paradis V, Raymond E, Albert S, Barry B, Faivre S. Macrophages in the microenvironment of head and neck cancer: potential targets for cancer therapy. Oral Oncol. 2019 Jan;88:29-38.

20. Green, C. E., Liu, T., Montel, V., Hsiao, G., Lester, R. D., Subramaniam, S., Gonias, S. L., & Klemke, R. L. (2009). Chemoattractant signaling between tumor cells and macrophages regulates cancer cell migration, metastasis and neovascularization. PloS one, 4(8), e6713.

21. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. AJCC cancer staging manual (7th ed). New York, NY: Springer; 2010.

22. American Joint Committee on Cancer. (2002). Lip and Oral Cavity. In: , et al. AJCC Cancer Staging Manual. Springer, New York, NY.

23. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol. 2010 Jun;17(6):1471-4.

24. Lydiatt, W.M., Patel, S.G., O'Sullivan, B., Brandwein, M.S., Ridge, J.A., Migliacci, J.C., Loomis, A.M. and Shah, J.P. (2017), Head and neck cancers—major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 67: 122-137.

25. Dhruv Jain, MD, Chandrashekhar Dravid, MS, Abha Singla, MD, Smita Kumari, DNB, Rajesh Kumar Grover, MD, Comparison of the Seventh and Eighth Editions of the American Joint Committee on Cancer pT and pN Classifications as Predictors of Survival in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma, American Journal of Clinical Pathology, Volume 151, Issue 3, March 2019, Pages 292–301.

26. Piazza, Cesare; Montalto, Nausica; Paderno, Alberto; Taglietti, Valentina; Nicolai, Piero Is it time to incorporate 'depth of infiltration' in the T staging of oral tongue and floor of mouth cancer?, Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery: April 2014 - Volume 22 - Issue 2 - p 81-89.

27. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, et al. (Eds.). AJCC Cancer Staging Manual (8th edition). Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017.

28. Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, Hernandez-Prera JC, Suárez C, Kowalski LP, Ferlito A, Leivo I. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. Oral Oncol. 2020 Aug;107:104799.

29. P.A. Jakobsson, C.M. Eneroth, D. Killander, G. Moberger, B. Martensson. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. Acta Radiol Ther Phys Biol, 12 (1973), pp. 1-

30. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. Scand J Dent Res. 1987 Jun;95(3):229-49.

31. M. Bryne, H.S. Koppang, R. Lilleng, A. Kjaerheim. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. J Pathol, 166 (1992), pp. 375-

32. El-Naggar AK, Chan J, Grandis J, Takata T, Slootweg P. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed.; 2017. p. 105–111

33. Thode C, Jørgensen TG, Dabelsteen E, Mackenzie I, Dabelsteen S. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. Journal of oral pathology & medicine. 2011 Mar;40(3):201-7.

34. A. Arora, N. Husain, A. Bansal, A. Neyaz, R. Jaiswal, K. Jain, et al. Development of a new outcome prediction model in early-stage squamous cell carcinoma of the oral cavity based on histopathologic parameters with multivariate analysis: the aditi-nuzhat lymph-node prediction score (ANLPS) system. Am J Surg Pathol, 41 (2017), pp. 950-960

35. Ting, KC., Lee, TL., Li, WY. et al. Perineural invasion/lymphovascular invasion double positive predicts distant metastasis and poor survival in T3–4 oral squamous cell carcinoma. Sci Rep 11, 19770 (2021).

36. Yang X, Tian X, Wu K, Liu W, Li S, Zhang Z, Zhang C. Prognostic impact of perineural invasion in early stage oral tongue squamous cell carcinoma: Results from a prospective randomized trial. Surg Oncol. 2018 Jun;27(2):123-128.

37. da Silva SD, Kowalski LP. Perineural invasion in oral cancer: challenges, controversies and clinical impact. Chin Clin Oncol. 2019 Oct;8(S1):S5.

38. Varsha BK, Radhika MB, Makarla S, Kuriakose MA, Kiran GS, Padmalatha GV. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: Case series and review of literature. J Oral Maxillofac Pathol. 2015 Sep-Dec;19(3):335-41.

39. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Head and neck cancer.Version 1.2021.Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/ https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/ (Accessed on January 29, 2020).

40. Sharma, K., Ahlawat, P., Gairola, M., Tandon, S., Sachdeva, N., & Sharief, M. I. (2019). Prognostic factors, failure patterns and survival analysis in patients with resectable oral squamous cell carcinoma of the tongue. Radiation oncology journal, 37(2), 73–81.

41. Barttelbort SW, Ariyan S. Mandible preservation with oral cavity carcinoma: rim mandibulectomy versus sagittal mandibulectomy. Am J Surg. 1993 Oct;166(4):411-5.

42. Joo, Y. H., Cho, J. K., Koo, B. S., Kwon, M., Kwon, S. K., Kwon, S. Y., Kim, M. S., Kim, J. K., Kim, H., Nam, I., Roh, J. L., Park, Y. M., Park, I. S., Park, J. J., Shin, S. C., Ahn, S. H., Won, S., Ryu, C. H., Yoon, T. M., Lee, Chung, P. S. (2019). Guidelines for the Surgical Management of Oral Cancer: Korean Society of Thyroid-Head and Neck Surgery. Clinical and experimental otorhinolaryngology, 12(2), 107–144.

43. Fujii N, Shomori K, Shiomi T, Nakabayashi M, Takeda C, Ryoke K, Ito H. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. J Oral Pathol Med. 2012 Jul;41(6):444-51.

44. Fielding LP, Fenoglio-Preiser CM, Freedman LS. The future of prognostic factors in outcome prediction for patients with cancer. Cancer. 1992 Nov;70(9):2367–77

45. Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. Cancer. 1990 Jul 1;66(1):109-13.

46. Ho CM, Lam KH, Wei WI, Lau WF. Treatment of neck nodes in oral cancer. Surg Oncol. 1992 Feb;1(1):73

47. de-Assis EM, Pimenta LG, Costa-e-Silva E, Souza PE, Horta MC. Stromal myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012 Sep 1;17(5):e733-8.

48. Johansson, Magnus et al. "Polarized immune responses differentially regulate cancer development." Immunological reviews vol. 222 (2008): 145-54.

49. Chaudhary M, Gadbail AR, Mugdha G, P. Mankar P (Gadbail), Shailesh M. Gondivkar SM, Gawande M, Patil S. Comparison of Myofibroblasts Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma, Verrucous Carcinoma, High Risk Epithelial Dysplasia, Low Risk Epithelial Dysplasia and Normal Oral MucosaHead Neck Pathol. 2012 Sep; 6(3): 305–313.

50. Kapse SC, Rathod N, Baad R, Mandlik J, Sharma AS, Bommanavar S.Quantitative assessment of myofibroblast in severe dysplasia, microinvasion and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study.J Contemp Dent Pract. 2013 Jan 1;14(1):34-8.

51. Gupta K, Metgud R, Gupta J. Evaluation of stromal myofibroblasts in oral leukoplakia, oral submucous fibrosis, and oral squamous cell carcinoma--an immunohistochemical study.J Cancer Res Ther. 2015 Oct-Dec;11(4):893-8.

52. Skalli O., Ropraz P., Trzeciak A., Benzonana G., Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation.J Cell Biol. 1986 Dec;103(6 Pt 2):2787-96.

53. Inoue H, Tsuchiya H, Miyazaki Y, Kikuchi K, Ide F, Sakashita H, Kusama K. Podoplanin expressing cancer-associated fibroblasts in oral cancer. Tumour Biol. 2014 Nov;35(11):11345-52.

54. Augsten M. Cancer-Associated Fibroblasts as Another Polarized Cell Type of the Tumor Microenvironment. Front Oncol. 2014; 4: 62.

55. Cintorino M, Bellizzi de Marco E, Leoncini P, Tripodi SA, Xu LJ, Sappino AP, Schmitt-Gräff A, Gabbiani G. Expression of alpha-smooth-muscle actin in stromal cells of the uterine cervix during epithelial neoplastic changes. Int J Cancer. 1991 Apr 1;47(6):843-6.

56. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, Coletta RD. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. Oral Oncol. 2008 May;44(5):509-17.

57. Vered M,Dobriyan A, Dayan D, et al. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. Cancer Sci 2010; 101:274-80.

58. Jia, C. C., Wang, T. T., Liu, W., Fu, B. S., Hua, X., Wang, G. Y., Li, T. J., Li, X., Wu, X. Y., Tai, Y., Zhou, J., Chen, G. H., & Zhang, Q. (2013). Cancer-associated fibroblasts from hepatocellular carcinoma promote malignant cell proliferation by HGF secretion. PloS one, 8(5), e63243.

59. Vered M, Dayan D, Yahalom R, Dobriyan A, Barshack I, Bello IO, Kantola S, Salo T. Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2010 Sep 1;127(6):1356-62.

60. Etemad-Moghadam S, Khalili M, Tirgary F, Alaeddini M. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2009 Sep;38(8):639-43.

61. Rao, Sowmya J et al. “Immunohistochemical analysis of stromal fibrocytes and myofibroblasts to envision the invasion and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma.” Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP vol. 21,2 (2017): 218-223.

62. Smitha A, Rao K, Umadevi HS, Smitha T, Sheethal HS, Vidya MA. Immunohistochemical study of α-smooth muscle actin expression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Pathol. 2019 Jan-Apr;23(1):59-64.

63. Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal Myofibroblasts Accompany Modifications in the Epithelial Phenotype of Tongue Dysplastic and Malignant Lesions. Cancer Microenviron. 2009 Dec; 2(1): 49–57.

64. Lim KP, Cirillo N, Hassona Y, Wei W, Thurlow JK, Cheong SC, Pitiyage G, Parkinson EK, Prime SS. Fibroblast gene expression profile reflects the stage of tumour progression in oral squamous cell carcinoma. J Pathol. 2011 Mar;223(4):459-69.

65. Akrish SJ, Rachmiel A, Sabo E, Vered M, Ben-Izhak O. Cancer-associated fibroblasts are an infrequent finding in the microenvironment of proliferative verrucous leukoplakia-associated squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2017 May;46(5):353-358.

66. De Wever O, Mereel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. J Pathol 2003;200:429-47.

67. Hu Y1 et al. Tumor-associated macrophages correlate with the clinicopathological features and poor outcomes via inducing epithelial to mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. J ExpClin Cancer Res. 2016 Jan 15;35:12.

68. SeminerioI, et al. High infiltration of CD68+ macrophages is associated with poor prognoses of head and neck squamous cell carcinoma patients and is influenced by human papillomavirus. Oncotarget. 2018 Feb 16; 9(13): 11046–11059.

69. Liu SY, Chang LC, Pan LF, Hung YJ, Lee CH, Shieh YS. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2008 Mar;44(3):277-85.

70. Marcus B, Arenberg D, Lee J, Kleer C, Chepeha DB, Schmalbach CE, Islam M, Paul S, Pan Q, Hanash S, Kuick R, Merajver SD, Teknos TN.Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Cancer. 2004 Dec 15;101(12):2779

71. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, Qian H, Xue XN, Pollard JW. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. Cancer Res. 2006 Dec 1;66(23):11238-46. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1278.

72. Chen SJ, Zhang QB, Zeng LJ, Lian GD, Li JJ, Qian CC, Chen YZ, Chen YT, Huang KH. Distribution and clinical significance of tumour-associated macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma: a retrospective analysis in China. Curr Oncol. 2015 Feb;22(1):e11-9.

73. Jeong H, Hwang I, Kang SH, Shin HC, Kwon SY. Tumor-Associated Macrophages as Potential Prognostic Biomarkers of Invasive Breast Cancer. J Breast Cancer. 2019;22(1):38-51. Published 2019 Jan 2.

74. Sun, Shujun et al. “The Expression and Relationship of CD68-Tumor-Associated Macrophages and Microvascular Density With the Prognosis of Patients With Laryngeal Squamous Cell Carcinoma.” Clinical and experimental otorhinolaryngology vol. 9,3 (2016): 270-7.

75. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Høyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. J Clin Oncol. 2009;27:3330–3337.

76. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck. 2016;38(7):1074–84.

77. Ni YH, Ding L, Huang XF, Dong YC, Hu QG, Hou YY. Microlocalization of CD68 tumor-associated macrophages in tumor stroma correlated with poor clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. Tumour Biol. 2015;36(7):5291–8.

78. Mendoza M, Khanna C. Revisiting the seed and soil in cancer metastasis. Int J Biochem Cell Biol 2009; 41: 1452–62.

79. Herrera, M., Berral-González, A., López-Cade, I. et al. Cancer-associated fibroblast-derived gene signatures determine prognosis in colon cancer patients. Mol Cancer 20, 73 (2021).

80. Hashimoto O, Yoshida M, Koma Y, Yanai T, Hasegawa D, Kosaka Y, Nishimura N, Yokozaki H. Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development. J Pathol. 2016 Oct;240(2):211-23.

81. Comito G, Giannoni E, Segura CP, Barcellos-de-Souza P, Raspollini MR, Baroni G, Lanciotti M, Serni S, Chiarugi P. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. Oncogene. 2014 May 8;33(19):2423-31.

82. Miyake M, Hori S, Morizawa Y, Tatsumi Y, Nakai Y, Anai S, Torimoto K, Aoki K, Tanaka N, Shimada K, Konishi N, Toritsuka M, Kishimoto T, Rosser CJ, Fujimoto K. CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. Neoplasia. 2016 Oct;18(10):636-646.

83. Adel, Mohamad et al. “Evaluation of Lymphatic and Vascular Invasion in Relation to Clinicopathological Factors and Treatment Outcome in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma.” Medicine vol. 94,43 (2015): e1510.

84. Thomas B, Stedman M, Davies L. Grade as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma: a population-based analysis of the data. Laryngoscope. 2014 Mar;124(3):688-94.

85. Spoerl, S.; Spoerl, S.; Reil, S.; Gerken, M.; Ludwig, N.; Taxis, J.; Fischer, R.; Ettl, T.; Reichert, T.E.; Spanier, G. Prognostic Value of Perineural Invasion on Survival and Recurrence in Oral Squamous Cell Carcinoma. Diagnostics 2022, 12, 1062.

86. Fang, J., Li, X., Ma, D. et al. Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. BMC Cancer 17, 375 (2017).

87. Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. J Oral Maxillofac Pathol. 2011 May;15(2):168-76.

88. Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. Am J Surg Pathol. 1998 Feb;22(2):141-7.

89. Seifi S, Shahriar S, Ensieh S, Sayed MS, Hamid RG. Evaluation of á-SMA positive myofibroblasts in oral epithelial cell carcinoma, oral epithelial dysplasia and hyperkeratosis. J Mash Dent Sch 2010;33:321-30

90. Barth PJ, Schenck zu Schweinsberg T, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes, alpha-smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. Virchows Arch. 2004 Mar;444(3):231-4.

91. Shimasaki N, Kuroda N, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Hiroi M, Enzan H, Shuin T. The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness. Histol Histopathol. 2006 Apr;21(4):349-53.

92. Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. J Clin Pathol. 2003;56(4):271-276.

93. Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss C, Márton IJ. Oral cancer report from Northeastern Hungary. Pathol Oncol Res. 2008 Mar;14(1):85-92.

94. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. The pathology of tumor stromatogenesis. Cancer Biol Ther. 2007;6(5):639-45.

95. Li H, Zhang J, Chen SW, et al. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. J Transl Med 2015; 13; 198.

96. Chen J, Yang P, Xiao Y, Zhang Y, Liu J, Xie D, Cai M, Zhang X. Overexpression of α-sma-positive fibroblasts (CAFs) in Nasopharyngeal Carcinoma Predicts Poor Prognosis. J Cancer. 2017 Oct 23;8(18):3897-3902.

97. El-naggar, H., El Nouaem, M., Darwish, Z., Swaify, G., Essawy, M. (2021). Role of myofibroblasts in the primary lesions and lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. Alexandria Dental Journal, 46(3), 78-84.

98. Yu Y, Ke L, Lv X, Ling YH, Lu J, Liang H, Qiu W, Huang X, Liu G, Li W, Guo X, Xia W, Xiang Y. The prognostic significance of carcinoma-associated fibroblasts and tumor-associated macrophages in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Manag Res. 2018 Jul 9;10:1935-1946.

99. Ribatti D, Crivellato E. Immune cells and angiogenesis. J Cell Mol Med. 2009;13(9A):2822-2833.

100. Weber M, Büttner-Herold M, Hyckel P, Moebius P, Distel L, Ries J, Amann K, Neukam FW, Wehrhan F. Small oral squamous cell carcinomas with nodal lymphogenic metastasis show increased infiltration of M2 polarized macrophages--an immunohistochemical analysis. J Craniomaxillofac Surg. 2014 Oct;42(7):1087-94.

101. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, Inagawa H, et al. Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. Anticancer Res. 2004;24:3335–3342.

102. Bolat F, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Yagmurdur MC, Bal N, Demirhan B. Microvessel density, VEGF expression, and tumor-associated macrophages in breast tumors: correlations with prognostic parameters. J Exp Clin Cancer Res. 2006 Sep;25(3):365-72.

103. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. Cancer Res. 2004 Oct 1;64(19):7022-9.

104. Fuyuhiro Y, Yashiro M, Noda S, Kashiwagi S, Matsuoka J, Doi Y, Kato Y, Muguruma K, Sawada T, Hirakawa K. Myofibroblasts are associated with the progression of scirrhous gastric carcinoma. Exp Ther Med. 2010 Jul;1(4):547-551.

105. Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, Hanamura N, Kashikura Y, Takamura M, Yoneda M, Shiraishi T. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. Breast Cancer. 2012 Apr;19(2):170-6.

106. Bello IO, Vered M, Dayan D, Dobriyan A, Yahalom R, Alanen K, Nieminen P, Kantola S, Läärä E, Salo T. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. Oral Oncol. 2011 Jan;47(1):33-8.

107. Zhang B, Zhang Y, Zhao J, Wang Z, Wu T, Ou W, Wang J, Yang B, Zhao Y, Rao Z, Gao J. M2-polarized macrophages contribute to the decreased sensitivity of EGFR-TKIs treatment in patients with advanced lung adenocarcinoma. Med Oncol. 2014 Aug;31(8):127.

108. Jung KY, Cho SW, Kim YA, Kim D, Oh BC, Park DJ, Park YJ. Cancers with Higher Density of Tumor-Associated Macrophages Were Associated with Poor Survival Rates. J Pathol Transl Med. 2015 Jul;49(4):318-24.

109. Ohri CM, Shikotra A, Green RH, Waller DA, Bradding P. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. Eur Respir J. 2009 Jan;33(1):118–26.

110. Grandi C, Allossio M, Moglia DEA. Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas: therapeutic implications. Head Neck Surg, 8 (1985), p. 67

111. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. J Oral Maxillofac Surg, 63 (2005), pp. 1599-1605

112. Troiano G, Caponio VCA, Adipietro I, Tepedino M, Santoro R, Laino L, Lo Russo L, Cirillo N, Lo Muzio L. Prognostic significance of CD68+ and CD163+ tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. Oral Oncol. 2019 Jun;93:66-75.

113. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma [J] Cancer Res. 1996;56(20):4625–4629.

114. Salvesen HB, Akslen LA. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas [J] Int J Cancer. 1999;84(5):539–543.

115. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, et al. Prognostic value of tumour-associated macrophage count in human bladder cancer [J] Int J Urol. 2000;7(7):263–269.

116. Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, et al. Tumour associated macrophages in human prostate cancer: relation to Clinicopathological variables and survival [J] Int J Oncol. 2000;17(3):445–451.

117. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Kakolyris S, et al. Different patterns of stromal and cancer cell thymidine phosphorylase reactivity in non-small-cell lung cancer: impact on tumour neoangiogenesis and survival. Br J Cancer. 1998;77(10):1696-1703.

118. Badie B, Schartner JM. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas [J] Neurosurgery. 2000;46(4):957–961.

119. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. BMC Cancer. 2012;12:306.

120. Dourado MR, Guerra ENS, Salo T, Lambert DW, Coletta RD. Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. J Oral Pathol Med. 2018 May;47(5):443-453.

121. Almangush A, Leivo I, Mäkitie AA. Biomarkers for Immunotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma: Current Status and Challenges. Front Oncol. 2021 Mar 8;11:616629.

122. Lin CN, Wang CJ, Chao YJ, Lai MD, Shan YS. The significance of the co-existence of osteopontin and tumor-associated macrophages in gastric cancer progression. BMC Cancer. 2015 Mar 15;15:128.

9. КРАТЕНКИ

OSCC ….....Планоцелуларен карцином на усна шуплина
SCC .....Планоцелуларен карцином
TME ….....Туморска микросредина
TS ….....Туморска строма
TN ….....Туморско гнездо
MFs ….....Миофибробласти
MSCs ….....Мезенхимални стем клетки
NK ….....Природни клетки убијци
MDSCs ….....Миелоидни супресорни клетки
ECM ….....Екстрацелуларен матрикс
CAFs ….....Фибробласти – асоцирани со карцином
NFs …….....Нормални фибробласти
TGF - β…….....β - Фактор на туморски раст
EMT…….....Епително - мезенхимална транзиција
α – SMA …….....α-тип на актин на мазните мускули
α – SMA+ CAFs…….....α – SMA позитивни CAFs
MMMP …….....Ензим Металопротеиназа
TAMs …….....Макрофаги – асоцирани со тумор
TNF - α…….....α – Фактор на туморска некроза
CSF - 1 …….....Colony stimulating factor – 1
AJCC …….....Заеднички Американски Комитет за Канцер
UICC …….....Меѓународен Сојуз за Контрола на Канцер
pT .....Патолошки статус на големина на тумор
pN …….....Патолошки статус на вратни лимфни јазли
pTNM …….....Патолошки стадиум на болест
Mx …….....Не може да се процени присуство на далечни метастази
M0 .....Нема далечни метастази
c.....Клинички
p…….....Патолошки
G .....Хистолошки степен на тумор
KT …….....Компјутеризирана томографија
МРИ …….....Магнетна резонанца
PET …….....Positron emission tomography
WHO …….....Светска Здравствена Организација
LI …….....Лимфатична инвазија
LVI …….....Лимфоваскуларна инвазија
PnI …….....Перинеурална инвазија
NCCN Guidelines ….....Препораки на Сеопфатната Национална Мрежа за Канцер
NCCN Compendium …….....Компендиум на Сеопфатната Национална Мрежа за Канцер
ND …….....Вратна дисекција
PORT…….....Постоперативна радиотерапија
RT …….....Радиотерапија
CTx …….....Хемотерапија
CRT (RTCx) …….....Хеморадиотерапија
R0 …….....Негативни ресекциони хируршки маргини
R1 .....Позитивни ресекциони хируршки маргини
END .....Елективна вратна дисекција
FOM .....Под на усна шуплина
LNM .....Метастази во вратни лимфни јазли
SND .....Селективна вратна дисекција

RND .....Радикална вратна дисекција
MRND .....Модифицирана Радикална вратна дисекција
ENE .....Екстранодална екстензија
ECS .....Екстракапсуларно ширење
DOI .....Длабочина на инвазија
NOM .....Нормална орална лигавица
OL .....Орална Леукоплакија
OSMF .....Орална субмукозна фиброза
IBC .....Инвазивен карцином на дојка
NPC .....Назофарингеален карцином