



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

**Katarzyna Nowogrodzka**

**Ocena ekspresji nestyny w różnych postaciach histologicznych  
niemelanocytowych nowotworów skóry**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Promotor: dr hab. n. med. Alina Jankowska- Konsur**

**Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii**

**Wrocław 2023**

Pragnę podziękować promotorowi mojej pracy  
dr hab. n. med. Alinie Jankowskiej- Konsur  
za życzliwość i pomoc okazaną podczas przygotowania niniejszej pracy

Dr n. med. Aleksandrze Piotrowskiej

Prof. dr hab. n. med. Joannie Maj

oraz Kierownikowi Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii  
prof. dr hab. n. med. Jackowi Szepietowskiemu

*Pracę dedykuję Moim Rodzicom, Mężowi i Synom*

## Spis treści

1.	Wstęp .....	8
1.1.	Niemelanocytowe nowotwory skóry .....	8
1.1.1.	Czynniki ryzyka rozwoju niemelanocytowych nowotworów skóry .....	8
1.1.2.	Rogowacenie słoneczne .....	14
1.2.	Rak podstawnocomórkowy.....	17
1.2.1.	Obraz kliniczny .....	18
1.2.2.	Obraz histologiczny .....	20
1.3.	Rak kolczystocomórkowy.....	21
1.3.1.	Obraz kliniczny .....	21
1.3.2.	Obraz histologiczny .....	24
1.4.	Metody oceny zaawansowania klinicznego raków skóry .....	25
1.5.	Metody leczenia rogowacenia słonecznego i raków skóry. ....	31
1.6.	Nestyna .....	34
1.6.1.	Nestyna jako marker nowotworowych komórek macierzystych. ....	36
1.6.2.	Nestyna jako marker angiogenezy .....	38
1.6.3.	Ekspresja nestyny w skórze .....	41
2.	Założenia i cel pracy .....	42
3.	Materiał i metody .....	43
3.1.	Materiał.....	43
3.2.	Metody .....	46
3.2.1.	Badania immunohistochemiczne nestyny, CD31, CD34, Ki-67.....	46
3.2.2.	Ocena ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych .....	47
3.2.3.	Ocena liczby naczyń krwionośnych.....	48
3.2.4.	Ocena nasilenia ekspresji antygenu Ki-67 .....	48
3.2.5.	Metody statystyczne.....	49
4.	Wyniki.....	50
4.2.	Rogowacenie słoneczne .....	50
4.2.3.	Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny .....	51
4.2.4.	Ekspresja Ki-67 w ogniskach rogowacenia słonecznego.....	55
4.2.5.	Ekspresja CD31 w naczyniach krwionośnych podścieliska rogowacenia słonecznego. 59	
4.2.6.	Ekspresja CD34 w naczyniach krwionośnych podścieliska rogowacenia słonecznego	63
4.3.	Rak podstawnocomórkowy.....	67
4.3.3.	Ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych raka podstawnocomórkowego. ....	67

4.3.4.	Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny. ....	67
4.3.5.	Ekspresja antygenu Ki-67 w raku podstawnkomórkowym.....	74
4.3.6.	Gęstość naczyń krwionośnych CD31 <sup>+</sup> w podścielisku raka podstawnkomórkowego.	80
4.3.7.	Gęstość naczyń krwionośnych CD34 <sup>+</sup> w podścielisku raka podstawnkomórkowego.	86
4.4.	Rak kolczystokomórkowy.....	92
4.4.3.	Ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych raka kolczystokomórkowego. ....	92
4.4.4.	Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny. ....	93
4.4.5.	Ekspresja antygenu Ki-67 w raku kolczystokomórkowym.....	97
4.4.6.	Gęstość naczyń krwionośnych CD31 <sup>+</sup> w podścielisku raka kolczystokomórkowego.	101
4.4.7.	Gęstość naczyń krwionośnych CD34 <sup>+</sup> w podścielisku raka kolczystokomórkowego.	104
4.5.	Porównanie badanych grup.....	108
4.5.3.	Porównanie ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnkomórkowym i kolczystokomórkowym. ....	108
4.5.4.	Porównanie gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnkomórkowym i kolczystokomórkowym. ....	109
4.5.5.	Porównanie gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnkomórkowym i kolczystokomórkowym. ....	110
4.5.6.	Porównanie gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD34 w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnkomórkowym i kolczystokomórkowym. ....	112
4.3.5.	Porównanie ekspresji Ki-67 w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnkomórkowym i kolczystokomórkowym. ....	113
4.3.6.	Analiza zależności między nestyną, CD31, CD34 i Ki-67 w rogowaceniu słonecznym. .	115
4.3.7.	Analiza zależności między nestyną, CD31, CD34 i Ki-67 w raku podstawnkomórkowym. ....	115
4.3.8.	Analiza zależności między nestyną, CD31, CD34 i Ki-67 w raku kolczystokomórkowym. ....	116
5.	Omówienie.....	122
6.	Wnioski.....	129
7.	Streszczenie.....	130
8.	Abstract.....	132
9.	Bibliografia.....	135

## Wykaz stosowanych skrótów

**5-FU**- 5-fluorouracyl

**A172**- linia komórkowa wyizolowana z glejaka wielopostaciowego

**A549**- linia komórkowa niedrobnokomórkowego raka płuca.

**ABC transporter**- ATP-binding cassette transporter- białko transportowe wiążące ATP

**AJCC**- Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka

**AK**- rogowacenie słoneczne

**Akt**- kinaza serynowo-treoninowa

**ALA**- kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego

**Ang-1**- angiopoetyna 1

**Ang-2**- angiopoetyna 2

**BCC**- rak podstawnkomórkowy

**bFGF** - basic fibroblast growth factor, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

**CD133**- antygen CD133,

**CD15**- antygen CD15

**CD24**- antygen CD24 (heat stable antygen-HSA, nectadrin),

**CD31**- antygen CD31

**CD34**- antygen CD34

**CD44**- antygen CD44,

**Cdc2**- kinazę cyklinozależną 1

**Cdk5**- kinazę cyklinozależną 5

**CSCs**- cancer stem cells- nowotworowe komórki macierzyste

**CXCR4**- receptor chemokinowy o motywie CXC,

**DAB**- diaminobenzzydina

**DLE**- discoid lupus erythematosus, postać ogniskowa tocznia rumieniowatego

**DNA**- kwas deoksyrybonukleinowy

**ESA**- epithelial surface antigen- antygen powierzchniowy ESA

**GSK3 $\beta$** - izoforma  $\beta$  kinazy syntazy glikogenu 3

**H460**- linia komórkowa niedrobnokomórkowego raka płuca.

**HIF-1**- Czynn timer indukowany hipoksją 1

**HPV**- wirus brodawczaka ludzkiego

**Huh7**- linia komórkowa raka wątrobowokomórkowego

**IF**- intermediate filaments- filament pośrednie

**IFN beta**- interferon beta

**IFN-γ** interferon gamma

**IL-1**- interleukina 1

**IL-12**- interleukina 12

**IL-6**- interleukina 6

**IL-8**- interleukina 8

**kDa**- kilodalton

**Ki-67**- antygen proliferacji komórkowej Ki-67

**KIN**- keratinocytic intraepidermal neoplasia

**LED**- light-emitting diode, dioda emitująca światło

**MAL**- aminolewulinian metylu

**MCF-7**- linia komórkowa raka piersi

**MDA-MB-231/B02**- linia komórkowa potrójnie negatywnego raka piersi

**MMP-2**- metaloproteinaza 2

**MMP-9**- metaloproteinaza 9

**mTOR** – ssaczy cel rapamycyny, białkowa kinaza serynowo-treoninowa (mammalian)

**MVD**- microvessel density- średnia gęstość naczyń

**Nanog**- Homeobox protein NANOG- czynnik transkrypcyjny Nanog

**NCAM**- białko adhezyjne NCAM

**NCCN**- National Comprehensive Cancer Network

**NER**- naprawa poprzez wycięcie nukleotydu

**NMSC**- niemelanocytowe nowotwory skóry

**Oct3/4**- Octamer-binding transcription factor 3/4- czynnik transkrypcyjny Oct3/4

**OUN**- ośrodkowy układ nerwowy

**OZN**- obszar zagrożenia nowotworowego

**p35**- białko p35

**PD-1**- programmed cell death protein-1- Receptor programowanej śmierci 1

**PDGF**- platelet-derived growth factor - płytkopochodny czynnik wzrostu

**PDT**- terapia fotodynamiczna

**PECAM1**- platelet endothelial cell adhesion molecule-1- cząsteczka adhezji komórkowej płytkowo-śródbłonkowej 1

**PI3K** – kinaza 3-fosfatidyloinozytolu

**PUVA**- psoralen i fototerapia UVA

**Rat-401**- mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciw nestynie

**RNA**- kwas rybonukleinowy

**SCC**- rak kolczystokomórkowy

**shRNA**- short hairpin RNA- RNA o strukturze spinki do włosów

**SK-BR-3**- linia komórkowa raka piersi

**SOX-18**- czynnik transkrypcyjny SOX-18

**Sox2**- Sex determining region Y-box 2- czynnik transkrypcyjny Sox2.

**TB**- *trichoblastoma*

**Tie-2** – receptor Tie-2 wiążący angiopoetynę

**TNF $\alpha$** - czynnik martwicy nowotworów

**TNM**- tumor, nodes, metastases- system określania stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu.

**UICC**- Międzynarodowa Unia Walki z Rakiem

**UVA**- ultrafiolet A

**UVB**- ultrafiolet B

**UVC**- ultrafiolet C

**UVR**- promieniowanie ultrafioletowe

**VEGF** - vascular endothelial growth factor- czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

**VEGFR** - vascular endothelial growth factor receptor- receptor czynnika wzrostu śródbłonka

**WHO**- Światowa Organizacja Zdrowia

# 1. Wstęp

## 1.1. Niemelanocytowe nowotwory skóry

Niemelanocytowe nowotwory skóry (ang. Non-melanoma skin cancer- NMSC), inaczej nazywane rakami skóry to najliczniejsza grupa nowotworów złośliwych skóry. Zalicza się do nich m.in. raka podstawnokomórkowego (ang. Basal cell carcinoma-BCC) i raka kolczystokomórkowego (ang. Squamous cell carcinoma- SCC). Nowotwory skóry są najczęściej występującą grupą nowotworów w populacji rasy kaukaskiej na świecie [1], a zachorowalność stale rośnie. Zapadalność na raka podstawnokomórkowego skóry zwiększyła się 3-krotnie w ciągu 30 lat [2]. Szacuje się, że zachorowalność w Europie rośnie średnio o 5% rocznie, w USA odsetek ten szacuje się na 2% rocznie [1,3].

Najczęstszymi rakami skóry są rak podstawnokomórkowy (BCC) i kolczystokomórkowy (SCC), które łącznie stanowią 99% niemelanocytowych nowotworów skóry. Rak podstawnokomórkowy występuje około 3-5 razy częściej niż SCC [4]. Zapadalność wzrasta z wiekiem, osiągając szczyt w 6-8 dekadzie życia. Charakteryzują się niską śmiertelnością i rzadko prowadzą do powstawania przerzutów, wykazują natomiast miejscową złośliwość poprzez naciekanie na okoliczne tkanki. Doprowadzają do destrukcji kości i chrząstek, a co za tym idzie powodują defekty estetyczne, obniżenie jakości życia oraz odpowiadają za znaczną chorobowość w populacji, przez co stanowią istotny problem medyczny.

### 1.1.1. Czynniki ryzyka rozwoju niemelanocytowych nowotworów skóry

Czynniki ryzyka niemelanocytowych raków skóry można podzielić na modyfikowalne oraz niemodyfikowalne. Najważniejszym modyfikowalnym czynnikiem ryzyka rozwoju raków skóry jest ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (ang. ultraviolet radiation-UVR), które działa kancerogennie zarówno bezpośrednio poprzez indukcję uszkodzenia komórek (mutacje DNA) i pośrednio poprzez indukcję immunosupresji (supresja limfocytów T) [5].

Promieniowanie ultrafioletowe to promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali 100 nm do 400nm. Składa się z trzech zakresów długości fal: UVC (200-290nm), UVB (290-320nm), i UVA (320-400nm).



Promieniowanie UVA nie jest pochłaniane przez warstwę ozonową atmosfery, przenika przez szyby, wnika głęboko w skórę, docierając do skóry właściwej. Stanowi 95% promieniowania docierającego do powierzchni Ziemi. Odgrywa rolę przede wszystkim w procesach starzenia skóry, poprzez uwalnianie kolagenazy z fibroblastów i zwiększanie ekspresji metaloproteinaz w skórze właściwej. Ma też zdolność uszkodzania DNA przez nasilenie syntezy wolnych rodników tlenowych oraz reaktywnych form tlenu, w mechanizmie stresu oksydacyjnego. Wykazuje mniejsze działanie mutagenne niż UVB. Promieniowanie UVB pochłaniane jest w około 90% przez warstwę ozonową atmosfery. Stanowi około 5% ultrafioletu docierającego do Ziemi, a mimo to wykazuje silny wpływ na skórę. Promieniowanie UVB zależne jest od pory roku i pory dnia. W naszej szerokości geograficznej UVB występuje w największym natężeniu w miesiącach wiosenno- letnich, a w ciągu doby największe natężenie promieniowania UVB obserwujemy w godzinach okołopołudniowych. W przeciwieństwie do UVA nie przenika przez szyby. Bierze udział w syntezie witaminy D, odpowiedzialne jest za pojawianie się rumienia i opalenizny. Działanie rakotwórcze wykazuje działając bezpośrednio poprzez określone zmiany w onkogenach i na geny supresorowe nowotworów, które są odpowiedzialne za inicjację i progresję raków skóry [6]. Typem mutacji charakterystycznym dla uszkodzeń wywoływanych przez promieniowanie ultrafioletowe jest powstawanie dimerów pirymidynowych, najczęściej tranzycja cytozyna- tymina (C-T) i rzadziej zmian podwójnych typu CC-TT [7]. Powoduje to mutacje w keratynocytach, co prowadzi do transformacji nowotworowej. Najistotniejsze mutacje dotyczą genu telomerazy i genu supresorowego *p53*. Mutacje genu *p53* prowadzą do utraty funkcji białka kodowanego przez gen, które traci zdolność specyficznego wiązania się z DNA, co prowadzi do utraty funkcji regulatora transkrypcji. Mutacja genu *p53* wiąże się także z utratą zdolności komórek do apoptozy, w wyniku czego komórki mogą proliferować w sposób nieograniczony [8]. Promieniowanie UVC o najwyższej energii, ma działanie rumieniotwórcze, bakteriobójcze, w normalnych warunkach nie dociera do powierzchni Ziemi, ponieważ jest prawie całkowicie pochłaniane przez warstwę ozonową atmosfery.

Znaczenie ma także rodzaj ekspozycji na promieniowanie UV. Badania wykazały, że rekreacyjna ekspozycja na słońce dzieci i młodzieży zwiększa ryzyko BCC [9]. Intensywne opalanie, okazjonalne zwiększa ryzyko rozwoju SCC, natomiast w przypadku BCC ryzyko rośnie wraz z dawką kumulacyjną UV. Iannacone i wsp. porównywali w swojej pracy znaczenie ekspozycji przewlekłej oraz okazjonalnej na rozwój BCC [10]. Wyniki ich badań wskazują, że ryzyko rozwoju BCC rośnie zarówno przy nadmiernej okazjonalnej ekspozycji na promieniowanie UV jak i wraz ze wzrostem dawki kumulacyjnej [10]. Zwiększone ryzyko

zachorowania na raki skóry stwierdzono także u osób zawodowo narażonych na ekspozycję na UVR [6].

Pacjenci leczeni fototerapią UVA i UVB również narażeni są na rozwój raków skóry. Stern i wsp. sugerują, że znaczna ekspozycja na PUVA zwiększa ryzyko jedynie SCC, a nawet ekspozycja na duże dawki PUVA nie zwiększa istotnie ryzyka BCC [11]. W porównaniu z terapią PUVA, UVB (>300 zabiegów) jest skorelowane z niewielkim wzrostem ryzyka rozwoju BCC [12]. Należy jednak podkreślić, że to zagadnienie wymaga dalszych badań.

Niezaprzeczalny natomiast jest związek promieniowania UV emitowanego przez łożka opalające ze zwiększonym ryzykiem rozwoju nowotworów skóry. Ryzyko to jest wyższe u osób korzystających z tej formy opalania w młodym wieku [13,14].

Innym czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworów skóry jest promieniowanie jonizujące. Już w 1902 roku, 7 lat po wynalezieniu promieniowania rentgenowskiego, Friebe, jako pierwszy, opisał związek między nowotworami skóry a promieniowaniem jonizującym. BCC jest najczęściej występującym rakiem skóry wywołanym promieniowaniem jonizującym [15]. Rak kolczystokomórkowy występuje rzadziej. W badaniu Maalej i wsp. stwierdzono 125 przypadków BCC i 16 SCC na 150 nowotworów skóry indukowanych przez promieniowanie rentgenowskie [16]. Największe ryzyko rozwoju zmian nowotworowych związane jest z ekspozycją na promieniowanie rentgenowskie, a w mniejszym stopniu na promieniowanie gamma [17]. Średni czas od naświetlań do rozwoju nowotworu to około 20 lat [18]. Często rozpoznanie SCC wywołanego promieniowaniem poprzedza *radiodermatitis*, czyli tzw. uszkodzenie porentgenowskie skóry. Raki skóry indukowane przez promieniowanie jonizujące mają tendencję do większej złośliwości, w porównaniu ze zmianami wywoływanymi przez promieniowanie UV. Są także słabiej odgraniczone od otoczenia, ich marginesy są nieostre oraz w większym stopniu są związane z tworzeniem przerzutów. Badanie Edwardsa i wsp. pokazało, że SCC indukowane przez promieniowanie jonizujące wiązało się z 5-letnim przeżyciem u 50% pacjentów, podczas gdy SCC związane z promieniowaniem UV charakteryzowało się 5-letnimi przeżyciami u 90% pacjentów [19].

Wśród innych czynników rozwoju NMSC wymienia się także narażenia na czynniki chemiczne o działaniu kancerogennym, takie jak arsen, smoła pogazowa, produkty przemiany ropy naftowej a także tytoń i jego pochodne. Ekspozycja na arsen wywołuje stres oksydacyjny, który prowadzi do uszkodzeń DNA, niestabilności genomu i skracania telomerów [20]. Działanie kancerogenne arsenu obserwuje się zarówno po spożyciu, jaki i po ekspozycji na ten

pierwiastek. W wyniku kontaktu rozwija się rogowacenie arsenowe, uważane za stan przednowotworowy w obrębie, którego częściej rozwijają się raki skóry. Rogowacenie arsenowe dotyczy głównie rąk i stóp oraz twarzy [21]. U osób zawodowo narażonych na kontakt ze smołą może rozwinąć się rogowacenie smołowcowe, również uważane za stan przednowotworowy, predysponujący do rozwoju NMSC. Rogowacenie smołowcowe lokalizuje się na skórze dłoni, twarzy i moszny [22].

U osób poddawanych leczeniu immunosupresyjnemu, m.in. po przeszczepieniach narządów również zauważono częstsze występowanie raków skóry. Podobna zależność ma miejsce także w innych stanach immunosupresji, np. w przebiegu zakażenia wirusem HIV oraz w innych chorobach przebiegających z deficytem odporności, w przebiegu przewlekłej białaczki limfatycznej, a także u osób leczonych inhibitorami TNF $\alpha$  z powodu chorób autoimmunologicznych. Zauważono ponadto, że u pacjentów w immunosupresji raki skóry mają bardziej agresywny przebieg, rosną szybciej, częściej dają przerzuty i częściej prowadzą do zgonu [23].

Innym środowiskowym czynnikiem ryzyka rozwoju raka kolczystokomórkowego jest zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV), należącym do grupy papillomawirusów. Skórne typy HPV należą głównie do rodzajów beta i gamma, które są powszechnie obecne w skórze zdrowych osobników. Wyizolowano ponad 40 typów beta-HPV i 50 typów gamma-HPV, a liczba ta stale rośnie. Skórne wirusy HPV mogą działać w połączeniu z promieniowaniem UV jako kokarcynogeny [24]. Beta-HPV mogą również odgrywać rolę w rozwoju SCC u osób z prawidłową odpornością. W badaniu Andersson i wsp. stwierdzono korelację między obecnością wirusa a późniejszym rozpoznaniem SCC i BCC [25].

Wśród czynników ryzyka rozwoju NMSC, a w szczególności BCC wymienia się także nadmierne spożywanie alkoholu [26]. Wydaje się, że może mieć to związek z częstszymi oparzeniami słonecznymi u osób nadużywających alkoholu, jednak istnieją także doniesienia, że także metabolity alkoholu wykazujące działanie fotouwrażliwiające mogą w połączeniu z UVR zwiększać ryzyko rozwoju NMSC [27].

Do najważniejszych niemodyfikowalnych czynników ryzyka należą czynniki genetyczne. Wśród nich znaczenie ma kolor skóry, oczu i włosów. Uważa się, że fenotypy I i II wg skali Fitzpatricka predysponują do rozwoju BCC w większym stopniu niż pozostałe. Wykazano także, że osoby z jasnymi oczami miały większe ryzyko zachorowania na BCC i

SCC [28]. Dodatni wywiad rodzinny w kierunku raków skóry także uznaje się za czynnik zwiększający ryzyko rozwoju NMSC.

Istnieją także zespoły chorobowe, które wiążą się z częstszym występowaniem nowotworów skóry. Do genodermatoz zwiększających ryzyko rozwoju raka podstawnkomórkowego należy zaliczyć m.in. zespół znamionowych nabłoniaków podstawnkomórkowych (zespół Gorlina-Goltza), dziedziczony autosomalnie dominująco, charakteryzujący się nietypowym wyglądem twarzy, z dużą czaszką, dużymi guzami czołowymi, wydatną żuchwą i hiperteloryzmem. Typowe są torbiele zębów, małe zagłębienia skóry rąk i podeszew, cysty epidermalne zlokalizowane na obwodowych częściach ciała oraz predyspozycja do rozwoju mnogich BCC już w 2 i 3. dekadzie życia [17, 29, 30]. Kolejnym zespołem genetycznym jest zespół Rombo, dziedziczony w sposób autosomalny dominujący, charakteryzujący się zanikiem robakowatym skóry, prosakami na twarzy, łysieniem, sinicą obwodową, mnogimi nabłoniakami włosowymi (*trichoepithelioma*) oraz mnogimi rakami podstawnkomórkowymi [29]. Kolejną rzadką genodermatozą związaną z wyższym ryzykiem rozwoju raka podstawnkomórkowego jest zespół Bazexa- Dupré-Christola, dziedziczony autosomalnie dominująco z chromosomem X, charakteryzujący się mieszkowym zanikiem skóry, licznymi prosakami, skąpym owłosieniem i mnogimi BCC [31]. Istnieją także inne rzadkie zespoły genetyczne powiązane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka podstawnkomórkowego, do których zaliczamy zespół Oley'a, Zespół Schopfa, Schulza i Passarge'a, dysplazję przynasadową McKusicka, zespół Cowden, zespół Hermańskiego-Pudlaka, zespół Muira-Torre'a oraz Zespół Brooke'a-Spieglera [29].

Wśród genodermatoz związanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju NMSC znajduje się skóra pergaminowa i barwnikowa (*xeroderma pigmentosum*), rzadkie schorzenie dziedziczone autosomalnie recesywnie, charakteryzuje się silną nadwrażliwością na światło i przedwczesnym starzeniem się skóry, tworzeniem przebarwień i wysokim ryzykiem rozwoju nowotworów skóry- BCC, SCC i czerniaka. U podłoża choroby leży uszkodzenie jednego z mechanizmów naprawy DNA, czyli NER (naprawa przez wycięcie nukleotydu, ang. nucleotide excision repair). Prowadzi to do uszkodzeń materiału genetycznego w komórkach skóry narażonych na promieniowanie UV, a w konsekwencji rozwoju nowotworów skóry. Mediana wieku zachorowania na BCC i SCC wynosi około 8 lat [32].

Inną genodermatozą związaną z wyższym ryzykiem rozwoju SCC jest zespół Fergusona-Smitha, dziedziczony autosomalnie dominująco, charakteryzujący się

występowaniem mnogich rogowiaków kolczystokomórkowych w młodym wieku, które w większości ustępują samoistnie, jednak istnieje podwyższone ryzyko rozwoju SCC [33]. Także w przypadku zespołu Muira-Torre'a, dziedzicznego w sposób autosomalny dominujący, obserwuje się mnogie rogowiaki kolczystokomórkowe, liczne nowotwory gruczołów łojowych oraz nowotwory narządów wewnętrznych [34]. W przypadku zespołu Blooma, rzadkiej jednostki chorobowej, dziedziczonej autosomalnie recesywnie, obserwuje się ciężką nadwrażliwość na UV, poikilodermię oraz teleangiektazje. SCC stanowią 14% wszystkich guzów u pacjentów z zespołem Blooma [35]. Kolejną gendermatozą, w której obserwuje się częstsze występowanie raka kolczystokomórkowego jest *epidermodysplasia verruciformis*. Jest to choroba dziedziczona autosomalnie recesywnie, przebiegająca z podatnością na zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV). U pacjentów ekspozowanych na działanie promieni słonecznych rozwijają się zmiany przednowotworowe, które pozostawione bez leczenia często ulegają transformacji nowotworowej do inwazyjnego raka kolczystokomórkowego, średnio w drugiej lub trzeciej dekadzie życia [36].

Raki skóry mogą rozwijać się na skórze zdrowej lub na podłożu stanów przednowotworowych. Jednym z takich stanów jest rogowacenie białe (*leukoplakia*). Są to zmiany dotyczące błony śluzowej jamy ustnej lub narządów płciowych, charakteryzujące się białawymi ogniskami o gładkiej lub szorstkiej powierzchni, które nie dają dolegliwości subiektywnych. Często zmiany rozwijają się w miejscach przewlekłego drażnienia mechanicznego lub chemicznego. Czynnikiem zwiększającym ryzyko zezłośliwienia leukoplakii i konwersji do raka kolczystokomórkowego są palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu oraz nieprzestrzeganie higieny jamy ustnej. Zmiany zlokalizowane w dnie jamy ustnej, na języku i dolnej wardze charakteryzują się gorszym rokowaniem [17].

Do innych stanów przednowotworowych należą rogowacenie arsenowe, smołowcowe, a także *xeroderma pigmentosum*, przewlekłe porontgenowskie uszkodzenie skóry oraz rogowacenie słoneczne.

### 1.1.2. Rogowacenie słoneczne

Rogowacenie słoneczne (ang. Actinic keratosis, AK) należy do najczęściej występujących zmian skórnych u ludzi na całym świecie. Szacuje się, że pacjenci z rozpoznaniem AK stanowią 10% wizyt w poradniach dermatologicznych. Dotyczy przede wszystkim osób o jasnej karnacji, których skóra ekspozowana jest na promieniowanie ultrafioletowe. Częstość występowania AK rośnie wraz z wiekiem. W Wielkiej Brytanii 15–23% populacji ma stwierdzone zmiany o charakterze rogowacenia słonecznego, a u osób powyżej 50 r.ż. wartość ta sięga nawet 37,5% [37]. Częstość występowania rogowacenia słonecznego zależy także od regionu świata. W Australii szacuje się, że ogniska AK mogą występować u 60% populacji, natomiast występowanie tej jednostki chorobowej w Stanach Zjednoczonych szacuje się na 16–25% [38, 39]. W przeszłości rogowacenie słoneczne dotyczyło częściej mężczyzn, których praca często związana była z ekspozycją na UV, jednak w związku ze wzrostem popularności rekreacyjnej ekspozycji na słońce kobiety są narażone na występowanie AK w podobnym stopniu co mężczyźni.

Część autorów określa AK jako stan przednowotworowy. Jako pierwszy chorobę opisał francuski dermatolog Dubreuilh, który uznał ogniska AK za zmiany przedrakowe. W świetle ostatnich badań odpowiedniejsze wydaje się określanie rogowacenia słonecznego jako raka kolczystokomórkowego *in situ*, czyli raka nieprzekraczającego błony podstawnej naskórka.

Patogeneza rogowacenia słonecznego wiąże się z uszkodzeniem DNA keratynocytów przez promieniowanie ultrafioletowe. Główną rolę odgrywa promieniowanie UVB w zakresie 280–320 nm. Dochodzi do powstawania fotoproduktów, a w wyniku niewydolności mechanizmów naprawczych DNA dochodzi do mutacji w białkach supresorowych i regulatorowych, co prowadzi do upośledzenia eliminacji komórek nowotworowych. Promieniowanie UVA działa pośrednio poprzez nasilenie syntezy wolnych rodników tlenowych. Dodatkowo UVR działa immunosupresyjnie, sprzyjając transformacji nowotworowej. Kofaktorem zmian mogą być także niektóre wirusy brodawczaka ludzkiego (HPV) [17]. Dopóki ogniska rogowacenia słonecznego lokalizują się powyżej strefy błony podstawnej naskórka nazywane są rakiem kolczystokomórkowym *in situ*. Kiedy zmiany przekroczą błonę podstawną i przejdą do skóry właściwej powstaje inwazyjny rak kolczystokomórkowy. Szacuje się, że okres utajenia trwa około 10–20 lat, a rak kolczystokomórkowy rozwija się w 5–10% przypadków rogowacenia słonecznego [17].

Ogniska rogowacenia słonecznego mogą także ulec samoistnej regresji, szacuje się, że do ustąpienia ognisk AK w ciągu roku dochodzi w około 15-25% przypadków. Procesom regresji towarzyszy pojawianie się nowych zmian, więc całkowita liczba ognisk utrzymuje się na podobnym poziomie [40]. Dyskusyjna pozostaje kwestia transformacji ognisk AK w kierunku raka podstawnocomórkowego. Badania wykazały natomiast, że liczne ogniska rogowacenia słonecznego stanowią czynnik ryzyka rozwoju NMSC [41].

Obraz kliniczny rogowacenia słonecznego jest charakterystyczny. Zmiany lokalizują się na odsłoniętych częściach ciała, najczęściej na skórze twarzy, nieowłosionej skórze głowy, małżowinach usznych oraz grzbietach rąk. Zmiany rzadko występują pojedynczo. Najczęściej są to liczne, drobne szorstkie plamki, o powierzchni hiperkeratotycznej. Mogą przyjmować różne formy. Wczesne zmiany charakteryzują się szorstką powierzchnią, często w kolorze skóry. Zmiany najczęściej są bezobjawowe, okresowo może występować świąd o niewielkim nasileniu. Mogą występować jako ogniska rumieniowe, o różowym lub czerwonym zabarwieniu, początkowo o średnicy kilku milimetrów, a następnie mogą powiększać się do 1-2 cm. Zmianom tego typu często towarzyszą teleangiektazje. Najczęstszą odmianą są ogniska hiperkeratotyczne, barwy żółtawej lub brązowej. Ich pojawienie się związane jest z zaburzeniem prawidłowego procesu rogowacenia i nagromadzenia łusek. Szczególną odmianą tej postaci jest róg skóry. Jest to hiperkeratotyczna zmiana, najczęściej występująca pojedynczo, rosnąca pionowo ze skóry, przyjmująca kształt stożka. Może powstawać na podłożu ogniska AK, ale także w obrębie raka kolczystokomórkowego, rogowiaka kolczystokomórkowego, brodawki pospolitej czy choroby Bowena. Inną postacią kliniczną AK są zmiany liszajopodobne o fioletowym zabarwieniu, przypominające wyglądem liszaja płaskiego. Kolejną formą są zmiany barwnikowe, występujące najczęściej na twarzy. Charakteryzują się jasnobrązowym zabarwieniem. Szczególną odmianą rogowacenia słonecznego jest popromienne zapalenie czerwieni wargowej, najczęściej dotyczące wargi dolnej. Wiąże się z większym ryzykiem zezłośliwienia niż w przypadku innych zmian skórnych [17].

Rozpoznanie stawia się głównie na podstawie obrazu klinicznego, jednak w sytuacjach wątpliwych konieczne bywa wykonanie biopsji. W obrazie histologicznym AK obserwuje się obecność atypowych keratynocytów ograniczonych do naskórka. Atypowe keratynocyty cechują się nieprawidłowym rogowaceniem i dojrzewaniem. Komórki charakteryzują się obecnością dużych, nieregularnych, hiperchromatycznych jąder, które w większości ulegają stłoczeniu w warstwie podstawnej. Charakterystyczna jest także ogniskowa parakeratoza

naprzemiennie z hiperkeratozą, mikroskopowo uwidaczniające się jako niebieskie i różowe obszary warstwy rogowej. Struktury mieszkła włosowego często są oszczędzone. Widoczne może być także wnikanie komórek atypowych w warstwę brodawkowatą skóry właściwej. Na poziomie skóry właściwej obserwuje się zwyrodnienie tkanki sprężystej wynikające z uszkodzenia przez promieniowanie ultrafioletowe. Widoczne mogą być także naciek zapalny oraz poszerzone naczynia krwionośne [17]. Wyróżnia się postać zanikową, hiperkeratotyczną, bowenoidalną, akantolityczną, lichenoidalną i barwnikową AK, w zależności od dominujących zmian patomorfologicznych [42].

W celu klasyfikacji zmian zaproponowano podział analogiczny do raka szyjki macicy, czyli trzystopniowy podział KIN (ang. keratinocytic intraepidermal neoplasia) uwzględniający obraz kliniczny oraz histopatologiczny. Zmiany klasyfikowane jako KIN 1 mają przebieg subkliniczny, charakteryzują się występowaniem brunatno- czerwonych plam, bez złuszczenia czy szorstkości. W obrazie histologicznym zmiany są dyskretne. Mogą być widoczne hiperchromatyczne jądra o nieregularnym obrysie, cytoplazma ma wzmożoną zasado- i kwasochłonność, nie stwierdza się hiper- i parakeratozy. W obrazie KIN 2 występują szorstkie, hiperkeratotyczne ogniska. Histologicznie stwierdza się występowanie atypowych keratynocytów obejmujące 2/3 naskórka. W KIN 3 dominują czerwono- brunatne blaszki oraz strupy umiejscowione na skórze uszkodzonej UVR. W obrazie histologicznym atypowe keratynocyty występują we wszystkich warstwach naskórka oraz przydatkach skóry [43].

W przypadku rogowacenia słonecznego podkreśla się istnienie tzw. obszaru zagrożenia nowotworowego (OZN). Jest to obszar skóry uszkodzonej przez promieniowanie ultrafioletowe z widocznymi, subklinicznymi ogniskami AK oraz obszarami morfologicznie niezmiennymi. Badania wykazały, że w keratynocytach w obrębie OZN występują zmiany genetyczne zwiększające ryzyko rozwoju raka kolczystokomórkowego. Widoczne i niewidoczne klinicznie ogniska AK mogą ewoluować do inwazyjnego raka skóry [44].

W diagnostyce różnicowej pojedynczych ognisk AK należy brać pod uwagę rogowacenie łojotokowe lub brodawkę łojotokową, plamę soczewicowatą, a także brodawki płaskie i chorobę Bowena. W przypadku odmiany liszajopodobnej zmiany poza liszajem płaskim mogą wykazywać podobieństwo do raka podstawnokomórkowego oraz toczenia rumieniowatego krążkowego (DLE). W odmianie hiperkeratotycznej zmiany zlokalizowane na kończynach należy różnicować z blaszkami łuszcycowymi [17].



## 1.2. Rak podstawnokomórkowy

Rak podstawnokomórkowy (*carcinoma basocellulare*, BCC) to wolno rosnący nowotwór nabłonkowy skóry o miejscowej złośliwości, który cechuje się niewielkim ryzykiem tworzenia przerzutów oraz niską śmiertelnością. Z uwagi na możliwość naciekania i destrukcji okolicznych tkanek, w części przypadków prowadzi do szpecących zniekształceń, a w konsekwencji obniżenia jakości życia pacjentów.

BCC jest najczęstszym nowotworem złośliwym u ludzi rasy kaukaskiej oraz najczęstszym rakiem skóry. Liczba nowych przypadków stale rośnie. W 2000 roku zarejestrowano w Polsce ponad 2700 nowych zachorowań na raki skóry wśród kobiet i ponad 2600 wśród mężczyzn, natomiast w 2010 roku odpowiednio 5300 oraz 4800 nowych przypadków. Bazując na tych danych można określić, że zachorowalność wzrosła o blisko 100% w ciągu 10 lat [45]. Szacuje się, że ryzyko rozwoju raka podstawnokomórkowego w ciągu życia u osoby rasy białej wynosi około 30% [46]. Zapadalność na BCC wzrasta z wiekiem, 95% pacjentów to osoby po 65 roku życia. Wzrasta jednak także zachorowalność wśród osób poniżej 40 rż, w szczególności u kobiet [47].

W etiopatogenezie raka podstawnokomórkowego zwraca się uwagę na znaczenie czynników genetycznych. Badania nad zespołem Gorlina- Goltza przyczyniły się do ustalenia znaczenia szlaku Hedgehog w rozwoju BCC. Szlak Hedgehog fizjologicznie pełni funkcję regulatorową w rozwoju embrionalnym, natomiast w dojrzałym organizmie pełni funkcję kontrolną nad zdrowymi tkankami. Fizjologicznie dochodzi do połączenia białka Shh (sonic hedgehog) z receptorem Ptch1 (Patch 1), które prowadzi do uwolnienia białko Smo. Powoduje to rozszczepienie białek gliadynowych (Gli), ich transportu do jądra komórkowego, a następnie kontrolowanej proliferacji komórki. Zaburzenie jego funkcjonowania może prowadzić do rozwoju nowotworów, w tym BCC [48]. W około 90% sporadycznych przypadków BCC dochodzi do inaktywacji receptora PTCH1 (Patched 1), a w około 10% do aktywacji receptora SMO (Smoothened). Prowadzi to do nadmiernej aktywacji szlaku Hedgehog, przedostania się białek Gli w całości do jądra komórkowego, aktywacji transkrypcji i w konsekwencji do niekontrolowanej proliferacji komórki [49, 50].

### 1.2.1. Obraz kliniczny

Rak podstawnocomórkowy skóry lokalizuje się przede wszystkim na skórze ekspozowanej na promieniowanie ultrafioletowe, najczęściej na twarzy, szczególnie w obrębie części górnej. Rzadziej występuje w dolnej części twarzy, na owłosionej skórze głowy, a także w górnej części tułowia. BCC może występować także w nietypowych lokalizacjach, m.in. na podszewkach stóp, między palcami stóp, w okolicy odbytu i na mosznie [51]. Z uwagi na zróżnicowany obraz kliniczny raka podstawnocomórkowego wyróżnia się kilka postaci BCC: powierzchowną, guzkową, barwnikową, twardzinopodobną oraz wrzodziejącą [50].

Postać powierzchowna najczęściej występuje na skórze tułowia, stanowiąc około 60% zmian w tej lokalizacji. Przyjmuje charakter rumieniowych blaszek pokrytych łuską, nadżerkami lub strupami. Cechą charakterystyczną jest odgraniczenie od otoczenia lekko wyniosłym wałem [22]. W dermoskopii stwierdza się struktury palczaste, przypominające liście klonu oraz cienkie teleangiektazje, przy jednoczesnym braku szaroniebieskich gniazd owalnych, owrzodzenia oraz naczyń drzewkowatych [52]. Cechuje się łagodnym i przewlekłym przebiegiem. Zmiany różnicuje się z łuszczycą, chorobą Bowena oraz wypryskiem. Odmianą postaci powierzchniowej jest tzw. guz Arninga (*carcinoma basocellulare superficiale multicentricum*), czyli postać wieloogniskowa, która stanowi 15% przypadków BCC. Liczne ogniska lokalizują się głównie na tułowiu i mają charakter rumieniowatych blaszek. Zmiany charakteryzują się przewlekłym przebiegiem tendencją do nawrotów.

Kolejną często występującą odmianą BCC jest postać guzkowa (*BCC nodosum*), stwierdzana najczęściej na skórze głowy i szyi, stanowiąc 90% zmian w tej okolicy. Przyjmuje postać guzka o perłowych lub woskowych brzegach, z zagłębieniem w części centralnej, często z widocznym owrzodzeniem lub strupem. Cechą charakterystyczną są rozgałęzione teleangiektazje, w terminologii dermatoskopowej określane jako naczynia drzewkowate [52]. W diagnostyce różnicowej należy brać pod uwagę znamiona barwnikowe oraz guzy przydatków skóry [17].

Postać barwnikowa (*BCC pigmentosum*) charakteryzuje się występowaniem zmiany guzkowej lub grudkowej, barwy sinoniebieskiej, brązowej lub czarnej, z uniesionym brzegiem. W obrazie dermoskopowym oprócz teleangiektazji widoczne są także szaroniebieskie gniazda owalne [52]. W diagnostyce różnicowej należy uwzględnić czerniaka, znamię melanocytowe,

znamie błękitne, podrażnione brodawki łojotokowe oraz zmiany naczyniowe typu *angiokeratoma* lub *hemangioma* [17].

Postać twardzinopodobna (*BCC sclerodermiforme*) charakteryzuje się bardziej agresywnym przebiegiem, naciekając głębiej położone struktury. Przypomina bliznę zanikową z nielicznymi poszerzonymi naczyniami krwionośnymi, najczęściej lokalizuje się na twarzy. W dermoskopii widoczne jest białe podłoże, pojedyncze cienkie naczynia drzewkowate oraz brązowe ziarnistości [52]. W rozpoznaniu różnicowym uwzględnia się twardzinę, czerniaka desmoplastycznego, nabłoniaka włosowego włókniejącego (*tricheopithelioma desmoplasticum*) oraz włókniakomięsaka skóry wystającego (*dermatofibrosarcoma protuberans*) [17].

Rak podstawnocomórkowy wrzodziejący (*BCC exulcerans*) występuje głównie na twarzy i owłosionej skórze głowy, w szczególności w obrębie fałdów nosowo- wargowych, w kącie oka oraz w okolicy uszu. Ma postać owrzodzenia, z nierównymi, poszarpanymi granicami i perłowym brzegiem. Ma tendencję do destruktywnego wzrostu obejmującego nie tylko tkanki miękkie, ale również kości i chrząstki, mogą osiągać duże rozmiary prowadząc do znacznych okaleczeń, jednak rzadko dochodzi do przerzutów. Należy je różnicować z owrzodzeniami o innej etiologii [17].

Do innych rzadszych odmian należy m.in. rak podstawnocomórkowy torbielowaty (*BCC cysticum*), który charakteryzuje się występowaniem miękkiej, przezroczystej zmiany, z niebieskobiałym zabarwieniem oraz drobnymi teleangiektazjami. Najczęściej lokalizuje się na powiekach oraz w okolicy policzka. Zmiany należy różnicować z guzami przydatków skóry [17].

Guz włóknisto-nabłonkowy, nazywany także guzem Pinkusa, to rzadko występująca postać, charakteryzująca się występowaniem miękkiego, różowego lub cielistego guzka lub tarczki, zlokalizowanej najczęściej w okolicy lędźwiowo- krzyżowej [17].

Szczególnością jest metatypowy rak podstawnocomórkowy, inaczej rak podstawnocomórkowy (*carcinoma baso-spinocellulare*). Są to zmiany guzkowe, które w obrazie mikroskopowym wykazują cechy zarówno raka podstawnocomórkowego jak i kolczystocomórkowego. Należy do agresywnych form BCC i może naciekać okoliczne struktury, dawać przerzuty oraz wykazywać tendencję do nawrotów [53].

Raki podstawnocomórkowe charakteryzują się naciekaniem okolicznych struktur, natomiast bardzo rzadko dają przerzuty odległe. Szacuje się, że około 0,003-0,1% BCC wiąże się z powstaniem przerzutów. Większe ryzyko towarzyszy dużym, owrzodziałym, naciekowym guzom, szczególnie nawrotowym po zabiegach chirurgicznych lub po radioterapii. Około połowa przerzutów dotyczy regionalnych węzłów chłonnych, natomiast reszta związana jest z rozsiewem krwiopochodnym głównie do płuc i kości [54].

### 1.2.2. Obraz histologiczny

Rak podstawnocomórkowy skóry wywodzi się z multipotencjalnych komórek rozrodczych warstwy podstawnej naskórka i przydatków skóry, tworzących gniazda i pasma guza, umocowane we włóknistym zrębie. Komórki nowotworowe charakteryzują się ciasnym ułożeniem, skąpą, zasadochłonną cytoplazmą oraz okrągłym lub owalnym jądrem. Na obwodzie komórki bazaloidalne układają się równolegle, palisadowato, tworząc charakterystyczne dla BCC gniazda. Naskórek często wykazuje cechy zaniku, może też ulegać owrzodzeniu. Często obserwuje się także szczeliny oddzielające gniazda nowotworowe od skóry właściwej. Macierz skóry właściwej może mieć przerzedzoną strukturę, z cechami zwyrodnienia śluzowego i amyloidowego lub być nadmiernie zbita, z cechami zwyrodnienia włóknistego. Dostyc często obserwowane są podziały komórkowe, wskazujące na dużą liczbę mitoz, natomiast martwica zdarza się rzadko. Dodatkowo mogą występować niejednorodne nacieki zapalne podścieliska [17, 55].

Ze względu na istnienie licznych postaci raka podstawnocomórkowego wykazuje on też różnice w obrazie histologicznym. Ze względu na architekturę wzrostu guza oraz sposób naciekania skóry właściwej postaci histologiczne BCC możemy podzielić na grupę o powolnym wzroście, do której zaliczamy BCC guzkowy, powierzchowny, drobnoguzkowy i lejkowo-torbielowaty oraz grupę agresywnej progresji, do której należą BCC naciekający, twardzinopodobny i rak podstawno-kolczystocomórkowy [50]. W postaci guzkowej BCC stwierdza się obecność wielu gniazd guza, rozmieszczonych asymetrycznie. Wariant guzkowo-gruczołowy cechuje występowanie gniazd i pasm przypominających struktury gruczołowe, a w wariantcie guzkowo-torbielowatym widoczne są jamy torbielowate. W odmianie barwnikowej obraz jest podobny do odmiany guzkowej, z obecnością licznych ziaren melaniny. Odmiana powierzchowna charakteryzuje się obecnością okrągłych lub owalnych

gniazd uwypuklających się od warstwy podstawnej naskórka w głąb skóry właściwej. W postaci drobnoguzkowej BCC dominują drobne owalne guzki otoczone palisadowymi bazaloidalnymi komórkami. Typ naciekający tworzą wielokątne struktury o „kolczastych” kształtach i pasma naciekające warstwę siateczkowatą skóry właściwej, z zwyrodnieniem śluzowym podścieliska. W odmianie twarżinopodobnej obserwuje się liczne, drobne gniazda i pasma komórek silnie przylegające do zwłókniałego podścieliska. Rak podstawno-kolczystokomórkowy posiada ogniskowe zmiany keratocyczne, z obecnością dyskeratozy, anaplazji i dużej aktywności mitotycznej. Guz włóknisto- nabłonkowy (*fibroepithelioma*), czyli tzw. guz Pinkusa tworzą cienkie, rozgałęzione pasma, wnikające pionowo w głąb skóry właściwej. Wyróżnia się także postać z różnicowaniem sarkomatycznym, charakteryzującą się współwystępowaniem struktur typowych dla BCC ze złośliwą komponentą mezenchymalną [55, 56].

### 1.3. Rak kolczystokomórkowy

Rak kolczystokomórkowy skóry (squamous cell carcinoma- SCC, *carcinoma planoepitheliale*- rak płaskonabłonkowy) jest drugim pod względem częstości występowania nowotworem skóry, zaraz po raku podstawnokomórkowym i stanowi średnio 20% nowotworów złośliwych skóry [57]. Zachorowalność na raka kolczystokomórkowego w Europie wynosi 60-120/100 000 ludności [56]. SCC wywodzi się z keratynocytów warstwy kolczystej naskórka i charakteryzuje się powolnym wzrostem oraz zdolnością tworzenia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych oraz przerzutów odległych. Ryzyko tworzenia przerzutów szacuje się na około 4% wszystkich przypadków SCC [58]. Liczba nowych zachorowań na raka kolczystokomórkowego dynamicznie wzrasta, niektóre dane wskazują na szybszy wzrost zachorowań na SCC w porównaniu z BCC, co powoduje zmniejszenie różnicy w częstości występowania tych raków skóry [59].

#### 1.3.1. Obraz kliniczny

Rak kolczystokomórkowy lokalizuje się najczęściej na skórze odsłoniętej, eksponowanej na działanie promieniowania UV, na twarzy, grzbietach rąk i przedramion. SCC może rozwijać

się także na podłożu przewlekłych stanów zapalnych lub owrzodzeń, lokalizując się wówczas często na podudziach lub stopach, ale może dotyczyć też innych lokalizacji. Rzadziej rak kolczystokomórkowy może pojawiać się na skórze osłoniętej przed UVR, np. w okolicy narządów płciowych lub w okolicy odbytu. Wyróżnia się także odmianę zlokalizowaną na podszewkach stóp, czyli rak brodawkujący stóp (*carcinoma cuniculatum*) [60]. Rak kolczystokomórkowy może także rozwijać się na błonach śluzowych lub na ich granicy [58]. Zmiany zlokalizowane w obrębie małżowiny usznej oraz czerwieni wargowej mają większą tendencję do tworzenia przerzutów niż raki w innych lokalizacjach [61].

Rak kolczystokomórkowy może pojawić się *de novo* na skórze dotychczas niezmienionej lub na podłożu stanów przednowotworowych, najczęściej w obrębie ognisk rogowacenia słonecznego. Do innych stanów przedrakowych związanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka kolczystokomórkowego zalicza się rogowacenie arsenowe i smołowcowe, przewlekłe porontgenowskie uszkodzenie skóry, leukoplakię, róg skóry oraz *xeroderma pigmentosum*.

Odmiany raka kolczystokomórkowego dzielimy na raki *in situ*, do których zalicza się chorobę Bowena i erytroplazję Queyrata oraz na inwazyjnego raka kolczystokomórkowego. Raki *in situ* charakteryzują się ograniczeniem do naskórka, natomiast inwazyjny rak kolczystokomórkowy wiąże się z przekroczeniem błony podstawnej i pojawieniem się atypowych keratynocytów wnikających w skórę właściwą [17].

Choroba Bowena jest schorzeniem charakteryzującym się występowaniem najczęściej pojedynczych, wolnorosnących plam lub ognisk łuszczycopodobnych. W etiopatogenezie choroby Bowena rolę odgrywają obecność onkogennych typów HPV, ekspozycja na promieniowanie słoneczne, a także promieniowanie jonizujące i ekspozycja na kancerogeny. Zmiany są ostro odgraniczone, rumieniowe, czasem mogą przyjmować kształt obrączkowaty, z lekko uniesionym brzegiem. Lokalizują się najczęściej na tułowiu, ale mogą zajmować także twarz, palce oraz narządy płciowe. W obrazie dermoskopowym stwierdza się obecność białych, bezstrukturalnych obszarów oraz naczyń kłębuszkowatych lub typu kropek [62]. Pojawienie się owrzodzenia lub nacieku wskazuje na rozwój guza inwazyjnego. Do rozwoju inwazyjnego SCC dochodzi w 3-5% przypadków choroby Bowena, charakteryzuje się on agresywniejszym przebiegiem niż SCC rozwijający się na podłożu AK [60].

Inną postacią raka *in situ* jest erytroplazja Queirata, lokalizująca się na błonach śluzowych, najczęściej narządów płciowych, ale może dotyczyć też okolicy odbytu i jamy ustnej. U

mężczyzn najczęściej pojawia się na wewnętrznej powierzchni napletka lub żołądzi, u kobiet na błonach śluzowych warg sromowych. Najczęściej jest to ostro odgraniczona, czerwona, aksamitna plama lub tarczka. Pojawienie się owrzodzenia, nacieku lub zgrubienia wskazuje na rozwój raka kolczystokomórkowego, co zdarza się częściej niż w przypadku choroby Bowena i charakteryzuje się bardziej agresywnym przebiegiem [17, 60].

Inwazyjny rak kolczystokomórkowy ma zazwyczaj postać twardego, egzofitycznego, niebolesnego guzka, często zmienionego zapalnie. Może też przyjąć formę zmiany rumieniowo-naciekowej, z rogowaceniem na powierzchni, a z czasem może pojawiać się owrzodzenie lub martwica. W obrazie dermoskopowym widoczne są białe masy bezstrukturalne, centralny czop rogowy z owrzodzeniem, charakterystyczne naczynia polimorficzne oraz typu spinek do włosów [63]. SCC wysoko zróżnicowany lub o umiarkowanym zróżnicowaniu charakteryzuje się obecnością białych struktur mas keratynowych, białych kół, białych otoczek (halo) i bezstrukturalnych białych obszarów w obrazie dermoskopowym. W niskozróżnicowanych postaciach SCC obserwuje się obecność rumieniowego podłoża, nadżerek i owrzodzeń [64].

Szczególą postacią SCC jest rak brodawkujący (*carcinoma verrucosum*), charakteryzujący się powolnym wzrostem i łagodnym przebiegiem, bez tendencji do tworzenia przerzutów. W jego przypadku szczególne znaczenie ma obecność wirusa brodawczaka ludzkiego, który stwierdzany jest w większości zmian i uznaje się go za główny czynnik ryzyka rozwoju brodawkującego SCC. Zmiany lokalizują się głównie w obrębie jamy ustnej, narządów płciowych, kończyn dolnych oraz na podszewkach stóp. Rak brodawkujący jamy ustnej (*florid oral papillomatosis*) ma postać białych plam lub tarczek, które z czasem grubieją i pojawiają się nieregularne grudki i stwardnienia. *Papillomatosis cutis carcinooides* rozwija się głównie na podudziach, najczęściej na podłożu przewlekłych owrzodzeń lub stanu zapalnego. Ma postać dużych kalafiorowatych tworów, pokrytych strupami, z ogniskami martwicy oraz uniesionymi brzegami. Zmiany na narządach płciowych nazywane kłykciami kończystymi olbrzymimi (*condylomata giganteum Buschke- Löwentein*), opisuje się je jako duże guzy, o nieprzyjemnym zapachu, wyglądem przypominające mózg. Odmiana ta jest w większości wywołana przez HPV 6 i 11. *Carcinoma cuniculatum* także związana jest z obecnością wirusa HPV, dotyczy podeszew stóp, gdzie przyjmuje postać egzofitycznego guza z licznymi szczelinami i zatokami [17].

### 1.3.2. Obraz histologiczny

Rak kolczystokomórkowy w obrazie histologicznym charakteryzuje się proliferacją atypowych keratynocytów, które szerzą się w głąb skóry właściwej, a czasem także do głębszych tkanek. Rak kolczystokomórkowy *in situ* w odmianie Bowena charakteryzuje się obecnością dużych atypowych keratynocytów, tzw. komórek bukietowatych, które nie przekraczają granicy błony podstawnej. W przypadku inwazyjnego SCC keratynocyty wykazują różny stopień zróżnicowania i keratynizacji, obserwuje się obecność mitoz, w tym mitoz patologicznych. Zmiany o wysokim stopniu zróżnicowania charakteryzują się keratynizacją pojedynczych komórek oraz skupiskami atypowych keratynocytów, które wytwarzają koncentryczne skupiska zrogowaciałych szczątków komórkowych, tzw. perły rakowe. W zmianach o niskim stopniu zróżnicowania nie obserwuje się procesu keratynizacji, guz nacieka skórę właściwą wąskimi pasmami, tzw. językami, wokół których widoczny jest nasilony odczyn zapalny [65].

W ocenie złośliwości histologicznej raka kolczystokomórkowego stosuje się skalę Brodersa, w której na podstawie atypii i stopnia zróżnicowania komórek klasyfikuje się raki do jednego z czterech stopni. W skali tej bierze się pod uwagę odsetek komórek niezróżnicowanych, w których nie stwierdza się cech rogowacenia.

**G1-** > 75% komórek wysoko zróżnicowanych. Rak wysoko zróżnicowany, o nieznacznej atypii i wysokim stopniu keratynizacji.

**G2-** 50-75% komórek zróżnicowanych. Rak średnio zróżnicowany. Widoczna większa atypia i mniejsza keratynizacja.

**G3-** 25-50% komórek zróżnicowanych. Rak nisko zróżnicowany. Komórki z cechami anaplazji, z atypowymi mitozami, pojedyncze ogniska keratynizacji.

**G4-** <25% komórek zróżnicowanych. Rak anaplastyczny, niezróżnicowany. Komórki są anaplastyczne, pleomorficzne, wrzecionowate, występują patologiczne mitozy.



## 1.4. Metody oceny zaawansowania klinicznego raków skóry

W celu określenia stopnia zaawansowania raków skóry używa się klasyfikacji TNM, która opiera się na ocenie trzech najistotniejszych cech w rozwoju choroby nowotworowej: T- wielkości guza pierwotnego, N- obecności przerzutów w węzłach chłonnych i M- obecności przerzutów odległych. W oparciu o klasyfikację TNM ocenia się stopień zaawansowania klinicznego, zaliczając nowotwór do jednego z pięciu stopni (w skali 0-IV). Klasyfikacja TNM jest okresowo aktualizowana na podstawie nowych doniesień w zakresie diagnostyki i leczenia chorób nowotworowych przez takie organizacje, jak Międzynarodowa Unia Walki z Rakiem (UICC), Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka (AJCC) czy Światowa Organizacja Zdrowia (WHO). Aktualnie obowiązuje 8 edycja klasyfikacji AJCC, która ukazała się w 2017 roku [50, 58, 66] (Tabela 1 i 2), w której uwzględniono odrębną klasyfikację zmian w rejonie głowy i szyi.

Tabela 1. Ocena stopnia zaawansowania wg AJCC (nie dotyczy SCC skóry powieki) [66].

T (tumor) - guz pierwotny nowotworu	
Tx	Nie można ocenić guza pierwotnego
T0	Nie stwierdza się guza pierwotnego
Tis	Rak przedinwazyjny (carcinoma in-situ)
T1	Guz nie większy niż 2 cm z < 2 czynnikami wysokiego ryzyka <sup>1</sup>
T2	Guz większy niż 2 cm lub guz o każdym wymiarze z $\geq 2$ czynnikami wysokiego ryzyka <sup>1</sup>
T3	Guz z naciekaniami szczęki, żuchwy, oczodołu lub kości skroniowej
T4	Guz z naciekaniami szkieletu lub naciekaniami okołonervowymi na podstawie czaszki

<sup>1</sup> czynniki wysokiego ryzyka zmiany pierwotnej

Czynniki wysokiego ryzyka SCC	
Głębokość nacieku zmiany pierwotnej	>2mm Poziom nacieku wg Clarka $\geq$ IV Nacieki przestrzeni okołonervowych
Lokalizacja zmiany	Małżowina uszna Czerwień wargowa Warga niepokryta włosami
Stopień zróżnicowania	Nisko zróżnicowany lub niezróżnicowany

N (lymph nodes) - stan regionalnych węzłów chłonnych		
Nx	Nie można ocenić okolicznych węzłów chłonnych	
N0	Brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych	
N1	Przerzuty, nie większe niż 3 cm, w jednym regionalnym węźle chłonnym położonym w splotach po stronie pierwotnej zmiany	
N2	Przerzut do pojedynczego węzła chłonnego położonego w splotach po stronie pierwotnej zmiany; wielkość węzła > 3 cm, ale ≤ 6 cm; lub do licznych węzłów chłonnych po stronie zmiany pierwotnej, jednak żaden węzeł chłonny nie jest większy niż 6 cm; lub obustronne przerzuty lub przerzuty na przeciwną stronę niż zmiana pierwotna, jednak węzły chłonne < 6 cm	
	N2a	Przerzut do pojedynczego węzła chłonnego położonego w splotach po stronie pierwotnej zmiany; wielkość węzła > 3 cm, ale ≤ 6 cm
	N2b	Przerzuty do licznych węzłów chłonnych po stronie pierwotnej zmiany, jednak żaden węzeł chłonny nie jest większy niż 6 cm
	N2c	Przerzuty obustronne lub przerzuty na przeciwną stronę niż zmiana pierwotna, jednak węzły chłonne nie większe niż 6 cm
N3	Przerzut do węzła chłonnego o wielkości > 6 cm w największym wymiarze	

M (metastases) - przerzuty odległe	
M0	nie stwierdza się obecności przerzutów odległych
M1	stwierdza się przerzuty odległe

Stopień zaawansowania raka skóry na podstawie klasyfikacji TNM	
Stopień 0	Tis N0 M0
Stopień I	T1 N0 M0
Stopień II	T2 N0 M0
Stopień III	T3 N0 M0
	T1 N1 M0
	T2 N1 M0
	T3 N1 M0
Stopień IV	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N2 M0
	Każde T N3 M0
	T4 Każde N M0
	Każde T Każde N M1

Tabela 2. Aktualizacja klasyfikacji AJCC z 2017 roku - uwzględniono odrębną klasyfikację zmian w rejonie głowy i szyi [66].

T (tumor) - guz pierwotny nowotworu		
Tx	Nie można ocenić guza pierwotnego	
T0	Nie stwierdza się guza pierwotnego	
Tis	Rak przedinwazyjny (carcinoma in-situ)	
T1	Guz nie większy niż 2 cm	
T2	Guz większy niż 2 cm i nie większy niż 4 cm	
T3	Guz większy niż 4 cm lub niewielkie naciekanie kości lub naciekanie okołonerkowe lub głęboki naciek nowotworowy (definiowany jako naciek poza podskórną tkankę tłuszczową lub > 6 mm)	
T4	Guz z naciekaniem rozległym kości, podstawy czaszki i/lub otworu podstawy czaszki	
	T4a	Guz naciekający warstwę korową kości kości/szpik kostny
	T4b	Guz naciekający kości ośrodkowej tułowia i głowy włącznie z naciekaniem otworów międzykręgowych z przestrzenią nadtwardówkową

N (lymph nodes) - stan regionalnych węzłów chłonnych		
Nx	Nie można ocenić okolicznych węzłów chłonnych	
N0	Brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych	
N1	Przerzuty, nie większe niż 3 cm, w jednym regionalnym węzle chłonnym	
N2	Przerzut do pojedynczego węzła chłonnego położonego w splotach po stronie pierwotnej zmiany; wielkość węzła > 3 cm, ale $\leq 6$ cm; lub do licznych węzłów chłonnych po stronie zmiany pierwotnej, jednak żaden węzeł chłonny nie jest większy niż 6 cm; lub obustronne przerzuty lub przerzuty na przeciwną stronę niż zmiana pierwotna, jednak węzły chłonne < 6 cm i bez naciekania pozatorebkowego	
	N2a	Przerzut do pojedynczego węzła chłonnego położonego w splotach po stronie pierwotnej zmiany; wielkość węzła > 3 cm, ale $\leq 6$ cm i bez naciekania pozatorebkowego
	N2b	Przerzuty do licznych węzłów chłonnych po stronie pierwotnej zmiany, jednak żaden węzeł chłonny nie jest większy niż 6 cm i bez naciekania pozatorebkowego
	N2c	Przerzuty obustronne lub przerzuty na przeciwną stronę niż zmiana pierwotna, jednak węzły chłonne nie większe niż 6 cm i bez naciekania pozatorebkowego
N3	Przerzut do węzła chłonnego o wielkości > 6 cm w największym wymiarze i bez naciekania pozatorebkowego lub przerzut do węzła chłonnego z naciekiem pozatorebkowym	
	N3a	Przerzut do węzła chłonnego o wielkości > 6 cm w największym wymiarze i bez naciekania pozatorebkowego
	N3b	Przerzut do węzła chłonnego z naciekiem pozatorebkowym (ENE+, extranodal extension)

M (metastases) - przerzuty odległe	
M0	nie stwierdza się obecności przerzutów odległych
M1	stwierdza się przerzuty odległe

Stopień zaawansowania raka skóry na podstawie klasyfikacji TNM	
Stopień 0	Tis N0 M0
Stopień I	T1 N0 M0
Stopień II	T2 N0 M0
Stopień III	T3 N0 M0
	T1 N1 M0
	T2 N1 M0
	T3 N1 M0
Stopień IV	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N2 M0
	Każde T N3 M0
	T4 Każde N M0
	Każde T Każde N M1

Histologiczne stopnie złośliwości (G)	
Gx	Nie do oceny
G1	Wysoko zróżnicowany
G2	Średnio zróżnicowany
G3	Nisko zróżnicowany
G4	Nie zróżnicowany

Ze względu na dość rzadkie występowanie przerzutów do węzłów chłonnych oraz przerzutów odległych klasyfikacja TNM nie zawsze jest stosowana. NCCN (National Comprehensive Cancer Network, wersja 1 z 2018 roku, z aktualizacją z 2022 roku) zaproponowała metodę oceny ryzyka nawrotu nowotworu, częściej stosowaną w przypadkach miejscowo zaawansowanych raków skóry. Umożliwia ona zakwalifikowanie zmiany do grupy wysokiego lub niskiego ryzyka nawrotu na podstawie parametrów klinicznych i histologicznych (tabela 3 i 4) [59, 67, 68].

Tabela 3. Ocena ryzyka dla raka kolczystokomórkowego skóry wg NCCN [59].

Lokalizacja i rozmiar	Zmiana niskiego ryzyka	Zmiana wysokiego ryzyka
	Obszar L < 20mm	Obszar L ≥ 20mm
	Obszar M < 10 mm	Obszar M ≥ 10 mm
		Obszar H
Brzeży zmiany	Dobrze, ostro odgraniczone	Granice nieostre
Guz pierwotny lub nawrotowy	Pierwotny	Nawrotowy
Immunosupresja	Nie	Tak
Wcześniejsza radioterapia lub przewlekły proces zapalny w tkance guza	Nie	Tak
Szybki wzrost guza	Nie	Tak
Objawy neurologiczne	Nie	Tak
Stopień histologicznego zróżnicowania	Wysoko lub średnio zróżnicowany G1, G2	Nisko zróżnicowany G3
Grubość guza	< 2 mm I–III poziom wg Clarka	≥ 2 mm IV–V poziom wg Clarka
Typ histopatologiczny	<i>Metatypicus</i> <i>Verrucosus</i> <i>Fusifformis</i> <i>Mixtus</i>	<i>Acantholiticus</i> <i>Desmoplasticus</i> <i>Adenoidalis</i> , <i>Adenoidosquamousus</i> <i>Mucosoadenoidalis</i> <i>Fusifformis</i> (po radioterapii)
Naciekanie okołonерwowe	Nie	Tak

Obszar L – tułów i kończyny z wyłączeniem wyprostnej powierzchni podudzia, rąk, stóp, kostek i paznokci; obszar M – część środkowa twarzy, policzki, czoło, skóra owłosiona głowy, szyja, wyprostna powierzchnia podudzia; obszar H – głowa i szyja z wyłączeniem obszaru M, genitalia, ręce i stopy.

Tabela 4. Ocena ryzyka dla raka podstawnokomórkowego wg NCCN [67].

Lokalizacja i rozmiar	Zmiana niskiego ryzyka	Zmiana wysokiego ryzyka
	Obszar L < 20mm	Obszar L ≥ 20mm
	Obszar M < 10 mm	Obszar M ≥ 10 mm
		Obszar H
Brzegi zmiany	Dobrze, ostro odgraniczone	Granice nieostre
Guz pierwotny lub nawrotowy	Pierwotny	Nawrotowy
Immunosupresja	Nie	Tak
Wcześniejsza radioterapia	Nie	Tak
Typ histopatologiczny	Guzkowy, Powierzchnowy	Naciekający
Naciekanie okołonерwowe	Nie	Tak

Obszar L – tułów i kończyny z wyłączeniem wyprostnej powierzchni podudzia, rąk, stóp, kostek i paznokci; obszar M – część środkowa twarzy, policzki, czoło, skóra owłosiona głowy, szyja, wyprostna powierzchnia podudzia; obszar H – głowa i szyja z wyłączeniem obszaru M, genitalia, ręce i stopy.

### 1.5. Metody leczenia rogowacenia słonecznego i raków skóry.

Istnieje wiele metod leczenia rogowacenia słonecznego i raków skóry. W przypadku NMSC decydujące znaczenie mają typ histologiczny, stopień zaawansowania i głębokość nacieku, a także stan ogólny pacjenta i obecność chorób towarzyszących. Należy uwzględnić także rozmiar i liczbę zmian, ich lokalizację, radykalność terapii, stan odporności pacjenta. Ważne są też możliwość zachowania funkcji narządu oraz efekt estetyczny, a także ryzyko możliwych powikłań i działań niepożądanych. Nie bez znaczenia pozostają także preferencje pacjenta, dostępność wybranej metody i doświadczenie lekarza [69].

W przypadku raków skóry metodą z wyboru jest chirurgiczne usunięcie zmiany, z kontrolą marginesów. W przypadku SCC o niskim ryzyku nawrotu zaleca się zachowanie 6 mm marginesu zdrowej tkanki, a w przypadku zmian związanych z większym ryzykiem nawrotu zaleca się zastosowanie szerszych 10 mm marginesów wycięcia. W przypadku raka

podstawnokomórkowego zalecany margines wycięcia zmiany o niskim ryzyku nawrotu to 4 mm, natomiast w przypadku zmian wysokiego ryzyka zaleca się poszerzenie marginesu do 10 mm [50, 58]. Zarówno w przypadku raków podstawnokomórkowych oraz kolczystokomórkowych o wysokim ryzyku wznowy zaleca się zastosowanie chirurgii mikrograficznej Mohsa, która umożliwia śródoperacyjną histologiczną ocenę doszczętności zabiegu. Metoda ta polega na wieloetapowym wycinaniu zmiany z oceną histologiczną kolejnych fragmentów do momentu, w którym w brzegach zmiany nie stwierdza się komórek guza. Zapewnia ona doszczętne usunięcie guza, a jednocześnie umożliwia maksymalne oszczędzenie zdrowych tkanek [55].

Inną metodą leczenia raków skóry jest radioterapia, wykorzystywana w leczeniu BCC i SCC. Stosowana w przypadkach, gdy zabieg operacyjny jest przeciwwskazany lub niemożliwy do wykonania, a także jako leczenie uzupełniające po niedoszczętnym usunięciu guza lub po limfadenektomii z powodu przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych. W przypadku BCC radioterapia wykazuje większą skuteczność w przypadku zmian pierwotnych niż nawrotowych oraz w przypadku zmian guzkowych, o mniejszej średnicy [50, 70].

Kolejną opcją leczenia jest kriochirurgia polegająca na kontrolowanej destrukcji chorobowo zmienionych tkanek poprzez indukcję martwicy termicznej przy użyciu podtlenku azotu lub ciekłego azotu o temperaturze -50 do -60 °C. Metoda ta może być wykorzystywana w przypadku powierzchownych BCC o niskim ryzyku i w przypadku rogowacenia słonecznego. Dane dotyczące skuteczności krioterapii w leczeniu raków kolczystokomórkowych są niejednorodne, co może mieć związek z różnym doborem pacjentów, różnymi technikami przeprowadzenia zabiegu oraz doświadczeniem operatorów [50, 59].

Do powierzchownych metod leczenia należy m.in. terapia fotodynamiczna (photodynamic therapy- PDT), coraz częściej wykorzystywana w leczeniu AK i NMSC. Polega na aplikacji na chorobowo zmienione miejsca fotouczulacza, kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego (ALA) lub aminolewulinian metylu (MAL). Zaletą tej metody jest kumulacja fotosensybilatora w komórkach patologicznych w większym stężeniu niż w komórkach prawidłowych. Do aktywacji fotouczulacza stosuje się światło o długości 610 nm, emitowane przez lampy LED lub lasery. Prowadzi do powstania wolnych rodników tlenowych, anionorodnika podtlenkowego i rodnika wodorotlenkowego, które uszkadzają białka, DNA i fosfolipidy. W przypadku rogowacenia słonecznego PDT charakteryzuje się wysoką skutecznością,



szacowaną na 75-92% po 1-2 zabiegach [71, 72]. W przypadku BCC terapia fotodynamiczna znalazła zastosowanie w powierzchniowych BCC oraz postaci guzkowej, po uprzednim wyłyżeczkowaniu. Skuteczność tej metody w leczeniu BCC szacuje się na 70-90% i jest wyższa w postaciach powierzchniowych niż guzkowych [73]. Zastosowanie tej metody w SCC *in situ* wiąże się ze skutecznością w zakresie 48-89% i wiąże się z wyższym odsetkiem nawrotów [58, 74].

Inną powierzchniową metodą leczenia jest 5% imikwimod, który jest modulatorem odpowiedzi immunologicznej poprzez pobudzenie monocytów i makrofagów. Imikwimod zwiększa odpowiedź komórkową poprzez stymulowanie wydzielania cytokin prozapalnych, takich jak IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . W przypadku rogowacenia słonecznego skuteczność imikwimodu ocenia się na 45-84% [41]. Może być on także stosowany w powierzchniowym BCC, gdzie u 85% pacjentów nie zaobserwowano nawrotów w ciągu 5 lat od zakończenia leczenia [75]. W przypadku SCC *in situ* stosowanie imikwimodu prowadzi do ustąpienia 73% zmian [59].

Innym miejscowym preparatem w kremie jest 5-fluorouracyl (5-FU), który hamuje syntezę DNA i zmienia funkcję RNA. Może być stosowany w leczeniu rogowacenia słonecznego, w powierzchniowym BCC oraz w SCC *in situ*. Skuteczność, bezpieczeństwo i efekt kosmetyczny, na przykładzie raka podstawnokomórkowego, są zbliżone do imikwimodu [76].

W przypadku rogowacenia słonecznego ważną kwestią jest leczenie całego obszaru zagrożenia nowotworowego (OZN), czyli usuwanie widocznych ognisk AK, ale także ognisk subklinicznych w obrębie skóry uszkodzonej promieniowaniem ultrafioletowym, w którym ryzyko rozwoju AK i SCC jest podwyższone [77]. W terapii OZN zastosowanie znajdują omówione powyżej imikwimod, 5-fluorouracyl, terapia fotodynamiczna, a także mebutynian ingenolu, diklofenak oraz tretynoina [41].

W przypadku NMSC dostępne są także metody leczenia ogólnego. Wismodegib to drobnocząsteczkowy inhibitor szlaku Hedgehog, który znajduje zastosowanie w leczeniu miejscowo zaawansowanego BCC oraz przerzutowego BCC, w których nie ma możliwości leczenia chirurgicznego i radioterapii, a także u pacjentów z zespołem Gorlina- Goltza [67]. Innym drobnocząsteczkowym inhibitorem szlaku Hedgehog jest sonidegib. W przypadku raków kolczystokomórkowych skóry o zaawansowaniu regionalnych i układowym dostępne są przeciwciała anty PD-1 (programmed cell death protein-1) cemiplimab i pembrolizumab [50,

58]. Nie bez znaczenia pozostaje także kwestia fotoprotekcji polegająca na regularnym stosowaniu preparatów przeciwsłonecznych przez cały rok.

## 1.6. Nestyna

Nestyna (ang. neuronal stem cell protein) została pierwotnie zidentyfikowana przy użyciu mysiego przeciwciała monoklonalnego Rat-401 w 1985 roku. Przeciwciało to wykazywało specyficzną wobec antygeny, który ulegał przejściowej ekspresji w określonych regionach rozwijającego się ośrodkowego układu nerwowego (OUN) oraz w komórkach nieneuronalnych w obwodowym układzie nerwowym [78]. Dalsze badania doprowadziły do zakwalifikowania jej jako białka należącego do grupy VI typu filamentów pośrednich (IF-intermediate filaments) [79]. Bierze udział w organogenezie i metabolizmie komórkowym, a także uczestniczy w organizacji cytoszkieletu. Białko to składa się z 1621 aminokwasów, o szacowanej masie cząsteczkowej 177,4 kDa. Nestyna ma wysoce konserwatywną domenę rdzenia  $\alpha$ -helikalnego złożoną z 300-330 aminokwasów otoczoną N- i C-końcowymi domenami [80]. Posiada ona dwie cechy, które określają jej unikalne właściwości. Krótki N-końiec zapobiega samoorganizacji nestyny, w wyniku czego tworzy ona heterodimery z innymi IF, najchętniej z wimentyną [81]. Dodatkowo nestyna ma niekonwencjonalnie długą domenę C-końca, która wystaje ze struktury włókna, będąc dostępną dla modyfikacji potranslacyjnych i interakcji z białkami [80].

Ekspresję nestyny stwierdzono pierwotnie w neuroepitelialnych komórkach macierzystych, natomiast badania wykazały, że nestyna ulega ekspresji także w innych tkankach, między innymi w komórkach satelitowych mięśni szkieletowych, rozwijających się miotomach, jądrach, wyspach trzustkowych, mieszkach włosowym, sercu i szpiku kostnym [82, 83, 84, 85, 86, 87, 88]. Nestyna, podobnie jak inne filamety pośrednie odgrywa znaczącą rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej komórek i tkanek [89]. Bierze ona także udział w różnych procesach komórkowych, m.in. w migracji komórek, proliferacji czy apoptozie [90, 91]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że fosforylacja białek filamentów pośrednich znacząco zmienia strukturę/dynamikę IF w komórkach. Nestyna ma wiele miejsc fosforylacji i wykazano, że jest fosforylowana przez kinazy zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, na przykład kinazę cyklinozależną 1 (cdc2) i kinazę cyklinozależną 5 (Cdk5) [92, 93]. W normalnych komórkach nestyna jest silnym czynnikiem determinującym

przeżycie, działając poprzez cytoplazmatyczną sekwestrację kompleksu Cdk5/p35, który chroni komórki przed śmiercią komórek wywołaną stresem oksydacyjnym [94]. Istnieją doniesienia wskazujące, że fosforylacja nestyny wpływa bezpośrednio na proliferację komórek nowotworowych [95].

Dowiedziano, że nestyna odgrywa istotną rolę w patogenezie niektórych nowotworów, sprzyjając ich rozwojowi. Badania na modelu mysim z wykorzystaniem linii komórkowych raka wątrobowokomórkowego Huh7 [96] oraz glejaka wielopostaciowego A172 [97] wykazały, że zahamowanie ekspresji nestyny skutkowało zmniejszonym tworzeniem się guza *in vivo*.

Ścieżka sygnałowa kinazy 3- fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej Akt jest jednym z głównych układów aktywowanych w trakcie kancerogenezy, odpowiedzialnych za regulowanie procesów komórkowych, jak proliferacja czy migracja [98, 99]. Wykazano, że dysregulacja i nadmierne pobudzenie szlaku PI3K-Akt-mTOR odgrywa znaczącą rolę w rozwoju nowotworu. Zaobserwowano zmniejszoną fosforylację kluczowych białek, m.in. Akt i GSK3 $\beta$  pod wpływem obniżenia ekspresji nestyny [100].

Na przykładzie niedrobnokomórkowego raka płuca badano wpływ nestyny na proliferację komórek nowotworowych. Linie komórkowe A549 i H460 transfekowano plazmidami kodującymi shRNA przeciw nestynie. Za pomocą immunofluorescencji i immunoblotingu stwierdzono zmniejszoną ekspresję nestyny, a jej zablokowanie w komórkach nowotworowych doprowadziło do zmniejszenia zdolności do tworzenia kolonii. Wielkość proliferacji mierzona jako spadek ilości żywych komórek była zmniejszona w komórkach o obniżonej ekspresji nestyny. Ponadto komórki wykazujące obniżoną ekspresję nestyny charakteryzowały się także obniżeniem ekspresji markera proliferacji Ki-67. Dodatkowo synteza DNA w komórkach o obniżonej ekspresji nestyny została znacząco zahamowana w porównaniu z kontrolnymi komórkami nowotworowymi [100].

Innym istotnym mechanizmem jest zdolność nestyny do nasilenia procesów onkogenezy poprzez hamowanie genów supresorowych. Przykładem może być rak wątrobowokomórkowy, w którym ekspresja nestyny korelowała z niską ekspresją białka p53, co wiązało się z niskim odsetkiem przeżyć [96].

Oporność na śmierć komórek na drodze apoptozy to ważny mechanizm obronny komórek nowotworowych, pozwalający komórkom przeżyć np. chemioterapię. Na przykładzie glejaka dowiedziano, że populacja komórek macierzystych wykazujących ekspresję nestyny

korelowała z opornością na chemioterapię [101]. Innym mechanizmem oporności na śmierć komórek jest autofagocytoza, proces polegający na degradacji przez komórkę białek lub organelli komórkowych, aby podtrzymać metabolizm [102]. Wykazano wpływ nestyny na ścieżkę sygnałową AKT/mTOR, która pełni kluczową rolę w procesie autofagii [103].

#### 1.6.1. Nestyna jako marker nowotworowych komórek macierzystych.

Nowotworowe komórki macierzyste (CSCs- cancer stem cells) definiuje się jako małą subpopulację inicjalnych, niezróżnicowanych komórek nowotworowych, które charakteryzują się zdolnością do samoodnawiania i różnicowania się w wiele typów komórek nowotworowych [104]. Do ich opisanie używa się terminów „inicjujący nowotwór” lub „nowotworowy” (ang. tumorigenic, tumor-initiating), ze względu na ich zdolność do powiększania się guza [105]. Zdolność nowotworowych komórek macierzystych do odnawiania stale rosnącego guza odpowiedzialna jest za oporność terapeutyczną i tworzenie przerzutów.

Komórki macierzyste raka są zwykle charakteryzowane na podstawie obecności i/lub braku kilku markerów komórkowych, których kombinacja jest specyficzna dla fenotypu CSC w odpowiednim guzie. Do takich markerów zalicza się białka powierzchniowe lub błonowe komórki (CD15, CD24, CD44, CD133, CXCR4, NCAM i ABC transportery), białka cytoplazmatyczne (nestyna, Musashi-1 i dehydrogenaza aldehydowa) lub białka jądrowe (Sox-2, Oct3/4 i Nanog), które pełnią różne funkcje strukturalne lub metaboliczne w komórce [104].

Ekspresja nestyny była badana w wielu typach nowotworów, z uwagi na potencjalną wartość diagnostyczną oraz prognostyczną. Pierwsze badania dotyczące ekspresji nestyny w nowotworowych komórkach macierzystych dotyczyły nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, między innymi w rdzeniakach, gwiaździakach, wyściółczakach czy zwojakoglejakach. Wykazano koekspresję nestyny z markerami CD133 oraz Sox-2. Zaobserwowano także spadek ekspresji nestyny wraz ze zwiększonym zróżnicowaniem komórek macierzystych [106, 107, 108, 109].

Hodowla komórek raka płaskonabłonkowej jamy ustnej w określonej pożywce bez surowicy doprowadziła do powstania sfer zawierających komórki wykazujące fenotypy CSC, w tym wysoką ekspresję nestyny, CD133, Oct-4 i Nanog, będących markerami komórek

macierzystych. Wykazywały one zdolność do różnicowania, zwiększoną zdolność migracji i zdolność inicjowania nowotworzenia. Należy jednak zauważyć, że nestynę znaleziono również w ciałkach kulistych komórek, które wykazywały ograniczony potencjał proliferacyjny i zmniejszoną ekspresję genów odpowiedzialnych za samoodnawianie [110].

Ekspresję nestyny wykazano także w nowotworowych komórkach macierzystych wyizolowanych z nowotworów pochodzenia mezenchymalnego, takich jak mięsak prążkowanokomórkowy (*rhabdomyosarcoma*), kostniakomięsak (*osteosarcoma*), chrzęstniakomięsak (*chondrosarcoma*), włókniakomięsak (*fibrosarcoma*). Podobnie jak w przypadku fenotypu CSC w guzach neurogennych stwierdzono tutaj koekspresję nestyny z CD133 [111, 112, 113].

Dowiedziano znaczenia nestyny jako czynnika prognostycznego w raku jajnika [114]. Wykazano korelację ekspresji nestyny z zaawansowaniem procesu nowotworowego, zajęciem węzłów chłonnych oraz obecnością przerzutów odległych [115]. Zauważono także że zwiększona ekspresja nestyny w surowicy pacjentek chorujących na raka jajnika koreluje z bardziej agresywnym przebiegiem [116].

Z guza prostaty wyizolowano komórki wykazujące ekspresję typowych markerów komórek macierzystych, takich jak Nanog, Oct4, Sox-2, CD133 oraz nestyny [117]. W badaniu na liniach komórkowych potwierdzono chemiooporność i rakotwórczość komórek macierzystych raka prostaty [118].

Komórki macierzyste raka piersi są zazwyczaj izolowane zgodnie z ich fenotypem ESA+/CD44+/CD24-. Wykazują także ekspresję Oct-4 i nestyny oraz wykazują zwiększoną rakotwórczość poprzez tworzenie mammosfer w warunkach *in vitro* [119]. Wysoka ekspresja nestyny wiąże się ze 100-krotnym wzrostem rakotwórczości w porównaniu z komórkami wykazującymi słabą ekspresję nestyny i fenotypem ESA+/CD44+/CD24-. Dowiedziono, że podwyższona ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych raka piersi jest negatywnym czynnikiem prognostycznym. Związana była ona z młodszym wiekiem pacjenta, wyższym stopniem złośliwości guza, zajęciem węzłów chłonnych oraz krótszym przeżyciem [120].

Zwiększona ekspresja nestyny korelowała także z niskim stopniem różnicowania, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, stopniem w klasyfikacji TNM oraz rozmiarem guza w przypadkach niedrobnokomórkowego raka płuca, co wskazuje na możliwość wykorzystania nestyny jako czynnika prognostycznego także w tym nowotworze [121].

Nestyna jako marker nowotworowych komórek macierzystych była także raportowana między innymi w przypadku gruczolakoraka żołądka. Stwierdzono korelację między ekspresją nestyny i CD44, co stanowiło pierwszy opis fenotypu nestyna+/CD44++ w tym typie nowotworu [122].

### 1.6.2. Nestyna jako marker angiogenezy

Angiogeneza to złożony proces tworzenia nowych kapilar, poprzez wydłużanie i rozgałęzianie sieci już istniejących naczyń, wywołany stymulacją czynnikami proangiogennymi [123]. Może być elementem procesów fizjologicznych, jak embriogeneza lub regeneracja tkanek lub procesów patologicznych, jak kancerogeneza. Proces waskularyzacji regulowany jest przez układ czynników pobudzających i hamujących.

Rozwój dojrzałej sieci naczyniowej to proces charakteryzujący się kolejnymi etapami na podłożu molekularnym, które opierają się na zrównoważonej interakcji komórek, macierzy pozakomórkowej i czynników angiogennych. Bodźcem inicjującym proces często jest hipoksja, która powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego HIF-1, indukującego transkrypcję różnych cytokin i czynników angiogennych. Aktywacja komórek śródbłonka przez te czynniki reguluje rozszerzenie naczyń i zwiększoną przepuszczalność z późniejszą degradacją błony podstawnej przez metaloproteinazy macierzy (MMP-2 i MMP-9), po której następuje wynaczynienie białek osocza. W odpowiedzi na stymulację cytokinami i czynnikami wzrostu (czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego – VEGF, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów – bFGF, płytkowy czynnik wzrostu – PDGF) komórki śródbłonka migrują ze światła naczyń i razem z przyciągniętymi prekursorami komórek śródbłonka tworzą naczynie, która „wyrasta” ze starej kapilary. Tworzy się nowe światło, rozpoczyna się przepływ krwi, a komórki śródbłonka naczyń dojrzewają, tworząc nową błonę podstawną. Perycyty, pluripotencjalne komórki pochodzenia mezenchymalnego o cechach komórek mięśni gładkich, biorą udział w ostatnim etapie tworzenia i dojrzewania naczyń poprzez bezpośrednią interakcję z komórkami śródbłonka. Na funkcję perycytów w tych szlakach wpływa izoforma BB PDGF oraz aktywacja receptora Tie-2 przez Angiopoetynę 1 i 2 (Ang-1 i Ang-2) [123].

Do najważniejszych czynników pobudzających proces angiogenezy należy rodzina naczyniowo-śródbłonkowych czynników wzrostu (vascular endothelial growth factor, VEGF). Opisano pięć podtypów VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i łożyskowy czynnik

wzrostu) z różnym powinowactwem do trzech różnych receptorów VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3, należących do rodziny kinaz tyrozynowych. Aktywacja VEGFR-2, obecnego na wielu typach komórek, m.in. komórek śródbłonna, komórek mięśni gładkich naczyń, hematopoetycznych komórkach macierzystych, monocytach, neuronach, makrofagach, płytkach krwi, keratynocytach) przez VEGF-A wydaje się istotnym etapem angiogenezy zarówno fizjologicznej jak i związanej z rozrostem nowotworowym. Jego aktywacja promuje proliferację i wzrost oraz wydłuża czas przeżycia komórek śródbłonna. Aktywacja VEGFR-3 przez VEGF-C i VEGF-D na komórkach śródbłonna limfatycznego jest związana z limfangiogenezą [124].

Stopień angiogenezy oceniany jest za pomocą wskaźnika gęstości mikrokapilar (MVD), z wykorzystaniem przeciwciał przeciw CD34, CD31 oraz czynnikowi VIII [125]. Antygen CD34 jest transbłonową glikoproteiną, należy do rodziny adhezyjnych molekuł – sialomucyn, jej ciężar cząsteczkowy wynosi 110 kDa [126]. Białko CD34 ulega ekspresji na powierzchni komórek hematopoetycznych szpiku kostnego, komórek tucznych, komórek dendrytycznych, a także na powierzchni komórek progenitorowych śródbłonna i komórkach śródbłonna, co wykorzystuje się do oceny angiogenezy. Reakcja immunohistochemiczna z antygenem CD34 uwidacznia duże i małe naczynia o różnym stopniu dojrzałości. Antygen CD31 jest białkiem adhezyjnym płytek i śródbłonna (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM1), należącym do nadrodziny immunoglobulin. Ulega ekspresji na komórkach śródbłonna naczyń, na powierzchni neutrofilów, monocytów, limfocytów T i B, płytek krwi oraz komórek nowotworowych. Ekspresja CD31 obserwowana jest na komórkach śródbłonna naczyń różnych rozmiarów, zarówno niedojrzałych jak i dojrzałych. Dodatkowo CD31 ulega ekspresji także na naczyniach limfatycznych. Czynnik VIII to glikoproteina podstawowa w procesach krzepnięcia krwi. Ulega ekspresji na dużych, dojrzałych naczyniach [127]. Ocena wskaźnika gęstości mikrokapilar (MVD) polega na określeniu średniej liczby naczyń/mm<sup>2</sup> w trzech najbardziej unaczynionych miejscach, tzw. „hot spots” [128]. Inną metodą oceny angiogenezy jest metoda Chalkleya, polegająca na określeniu powierzchni lub objętości naczyń w trzech najbardziej unaczynionych punktach [129].

Czynniki angiogenne, takie jak zwiększony poziom VEGF, ale także zwiększenie ekspresji bFGF w keratynocytach, wydają się odgrywać ważną rolę w progresji raków skóry [130]. Ekspozycja na promieniowanie UVB wpływa na równowagę czynników angiogennych, sprzyjając zwiększonej proliferacji komórek śródbłonna w istniejących naczyniach krwionośnych poprzez stymulację bFGF i VEGF, jednocześnie zmniejszając wytwarzanie

antyangiogenne IFN beta [131]. Bowden i wsp. oceniali ekspresję VEGF w SCC i BCC. VEGF ulegał ekspresji w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych zarówno w obrębie guza, jak i przylegającej skórze, a także w keratynocytach warstwy podstawnej naskórka. Zauważyli, że w przypadku BCC VEGF był wyrażany w komórkach nabłonka guza, głównie na inwazyjnym froncie guza w 24/44 przypadkach i jego ekspresja była istotnie większa w okolicy guza niż w obrębie skóry zdrowej. Bardziej rozlany wzorec ekspresji VEGF stwierdzono w 32/41 przypadków SCC i była ona istotnie związana ze stopniem zróżnicowania guza [132].

Nie znalazłam w światowym piśmiennictwie badań oceniających stopień ekspresji nestyny w śródbłonku naczyń w rakach skóry lub rógowaceniu słonecznym.

Na przykładzie raka trzustki opisywano ekspresję CD34, CD31 i czynnika VIII zarówno w nowopowstałych małych naczyniach jak i dużych naczyniach już istniejących, podczas gdy nestyna ulegała ekspresji jedynie w nowych naczyniach. Wydaje się zatem, że nestyna może być wykorzystywana jako wiarygodny marker neoangiogenezy. Zaobserwowano także, że redukcja ekspresji nestyny przy użyciu techniki wyciszania genów powodowała zahamowanie wzrostu linii komórkowych śródbłonka naczyniowego. W związku z tym nestyna może być punktem uchwytu umożliwiającym zahamowanie angiogenezy w raku trzustki [133].

Oceniano także wartość prognostyczną nestyny w komórkach przewodowego raka piersi oraz wpływ ekspresji nestyny na angiogenezę. Przeprowadzono analizę immunohistochemiczną 124 przypadków raka przewodowego z użyciem przeciwciał monoklonalnych przeciw nestynie, CD31, CD34, SOX-18 i Ki-67. Wykazano, że nasilenie ekspresji nestyny w komórkach guza korelowało z ekspresją nestyny w komórkach śródbłonka naczyń. Zauważono także dodatnią korelację między naczyniami wykazującymi ekspresję nestyny i SOX-18. Badanie potwierdziło wcześniejsze doniesienia, z których wynika, że ekspresja nestyny w komórkach śródbłonka koreluje z rakiem piersi potrójnie negatywnym, niskim stopniem zróżnicowania G3, wyższym wskaźnikiem proliferacji i krótszym przeżyciem. Ekspresję nestyny badano także na liniach komórkowych reprezentujących różne stopnie złośliwości. Wyższy poziom ekspresji nestyny obserwowano na liniach MDA-MB-231 i B02 niż MCF-7 i SK-BR-3 odpowiadających bardziej agresywnym postaciom raka piersi. Autorzy uważają, że podwyższony poziom ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych wiąże się z nasiloną angiogenezą, jednak mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska wymagają dalszych badań [134].



Badano także stopień ekspresji nestyny jako markera angiogenezy w raku jelita grubego. Zaobserwowano pozytywny trend między wysoką gęstością naczyń (MVD) wykazujących dodatnią ekspresję nestyny i zajęciem węzłów chłonnych. Odnotowano także znacznie wyższy wskaźnik MVD wykazujących ekspresję nestyny u pacjentów z bardziej zaawansowanym stadium klinicznym niż we wczesnym stadium raka. Wyniki sugerują, że nestyna może być wiarygodnym markerem dla oceny angiogenezy u chorych na raka jelita grubego. W przeciwieństwie do CD34 ekspresja nestyny w naczyniach krwionośnych wydaje się być bardziej czułym markerem progresji nowotworu [135].

Liczne doniesienia potwierdzają, że nestyna może być wiarygodnym markerem proliferujących komórek śródbłonna w tkankach, w których dochodzi do neowaskularyzacji [136, 137, 138]. Wciąż niejasna jednak pozostaje rola nestyny w procesie angiogenezy. Również pochodzenie komórek śródbłonna naczyniowego, wykazujących ekspresję nestyny jest niewyjaśnione. Proponowano teorię, która wskazywała na migrację mezenchymalnych komórek macierzystych ze szpiku kostnego [139]. Dong i wsp. wykazali, że komórki progenitorowe ludzkiego glejaka mają zdolność przekształcania się w komórki śródbłonna naczyń *in vitro* i *in vivo* [140]. Podobnie w skórze komórki macierzyste mieszków włosowych wykazują zdolność tworzenia naczyń [141].

### 1.6.3. Ekspresja nestyny w skórze

Sellheyer i Krahl scharakteryzowali wzorzec ekspresji nestyny w skórze. Na wczesnym etapie embriogenezy nestyna ulega ekspresji w obrębie całej niedojrzałej skóry. Wraz z rozwojem mieszka włosowego ekspresja nestyny ogranicza się do torebki łącznotkankowej mieszka włosowego. Podczas całego procesu embriogenezy keratynocyty nie wykazują ekspresji nestyny, natomiast dodatnie są komórki dendrytyczne, początkowo rozproszone między keratynocytami, a następnie lokalizujące się w zewnętrznej pochewce włosa. Rozwijające się naczynia krwionośne wykazują dodatnią ekspresję nestyny przez cały okres embriogenezy. W zdrowej skórze osób dorosłych ekspresję nestyny wykazują komórki torebki łącznotkankowej mieszka włosowego oraz okołomieszkowych naczyń krwionośnych. Dodatnio barwią się wrzecionowate fibroblasty ułożone wzdłuż torebki łącznotkankowej oraz fibroblasty o obfitej cytoplazmie w obrębie brodawki włosa. Zauważono także zmienną ekspresję w zależności od cyklu włosa, najsilniejsza ekspresja obserwowana była w fazie

wczesnego anagenu. Wydaje się, że torebka łącznotkankowa (inaczej mieszek włosowy łącznotkankowy) wywodząca się z mezenchymy, może stanowić niszę dla mezenchymalnych komórek macierzystych skóry. Nestyna jest uważana za marker mezenchymalnych komórek macierzystych w różnych tkankach [142].

## 2. Założenia i cel pracy

Niemelanocytowe nowotwory skóry to niejednorodna grupa nowotworów, w której dominują raki podstawnocomórkowe (BCC) i raki kolczystokomórkowe (SCC). Są najczęstszymi nowotworami w populacji rasy kaukaskiej i jednocześnie najczęstszymi nowotworami skóry, a w związku ze zwiększoną ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe oraz wzrostem liczby osób leczonych immunosupresyjnie, zachorowalność na nie stale rośnie, stanowiąc istotny problem kliniczny i terapeutyczny [4].

Nestyna jest to białko należące do typu VI filamentów pośrednich, bierze udział w organogenezie i metabolizmie komórkowym, uczestniczy też w organizacji cytoszkieletu. Ekspresję nestyny stwierdzono pierwotnie w neuroepitelialnych komórkach macierzystych, natomiast badania wykazały, że nestyna ulega ekspresji także w innych tkankach. Podobnie jak inne filamenty pośrednie odgrywa ona znaczącą rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej komórek i tkanek [89]. Bierze ona także udział w różnych procesach komórkowych, m.in. w migracji komórek, proliferacji czy apoptozie [90, 91].

Dalsze badania wykazały, że nestyna odgrywa także rolę w patogenezie wielu nowotworów, wykazano ekspresję nestyny w czerniaku, raku prostaty, trzustki, raku piersi i wielu innych. Badania wskazują na możliwą rolę nestyny w procesach kancerogenezy, m.in. hamowanie genów supresorowych, oporność na chemioterapię lub oporność na autofagocytozę. Ponadto wykazano, że nestyna jest jednym z markerów nowotworowych komórek macierzystych [104]. Istnieją doniesienia o znaczeniu prognostycznym ekspresji nestyny w raku piersi [120] oraz w raku jajnika [114]. W literaturze światowej, jak dotąd, istnieją jedynie pojedyncze prace dotyczące ekspresji nestyny w niemelanocytowych nowotworach skóry, a ich wyniki są niejednoznaczne.

Ponadto liczne doniesienia potwierdzają, że nestyna może być wiarygodnym markerem proliferujących komórek śródbłonna w tkankach, w których dochodzi do neowaskularyzacji.

Prowadzone badania wykazały, że nestyna może być wiarygodnym markerem angiogenezy w raku trzustki, raku piersi oraz raku jelita grubego [ 133, 134, 135]. Jak dotąd nie oceniano możliwości wykorzystania nestyny jako markera angiogenezy w rakach skóry.

W związku z powyższym, celem obecnej pracy jest:

1. Ocena ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych raka kolczystokomórkowego, podstawnkomórkowego oraz w rogowaceniu słonecznym.
2. Ocena gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny w podścielisku nowotworowym raka kolczystokomórkowego, podstawnkomórkowego i w rogowaceniu słonecznym.
3. Ocena gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 w podścielisku nowotworowym raka kolczystokomórkowego, podstawnkomórkowego i w rogowaceniu słonecznym.
4. Ocena gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD34 w podścielisku nowotworowym raka kolczystokomórkowego, podstawnkomórkowego i w rogowaceniu słonecznym.
5. Ocena nasilenia ekspresji antygenu Ki-67 w raku podstawnkomórkowym, kolczystokomórkowym i rogowaceniu słonecznym.
6. Ocena korelacji między ekspresją nestyny, CD31, CD34 i antygenu Ki-67 w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnkomórkowym i kolczystokomórkowym.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Materiał

Badaną grupę stanowiło 118 pacjentów leczonych na Oddziale Chirurgii Plastycznej w Katedrze i Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w latach 2015-2019, w tym 32 osoby z rozpoznaniem raka kolczystokomórkowego (SCC), 47 osób z rozpoznaniem raka podstawnkomórkowego (BCC) oraz 39 osób z rogowacieniem słonecznym (AK). W grupie pacjentów z rozpoznaniem rakiem kolczystokomórkowym kobiety stanowiły 34,4%, a mężczyźni 65,6%. Wiek pacjentów wynosił od 55 do 99 lat, średnia wieku wynosiła  $78,6 \pm 10,0$ . Czas trwania choroby wynosił średnio  $1,5 \pm 1,36$  roku. Zmiany skórne lokalizowały się najczęściej na skórze ekspozowanej

na działanie promieniowania UV (93%). Najczęstszą lokalizacją były skóra głowy (19,4%) oraz nos (19,4%). Głębokość nacieku wynosiła średnio  $4,9 \pm 4,2$  mm. Wśród pacjentów z rakiem podstawnokomórkowym kobiety stanowiły 53,2%, a mężczyźni 46,8%. Wiek chorych zawierał się w granicach między 40 a 99 lat (średnio  $71 \pm 12,9$  lat), średnica zmiany wynosiła średnio 15,2 mm (zakres wartości od 5 do 50 mm). Średni czas trwania choroby to 1,8 roku. Najczęstszą lokalizacją była skóra twarzy. U 27,7% pacjentów występowały mnogie ogniska. W grupie pacjentów z rozpoznaniem raka skóry słonecznej kobiety stanowiły 71,8%, a mężczyźni 28,2%. Wiek wynosił średnio  $70,4 \pm 12,5$  lat. Średni czas trwania choroby wynosił 1,4 roku. Większość zmian lokalizowała się na skórze ekspozycyjnej na słońce (83,8%).

Dokładną charakterystykę grup przedstawia tabela nr 5.

Projekt został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (opinia Komisji Bioetycznej nr KB- 311/2019).

Tab. 5. Charakterystyka grupy badanej.

	AK	BCC	SCC
N	39	47	32
Wiek [lata]:			
- zakres	39-87	40-99	55-99
- średnia $\pm$ SD	70,4 $\pm$ 12,5	71,0 $\pm$ 12,9	78,6 $\pm$ 10,0
- mediana	72	76	79
Płeć:			
-kobiety	28 (71,8%)	25 (53,2%)	11 (34,4%)
- mężczyźni	11 (28,2%)	22 (46,8%)	21 (65,6%)
Lokalizacja:			
- skóra odsłonięta	31 (82,0%)	37 (86%)	29 (90,6%)
- skóra zasłonięta	6 (15,4%)	6 (14,6%)	2 (6,3%)
Lokalizacja szczegółowa:			
- Twarz	12 (30,7%)	22 (46,8%)	7 (21,9%)
- Nos	11 (28,2%)	10 (21,3%)	6 (18,8%)
- Wargi	2 (5,1%)	1 (2,1%)	6 (18,8%)
- Ucho	2 (5,1%)	0 (0%)	3 (9,4%)
- Głowa	2 (5,1%)	3 (6,4%)	6 (18,8%)
- Tułów	4 (10,3%)	6 (12,8%)	2 (6,3%)
- Kończyna górna	1 (2,6%)	0 (0%)	0 (0%)
- Kończyna dolna	3 (7,6%)	1 (2,1%)	1 (3,1%)
Czas trwania [lata]:			
- zakres	0,5- 10	0,5- 8	0,25-6
- średnia $\pm$ SD	1,4 $\pm$ 1,9	1,8 $\pm$ 1,75	1,5 $\pm$ 1,36
- mediana	1	1	1
Głębokość nacieku [mm]:			
- zakres			1,2-18
- średnia $\pm$ SD			4,89 $\pm$ 4,2
- mediana			3
Średnica zmiany [mm]:			
- zakres		5-50	
- średnia $\pm$ SD		15,2 $\pm$ 9	
- mediana		11	
Ogniska nawrotowe		BCC nawrotowy 4 (8,5%) BCC pierwotny 43 (91,5%)	
Zmiany wieloogniskowe		BCC mnogie 13 (27,7%) BCC pojedyncze 32 (72,3%)	

## 3.2. Metody

U wszystkich badanych pacjentów pobrano materiał tkankowy, który stanowił guz nowotworowy z otaczającym marginesem zdrowej skóry. Materiał utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie i zatopiono w parafinie. Z uzyskanych bloczków parafinowych wykonano skrawki o grubości 4µm, które odparafinowano w ksylenie, uwodniono, a następnie wybarwiono hematoksyliną-eozyną i poddano ocenie histologicznej.

### 3.2.1. Badania immunohistochemiczne nestyny, CD31, CD34, Ki-67.

Badania zostały przeprowadzone na archiwalnych bloczkach parafinowych zawierających 47 przypadków raka podstawnokomórkowego oraz 32 kolczystokomórkowego skóry. Jako kontroli użyto 39 przypadków raka skóry. Z ww. materiału ukrojono preparaty o grubości 4 µm, na których wykonano reakcje immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał CD31 (nr kat. IR610, ready-to-use, Dako, Glostrup, Dania), CD34 (nr kat. IR632, ready-to-use, Dako), Nestin (nr kat. OBT1610, 1:100, BIO-RAD, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone) oraz Ki-67 (mysie, monoklonalne przeciwciało, nr kat. IR626, klon MIB-1, ready-to-use, Dako)

Procedura reakcji immunohistochemicznej z wykorzystaniem zestawu do wizualizacji EnVision FLEX+, Mouse (Dako) polega na odparafinowaniu, uwodnieniu oraz ciepłym odsłanianiu epitopów w buforze Tris/EDTA, pH 9 (EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH, dla przeciwciał CD31, CD34 oraz Nestin) lub w buforze cytrynianowym, pH 6 (EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH, dla przeciwciała Ki-67) przy użyciu aparatu PT Link (tzw. procedura 3-w-1). Następnym krokiem jest przepłukanie w buforze (roztwór soli fizjologicznej z buforem TRIS (pH 7,6) zawierającym Tween 20. Po nakropieniu EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent preparat inkubuje się 5 minut, po czym ponownie przepłukuje się w buforze. Po nakropieniu przeciwciał pierwszorzędowych – inkubuje się przez 20 minut, po czym przepłukuje się w buforze. W kolejnym kroku nakrapia się EnVision FLEX/HRP i inkubuje 20 minut, po czym przepłukuje w buforze i inkubuje w nim 5 minut. Następnie nakrapia się diaminobenzodynę (DAB), będącą substratem dla

peroksydazy chrzanowej i inkubuje przez 10 minut, po czym przepłukuje w buforze. W celu uwidocznienia jąder komórkowych i struktur tkanki nakrapia się EnVision FLEX Hematoxylin i inkubuje 5 minut. Resztki odczynnika odpłukuje się w wodzie destylowanej, następnie w buforze i ponownie w wodzie destylowanej. Skrawki odwadnia się przez przeprowadzenie przez szereg alkoholowy o wzrastającym stężeniu procentowym (70%, 96%, absolut) oraz wksylenie i inkubuje po 5 minut w każdym, po czym zamyka się szkiełka.

Następnie zdigitalizowano wykonane preparaty z wykorzystaniem skanera histologicznego Panoramic MIDI II (3D Histech, Budapeszt, Węgry).

### 3.2.2. Ocena ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych

Nasilenie reakcji immunohistochemicznej zostało ocenione z użyciem półilościowej skali IRS (Immuno Reactive Score) według Remmele i Stegner (tab. 6) [143]. Skala ta uwzględnia odsetek komórek immunopozytywnych (0-4 punktów) oraz intensywność reakcji barwnej (0-3 punktów). Ostateczny wynik jest iloczynem punktów przyznanych za powyższe parametry wynosząc od 0-12 punktów. W zależności od wyliczonej punktacji w skali IRS, nasilenie ekspresji opisuje się jako słabe, umiarkowane, silne lub jako jej brak (tab. 7). Ekspresja nestyny oceniana była w komórkach nowotworowych w masie guza.

Tab. 6. Skala oceny reakcji immunohistochemicznej IRS wg Remmele i Stagner.

<b>A- Liczba komórek immunopozytywnych</b>		<b>B- Intensywność reakcji</b>	
0	Brak komórek z pozytywną reakcją	0	Brak reakcji barwnej
1	< 10% komórek z pozytywną reakcją	1	Słabo nasiloną reakcją barwną
2	11-50% komórek z pozytywną reakcją	2	Średnio nasiloną reakcją barwną
3	51-80% komórek z pozytywną reakcją	3	Intensywną reakcją barwną
4	>80% komórek z pozytywną reakcją		
<b>Iloczyn AxB</b>			

Tab. 7. Interpretacja nasilenia ekspresji nestyny.

Liczba punktów w skali IRS	IRS klasyfikacja
0-1	0- negatywna
2-3	1- pozytywna, słaba ekspresja
4-8	2- pozytywna, umiarkowana ekspresja
9-12	3- pozytywna, silnie zaznaczona ekspresja

Za reakcję dodatnią przyjęto wyniki w skali IRS: 1,2 i 3, za reakcję ujemną przyjęto wynik 0.

### 3.2.3. Ocena liczby naczyń krwionośnych

Oceny liczby naczyń krwionośnych dokonano na skatalogowanych elektronicznie wirtualnych preparatach. Według danych literaturowych antygeny CD31 oraz CD34 są jednymi z najczęściej wykorzystywanych markerów komórek endotelialnych. Nestyna także ulega ekspresji w śródbłonku naczyń krwionośnych i może służyć jako marker do oznaczania naczyń krwionośnych. W związku z powyższym naczynia krwionośne uwidoczniono przy użyciu swoistych przeciwciał monoklonalnych dla nestyny, CD31 i CD34. Następnie poszukiwano trzech obszarów reprezentatywnych (ang.: hot spot) z najwyższą ekspresją ww. antygenów, na których zliczano pozytywnie wyznakowane naczynia, a następnie z trzech obszarów „hot spot” wyliczano średnią arytmetyczną. Tak oceniona gęstość naczyń krwionośnych- MVD (ang. microvessel density), posłużyła do oceny angiogenezy w badanych preparatach rógowacenia słonecznego, raka podstawnokomórkowego i raka koleczystokomórkowego.

### 3.2.4. Ocena nasilenia ekspresji antygeny Ki-67

Aby ocenić nasilenie ekspresji antygeny Ki-67 w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 200x, obliczano procent komórek z dodatnią reakcją barwną w stosunku do całkowitej liczby komórek nowotworowych. Wynik podano w skali od 0 do 4 punktów (tabela 8).



Tab. 8. Ocena nasilenia ekspresji antygenu Ki-67.

Odsetek komórek z dodatnią reakcją	Punkty
Brak	0
1-10%	1
11-25%	2
26-50%	3
>50%	4

Reakcję przyjęto za słabą, gdy odsetek komórek z dodatnią reakcją barwną na obecność antygenu Ki-67 nie przekraczał 25% (punkty 1-2), średnią przy zabarwieniu 26-50% komórek (3 punkty) oraz silną, jeśli wybarwieniu ulegało powyżej 50% komórek badanej zmiany (4 punkty), (tab.9).

Tab. 9. Nasilenie ekspresji antygenu Ki-67.

Punkty	0	1-2	3	4
	Brak reakcji	Słaba reakcja	Średnia reakcja	Silna reakcja

### 3.2.5. Metody statystyczne

W celu udzielenia odpowiedzi na postawione pytania badawcze przeprowadzono analizy statystyczne przy użyciu pakietu IBM SPSS Statistics 28. Za jego pomocą wykonano analizę podstawowych statystyk opisowych wraz z testem Shapiro-Wilka, test t Studenta oraz test Manna Whitneya dla prób niezależnych, analizę korelacji r Pearsona lub test Spearmana oraz analizę testem Kruskala-Wallisa. Do określenia rozkładu badanych cech ilościowych wykorzystany został test Kołmogorowa-Smirnowa. Zebrane dane zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu programu GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, Kalifornia, USA).

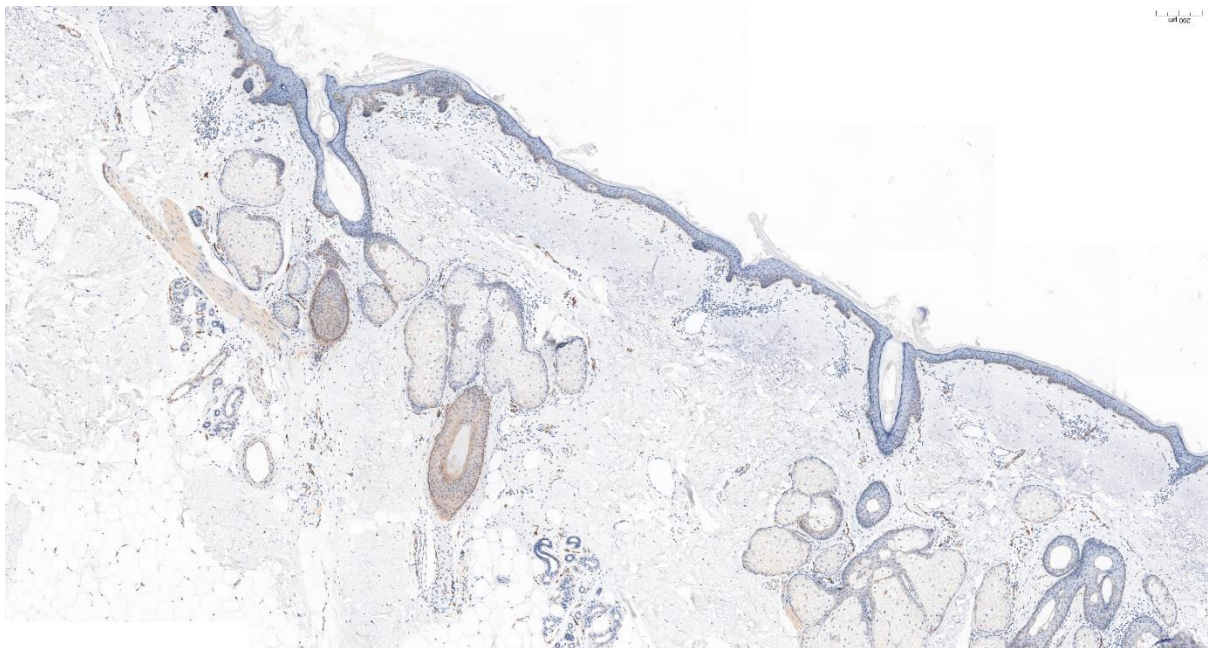
W zastosowanych testach statystycznych wartości testów i współczynników na poziomie  $p < 0,05$  przyjęte zostały za istotne statystycznie.

## 4. Wyniki

### 4.2. Rogowacenie słoneczne

We fragmentach zdrowej skóry reakcję barwną na obecność nestyny obserwowano w komórkach warstwy podstawnej naskórka, komórkach torebki łącznotkankowej mieszków włosowych. Dodatkowo barwią się też wrzecionowate fibroblasty ułożone wzdłuż torebki łącznotkankowej oraz fibroblasty w obrębie brodawki włosa. Ekspresja nestyny była także obserwowana w mięśniach poprzecznie prążkowanych oraz naczyniach krwionośnych (ryc.1).

Ryc.1. Ekspresja nestyny widoczna w błonie podstawnej naskórka, w mieszkach włosowych, naczyniach krwionośnych oraz mięśniach poprzecznie prążkowanych. Powiększenie x 40.



Brak ekspresji nestyny w ogniskach rogowacenia słonecznego stwierdzono we wszystkich 39 przypadkach (100%).

#### 4.2.3. Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny

Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny oceniano u 39 pacjentów z rogowaceniem słonecznym. Średnia gęstość naczyń krwionośnych w podścielisku rogowacenia słonecznego wynosiła  $10,2 \pm 5,5$ . Zakres wartości mieścił się w granicach od 2,7 do 26,7 (tab.5).

Tab. 5. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłonna naczyń w AK.

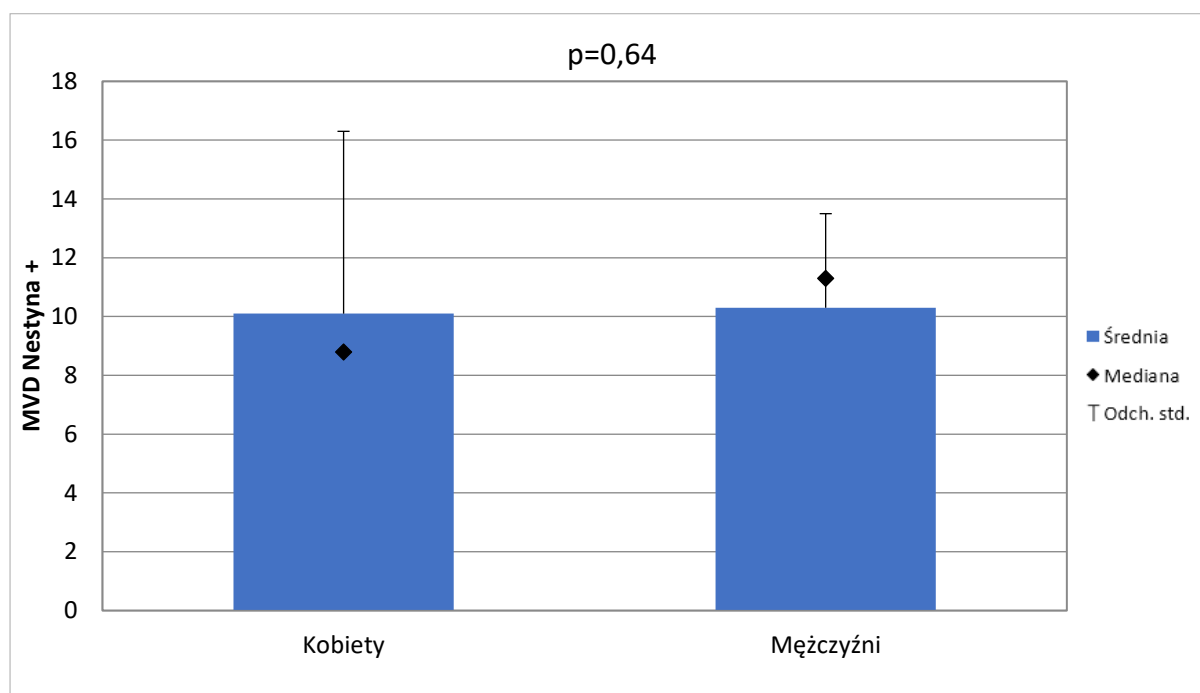
Ekspresja nestyny w komórkach śródbłonna naczyń w AK (n=39)	
Średnia	10,2
Odchylenie standardowe	5,5
Wartość minimalna	2,7
Wartość maksymalna	26,7
Mediana	9,7

Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny nie różniła się w zależności od płci ( $p=0,64$ ) (tab. 6, ryc. 2). W grupie badanej znalazło się 11 mężczyzn i 28 kobiet.

Tab. 6. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłonna naczyń u kobiet i mężczyzn

Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	28	$10,1 \pm 6,2$	2,7	26,7	8,8
Mężczyźni	11	$10,3 \pm 3,2$	5,0	14,7	11,3

Ryc. 2. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłónka naczyń u kobiet i mężczyzn

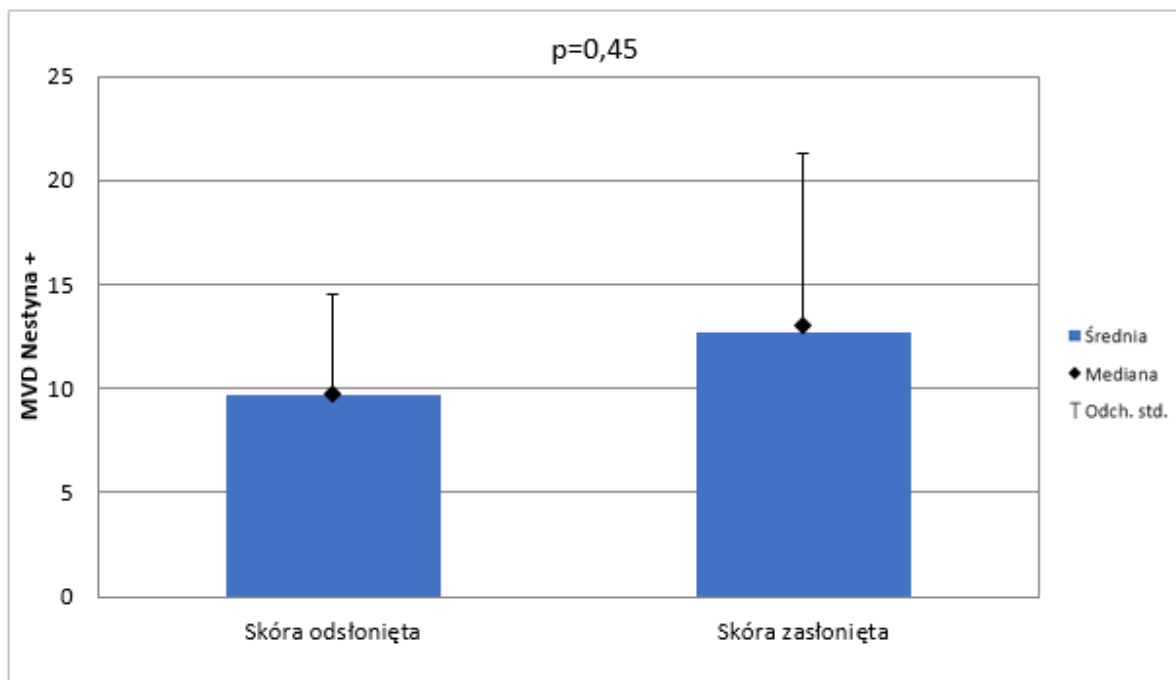


Nie wykazano także istotnej statystycznie różnicy w ekspresji nestyny w naczyniach krwionośnych w zależności od lokalizacji zmian ( $p=0,45$ ) (tab. 7, ryc. 3).

Tab. 7. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłónka naczyń w skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

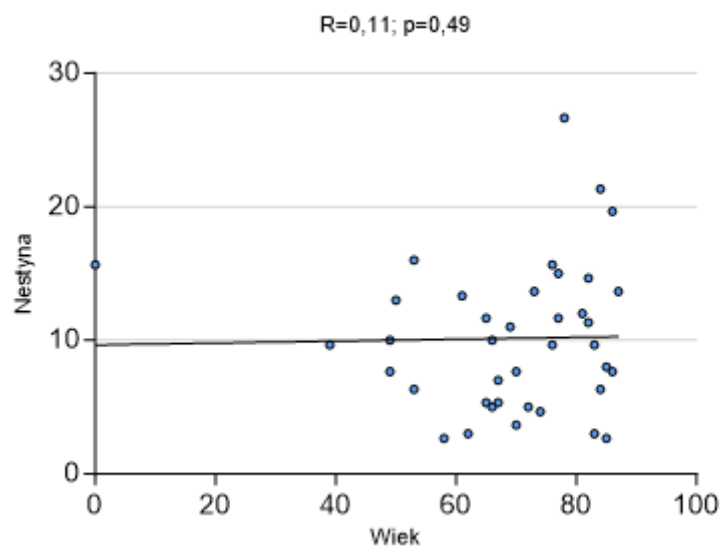
	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	32	9,7 $\pm$ 4,8	2,7	21,3	9,7
Skóra zasłonięta	6	12,7 $\pm$ 8,6	2,7	26,7	13,0

Ryc. 3. Brak różnic ekspresji nestyny w skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieni UV.



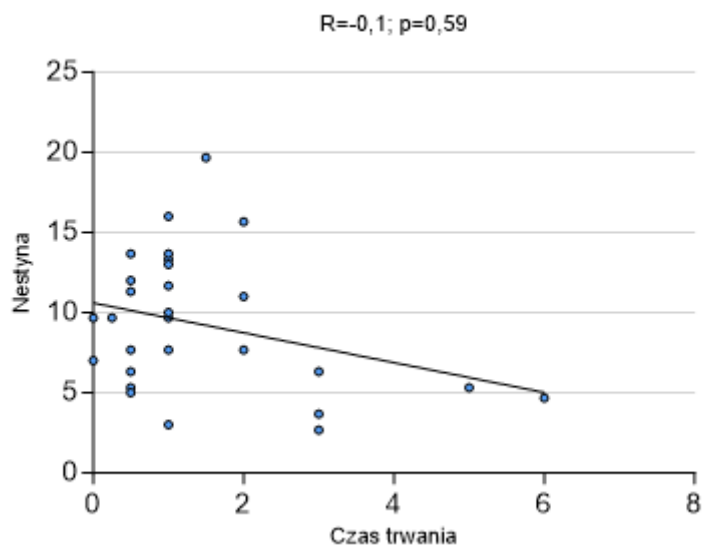
Nie stwierdzono istotniej statystycznie korelacji między wiekiem pacjentów a ekspresją nestyny w naczyniach krwionośnych w podścielisku rogowacenia słonecznego ( $p=0,49$ ) (ryc.4).

Ryc. 4. Brak istotnej statystycznie korelacji między wiekiem pacjentów a ekspresją nestyny w naczyniach krwionośnych w rogowaceniu słonecznym.

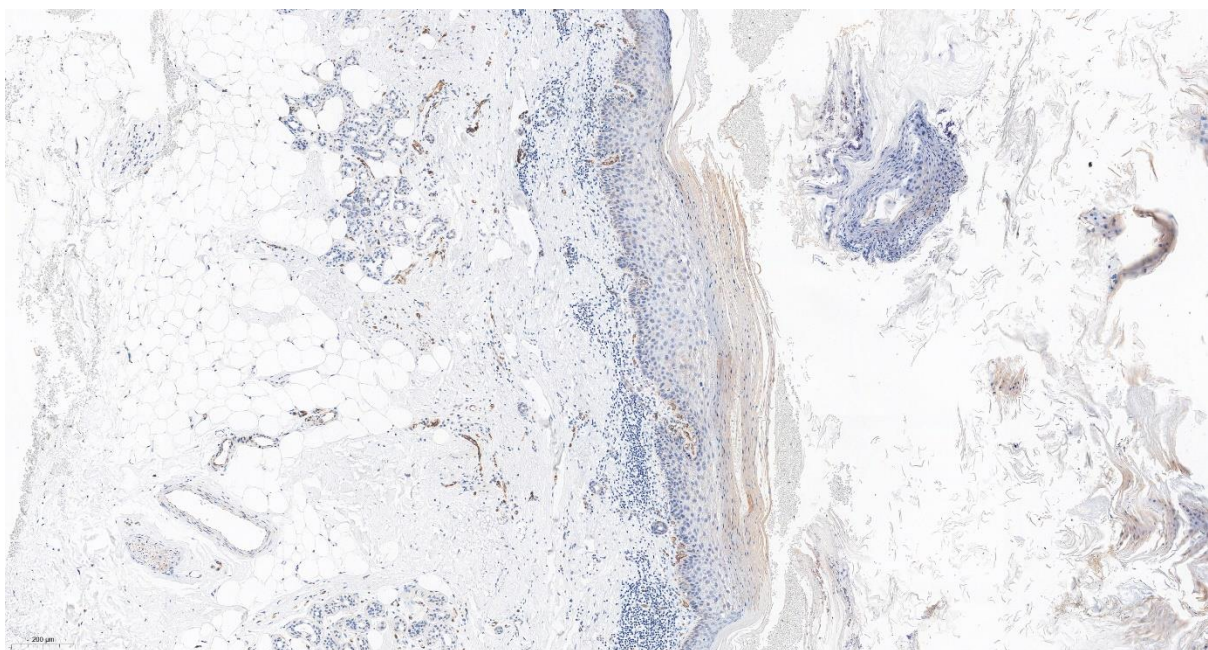


Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny nie różniła się także w zależności od czasu trwania choroby ( $p=0,59$ ) (ryc. 5).

Ryc. 5. Brak zależności między ekspresją nestyny w naczyniach krwionośnych a czasem trwania choroby.



Ryc. 6. Ekspresja nestyny w naczyniach krwionośnych w podścielisku rogowacenia słonecznego. Powiększenie x 100.



#### 4.2.4. Ekspresja Ki-67 w ogniskach rogowacenia słonecznego

Ekspresję Ki-67 w ogniskach rogowacenia słonecznego oceniano u 37 pacjentów. Średnia ekspresja Ki-67 wyniosła w tych przypadkach  $1,6 \pm 0,9$  (tab. 8).

Tab. 8. Ekspresja Ki-67 w rogowaceniu słonecznym.

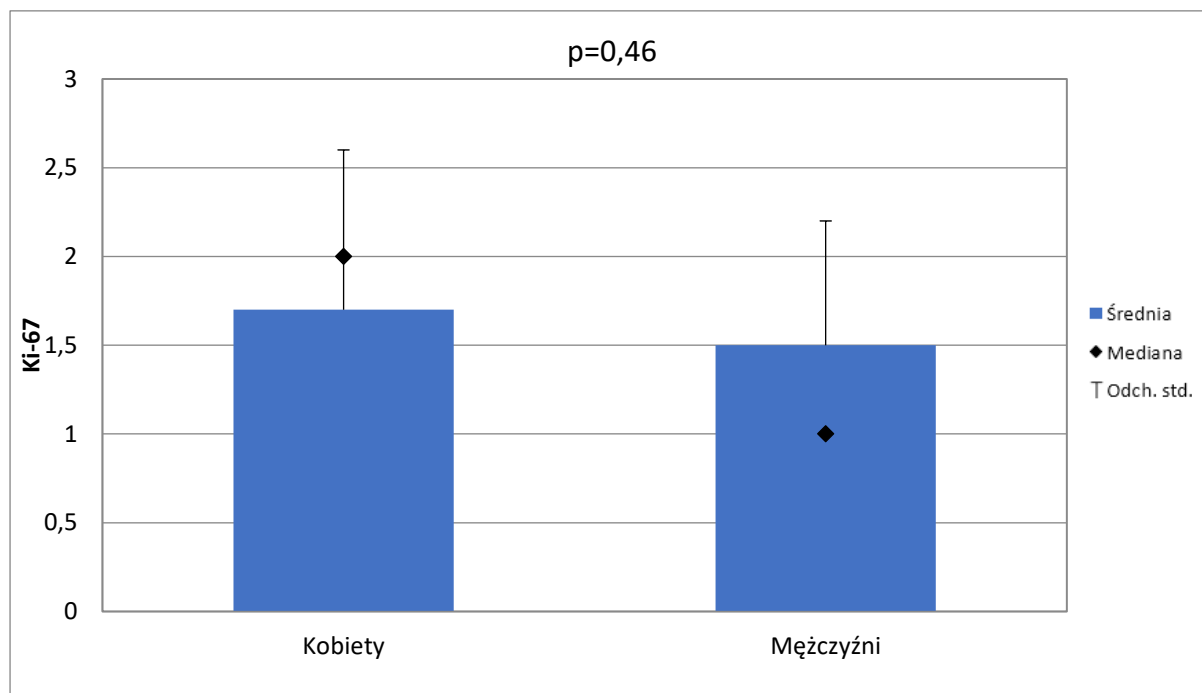
Ekspresja Ki-67 w rogowaceniu słonecznym (n=37)	
Średnia	1,6
Odchylenie standardowe	0,9
Wartość minimalna	0,0
Wartość maksymalna	4,0
Mediana	2,0

Ekspresja Ki-67 w ogniskach rogowacenia słonecznego nie różniła się w zależności od płci ( $p=0,46$ ) (tab.9, ryc. 7).

Tab. 9. Ekspresja Ki-67 w ogniskach rogowacenia słonecznego u kobiet i mężczyzn.

Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	27	$1,7 \pm 0,9$	0,0	4,0	2,0
Mężczyźni	10	$1,5 \pm 0,7$	1,0	3,0	1,0

Ryc. 7. Brak istotnej statystycznie różnicy w ekspresji Ki-67 w ogniskach rogowacenia słonecznego u kobiet i mężczyzn.



Wykazano istotną statystycznie różnicę w ekspresji Ki-67 w zależności od ekspozycji skóry na promieniowanie UV. Ekspresja Ki-67 była istotnie wyższa w przypadkach zlokalizowanych na skórze zasłoniętej przed promieniowaniem UV, w porównaniu z ogniskami AK na skórze odsłoniętej ( $p=0,02$ ). Średnia wynosiła  $2,3 \pm 0,5$  dla zmian zlokalizowanych na skórze zasłoniętej oraz  $1,5 \pm 0,9$  dla zmian na skórze odsłoniętej (tab. 10, ryc.8).

Tab.10. Ekspresja Ki-67 w ogniskach AK na skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

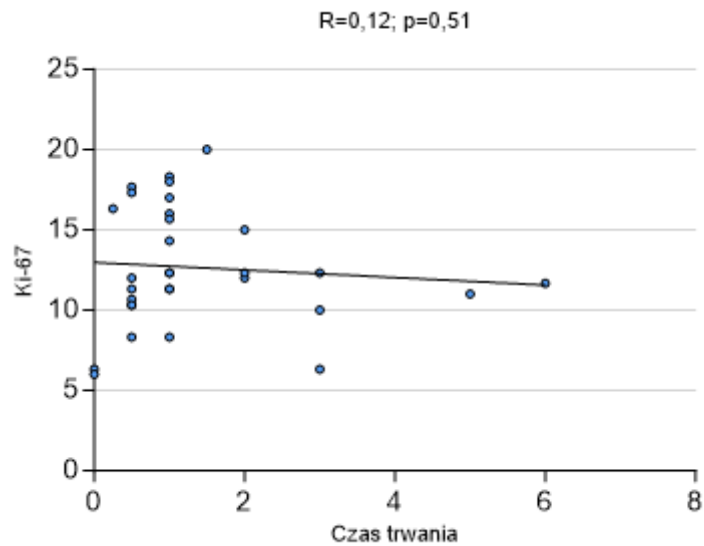
	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	30	$1,5 \pm 0,9$	0,0	4,0	1,0
Skóra zasłonięta	6	$2,3 \pm 0,5$	2,0	3,0	2,0



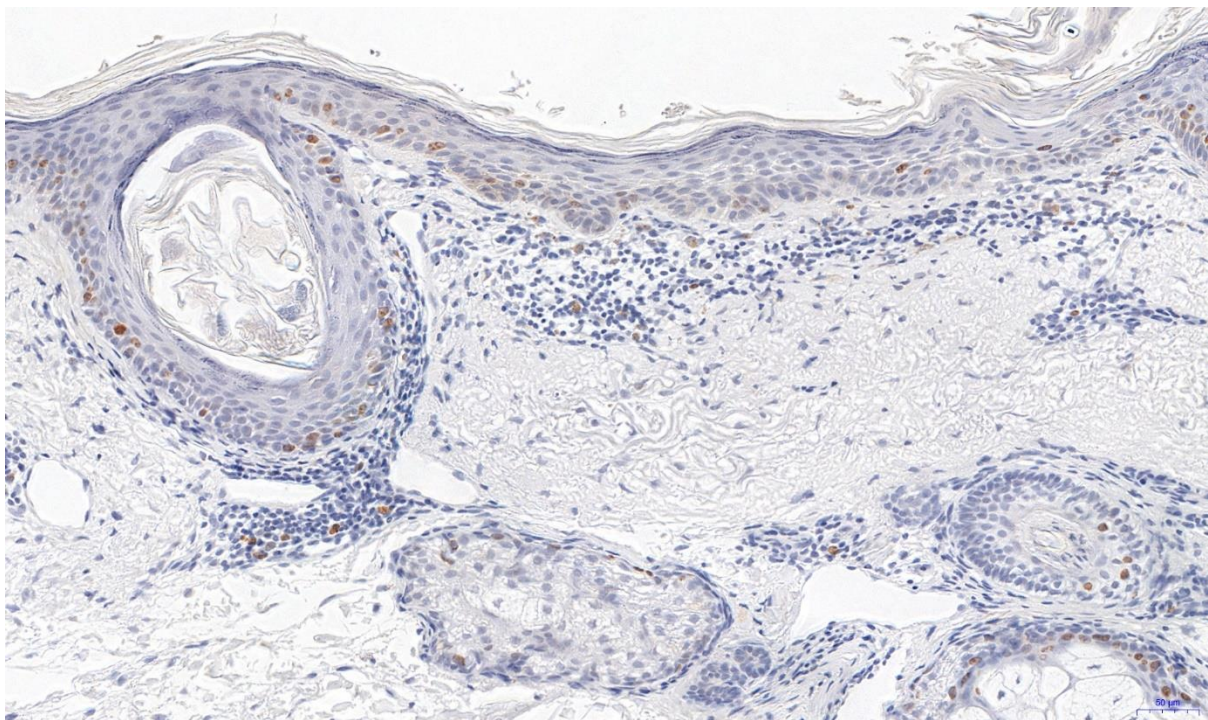


Nie wykazano także zależności między ekspresją Ki-67 a czasem trwania choroby ( $p=0,51$ ) (ryc.10).

Ryc. 10. Brak zależności między ekspresją Ki-67 a czasem trwania choroby.



Ryc. 11. Ekspresja Ki-67 w ogniskach rogowacenia słonecznego. Powiększenie x 100.



#### 4.2.5. Ekspresja CD31 w naczyniach krwionośnych podścieliska rogowacenia słonecznego.

Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 oceniano u 39 pacjentów z rogowacieniem słonecznym. Średnia gęstość naczyń krwionośnych w podścielisku rogowacenia słonecznego wynosiła  $13,9 \pm 6,9$ . Zakres wartości mieścił się w granicach od 5,0 do 34,7 (tab.10).

Tab. 10. Ekspresja CD31 w komórkach śródbłonna naczyń w AK.

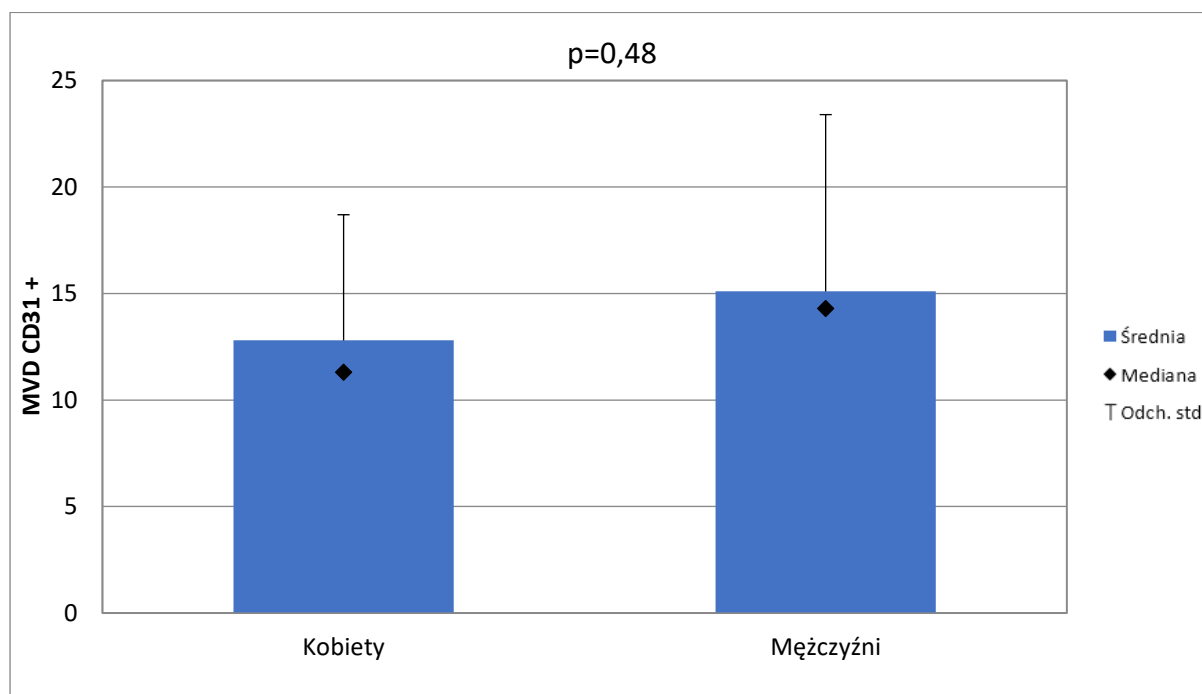
Ekspresja CD31 w komórkach śródbłonna naczyń w AK (n=39)	
Średnia	13,9
Odchylenie standardowe	6,9
Wartość minimalna	5,0
Wartość maksymalna	34,7
Mediana	12,3

Nie wykazano istotnej różnicy w ekspresji CD31 w naczyniach krwionośnych podścieliska rogowacenia słonecznego w zależności od płci ( $p=0,48$ ) (tab. 11, ryc. 12).

Tab.11. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 w zależności od płci.

Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	27	$12,8 \pm 5,9$	6,3	34,7	11,3
Mężczyźni	11	$15,1 \pm 8,3$	5,0	33,7	14,3

Ryc. 12. Brak istotnej statystycznie różnicy w ekspresji CD31 w naczyniach krwionośnych w AK w zależności od płci.

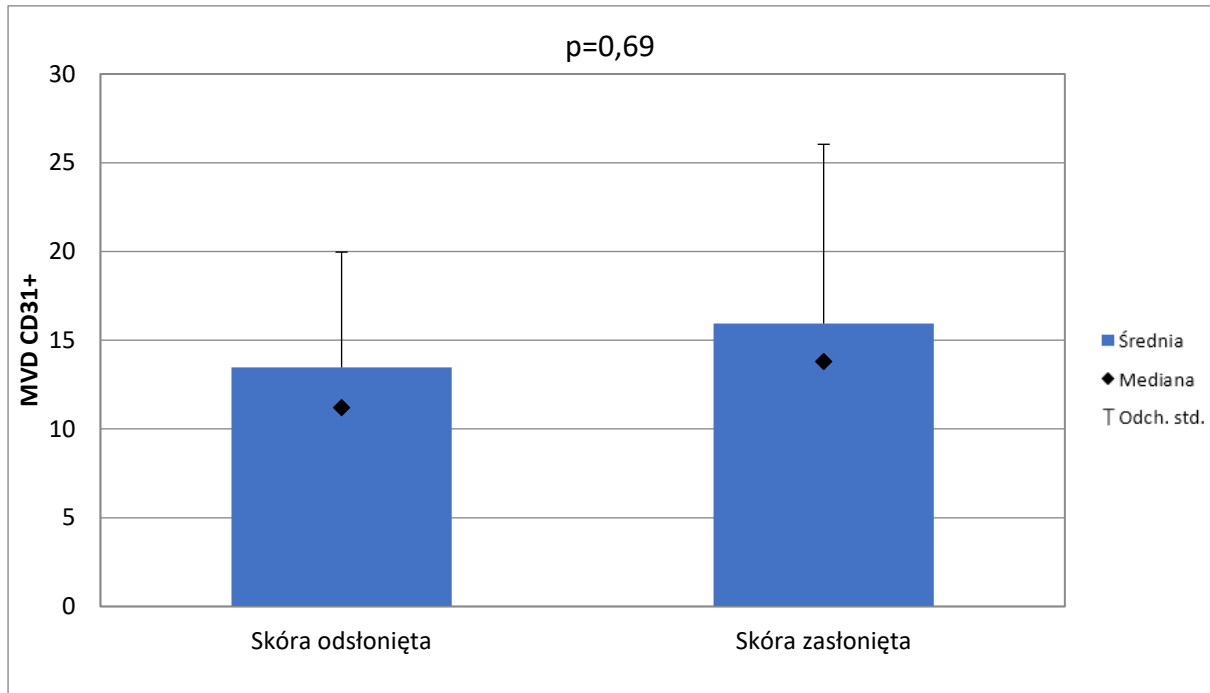


Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 nie różniła się w zależności od lokalizacji zmian na skórze ekspozowanej i nieekspozowanej na promieniowanie ultrafioletowe ( $p=0,69$ ) (tab. 12, ryc.13).

Tab. 12. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 w ogniskach AK na skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

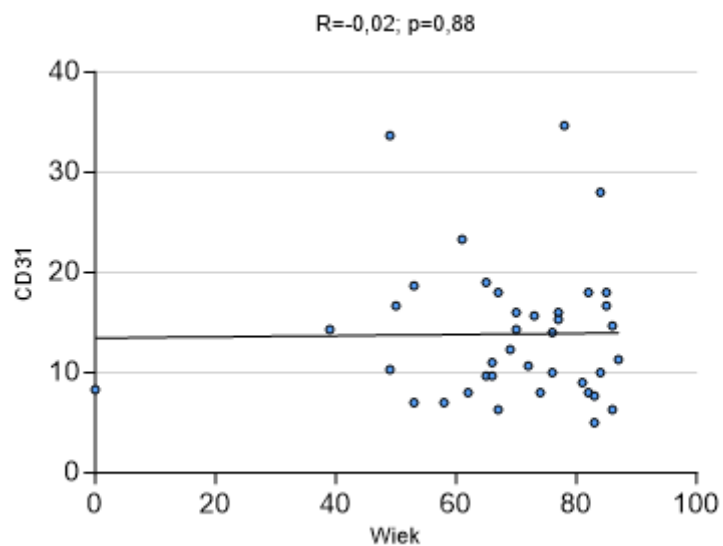
	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	32	13,5 $\pm$ 6,5	5,0	33,7	11,2
Skóra zasłonięta	6	15,9 $\pm$ 10,1	7,0	34,7	13,8

Ryc. 13. Brak zależności między lokalizacją AK a gęstością naczyń wykazujących ekspresję CD31.

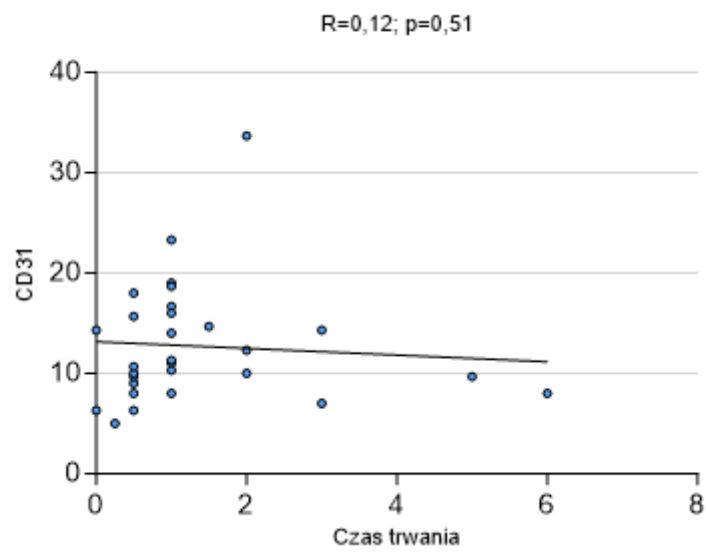


Nie stwierdzono także aby ekspresja CD31 była zależna od wieku pacjentów ( $p=0,88$ ) (ryc. 14) oraz czasu trwania choroby ( $p=0,51$ ) (ryc. 15).

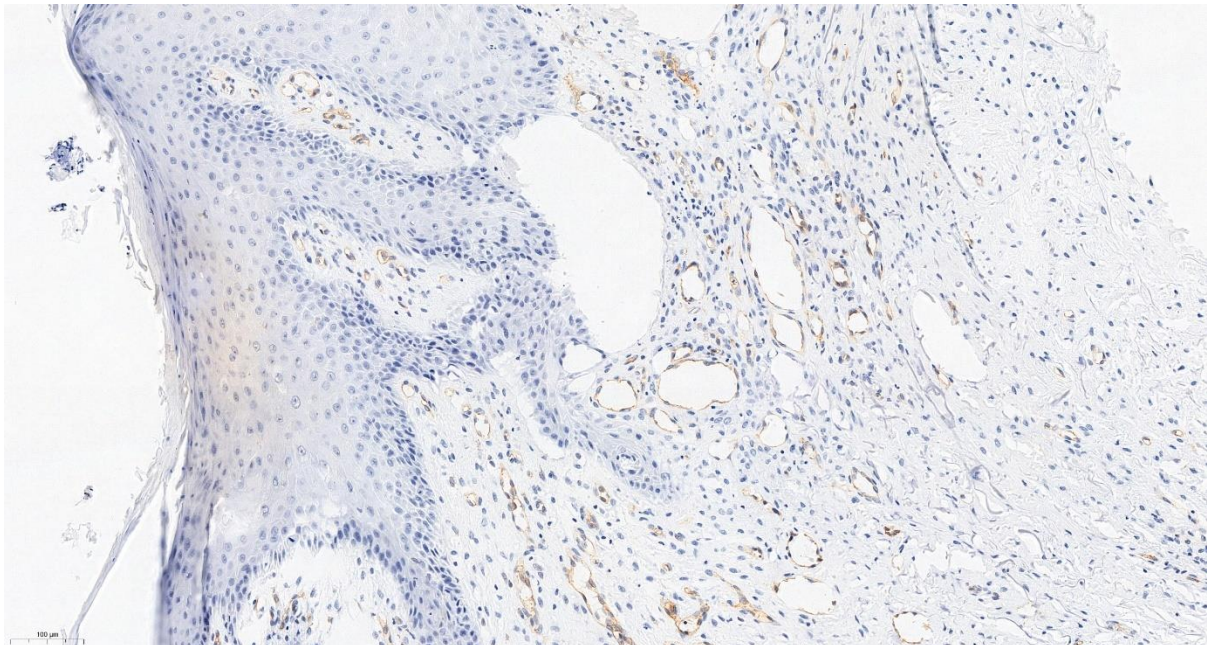
Ryc. 14. Brak zależności między wiekiem pacjentów a ekspresją CD31 w naczyniach krwionośnych AK.



Ryc. 15. Brak zależności między czasem trwania choroby a ekspresją CD31 w naczyniach krwionośnych AK.



Ryc. 16. Ekspresja CD31 w naczyniach krwionośnych podścieliska rogowacenia słonecznego. Powiększenie x 100.



#### 4.2.6. Ekspresja CD34 w naczyniach krwionośnych podścieliska rogowacenia słonecznego

Średnia gęstość naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> w podścielisku rogowacenia słonecznego wyniosła  $13,7 \pm 6,6$ . Zakres wartości mieścił się w granicach od 5,3 do 44,3 (tab. 13).

Tab. 13. Średnia gęstość naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> w podścielisku rogowacenia słonecznego.

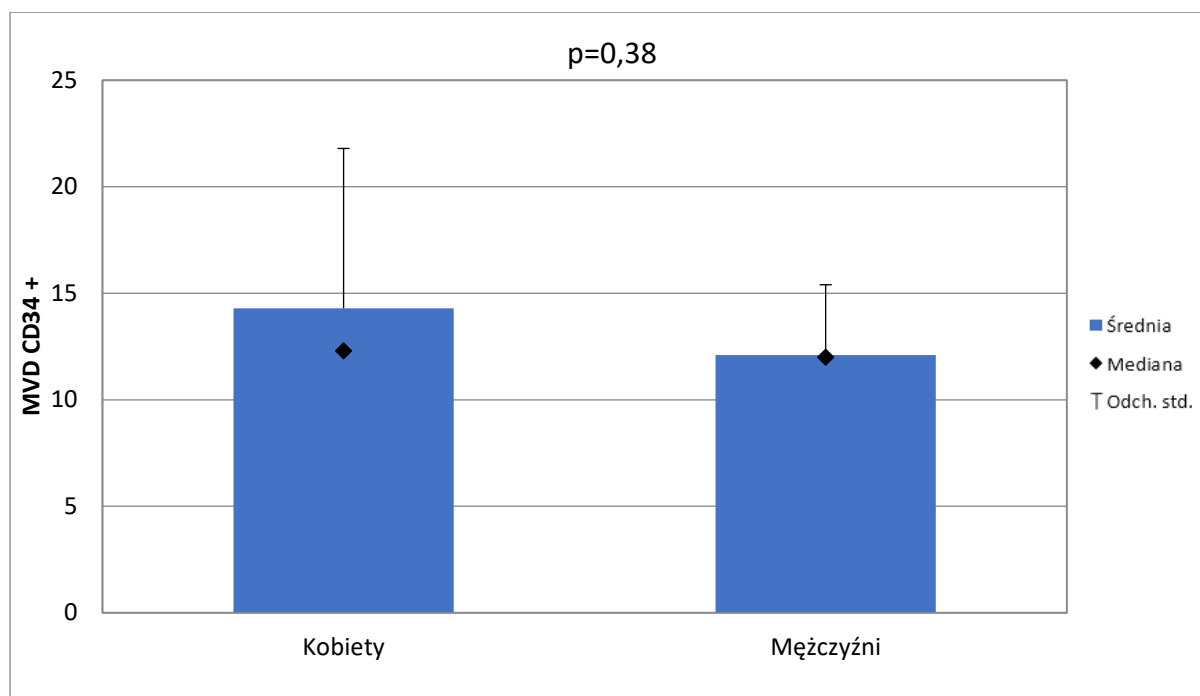
Ekspresja CD34 w komórkach śródbłonna naczyń w AK (n=39)	
Średnia	13,7
Odchylenie standardowe	6,6
Wartość minimalna	5,3
Wartość maksymalna	44,3
Mediana	12,0

Nie stwierdzono, aby gęstość naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> różniła się w zależności od płci pacjentów ( $p=0,38$ ) (tab.14, ryc. 17).

Tab. 14. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD34 w zależności od płci.

Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	28	$14,3 \pm 7,5$	5,3	44,3	12,3
Mężczyźni	11	$12,1 \pm 3,3$	6,0	16,3	12,0

Ryc. 17. Brak różnic w ekspresji CD34 w naczyniach krwionośnych u kobiet i mężczyzn.



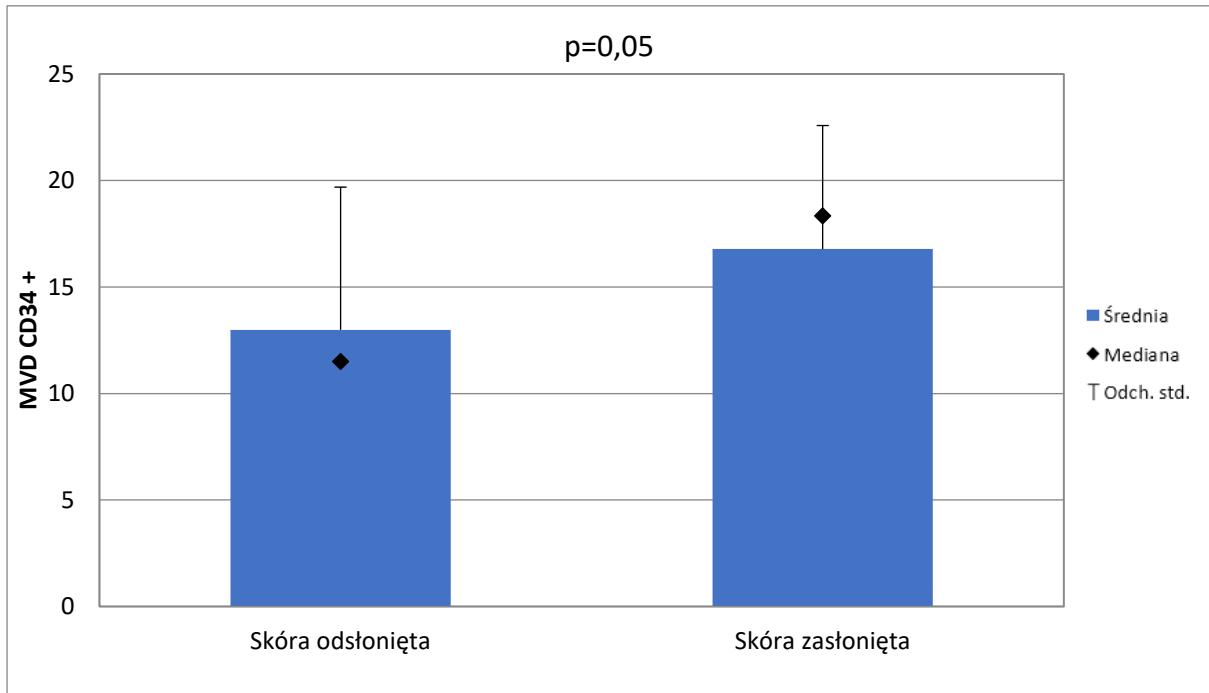
Stwierdzono natomiast istotnie wyższą gęstość naczyń CD34<sup>+</sup> w podścielisku ognisk rogowacenia słonecznego na skórze nieeksponowanej na promieniowanie UV w porównaniu z ogniskami eksponowanymi na UV ( $p=0,05$ ) (tab. 15, ryc. 18).

Tab. 15. Średnia gęstość naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> w ogniskach AK na skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	32	13,0 ± 6,7	5,3	44,3	11,5
Skóra zasłonięta	6	16,8 ± 5,8	6,3	23,3	18,3

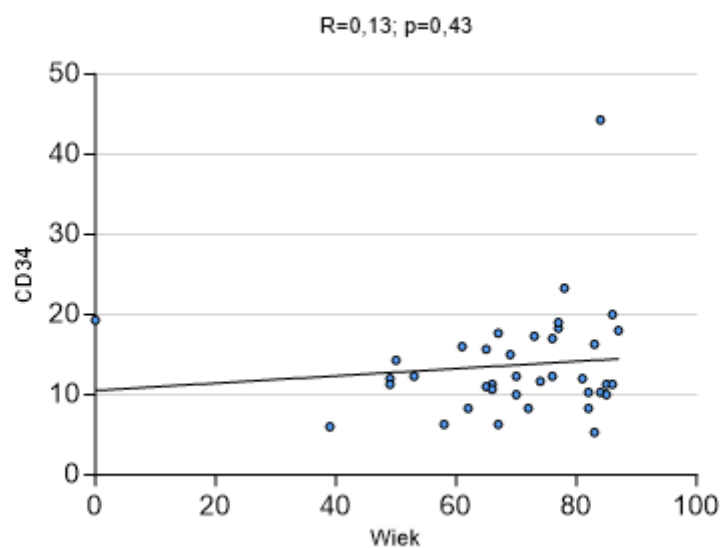


Ryc. 18. Większa średnia gęstość naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> na skórze zasłoniętej w porównaniu ze skórą odsłoniętą.



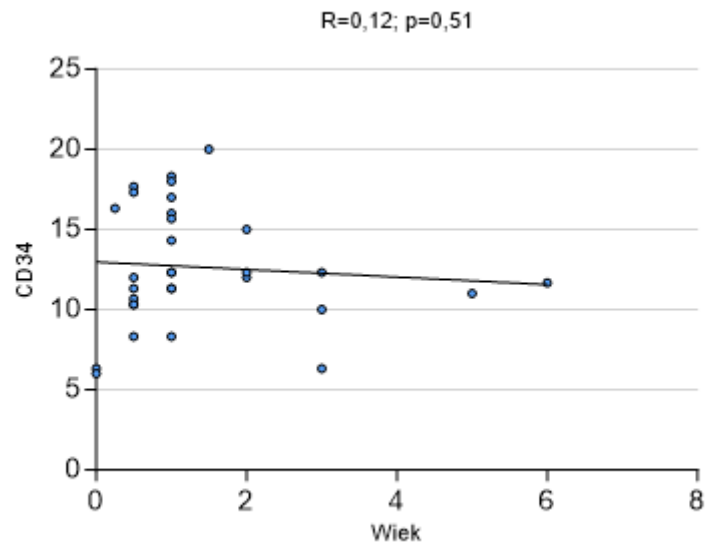
Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji między wiekiem pacjentów a gęstością naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> w podścielisku ognisk rogowacenia słonecznego ( $p=0,43$ ) (ryc. 19).

Ryc. 19. Brak zależności między wiekiem pacjentów a gęstością naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup>.

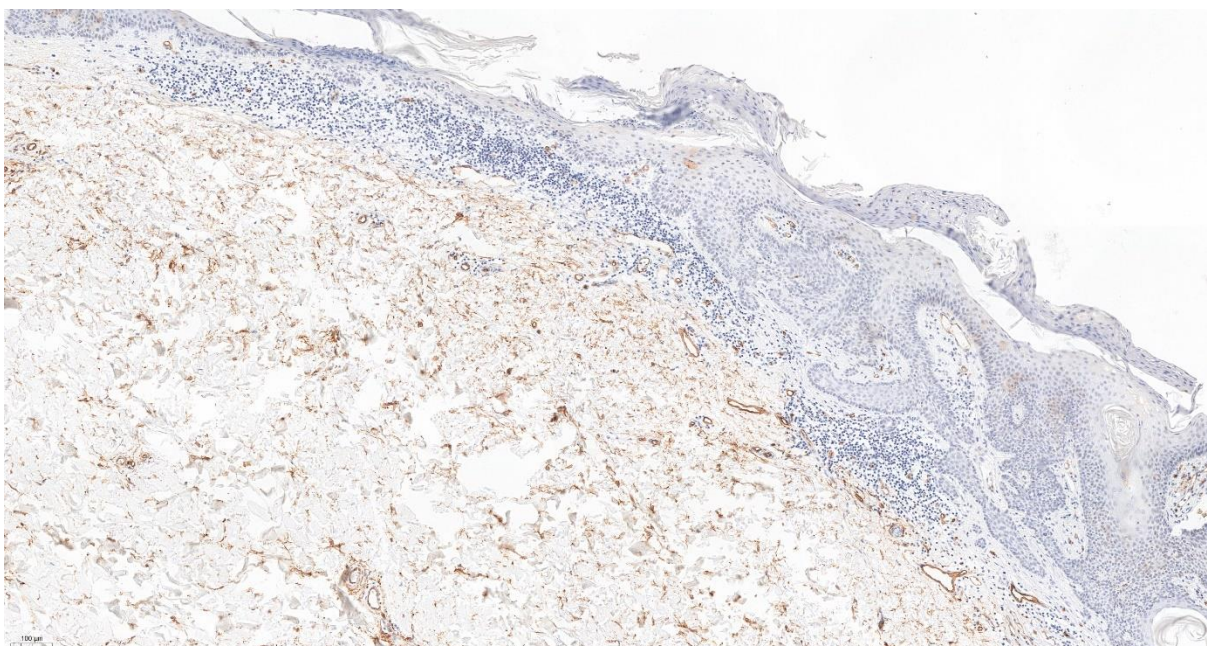


Nie stwierdzono także zależności między gęstością naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> a czasem trwania choroby ( $p=0,51$ ) (ryc. 20).

Ryc. 20. Brak zależności między czasem trwania choroby a gęstością naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup>.



Ryc. 21. Ekspresja CD34 w naczyniach krwionośnych podścieliska rogowacenia słonecznego. Powiększenie x 100.

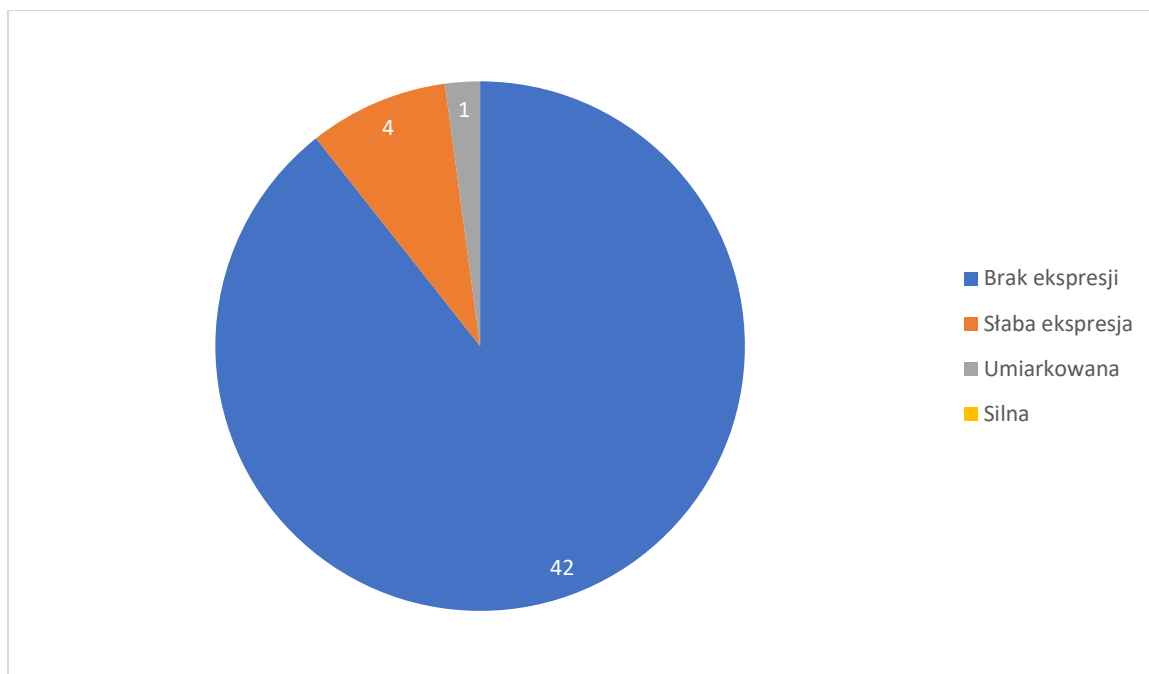


### 4.3. Rak podstawnokomórkowy

#### 4.3.3. Ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych raka podstawnokomórkowego.

W 42 przypadkach BCC nie stwierdzono ekspresji nestyny (89,4%), słabą ekspresję nestyny zaobserwowano w 4 przypadkach (8,5%), a w 1 przypadku ekspresja nestyny była umiarkowana (2,1%). Nie stwierdzono przypadków BCC wykazujących silną ekspresję nestyny w komórkach nowotworowych (ryc. 22).

Ryc. 22. Ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych BCC.



#### 4.3.4. Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny.

Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny oceniano w podścielisku 47 raków podstawnokomórkowych. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wyniosła  $18,1 \pm 6,6$ . Zakres uzyskanych wartości mieścił się w granicach od 6,7 do 32,3 (tab. 16).

Tab. 16. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny w podścielisku BCC.

Ekspresja nestyny w komórkach śródbłónka naczyń w BCC (n=47)	
Średnia	18,1
Odchylenie standardowe	6,6
Wartość minimalna	6,7
Wartość maksymalna	32,3
Mediana	17,3

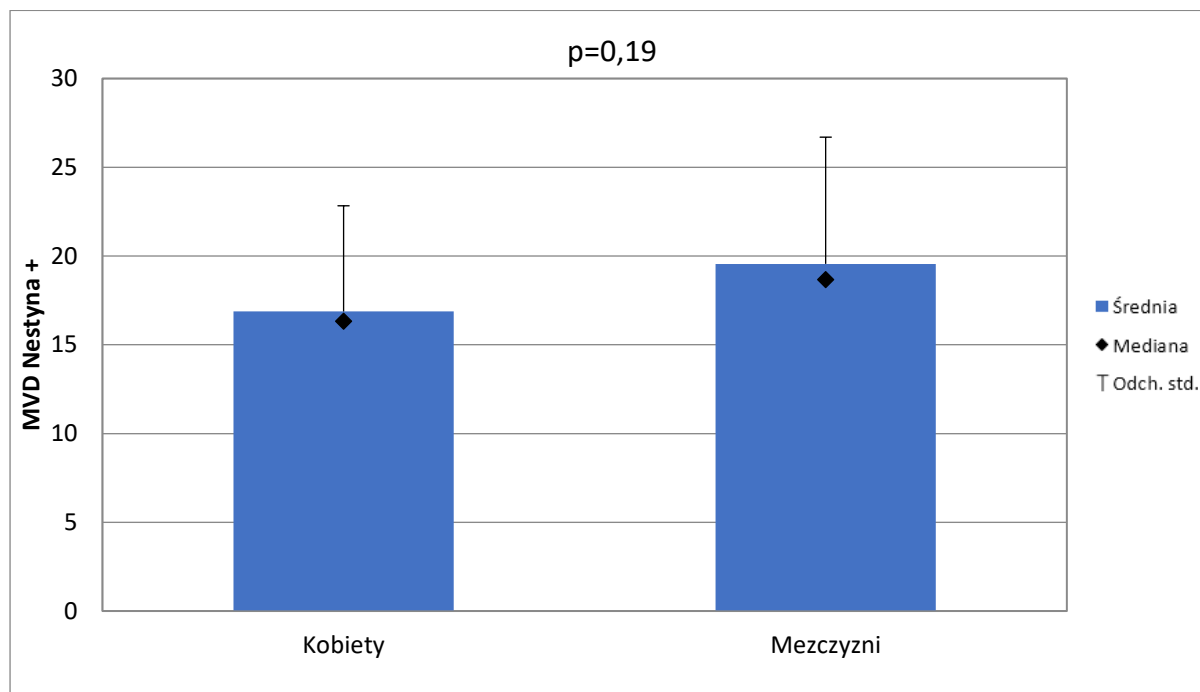
Nie wykazano, aby ekspresja nestyny w podścielisku raka podstawnokomórkowego korelowała z parametrami klinicznymi takimi jak:

- Płeć (p=0,19) (tab. 17, ryc. 23),
- Ekspozycja na promieniowanie UV (p=0,22) (tab. 18, ryc.24),
- Wiek (p=0,58) (ryc. 25),
- Czas trwania choroby (p=0,06) (ryc. 26).

Tab. 17. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłónka naczyń u kobiet i mężczyzn.

Płeć	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	25	16,9 ± 6,0	9,0	32,0	16,3
Mężczyźni	22	19,6 ± 7,1	6,7	32,3	18,7

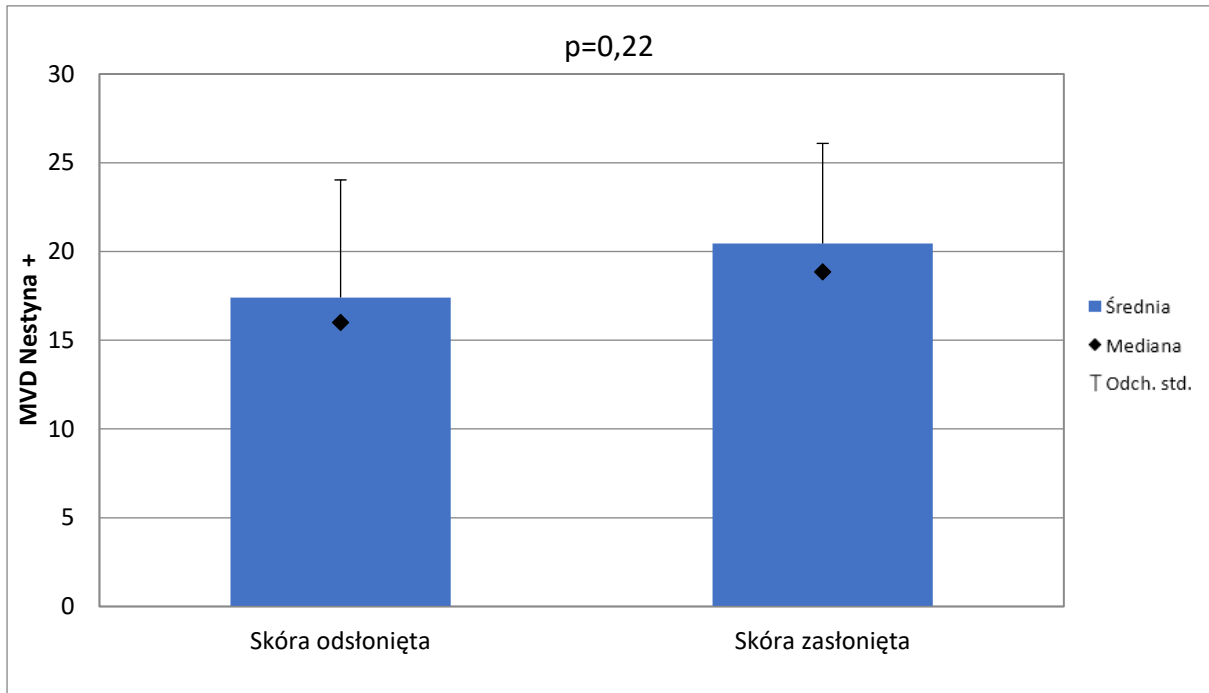
Ryc. 23. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji nestyny w naczyniach krwionośnych BCC u kobiet i mężczyzn.



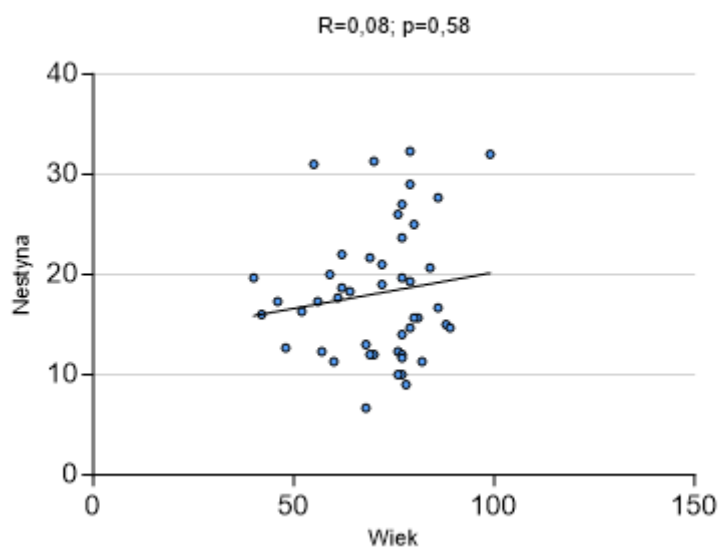
Tab. 18. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłonna naczyń w skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	37	17,4 ± 6,6	6,7	32,3	16,0
Skóra zasłonięta	6	20,5 ± 5,6	14,7	29,0	18,8

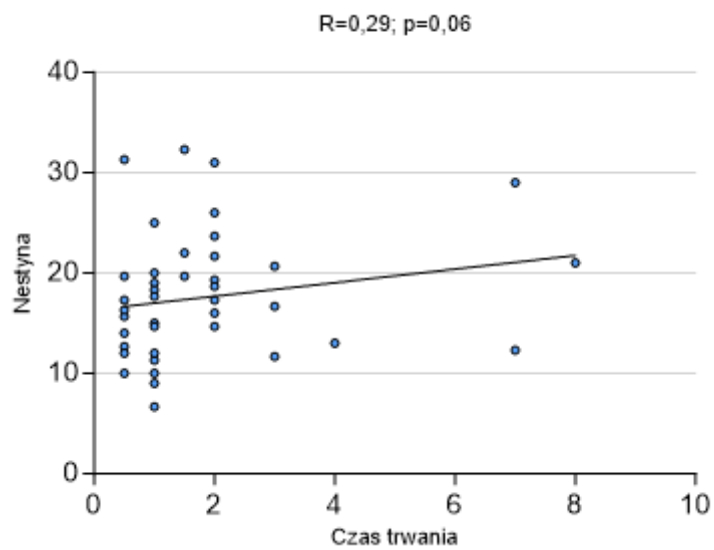
Ryc. 24. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji nestyny w naczyniach krwionośnych BCC w zależności od ekspozycji na promieniowanie UV.



Ryc. 25. Brak zależności między wiekiem pacjentów a ekspresją nestyny w naczyniach krwionośnych BCC.



Ryc. 26. Brak zależności między czasem trwania choroby a ekspresją nestyny w naczyniach krwionośnych BCC.

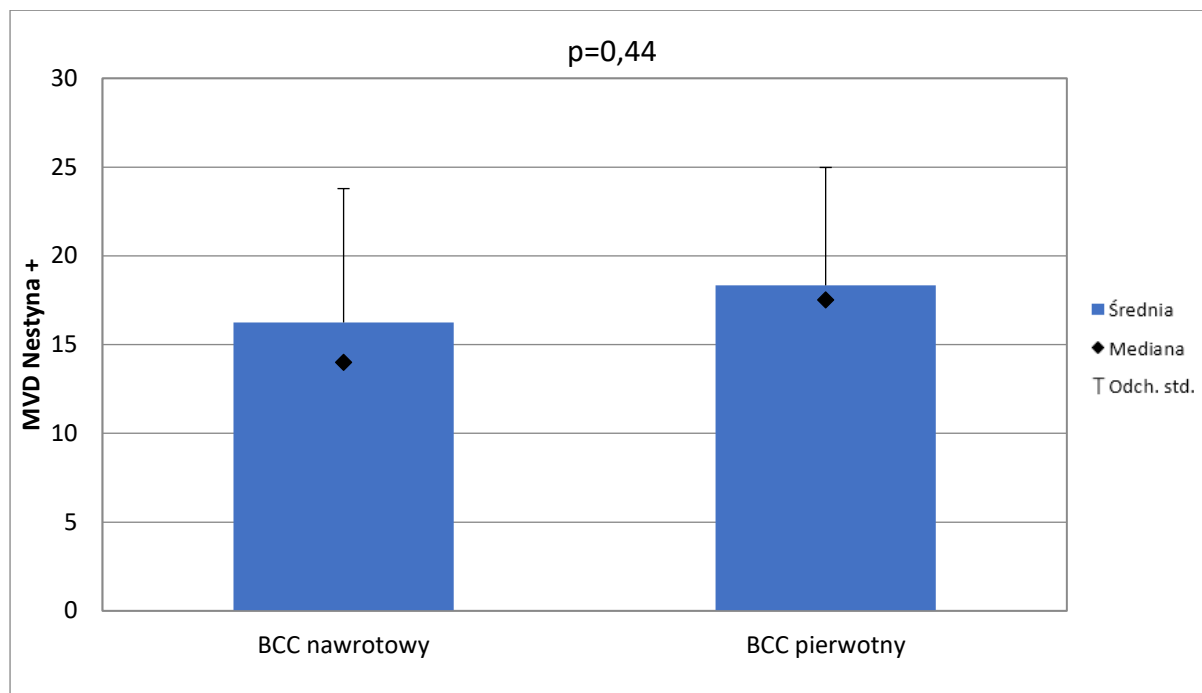


Nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w ekspresji nestyny u pacjentów ze zmianami nawrotowymi w porównaniu z grupą pacjentów, którzy zachorowali po raz pierwszy ( $p=0,44$ ) (tab.19, ryc. 27).

Tab. 19. Ekspresja nestyny w BCC nawrotowych i pierwotnych.

	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
BCC nawrotowy	4	16,3 $\pm$ 7,5	10,0	27,0	14,0
BCC pierwotny	40	18,3 $\pm$ 6,6	6,7	32,3	17,5

Ryc. 27. Brak istotnych różnic w ekspresji nestyny w zmianach pierwotnych i nawrotowych.



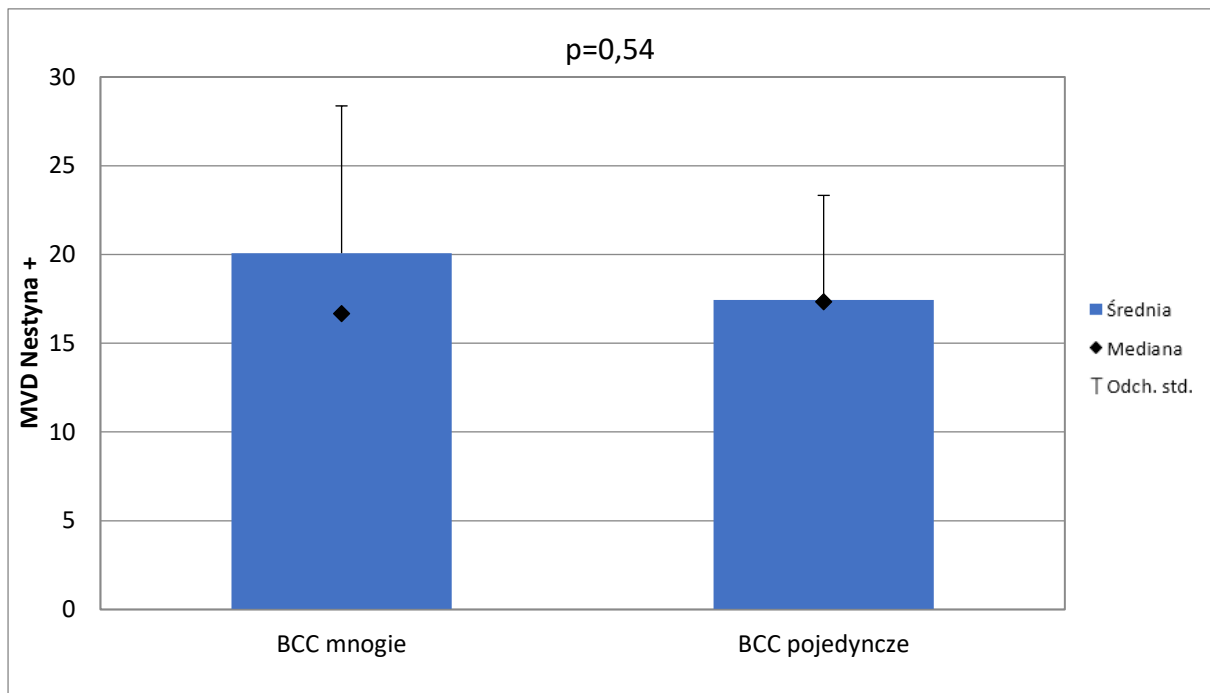
Oceniając średnią gęstość naczyń krwionośnych nie wykazano, aby ekspresja nestyny różniła się istotnie u pacjentów z mnogimi rakami podstawnocomórkowymi w porównaniu z grupą pacjentów, u których stwierdzono zmiany pojedyncze ( $p=0,54$ ) (tab. 20, ryc.28).

Tab. 20. Ekspresja nestyny w BCC mnogich i pojedynczych.

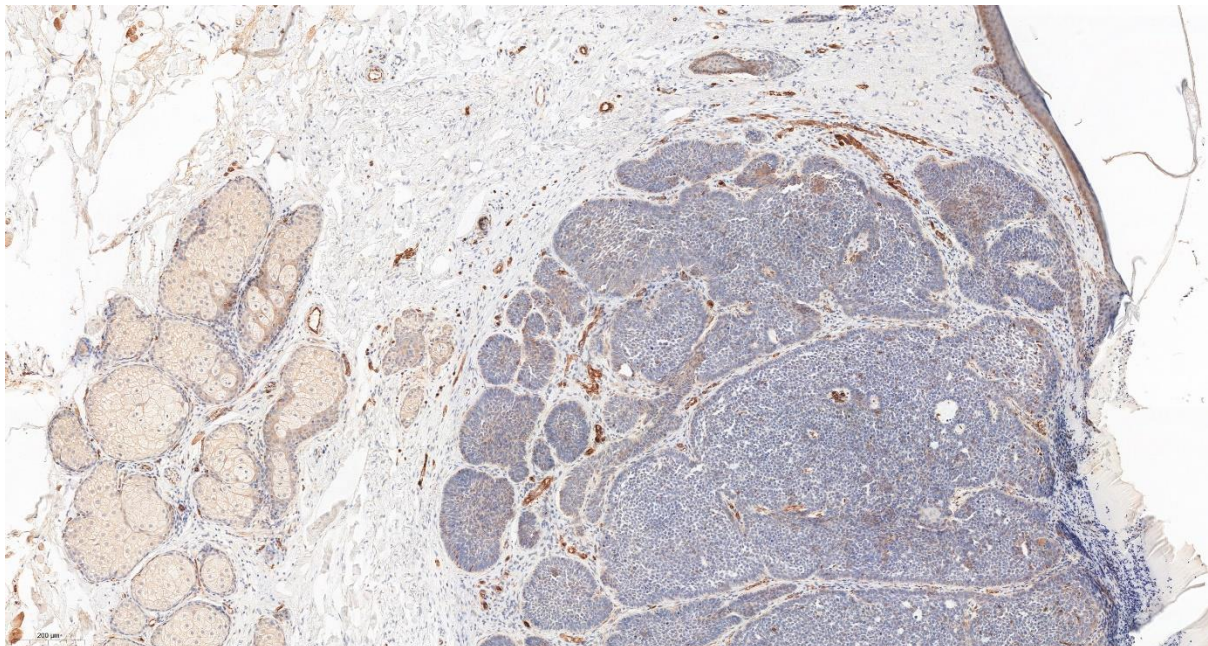
	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
BCC mnogie	13	20,1 $\pm$ 8,3	11,3	32,0	16,7
BCC pojedyncze	33	17,4 $\pm$ 5,9	6,7	32,3	17,3



Ryc. 28. Brak różnic w ekspresji nestyny w naczyniach krwionośnych w zależności od ilości zmian.



Ryc. 29. Ekspresja nestyny w naczyniach krwionośnych w podścielisku BCC, brak widocznych naczyń w gniazdach nowotworowych. Powiększenie x 100.



#### 4.3.5. Ekspresja antygenu Ki-67 w raku podstawnokomórkowym

Ekspresję antygenu Ki-67 oceniano u 47 pacjentów z rakiem podstawnokomórkowym. Średnia ekspresja Ki-67 w tej grupie wyniosła  $2,6 \pm 0,8$ . Zakres wartości mieścił się w granicach od 1,0 do 4,0 (tab. 21).

Tab. 21. Ekspresja antygenu Ki-67 w BCC.

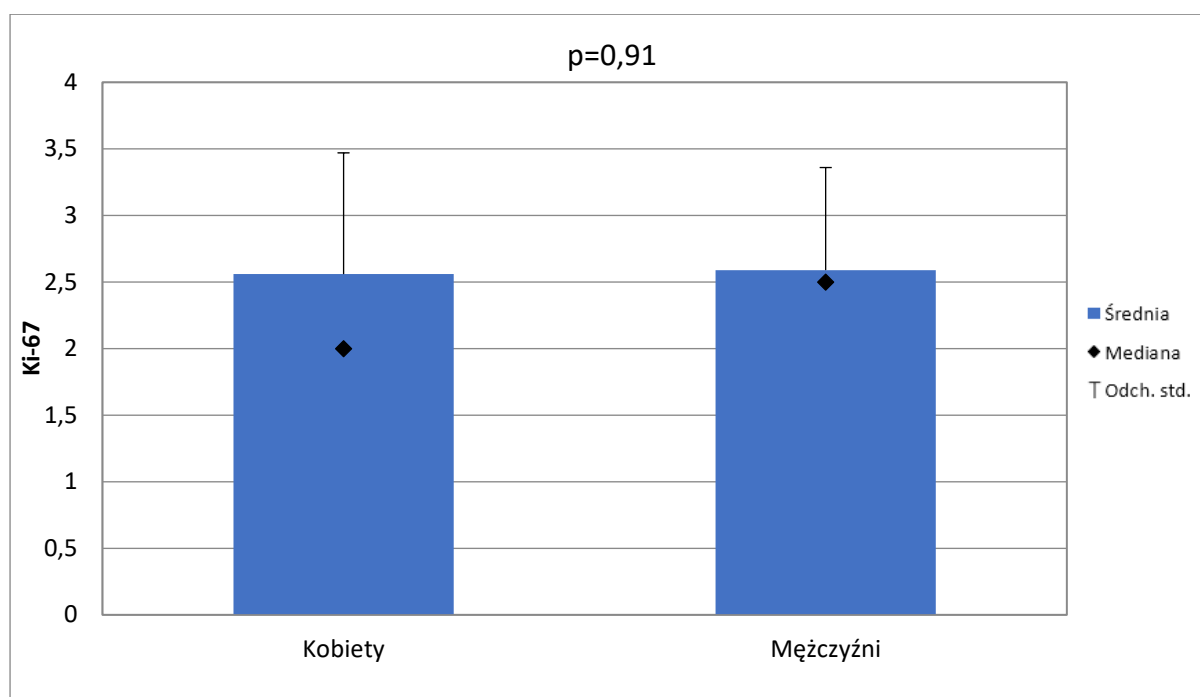
Ekspresja Ki-67 w BCC (n=47)	
Średnia	2,6
Odchylenie standardowe	0,8
Wartość minimalna	1,0
Wartość maksymalna	4,0
Mediana	2,0

Nie wykazano, aby ekspresja antygenu Ki-67 różniła się w zależności od płci pacjentów ( $p= 0,91$ ) (tab. 22, ryc. 30), lokalizacji związanej z narażeniem na promieniowanie UV ( $p= 0,29$ ) (tab. 23, ryc. 31), wiekiem pacjentów ( $p= 0,94$ ) (ryc.32) oraz czasem trwania choroby ( $p=0,51$ ) (ryc.33).

Tab. 22. Ekspresja antygenu Ki-67 w BCC u kobiet i mężczyzn.

Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	25	$2,6 \pm 0,9$	1,0	4,0	2,0
Mężczyźni	22	$2,6 \pm 0,8$	1,0	4,0	2,5

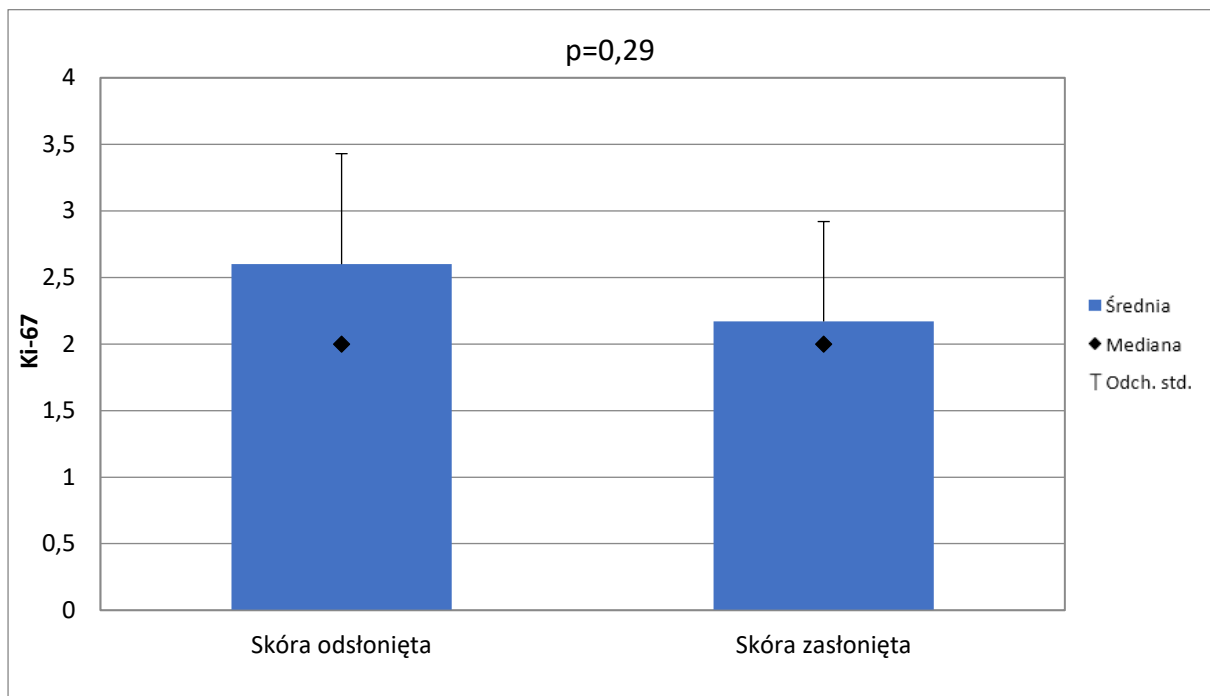
Ryc. 30. Brak różnic w ekspresji antygenu Ki-67 w BCC u kobiet i mężczyzn.



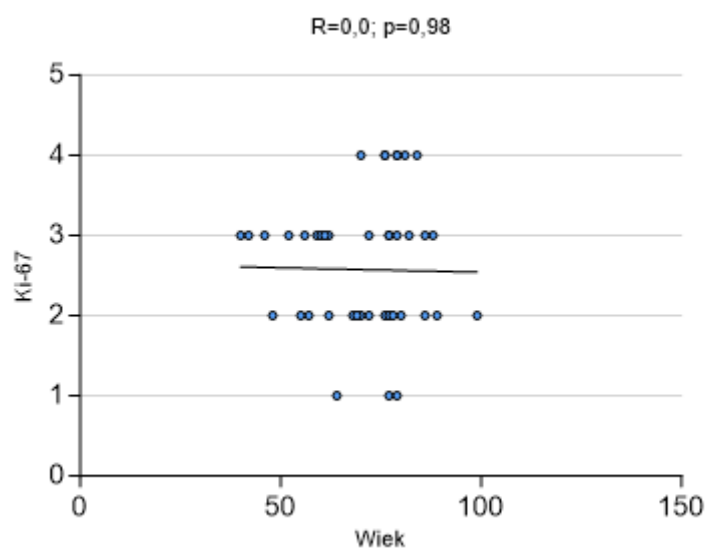
Tab. 23. Ekspresja Ki-67 na skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	37	2,6 ± 0,8	1,0	4,0	2,0
Skóra zasłonięta	6	2,2 ± 0,8	1,0	3,0	2,0

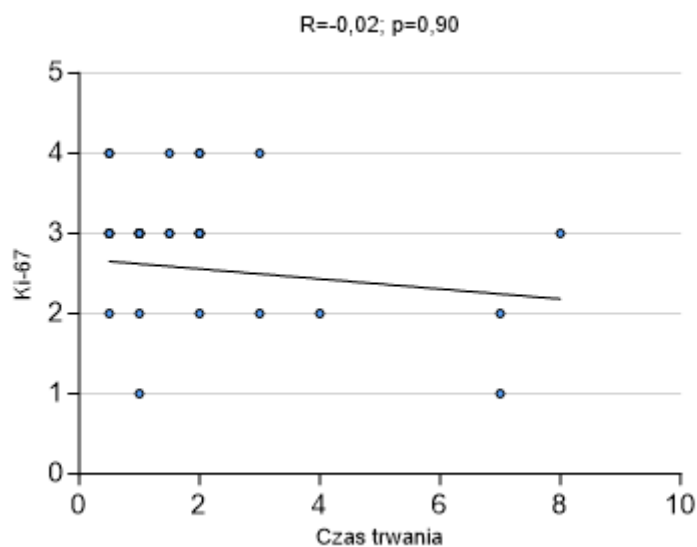
Ryc. 31. Brak zależności między lokalizacją BCC a nasileniem ekspresji antygenu Ki-67.



Ryc. 32. Brak różnic w ekspresji antygenu Ki-67 w zależności od wieku pacjentów.



Ryc. 33. Brak różnic w ekspresji antygenu Ki-67 w zależności od czasu trwania choroby.

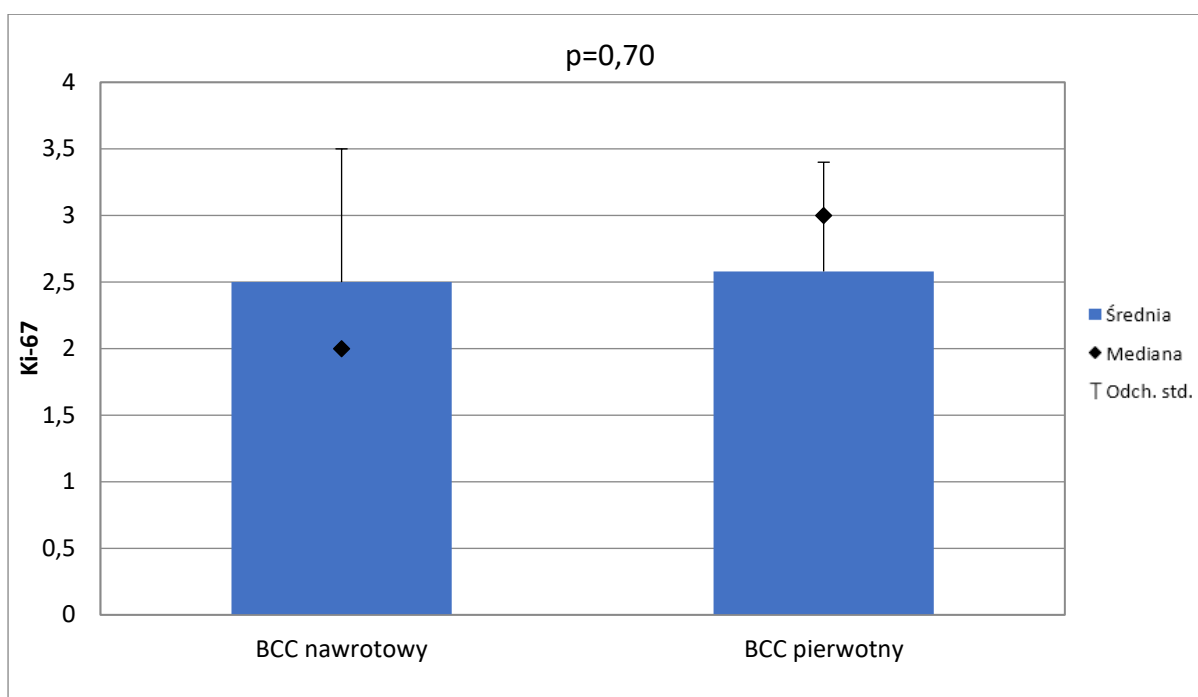


Nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w ekspresji antygenu Ki-67 u pacjentów ze zmianami nawrotowymi w porównaniu z grupą pacjentów, którzy zachorowali po raz pierwszy ( $p=0,70$ ) (tab. 24, ryc. 34).

Tab. 24. Ekspresja antygenu Ki-67 w BCC pierwotnych i nawrotowych

	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
BCC nawrotowy	4	2,5 $\pm$ 1,0	2,00	4,00	2,00
BCC pierwotny	43	2,6 $\pm$ 0,82	1,00	4,00	3,00

Ryc. 34. Brak istotnych różnic w ekspresji antygenu Ki-67 w BCC pierwotnych i nawrotowych.

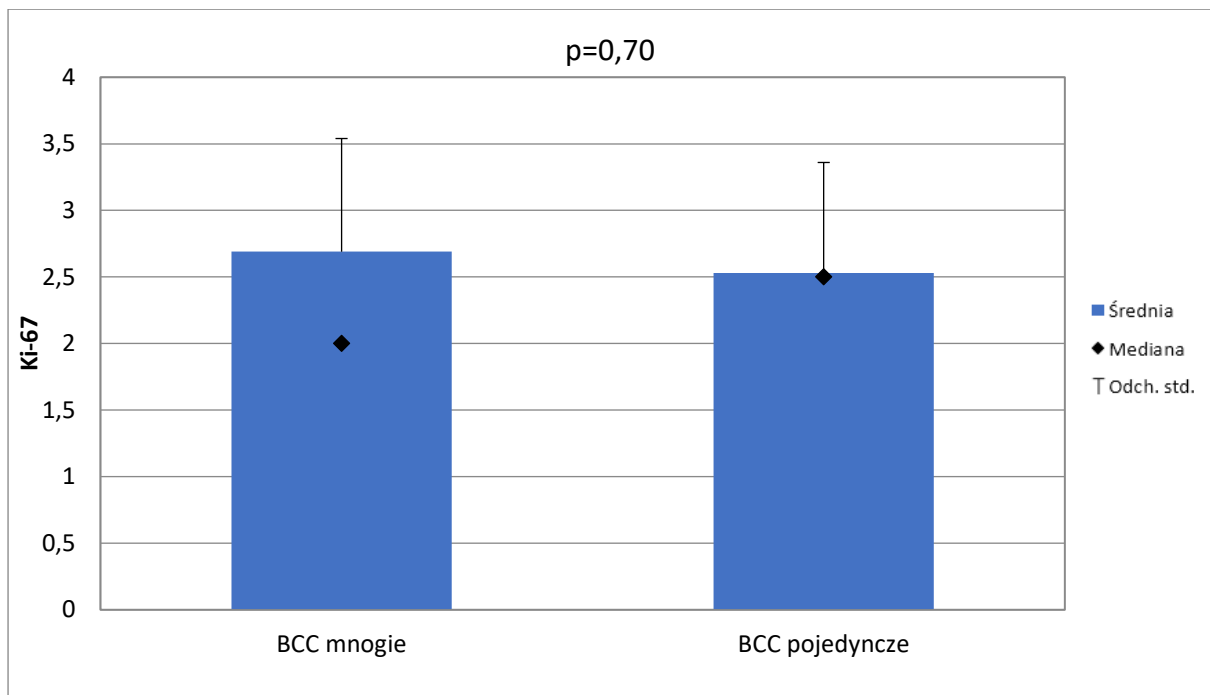


Nie wykazano także, aby ekspresja antygenu Ki-67 różniła się istotnie u pacjentów z mnogimi rakami podstawnokomórkowymi w porównaniu z grupą pacjentów, u których stwierdzono zmiany pojedyncze ( $p=0,70$ ) (tab. 25, ryc.35).

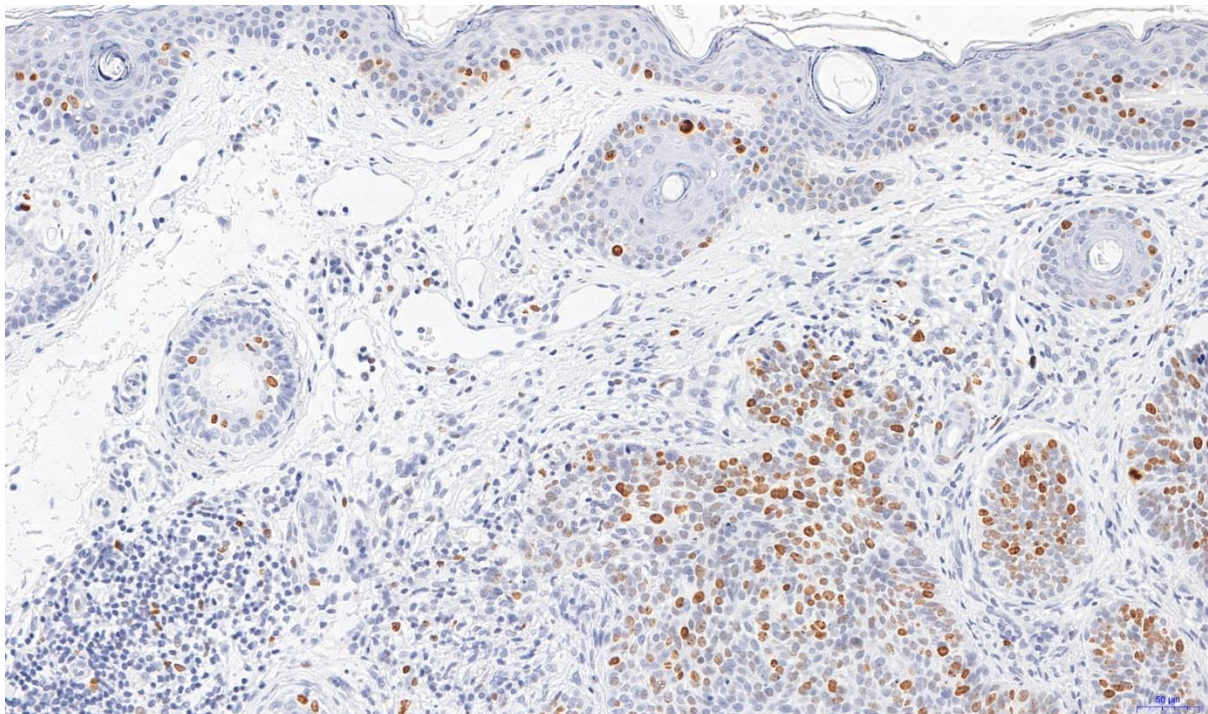
Tab. 25. Ekspresja antygenu Ki-67 w BCC mnogich i pojedynczych.

	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
BCC mnogie	13	2,7 $\pm$ 0,9	2,0	4,0	2,0
BCC pojedyncze	34	2,5 $\pm$ 0,8	1,0	4,0	2,5

Ryc. 35. Brak istotnych różnic w ekspresji antygenu Ki-67 w zależności od liczby zmian.



Ryc. 36. Ekspresja antygenu Ki-67 w raku podstawnokomórkowym. Powiększenie x 100.



#### 4.3.6. Gęstość naczyń krwionośnych CD31<sup>+</sup> w podścielisku raka podstawnokomórkowego.

Średnia gęstość naczyń krwionośnych CD31<sup>+</sup> wyniosła  $20,9 \pm 5,9$ . Zakres wartości mieścił się w granicach od 10,0 do 36,3 (tab. 26).

Tab.26. Ekspresja CD31 w komórkach śródbłonna naczyń w BCC.

Ekspresja CD31 w komórkach śródbłonna naczyń w BCC (n=47)	
Średnia	20,9
Odchylenie standardowe	5,9
Wartość minimalna	10,0
Wartość maksymalna	36,3
Mediana	21,7

Nie wykazano, aby gęstość naczyń CD31<sup>+</sup> w podścielisku raka podstawnokomórkowego korelowała z parametrami klinicznymi takimi jak:

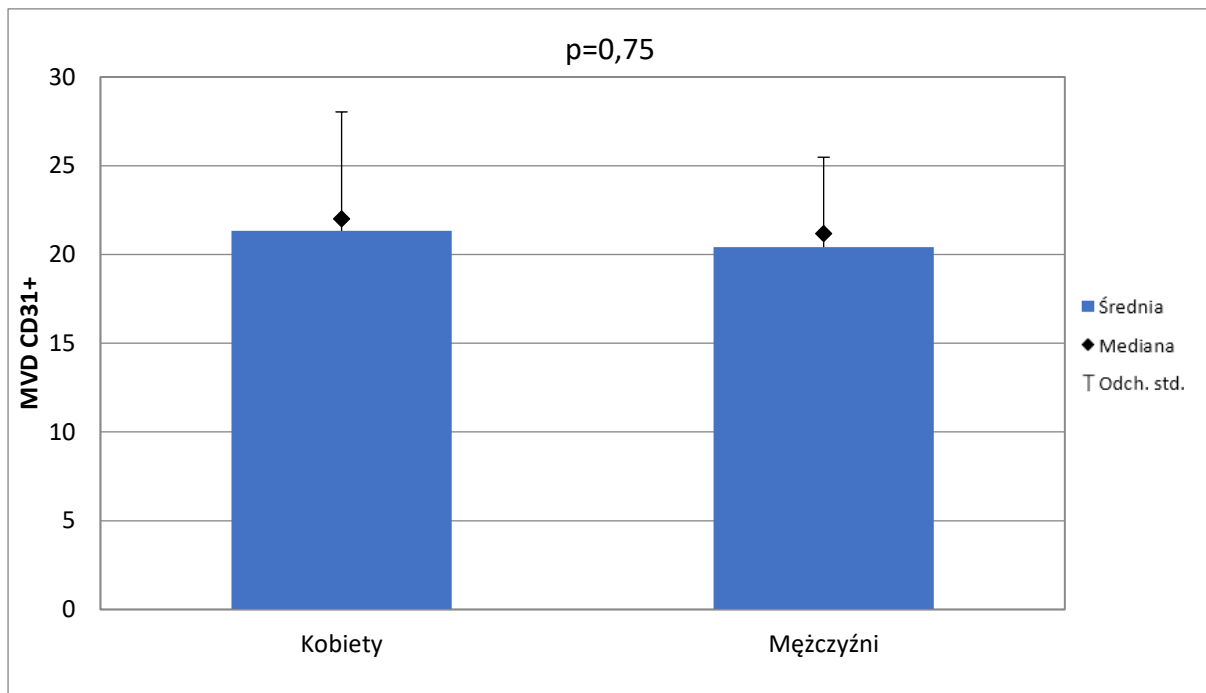
- Płeć ( $p= 0,75$ ) (tab. 27, ryc. 37),
- Czas trwania choroby ( $p= 0,15$ ) (ryc. 38),
- Wiek ( $p=0,72$ ) (ryc.39).

Tab. 27. Ekspresja CD31 w BCC u kobiet i mężczyzn.

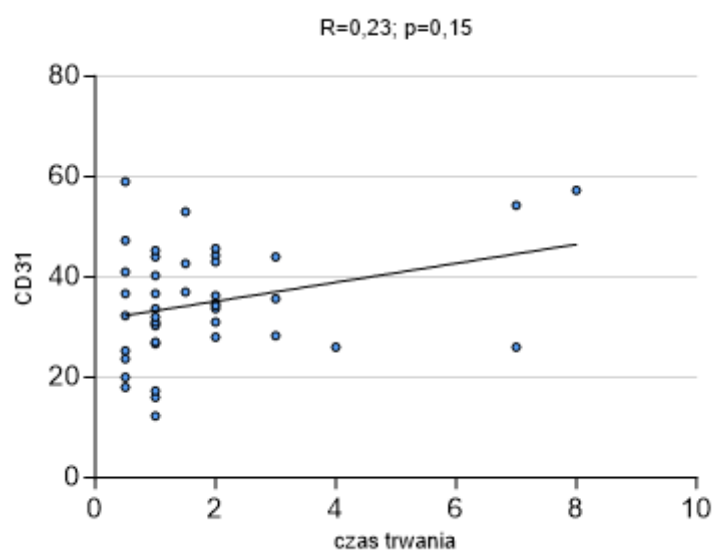
Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	25	21,3 $\pm$ 6,7	10,0	36,3	22,0
Mężczyźni	22	20,4 $\pm$ 5,1	12,0	28,0	21,2



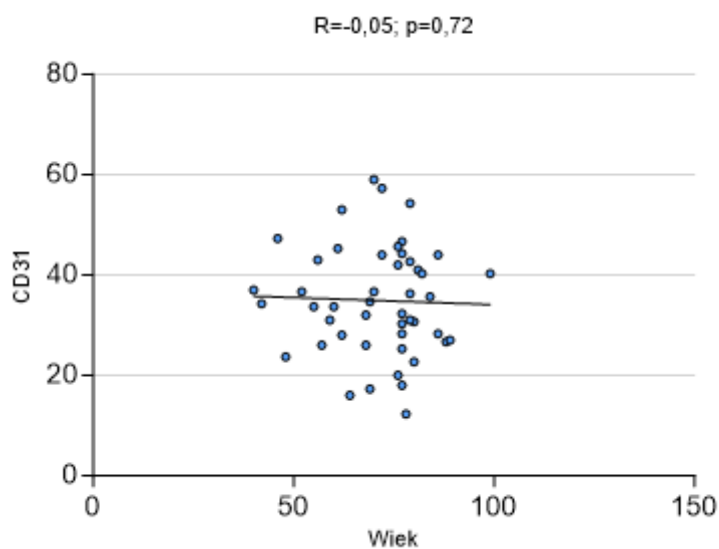
Ryc. 37. Brak istotnych różnic w ekspresji CD31 w naczyniach krwionośnych w zależności od płci.



Ryc. 38. Brak zależności między ekspresją CD31 w naczyniach krwionośnych a czasem trwania choroby.



Ryc. 39. Brak zależności między ekspresją CD31 w naczyniach krwionośnych a wiekiem pacjentów.

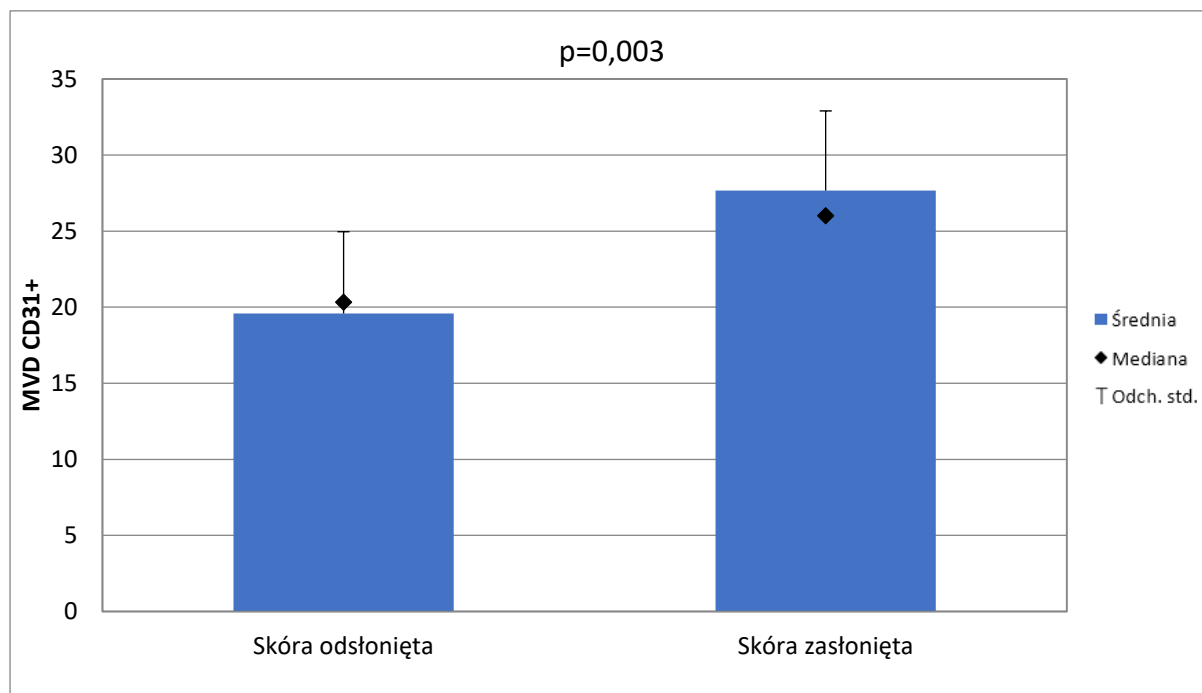


Wykazano, że średnie gęstości naczyń krwionośnych CD31<sup>+</sup> istotnie różniły się w zależności od lokalizacji związanej z narażeniem na działanie promieniowania UV. Zmiany umiejscowione na skórze zasłoniętej charakteryzowały się wyższą średnią gęstością naczyń krwionośnych w porównaniu do zmian zlokalizowanych na skórze narażonej na działanie promieniowania UV (p=0,003) (tab.28, ryc. 40).

Tab. 28. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 na skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	37	19,6 ± 5,4	10,0	30,7	20,3
Skóra zasłonięta	6	27,7 ± 5,2	22,7	36,3	26,0

Ryc. 40. Wyższa średnia gęstość naczyń krwionośnych CD31<sup>+</sup> na skórze zasłoniętej w porównaniu ze skórą eksponowaną na promieniowanie UV.

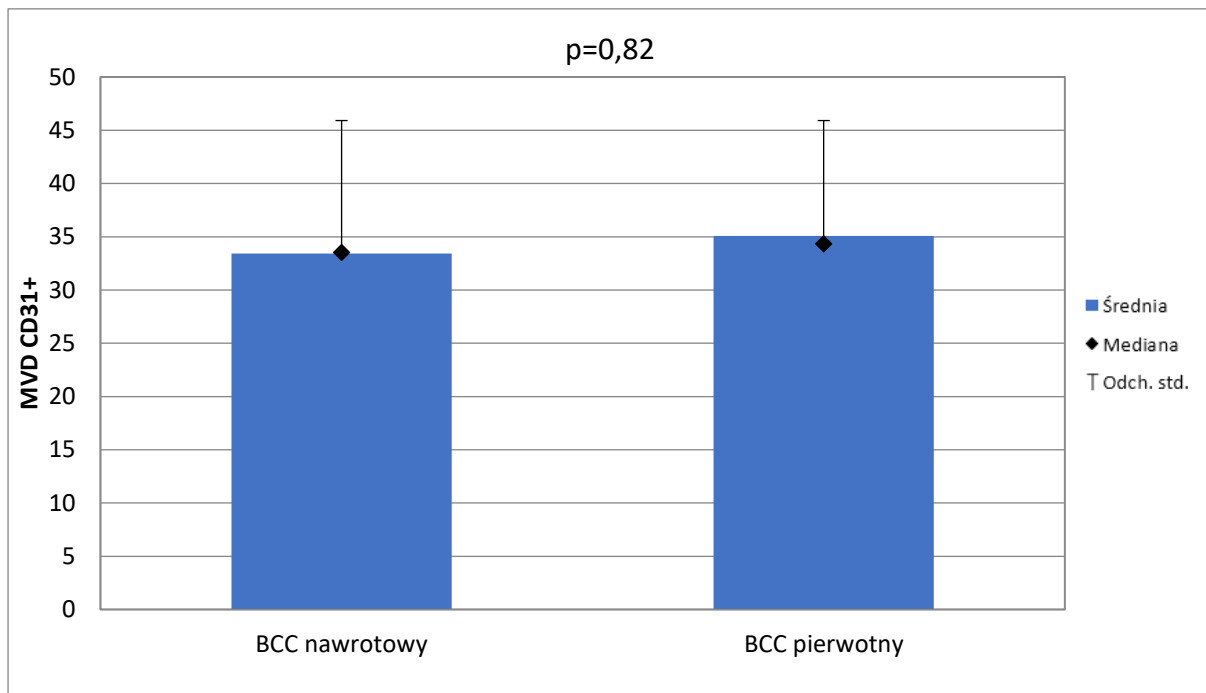


Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji CD31 u pacjentów ze zmianami nawrotowymi w porównaniu z grupą pacjentów, którzy zachorowali po raz pierwszy ( $p=0,82$ ) (tab. 29, ryc. 41).

Tab. 29. Ekspresja CD31 w BCC nawrotowych i pierwotnych.

	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
BCC nawrotowy	4	33,4 ± 12,5	20,0	46,7	33,5
BCC pierwotny	43	35,1 ± 10,8	12,3	59,0	34,3

Ryc. 41. Brak istotnych różnic w ekspresji CD31 w naczyniach krwionośnych w zmianach pierwotnych i nawrotowych.

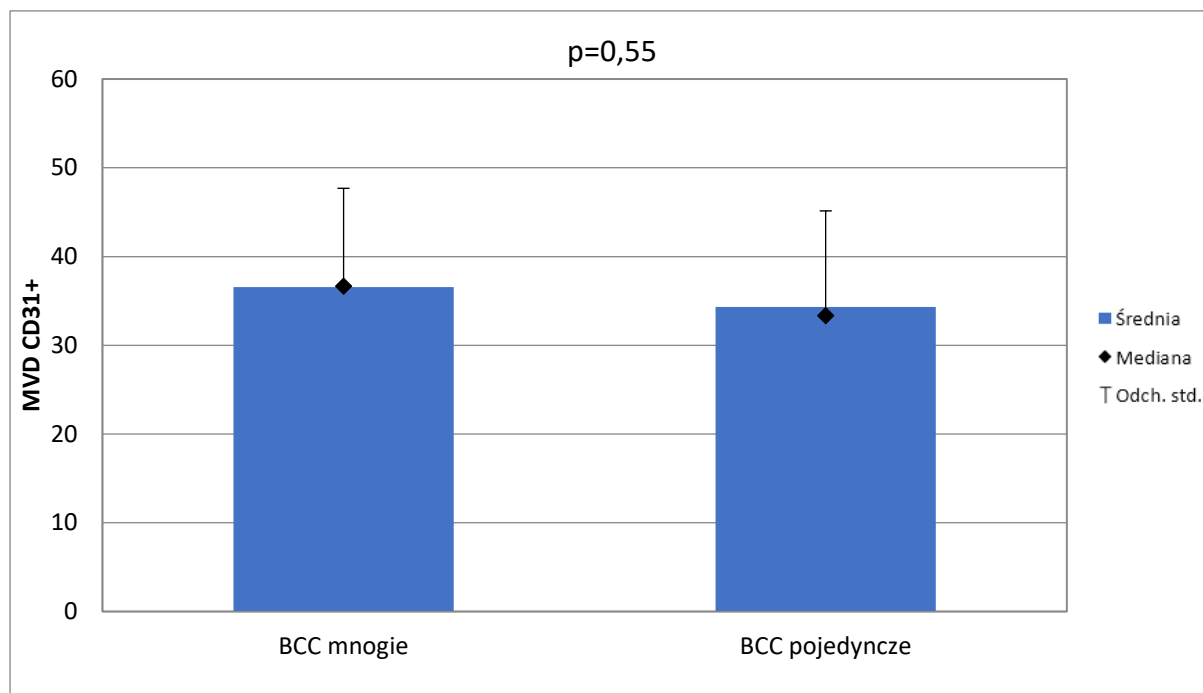


Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji CD31 u pacjentów z mnogimi rakami podstawnocomórkowymi w porównaniu z pacjentami, u których stwierdzono zmiany pojedyncze ( $p=0,55$ ) (tab. 30, ryc. 42).

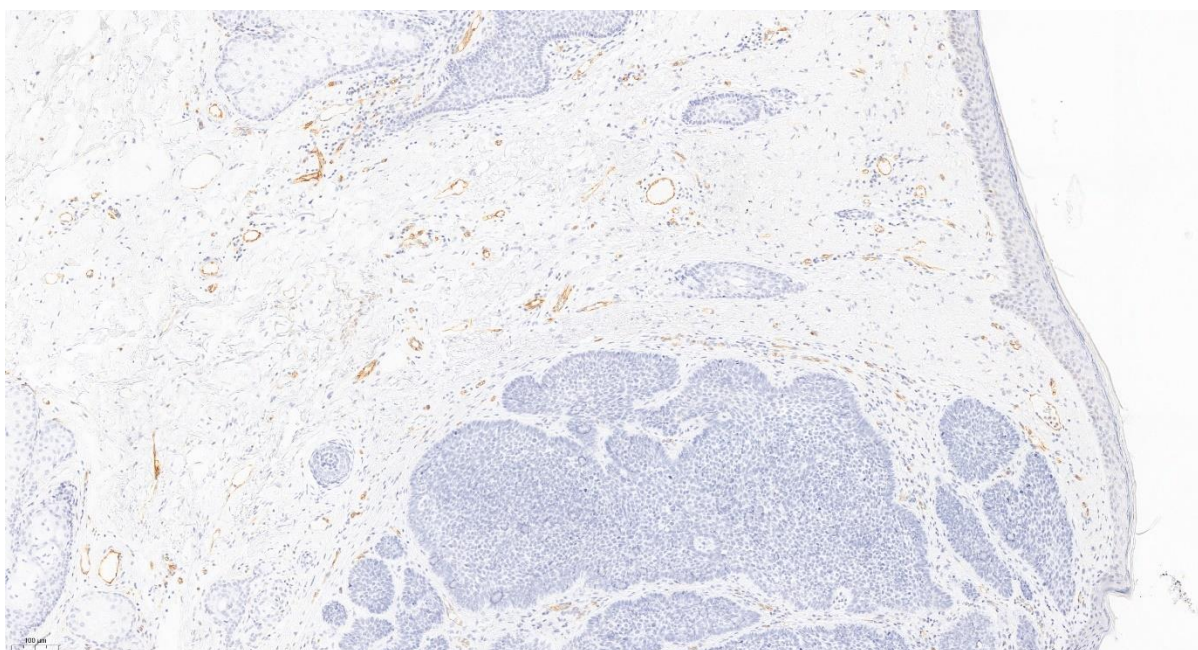
Tab. 30. Ekspresja CD31 w BCC mnogich i pojedynczych.

	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
BCC mnogie	13	36,6 $\pm$ 11,1	17,3	59,0	36,7
BCC pojedyncze	34	34,3 $\pm$ 10,8	12,3	57,3	33,3

Ryc. 42. Brak istotnych różnic w ekspresji CD31 w zmianach mnogich i pojedynczych.



Ryc. 43. Ekspresja CD31 w naczyniach krwionośnych w otoczeniu BCC, brak widocznych naczyń w masie guza. Powiększenie x 40.



#### 4.3.7. Gęstość naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> w podścielisku raka podstawnokomórkowego.

Średnia gęstość naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> wyniosła  $30,3 \pm 10,2$ . Zakres wartości mieścił się w granicach od 12,7 do 54,7 (tab.31).

Tab. 31. Ekspresja CD34 w komórkach śródbłonna naczyń w BCC.

Ekspresja CD34 w komórkach śródbłonna naczyń w BCC (n=47)	
Średnia	30,3
Odchylenie standardowe	10,2
Wartość minimalna	12,7
Wartość maksymalna	54,7
Mediana	31,0

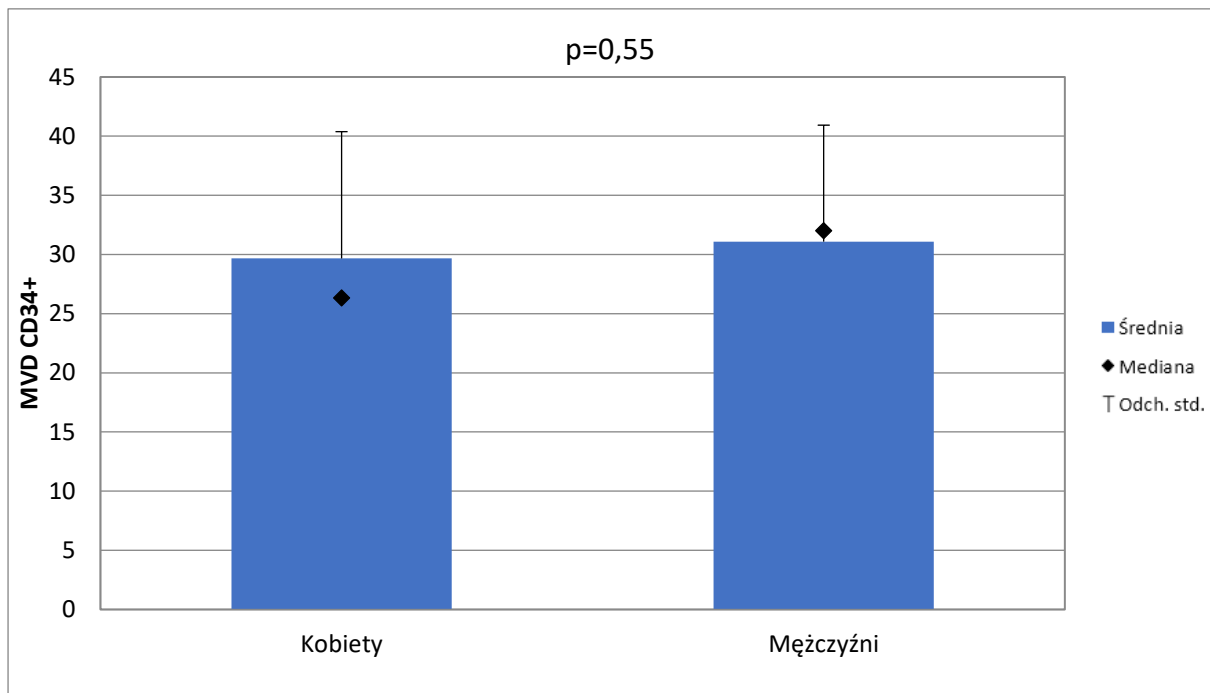
Nie wykazano, aby gęstość naczyń CD34<sup>+</sup> w podścielisku raka podstawnokomórkowego korelowała z parametrami klinicznymi takimi jak:

- Płeć (p= 0,55) (tab. 32, ryc. 44),
- Wiek pacjentów (p=0,1) (ryc. 45),
- Ekspozycja na promieniowanie UV (p=0,13) (tab. 33, ryc. 46),
- Czas trwania choroby (p=0,35) (ryc. 47).

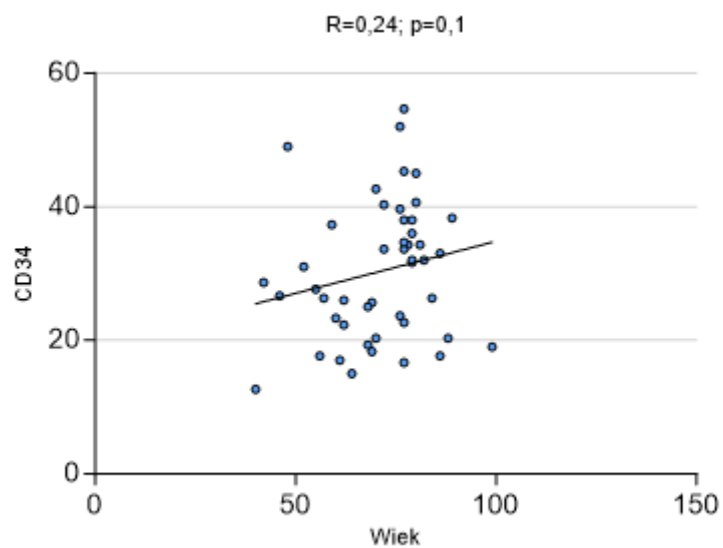
Tab. 32. Ekspresja CD34 w BCC u kobiet i mężczyzn.

Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	25	$29,7 \pm 10,7$	12,7	54,7	26,3
Mężczyźni	22	$31,1 \pm 9,8$	15,0	49,0	32,0

Ryc. 44. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji CD34 w naczyniach krwionośnych w podścielisku BCC u kobiet i mężczyzn.



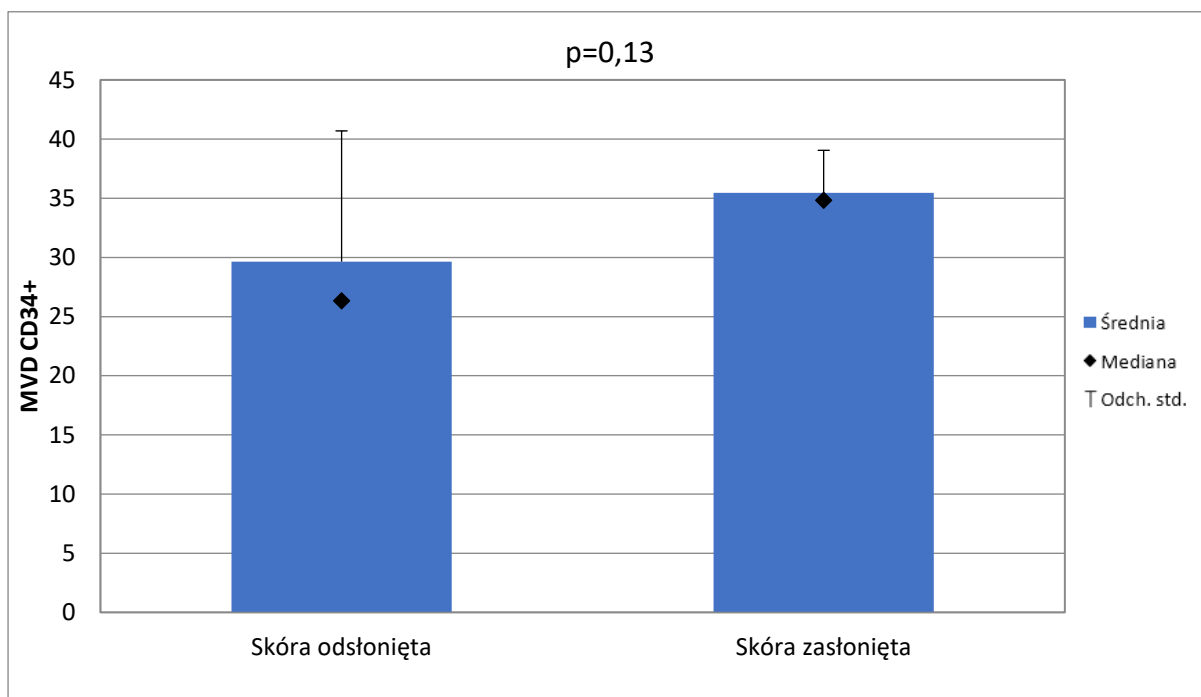
Ryc. 45. Brak zależności między ekspresją CD34 w naczyniach krwionośnych a wiekiem pacjentów.



Tab. 33. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD34 na skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

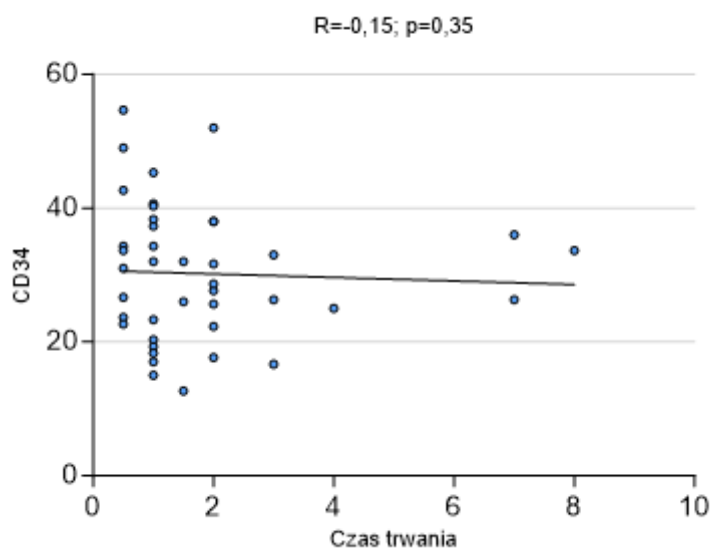
	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	37	29,7 ± 11,0	12,7	54,7	26,3
Skóra zasłonięta	6	35,5 ± 3,6	31,0	40,7	34,8

Ryc. 46. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji CD34 w zależności od ekspozycji na promieniowanie UV.





Ryc. 47. Brak zależności między ekspresją CD34 w naczyniach krwionośnych a czasem trwania choroby.

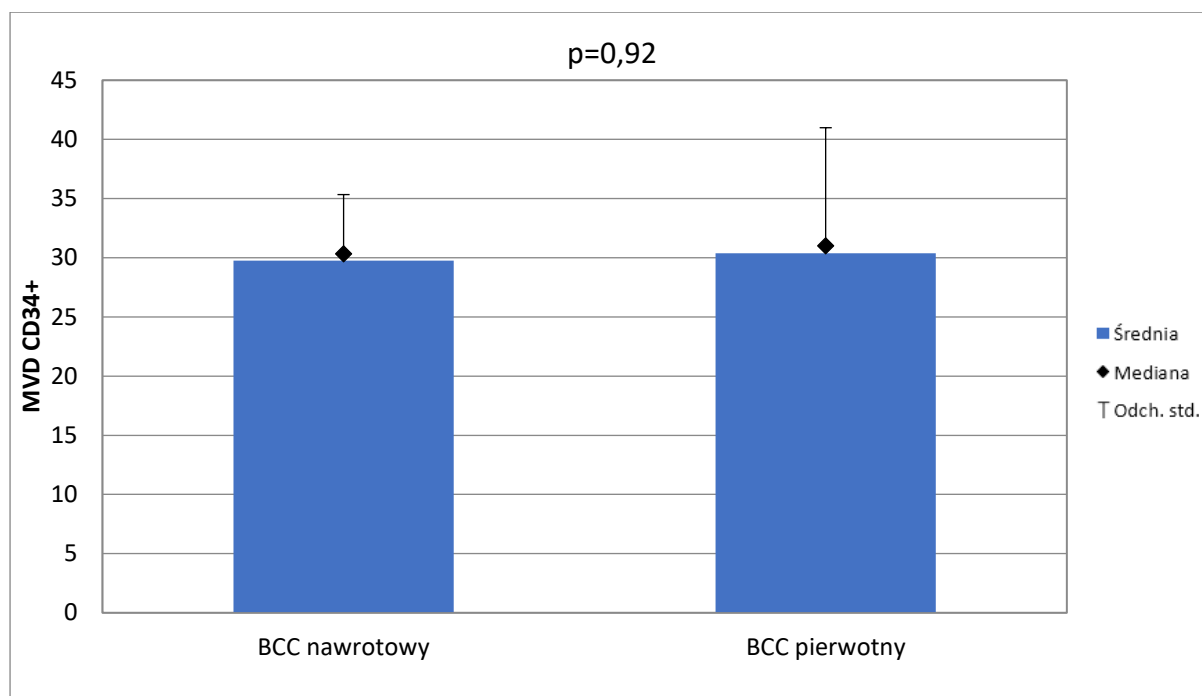


Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji CD34 u pacjentów ze zmianami nawrotowymi w porównaniu z grupą pacjentów, którzy zachorowali po raz pierwszy ( $p=0,92$ ) (tab. 34, ryc. 48).

Tab. 34. Ekspresja CD34 w BCC nawrotowych i pierwotnych.

	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
BCC nawrotowy	4	29,8 $\pm$ 5,6	23,7	34,7	30,3
BCC pierwotny	43	30,4 $\pm$ 10,6	12,7	54,7	31,0

Ryc. 48. Brak istotnych różnic w ekspresji CD34 w zmianach pierwotnych i nawrotowych.

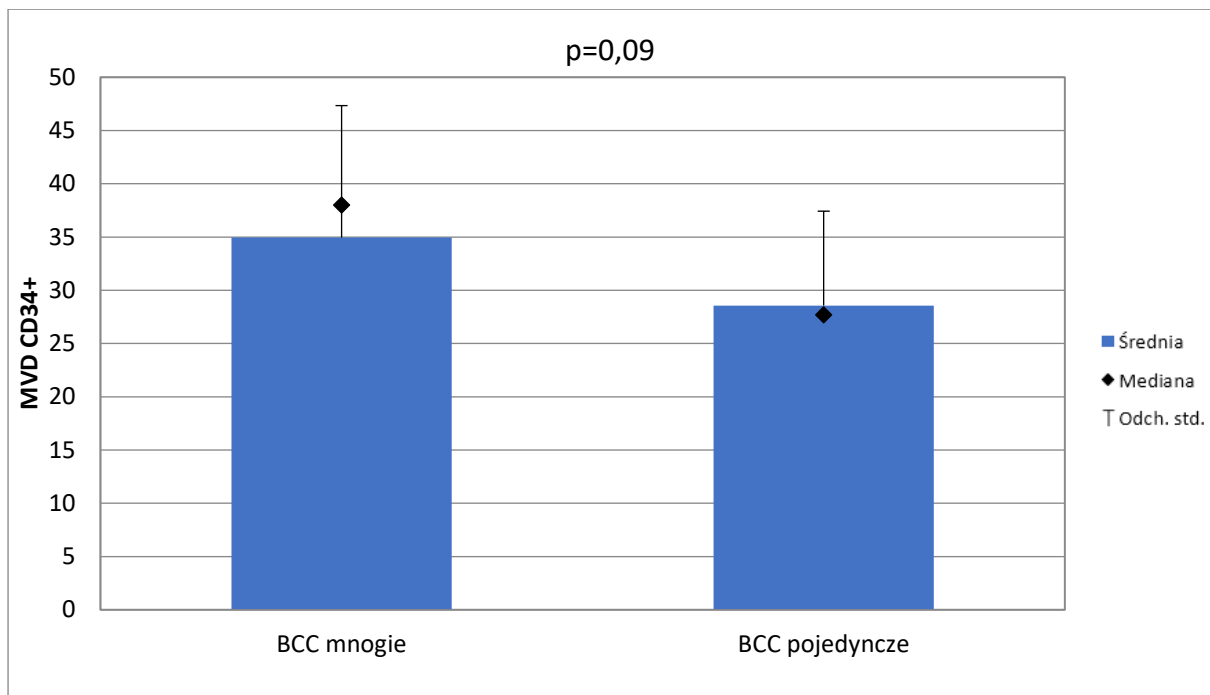


Nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w ekspresji CD34 u pacjentów z mnogimi rakami podstawnokomórkowymi w porównaniu z pacjentami, u których występowały zmiany pojedyncze ( $p=0,09$ ) (tab. 35, ryc. 49).

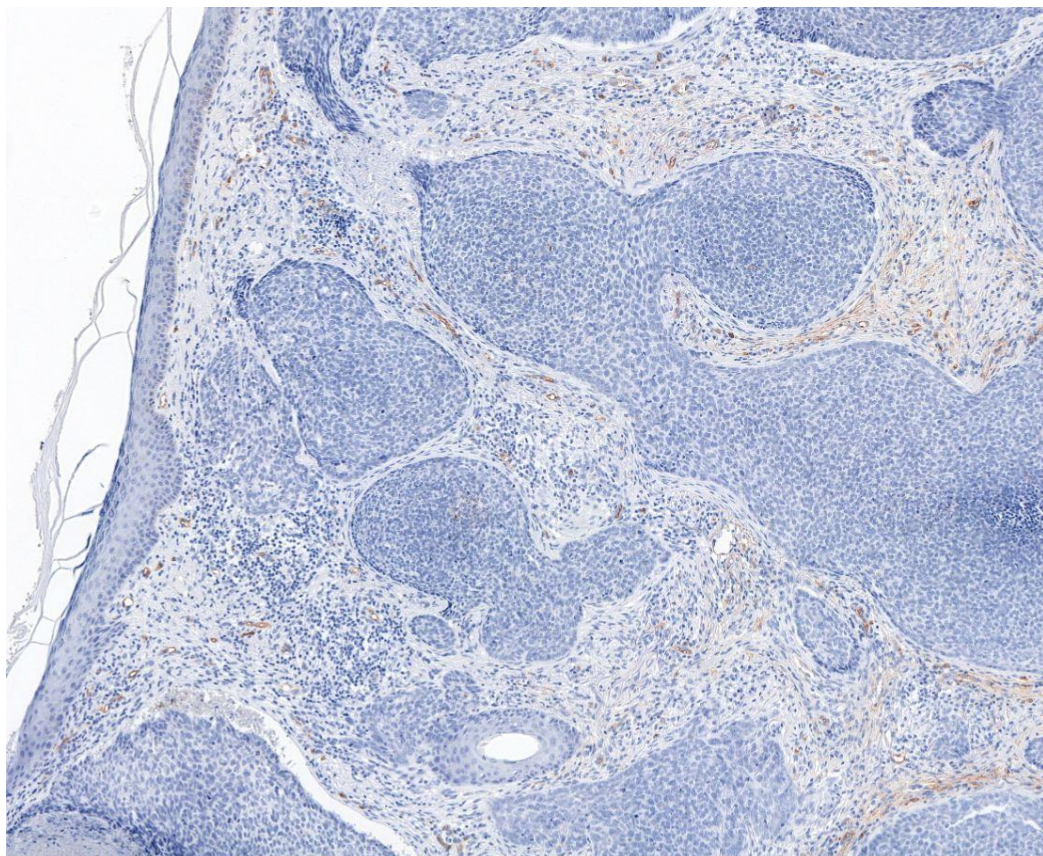
Tab. 35. Ekspresja CD34 w BCC mnogich i pojedynczych.

	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
BCC mnogie	13	35,0 $\pm$ 12,4	18,3	54,7	38,0
BCC pojedyncze	34	28,6 $\pm$ 8,9	12,7	49,0	27,7

Ryc. 49. Brak istotnych różnic w ekspresji CD34 w zmianach mnogich i pojedynczych.



Ryc. 50. Ekspresja CD34 w naczyniach krwionośnych w otoczeniu BCC, brak widocznych naczyń krwionośnych w masie guza. Powiększenie x 40.



## 4.4. Rak kolczystokomórkowy

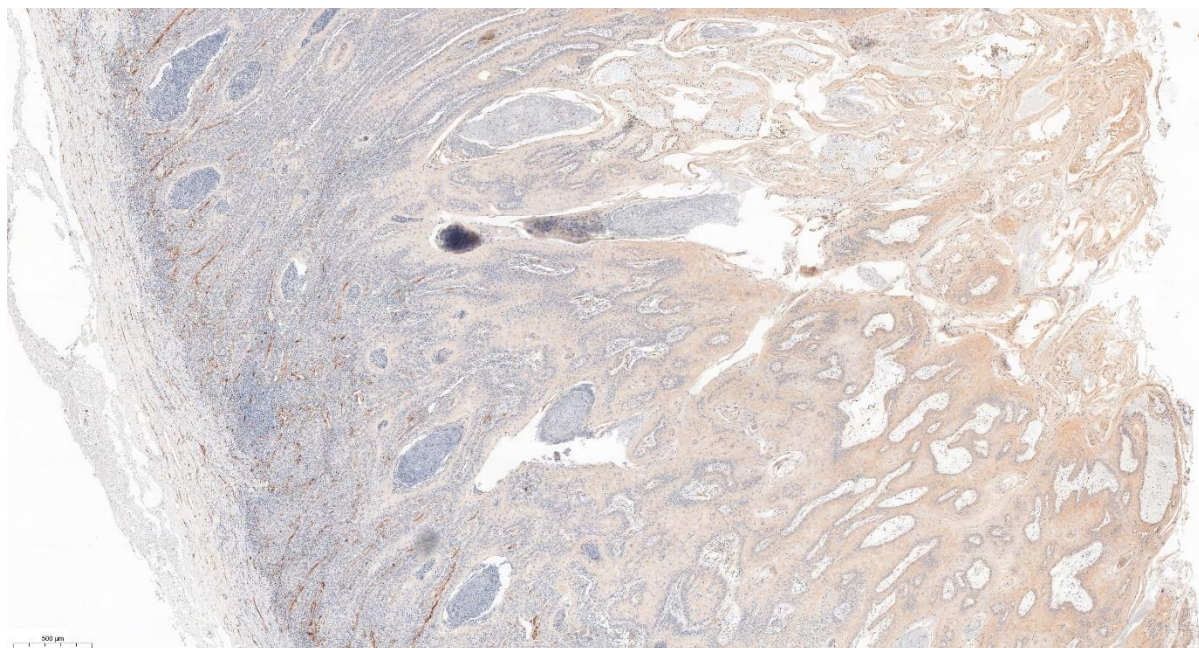
### 4.4.3. Ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych raka kolczystokomórkowego.

Ekspresja nestyny w masie guza oceniona była w 32 przypadkach SCC. W 18 przypadkach (56,25%) nie wykazano ekspresji, natomiast była ona dodatnia w 14 przypadkach- 8 z nich wykazywało słabą ekspresję (25,0%), a 6 umiarkowaną (18,75%), nie stwierdzono przypadków prezentujących silną ekspresję (ryc.51).

Ryc. 51. Ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych w SCC.



Ryc. 52. Słaba ekspresja nestyny w komórkach raka kolczystokomórkowego oraz silnie wyznakowane liczne, drobne naczynia krwionośne w podścielisku SCC. Powiększenie x 40.



#### 4.4.4. Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny.

Gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny oceniano w podścielisku 32 raków kolczystokomórkowych. We wszystkich preparatach stwierdzono ekspresję nestyny w śródbłonku naczyń. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wyniosła  $21,6 \pm 8,4$ . Zakres uzyskanych wartości mieścił się w granicach od 5,0 do 44,0 (tab. 36).

Tab. 36. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny w podścielisku SCC.

Ekspresja nestyny w komórkach śródbłonka naczyń w SCC (n=32)	
Średnia	21,6
Odchylenie standardowe	8,4
Wartość minimalna	5,0
Wartość maksymalna	44,0
Mediana	22,8

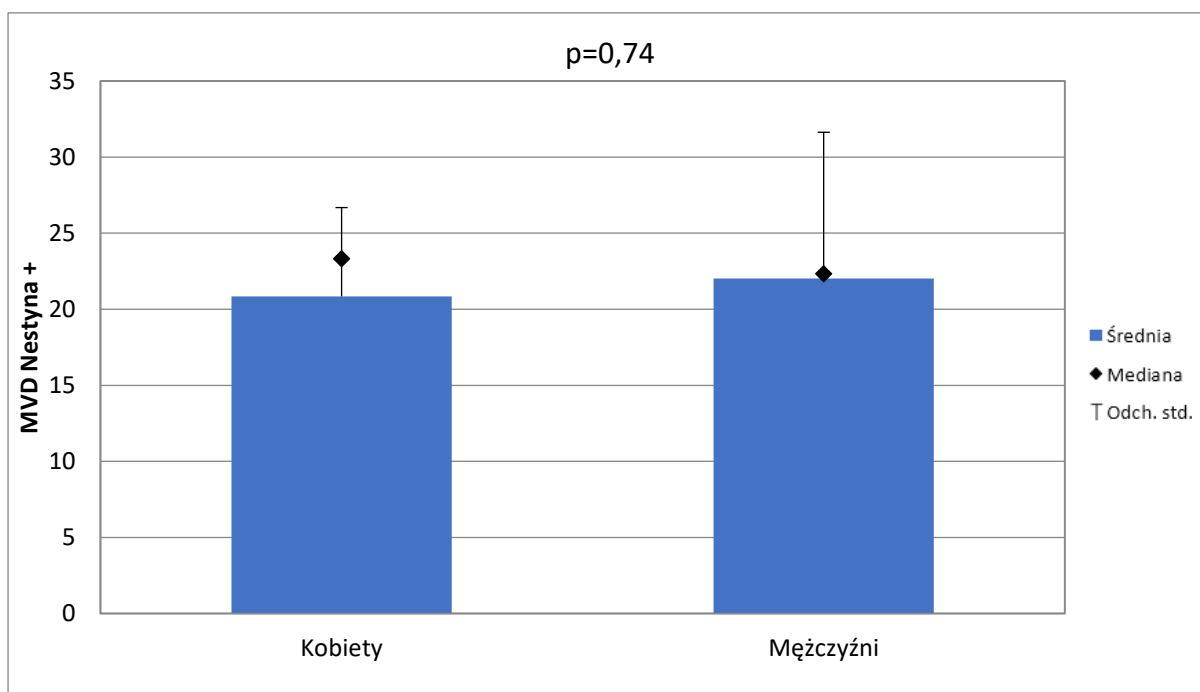
Nie wykazano, aby ekspresja nestyny w podścielisku raka kolczystokomórkowego korelowała z parametrami klinicznymi takimi jak:

- Płeć ( $p=0,74$ ) (tab. 37, ryc. 53),
- Ekspozycja na promieniowanie UV ( $p=-0,69$ ) (tab. 38, ryc.54),
- Wiek ( $p=0,17$ ) (ryc. 55),
- Czas trwania choroby ( $p=0,96$ ) (ryc. 56),
- Głębokość nacieku ( $p=0,81$ ).

Tab. 37. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłonna naczyń u kobiet i mężczyzn w SCC.

Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	11	20,9 $\pm$ 5,8	13,3	29,3	23,3
Mężczyźni	21	22,0 $\pm$ 9,6	5,0	44,0	22,3

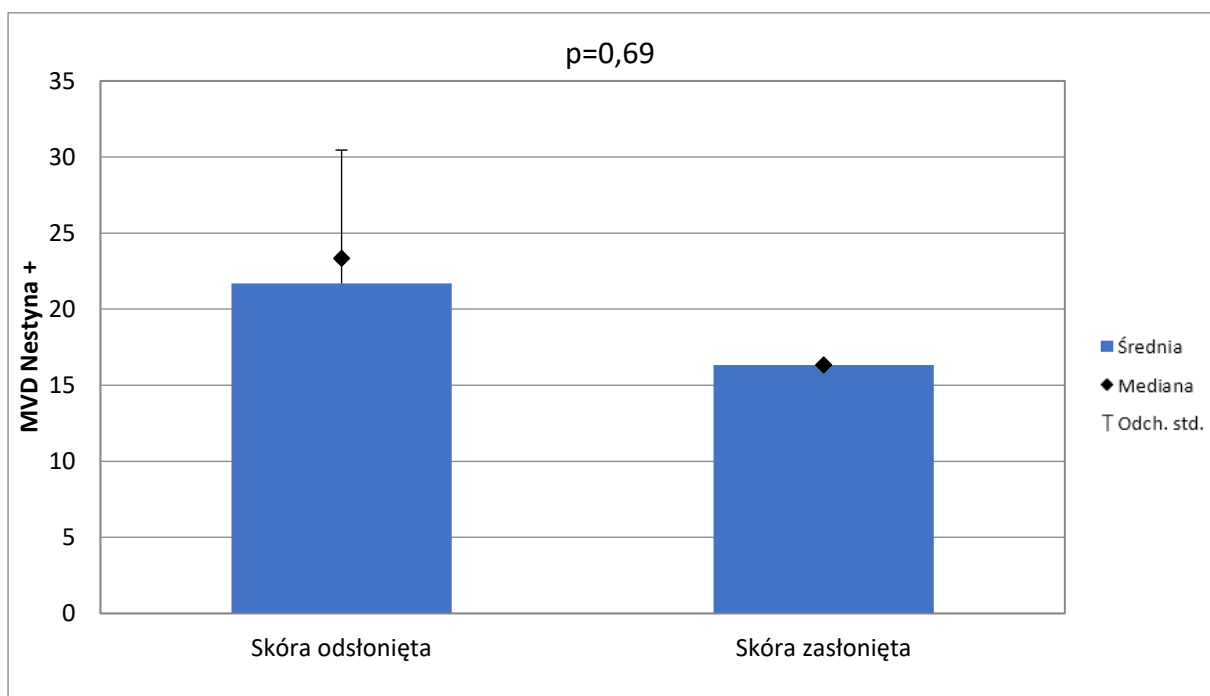
Ryc. 53. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji nestyny w naczyniach krwionośnych u kobiet i mężczyzn.



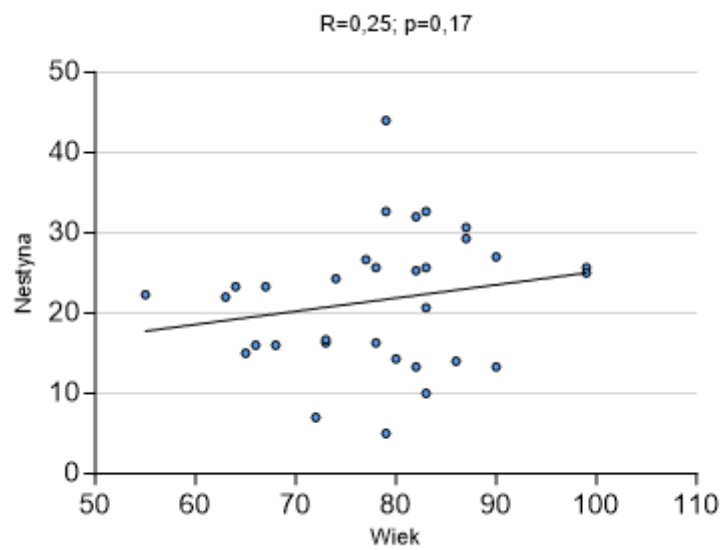
Tab. 38. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłónka naczyń w skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	29	21,7 ± 8,8	5,0	44,0	23,3
Skóra zasłonięta	1	16,3 ± 0,0	16,3	16,3	16,3

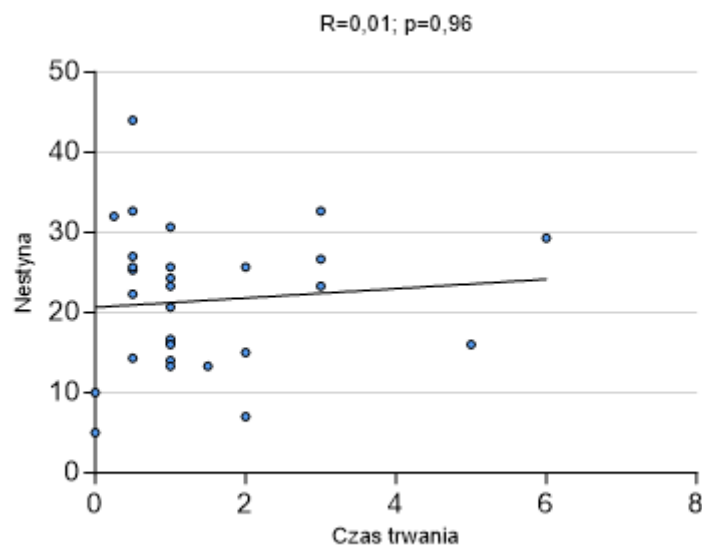
Ryc. 54. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji nestyny w zależności od ekspozycji na promieniowanie UV.



Ryc. 55. Brak zależności między ekspresją nestyny w naczyniach krwionośnych a wiekiem pacjentów.



Ryc. 56. Brak zależności między ekspresją nestyny w naczyniach krwionośnych a czasem trwania choroby.





#### 4.4.5. Ekspresja antygenu Ki-67 w raku kolczystokomórkowym

Ekspresję antygenu Ki-67 oceniano u 32 pacjentów z rakiem kolczystokomórkowym. Średnia ekspresja Ki-67 w tej grupie wyniosła  $2,6 \pm 1,0$ . Zakres wartości mieścił się w granicach od 1,0 do 4,0 (tab. 39).

Tab. 39. Ekspresja antygenu Ki-67 w raku kolczystokomórkowym.

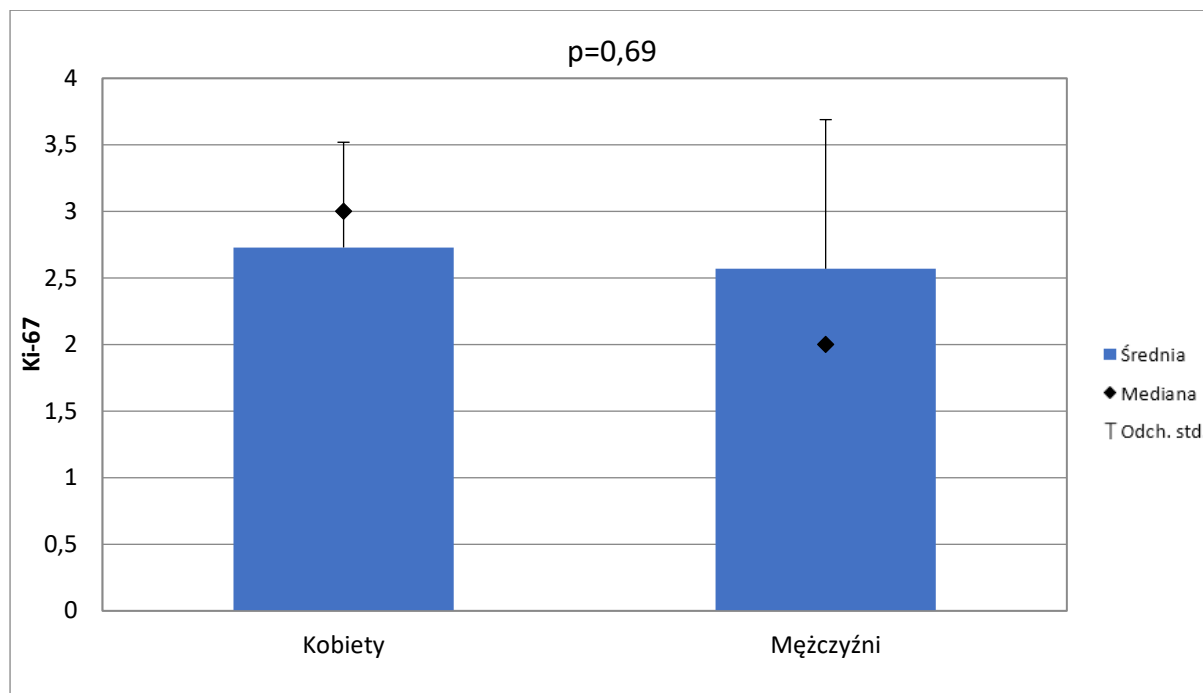
Ekspresja Ki-67 w SCC (n=32)	
Średnia	2,6
Odchylenie standardowe	1,0
Wartość minimalna	1,0
Wartość maksymalna	4,0
Mediana	2,5

Nie wykazano, aby ekspresja antygenu Ki-67 różniła się w zależności od płci pacjentów ( $p= 0,69$ ) (tab. 40, ryc. 57), lokalizacji związanej z narażeniem na promieniowanie UV ( $p= 0,50$ ) (tab. 41, ryc. 48), wieku pacjentów ( $p= 0,58$ ) (ryc.59), czasu trwania choroby ( $p=0,49$ ) (ryc. 60) oraz od głębokości nacieku ( $p=0,68$ ).

Tab. 40. Ekspresja antygenu Ki-67 u kobiet i mężczyzn w grupie chorych z SCC.

Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	11	$2,7 \pm 0,8$	2,0	4,0	3,0
Mężczyźni	21	$2,6 \pm 1,1$	1,0	4,0	2,0

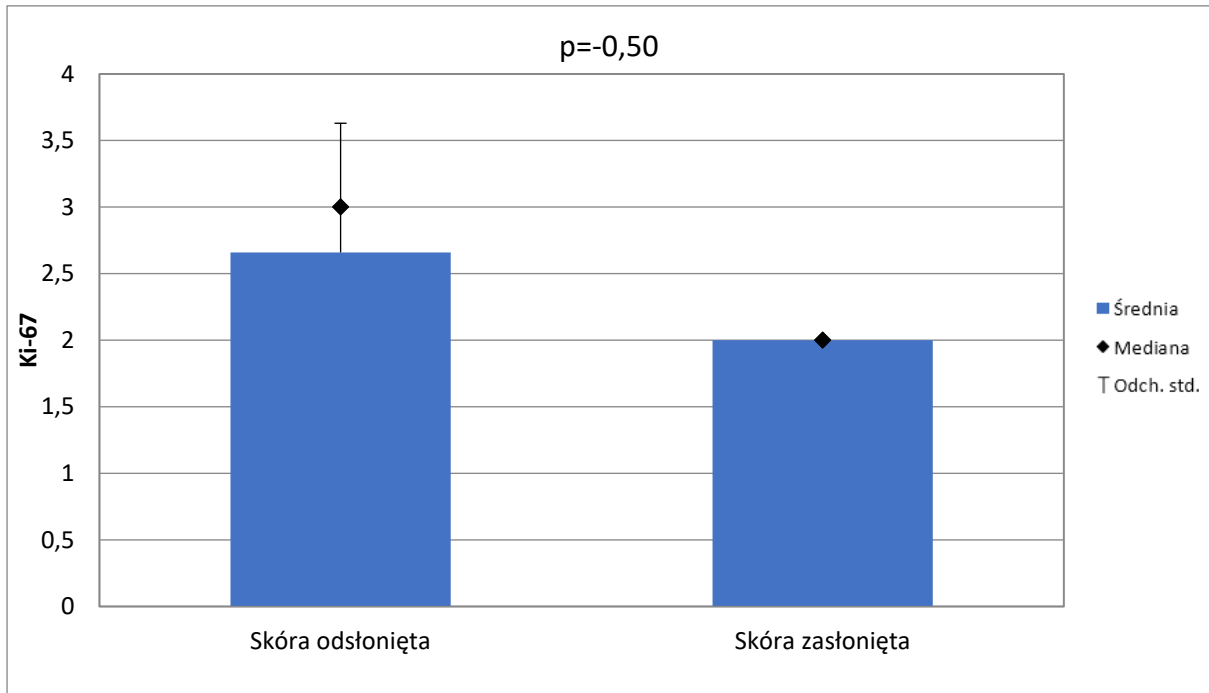
Ryc. 57. Porównanie ekspresji antygenu Ki-67 w zależności od płci w grupie chorych z SCC.



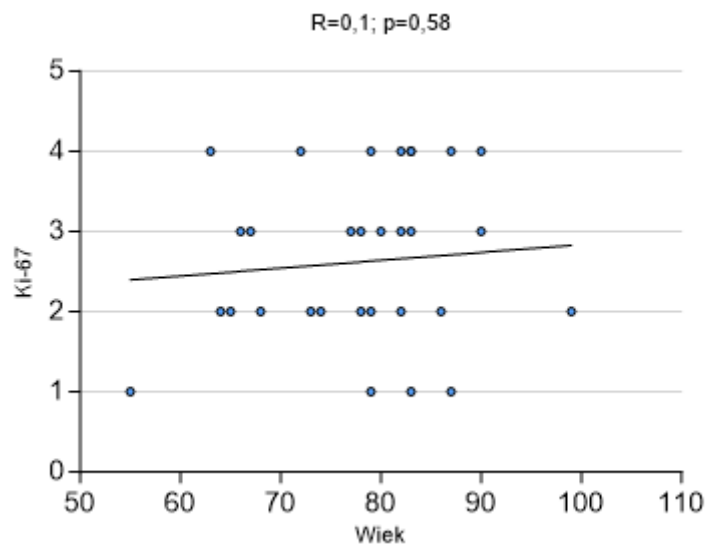
Tab. 41. Ekspresja Ki-67 na skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	29	2,7 ± 1,0	1,0	4,0	3,0
Skóra zasłonięta	1	2,0 ± 0,0	2,0	2,0	2,0

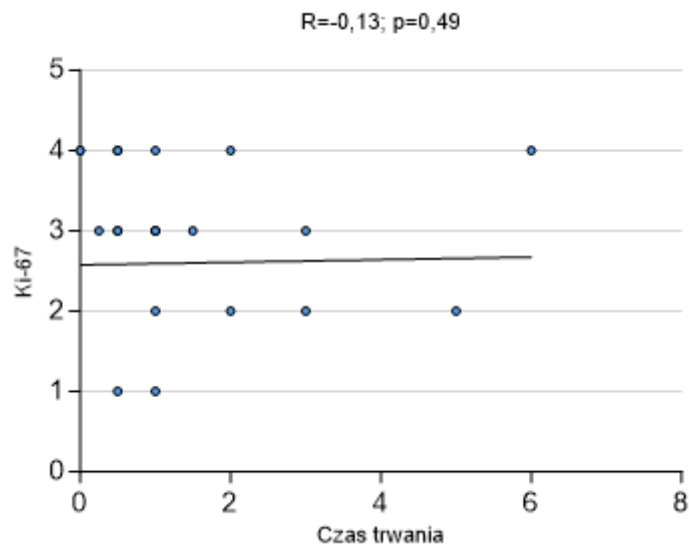
Ryc. 58. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji antygenu Ki-67 w zależności od ekspozycji na promieniowanie UV.



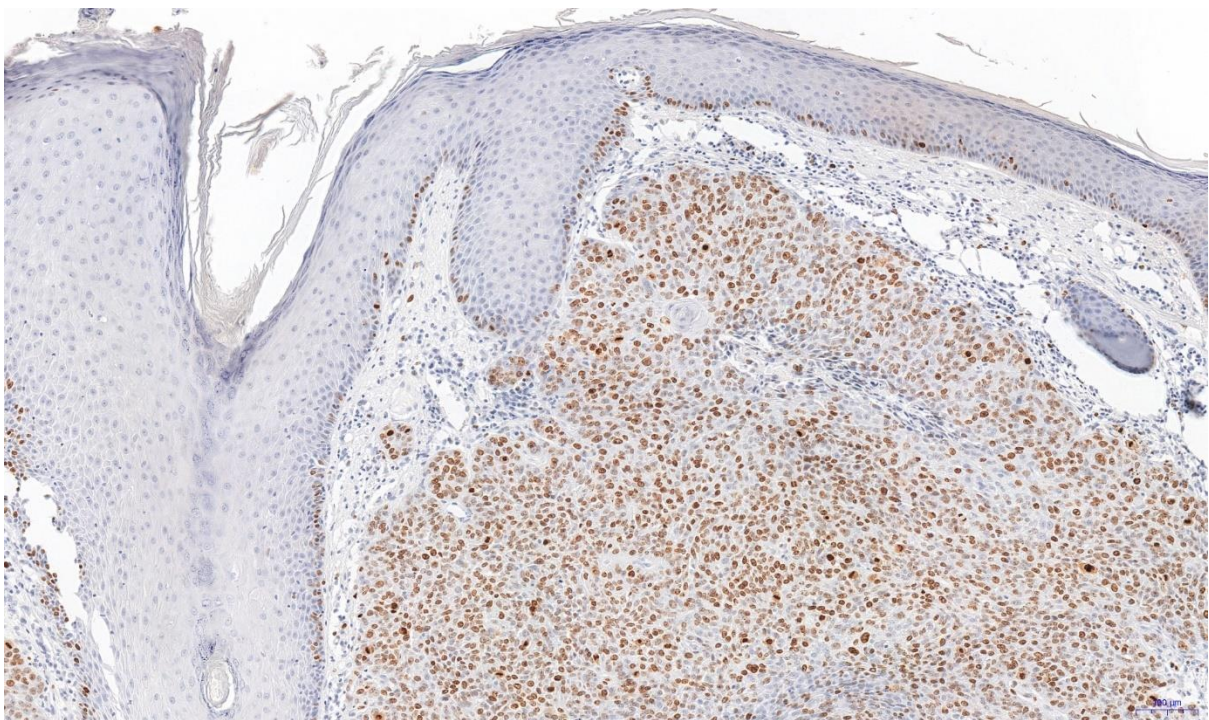
Ryc. 59. Brak zależności między ekspresją antygenu Ki-67 a wiekiem pacjentów, w grupie chorych z SCC.



Ryc. 60. Brak zależności między ekspresją antygenu Ki-67 a czasem trwania choroby, w grupie chorych z SCC.



Ryc. 61. Ekspresja antygenu Ki-67 w raku kolczystokomórkowym. Powiększenie x 100.



4.4.6. Gęstość naczyń krwionośnych CD31<sup>+</sup> w podścielisku raka koleczystokomórkowego.

Średnia gęstość naczyń krwionośnych CD31<sup>+</sup> wyniosła  $24,9 \pm 7,3$ . Zakres wartości mieścił się w granicach od 12,3 do 44,0 (tab. 42).

Tab.42. Ekspresja CD31 w komórkach śródbłonna naczyń w SCC.

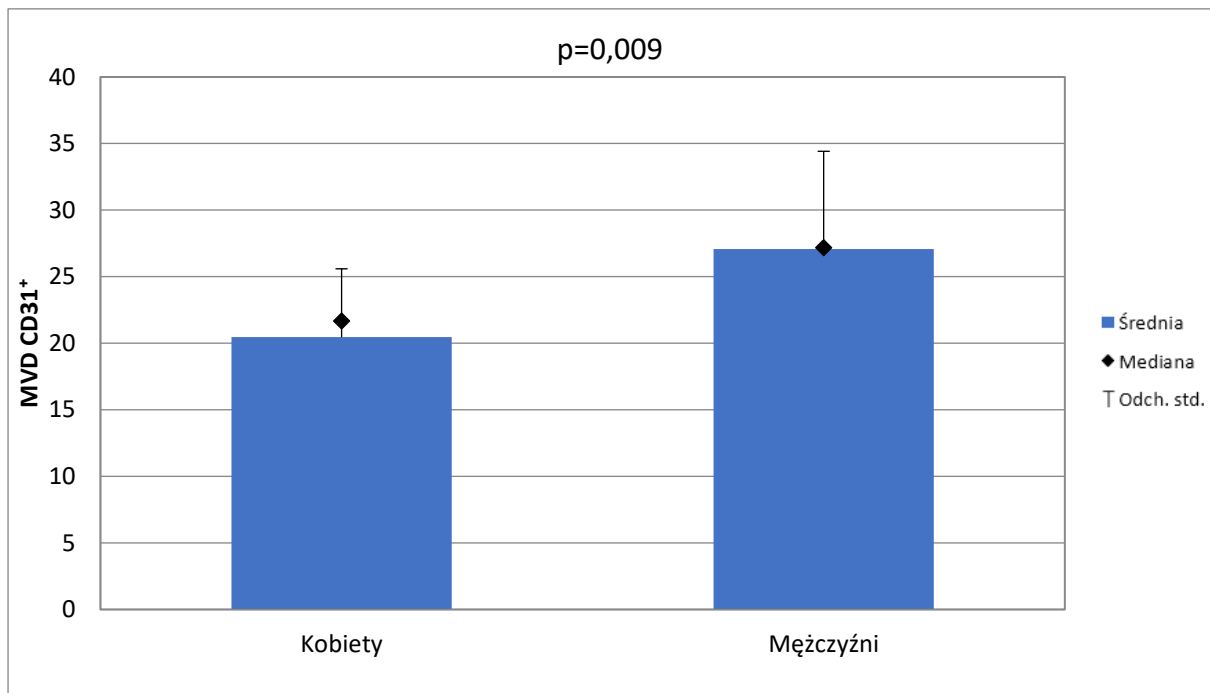
Ekspresja CD31 w komórkach śródbłonna naczyń w SCC (n=33)	
Średnia	24,9
Odchylenie standardowe	7,3
Wartość minimalna	12,3
Wartość maksymalna	44,0
Mediana	24,0

Średnia gęstość naczyń CD31<sup>+</sup> w podścielisku raka koleczystokomórkowego była wyższa w grupie mężczyzn, w porównaniu z grupą kobiet i wynosiła odpowiednio  $27,1 \pm 7,3$  u mężczyzn i  $20,5 \pm 5,1$  u kobiet ( $p=0,009$ ) (tab. 43, ryc. 62).

Tab. 43. Ekspresja CD31 w naczyniach krwionośnych u kobiet i mężczyzn, w grupie pacjentów z SCC.

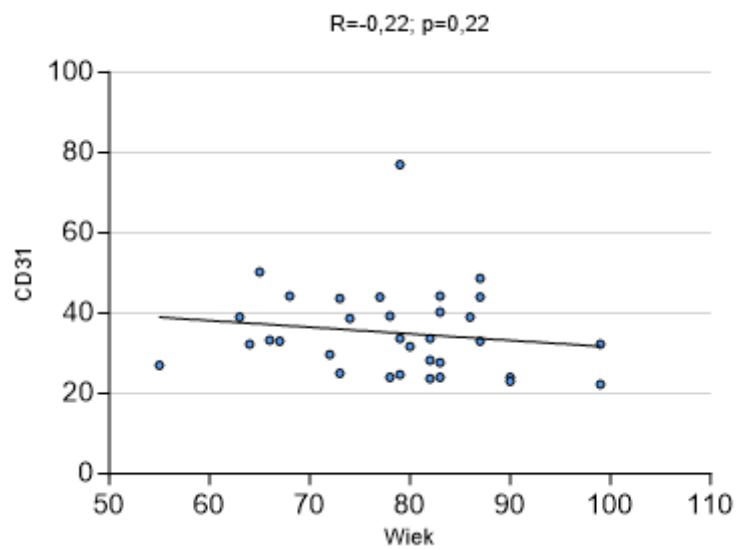
Płeć	N	Średnia $\pm$ SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	11	$20,5 \pm 5,1$	12,3	26,3	21,7
Mężczyźni	22	$27,1 \pm 7,3$	16,0	44,0	27,2

Ryc. 62. Wyższa ekspresja CD31 w naczyniach krwionośnych w grupie mężczyzn w porównaniu z grupą kobiet chorujących na raka kolczystokomórkowego skóry.

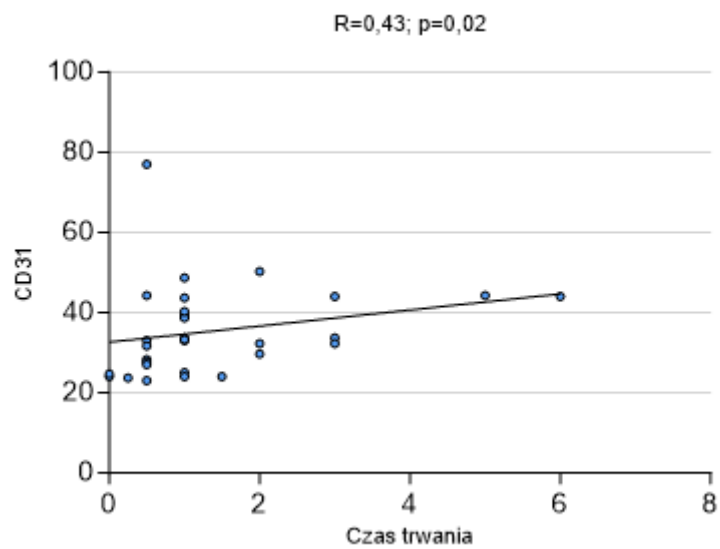


Nie stwierdzono różnic w gęstości naczyń CD31<sup>+</sup> w podścielisku SCC w zależności od ekspozycji na promieniowanie UV ( $p=0,84$ ), w zależności od wieku pacjentów ( $p=0,22$ ) (ryc. 63), a także w związku z głębokością nacieku ( $p=0,74$ ). Wykazano natomiast, że gęstość naczyń znakowanych CD31<sup>+</sup> jest skorelowana czasem trwania choroby ( $p= 0,02$ ) (ryc. 64).

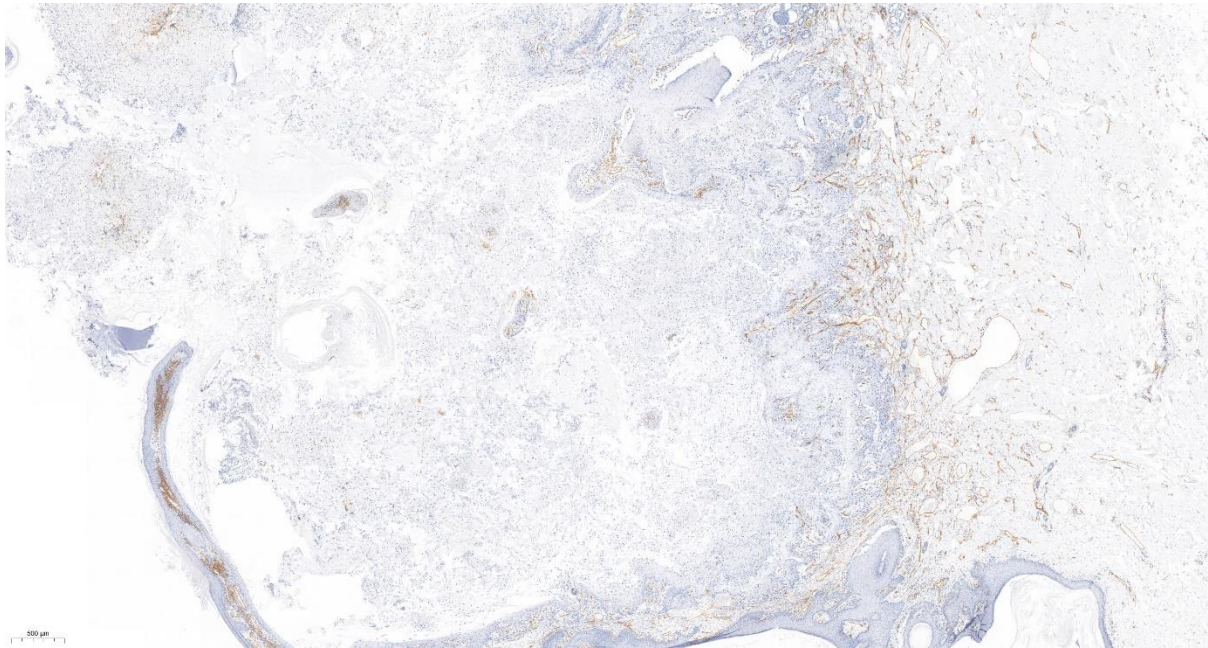
Ryc. 63. Brak zależności między ekspresją CD31 a wiekiem pacjentów, w grupie chorych z SCC.



Ryc. 64. Dodatnia korelacja między ekspresją CD31 a czasem trwania choroby, w grupie pacjentów z SCC.



Ryc. 65. Ekspresja CD31 w naczyniach krwionośnych w podścielisku SCC. Powiększenie x 40.



#### 4.4.7. Gęstość naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> w podścielisku raka kolczystokomórkowego.

Średnia gęstość naczyń krwionośnych CD34<sup>+</sup> wyniosła  $29,0 \pm 10,2$ . Zakres wartości mieścił się w granicach od 11,7 do 54,3 (tab.44).

Tab. 44. Ekspresja CD34 w komórkach śródbłonna naczyń w SCC.

Ekspresja CD34 w komórkach śródbłonna naczyń w SCC (n=31)	
Średnia	29,0
Odchylenie standardowe	10,2
Wartość minimalna	11,7
Wartość maksymalna	54,3
Mediana	26,7



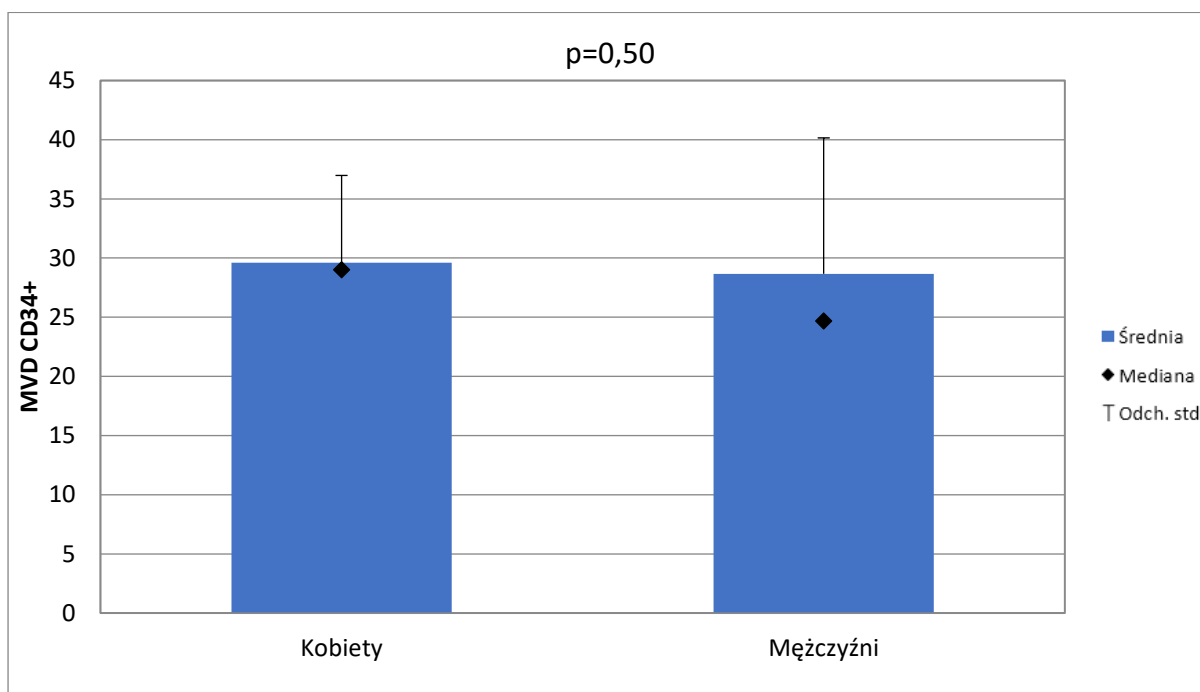
Nie wykazano, aby gęstość naczyń CD34<sup>+</sup> w podścielisku raka kolczystokomórkowego korelowała z parametrami klinicznymi takimi jak:

- Płeć (p= 0,50) (tab. 45, ryc. 66),
- Wiek pacjentów (p=0,71) (ryc.67),
- Ekspozycja na promieniowanie UV (p=0,11) (tab. 46),
- Czas trwania choroby (p=0,70) (ryc. 68),
- Głębokość nacieku (p= 0,34).

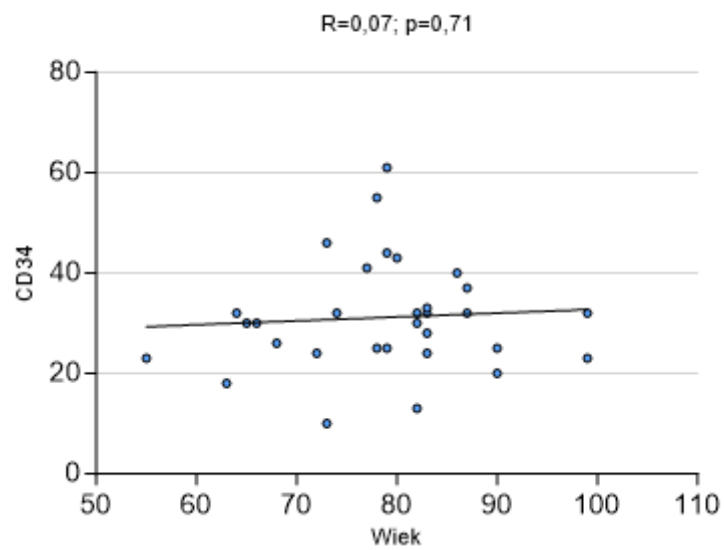
Tab. 45. Ekspresja CD34 w SCC u kobiet i mężczyzn.

Płeć	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Kobiety	10	29,6 ± 7,4	19,0	40,7	29,0
Mężczyźni	21	28,7 ± 11,5	11,7	54,3	24,7

Ryc. 66. Brak różnic w ekspresji CD34 w grupie mężczyzn i kobiet chorujących na SCC.



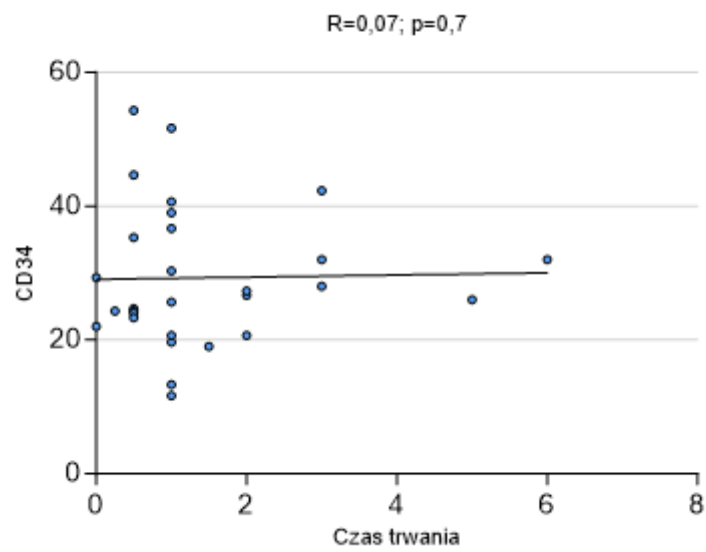
Ryc. 67. Brak zależności między ekspresją CD34 a wiekiem pacjentów w grupie chorych z SCC.



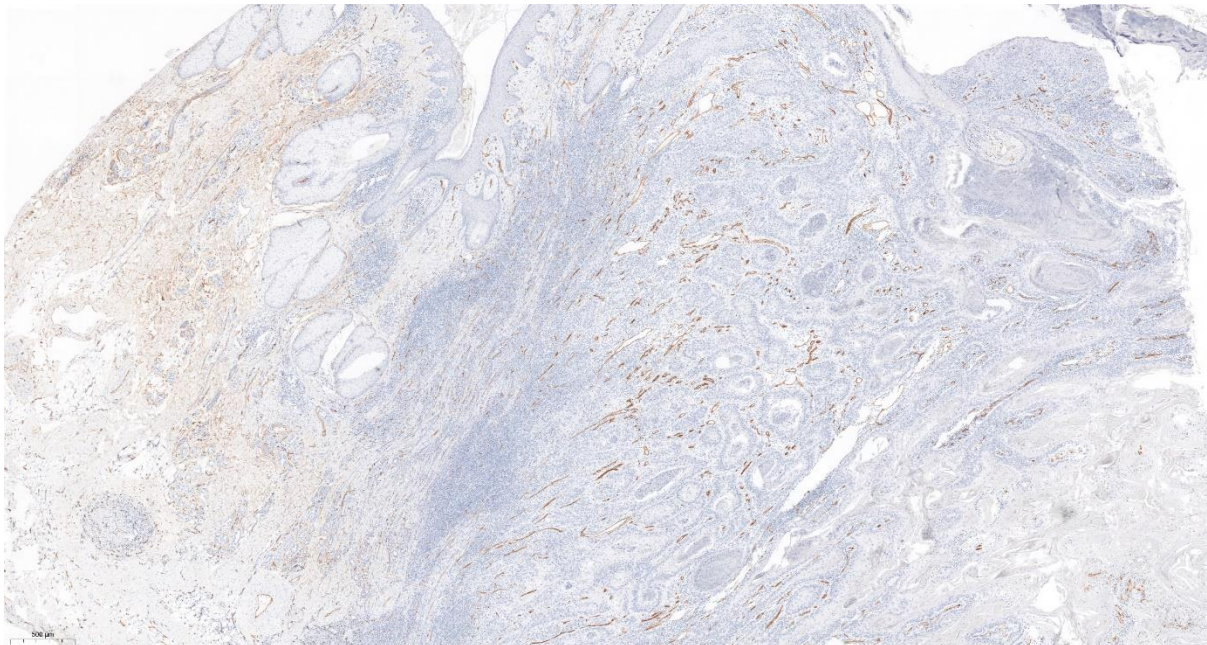
Tab. 46. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD34 na skórze odsłoniętej i zasłoniętej przed działaniem promieniowania UV.

	N	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum	Mediana
Skóra odsłonięta	28	30,0 ± 10,0	13,3	54,3	27,7
Skóra zasłonięta	1	11,7 ± 0,0	11,7	11,7	11,7

Ryc. 68. Brak zależności między ekspresją CD34 a czasem trwania choroby w grupie pacjentów z SCC.



Ryc. 69. Ekspresja CD34 w raku kolczystokomórkowym. Naczynia krwionośne widoczne zarówno w masie guza jak i w podścielisku. Powiększenie x 40.



## 4.5. Porównanie badanych grup

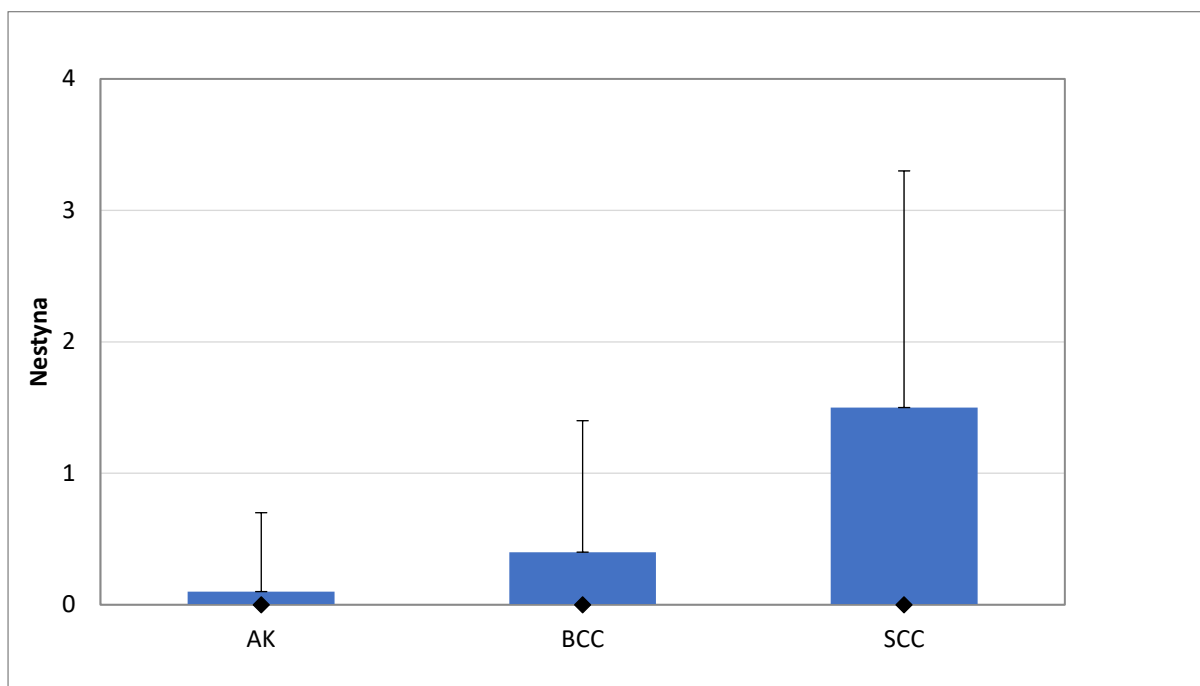
### 4.5.3. Porównanie ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnocomórkowym i kolczystokomórkowym.

W celu porównania ekspresji nestyny wśród pacjentów chorujących na AK, BCC i SCC z racji nierównoliczności grup, wykonano analizę Kruskala-Wallisa, która wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy porównywanymi grupami. Średnie wartości ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych wynosiły odpowiednio dla AK  $0,1 \pm 0,6$ , dla BCC  $0,4 \pm 1,0$  i dla SCC  $1,5 \pm 1,8$ . Średnia ekspresja nestyny była najwyższa wśród pacjentów z SCC. W teście Dunn stwierdzono, że oceniana ekspresja nestyny w rogowaceniu słonecznym była istotnie niższa w porównaniu do SCC ( $p < 0.0001$ ), nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy między AK i BCC ( $p > 0,05$ ). Dodatkowo średnia ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych była istotnie wyższa w przypadkach raka kolczystokomórkowego, w porównaniu z rakiem podstawnocomórkowym ( $p < 0.0001$ ).

Tab. 47. Porównanie ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych w AK, BCC i SCC.

	AK	BCC	SCC
N	39	47	32
Minimum	0,0	0,0	0,0
Maksimum	4,0	4,0	6,0
Mediana	0,0	0,0	0,0
Średnia	0,1	0,4	1,5
Odchylenie std.	0,6	1,0	1,8
Błąd std.	0,1	0,1	0,3

Ryc. 70. Porównanie ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych w AK, BCC i SCC.



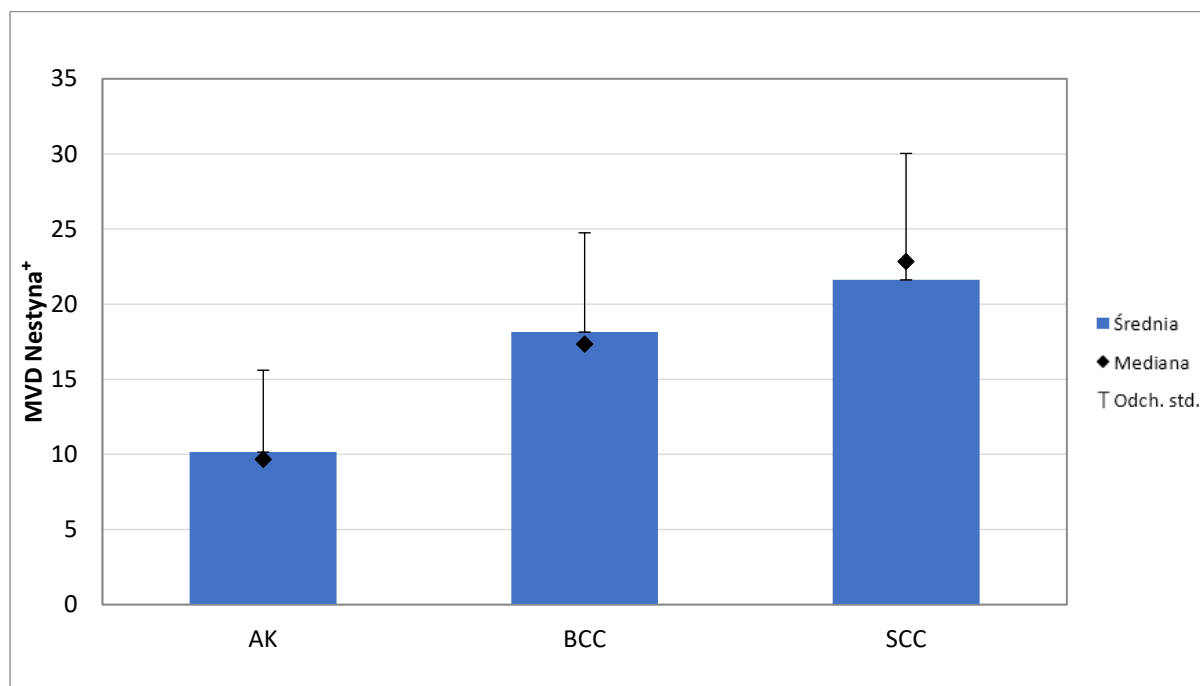
#### 4.5.4. Porównanie gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny w rogowaceniach słonecznych, raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym.

Analiza Kruskala-Wallisa wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy porównywanymi grupami. Wartości średnich gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny wynosiły odpowiednio dla AK  $10,2 \pm 5,5$ , dla BCC  $18,1 \pm 6,6$  i dla SCC  $21,6 \pm 8,4$ . Średnia gęstość naczyń była najwyższa wśród pacjentów z SCC. Oceniana średnia gęstość naczyń krwionośnych w rogowaceniach słonecznych była istotnie niższa w porównaniu do SCC i BCC ( $p < 0,0001$ ). Nie stwierdzono natomiast, żeby MVD w przypadku BCC i SCC różniły się istotnie od siebie ( $p > 0,05$ ).

Tab. 48. Porównanie ekspresji nestyny w naczyniach krwionośnych w AK, BCC i SCC.

	AK	BCC	SCC
N	39	47	32
Minimum	2,7	6,7	5,0
Maksimum	26,7	32,3	44,0
Mediana	9,7	17,3	22,8
Średnia	10,2	18,1	21,6
Odchylenie std	5,5	6,6	8,4
Błąd std	0,9	1,0	1,5

Ryc. 71. Porównanie ekspresji nestyny w naczyniach krwionośnych w AK, BCC i SCC.



#### 4.5.5. Porównanie gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 w rogowaczeniu słonecznym, raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym.

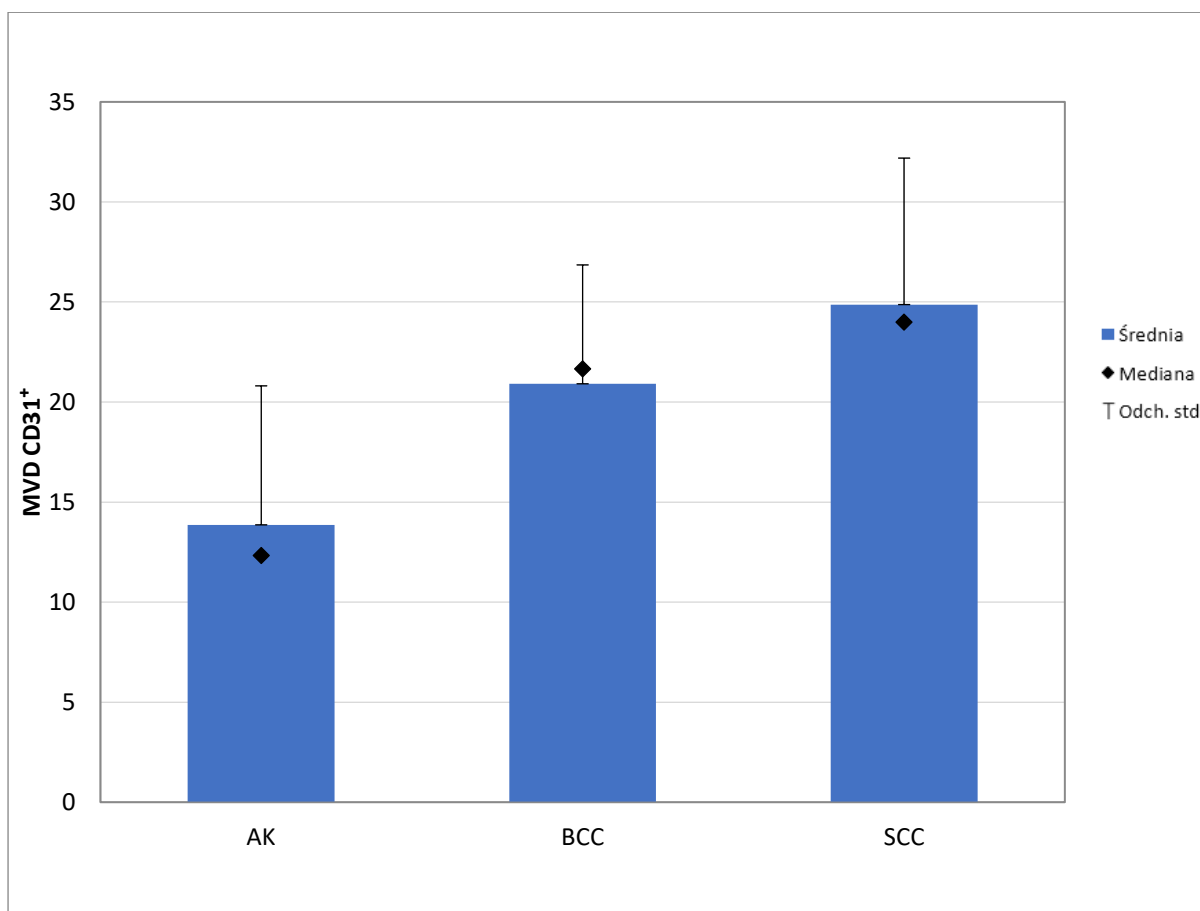
Analiza Kruskala-Wallisa wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy porównywanymi grupami. Wartości średnich gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 wynosiły odpowiednio dla AK  $13,9 \pm 6,9$ , dla BCC  $20,9 \pm 5,9$  i dla SCC  $24,9 \pm 7,3$ . Średnia gęstość naczyń była najwyższa wśród pacjentów z SCC. Oceniana średnia

gęstość naczyń krwionośnych w rogowaceniu słonecznym była istotnie niższa w porównaniu do SCC i BCC ( $p < 0.0001$ ). Nie stwierdzono natomiast, żeby MVD w przypadku BCC i SCC różniły się istotnie od siebie ( $p > 0,05$ ).

Tab. 49. Porównanie ekspresji CD31 w naczyniach krwionośnych w AK, BCC i SCC.

	AK	BCC	SCC
N	39	47	33
Minimum	5,0	10,0	12,3
Maksimum	34,7	36,3	44,0
Mediana	12,3	21,7	24,0
Średnia	13,9	20,9	24,9
Odchylenie std	6,9	5,9	7,3
Błąd std	1,1	0,9	1,3

Ryc. 72. Porównanie ekspresji CD31 w naczyniach krwionośnych w AK, BCC i SCC.



#### 4.5.6. Porównanie gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD34 w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnocomórkowym i kolczystocomórkowym.

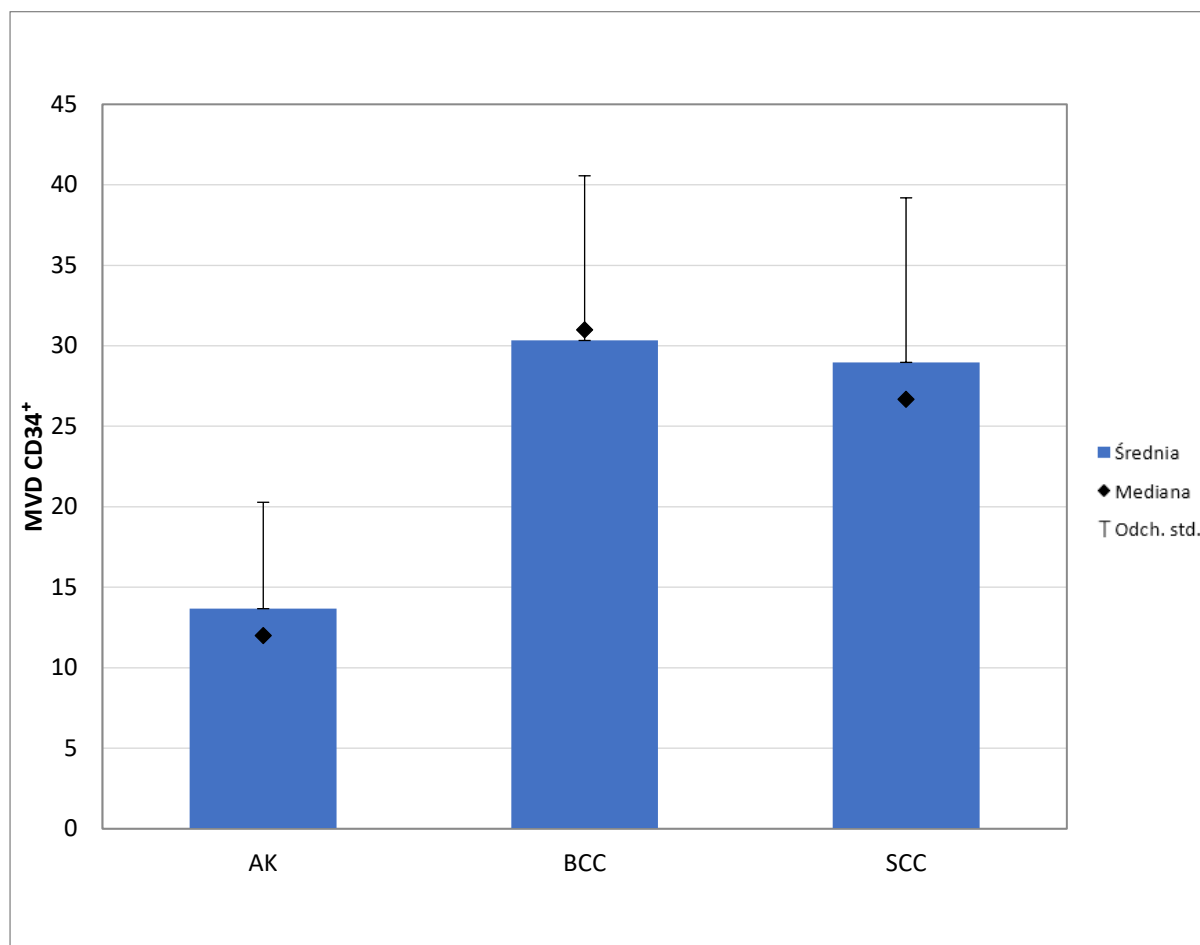
Analiza Kruskala-Wallisa wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy porównywanymi grupami. Wartości średnich gęstości naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD34 wynosiły odpowiednio dla AK  $13,7 \pm 6,6$ , dla BCC  $30,3 \pm 10,2$  i dla SCC  $29,0 \pm 10,2$ . Średnia gęstość naczyń była najwyższa wśród pacjentów z SCC. Oceniana średnia gęstość naczyń krwionośnych w rogowaceniu słonecznym była istotnie niższa w porównaniu do SCC i BCC ( $p < 0.0001$ ). Nie stwierdzono natomiast, żeby MVD w przypadku BCC i SCC różniły się istotnie od siebie ( $p > 0,05$ ).

Tab. 50. Porównanie ekspresji CD34 w naczyniach krwionośnych w AK, BCC i SCC.

	AK	BCC	SCC
N	39	47	31
Minimum	5,3	12,7	11,7
Maksimum	44,3	54,7	54,3
Mediana	12,0	31,0	26,7
Średnia	13,7	30,3	29,0
Odchylenie std	6,6	10,2	10,2
Błąd std	1,1	1,5	1,8



Ryc. 73. Porównanie ekspresji CD34 w naczyniach krwionośnych w AK, BCC i SCC.



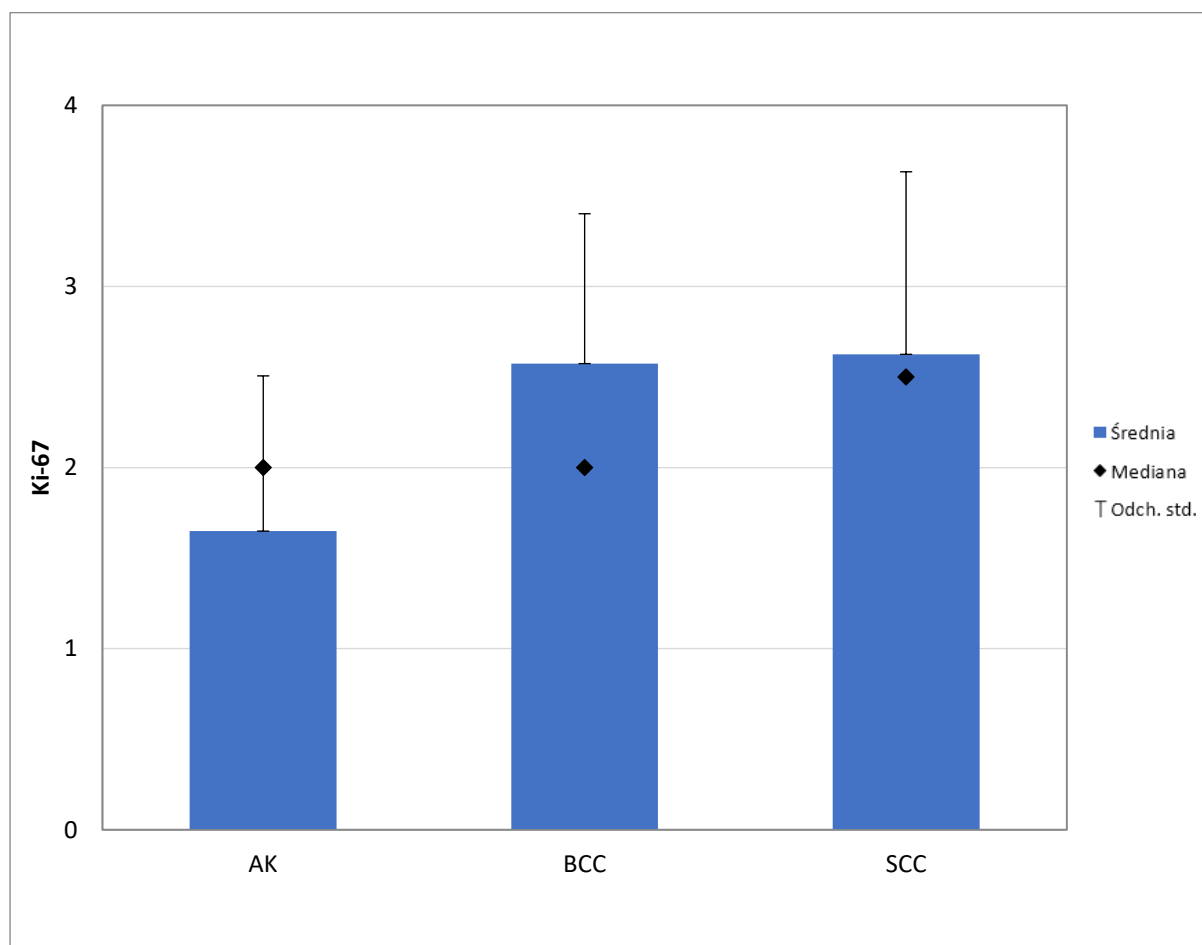
#### 4.3.5. Porównanie ekspresji Ki-67 w rógowaceniu słonecznym, raku podstawnocomórkowym i kolczystocomórkowym.

Analiza Kruskala-Wallisa wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy porównywanymi grupami. Wartości średnich ekspresji Ki-67 wynosiły odpowiednio dla AK  $1,7 \pm 0,9$ , dla BCC  $2,6 \pm 0,8$  i dla SCC  $2,6 \pm 1,0$ . Średnia ekspresja Ki-67 była najwyższa wśród pacjentów z SCC. Oceniana średnia ekspresja antygenu Ki-67 w rógowaceniu słonecznym była istotnie niższa w porównaniu do SCC i BCC ( $p < 0.0001$ ). Nie stwierdzono natomiast, żeby ekspresja Ki-67 w przypadku BCC i SCC różniły się istotnie między sobą ( $p > 0,05$ ).

Tab. 51. Porównanie ekspresji antygenu Ki-67 w AK, BCC i SCC.

	AK	BCC	SCC
N	37	47	32
Minimum	0,0	1,0	1,0
Maksimum	4,0	4,0	4,0
Mediana	2,0	2,0	2,5
Średnia	1,6	2,6	2,6
Odchylenie std	0,9	0,8	1,0
Błąd std	0,1	0,1	0,2

Ryc. 74. Porównanie ekspresji antygenu Ki-67 w AK, BCC i SCC.



#### 4.3.6. Analiza zależności między nestyną, CD31, CD34 i Ki-67 w rogowaceniu słonecznym.

W celu sprawdzenia czy między zmiennymi zależnymi występują istotne statystycznie związki i na czym polegają, wykonano analizę korelacji  $r$  Pearsona. Wyniki zaprezentowano w tabeli 52.

Tab. 52. Związek CD31, Ki-67, Nestyny i CD 34 w grupie osób z AK.

Zmienna		Nestyna	CD 34	CD 31
Ki-67	$r$ Pearsona	0,10	0,13	0,11
	istotność	0,580	0,437	0,531
CD 34	$r$ Pearsona	<b>0,69</b>	-	<b>0,41</b>
	istotność	<b>&lt;0,001</b>	-	<b>0,010</b>
CD 31	$r$ Pearsona	<b>0,46</b>	<b>0,41</b>	-
	istotność	<b>0,004</b>	<b>0,010</b>	-

W grupie pacjentów chorujących na rogowacenie słoneczne nestyna okazała się być dodatnio i silnie związana z CD34, a także dodatnio i umiarkowanie silnie związana z CD31. Oznacza to, że wraz ze wzrostem ekspresji nestyny, ekspresja CD31 i CD34 także wzrastała. Następnym istotnym statystycznie, dodatnim i umiarkowanie silnym związkiem, był związek CD31 i CD34, oznacza to, że wraz ze wzrostem ekspresji CD31 ekspresja CD34 także wzrastała. Nie stwierdzono natomiast związku między ekspresją nestyny, CD31 i CD34 a ekspresją antygenu Ki-67.

#### 4.3.7. Analiza zależności między nestyną, CD31, CD34 i Ki-67 w raku podstawnokomórkowym.

W celu sprawdzenia czy między zmiennymi zależnymi występują istotne statystycznie związki i na czym polegają, wykonano analizę korelacji  $r$  Pearsona. Wyniki zaprezentowano w tabeli 53.

Tab. 53. Związek CD31, Ki-67, nestyny i CD34 w grupie osób z BCC.

Zmienna		Nestyna	CD 34	CD 31
Ki-67	$r$ Pearsona	0,16	0,03	0,04
	istotność	0,271	0,844	0,772
CD 34	$r$ Pearsona	<b>0,71</b>	-	<b>0,91</b>
	istotność	<b>&lt;0,001</b>	-	<b>&lt;0,001</b>
CD 31	$r$ Pearsona	<b>0,69</b>	<b>0,91</b>	-
	istotność	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	-

W grupie osób z rozpoznaniem BCC średnia gęstość naczyń wykazujących ekspresję nestyny okazała się być dodatnio i silnie związana z ekspresją CD34, oznacza to, że wraz ze wzrostem ekspresji CD34, ekspresja nestyny także wzrastała. Kolejnym istotnym statystycznie związkiem był dodatni i umiarkowanie silny związek nestyny z CD31, oznacza to, że wraz ze wzrostem ekspresji nestyny, ekspresja CD31 także wzrastała. Następnym istotnym statystycznie dodatnim i silnym związkiem w grupie osób z BCC był związek CD31 z CD34. Oznacza to, że wraz ze wzrostem ekspresji CD31, ekspresja CD34 także wzrastała. Nie stwierdzono natomiast związku między ekspresją nestyny, CD31 i CD34 a ekspresją antygenu Ki-67.

#### 4.3.8. Analiza zależności między nestyną, CD31, CD34 i Ki-67 w raku kolczystokomórkowym.

W celu sprawdzenia czy między zmiennymi zależnymi występują istotne statystycznie związki i na czym polegają, wykonano analizę korelacji  $r$  Pearsona. Wyniki zaprezentowano w tabeli 54.

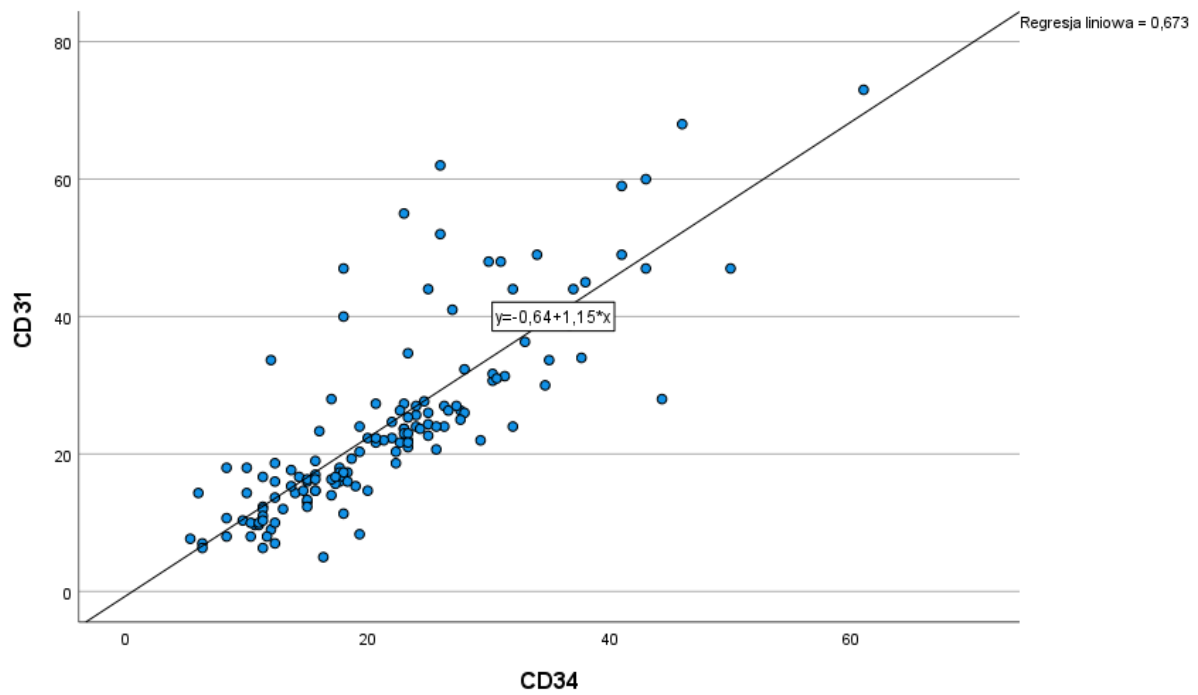
Tab. 54. Związek CD31, Ki-67, nestyny i CD34 w grupie osób z SCC.

Zmienna		Nestyna	CD 34	CD 31
Ki-67	r Pearsona	-0,24	-0,23	-0,30
	istotność	0,177	0,196	0,095
CD 34	r Pearsona	<b>0,82</b>	-	<b>0,86</b>
	istotność	<b>&lt;0,001</b>	-	<b>&lt;0,001</b>
CD 31	r Pearsona	<b>0,78</b>	<b>0,86</b>	-
	istotność	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	-

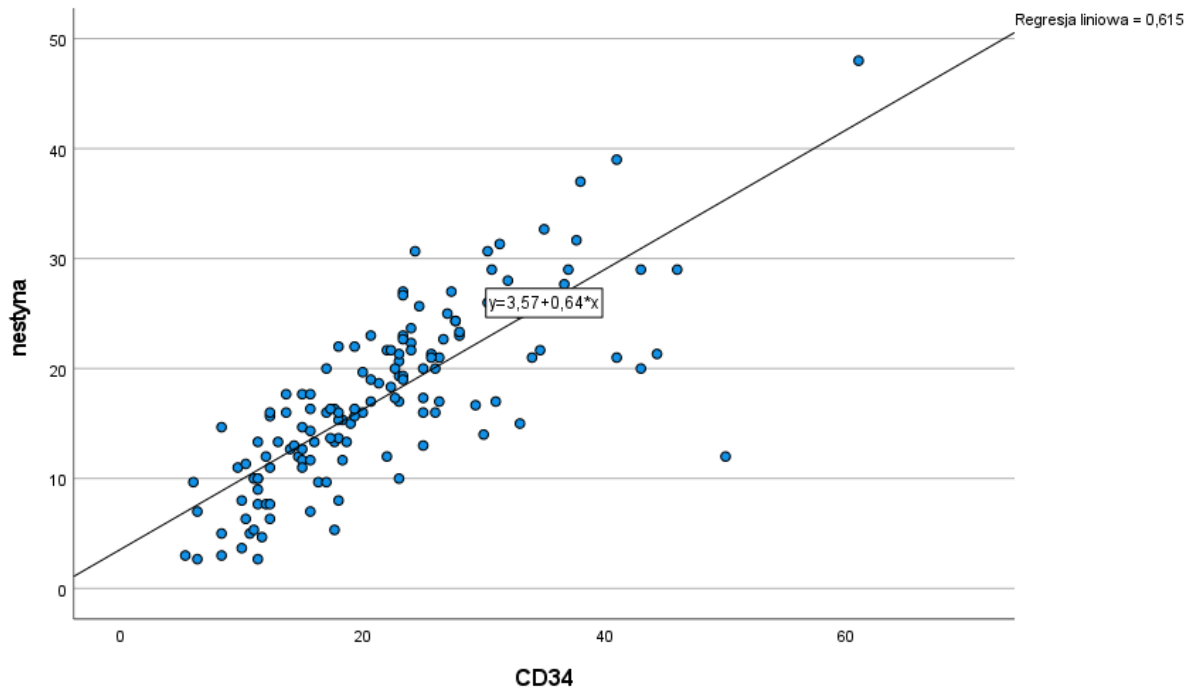
Analiza korelacji  $r$  Pearsona wykazała istotnie statystycznie związki. W grupie osób z SCC nestyna okazała się być dodatnio i silnie związana z CD31 i CD34. Oznacza to, że wraz ze wzrostem ekspresji nestyny ekspresja CD31 i CD34 także wzrastała. W tej grupie CD31 okazało się być dodatnio i silnie związane z CD34. Oznacza to, że wraz ze wzrostem ekspresji CD31, ekspresja CD34 także wzrastała. Nie stwierdzono natomiast związku między ekspresją nestyny, CD31 i CD34 a ekspresją antygenu Ki-67.

We wszystkich badanych grupach stwierdzono zależności między gęstością naczyń wykazujących ekspresję nestyny, CD31 i CD34. Wyniki zaprezentowano na rycinach 75-80.

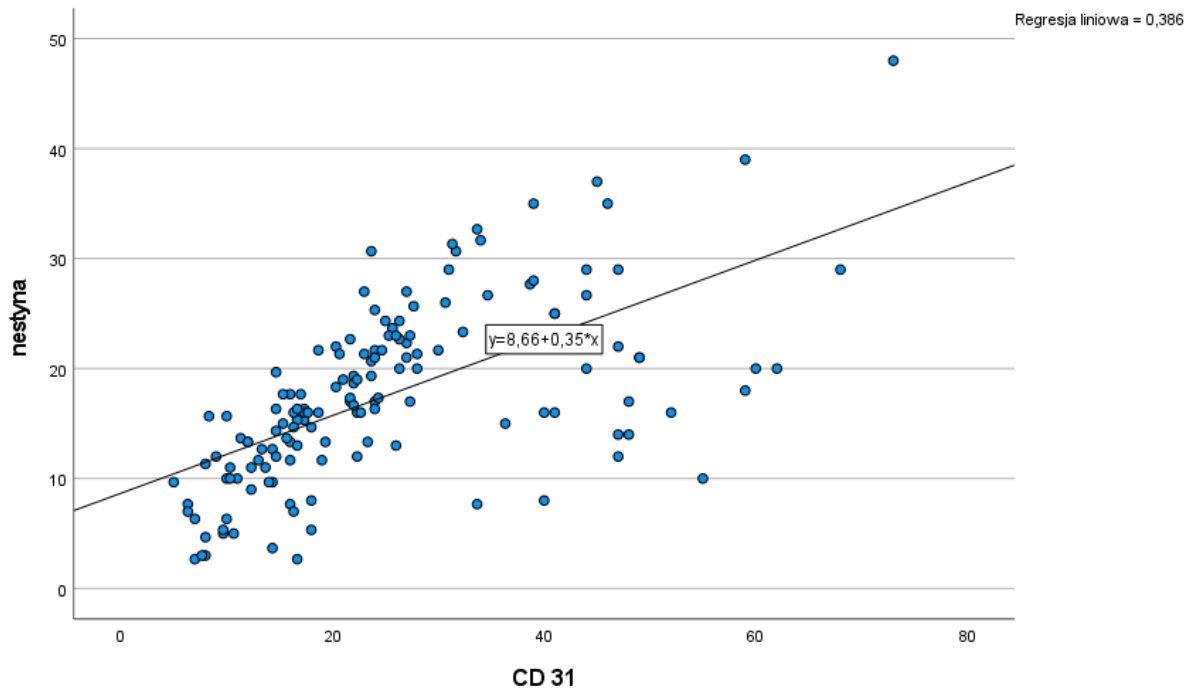
Ryc.75. Wykres rozrzutu przedstawiający związek CD31 i CD34 w AK, BCC i SCC.



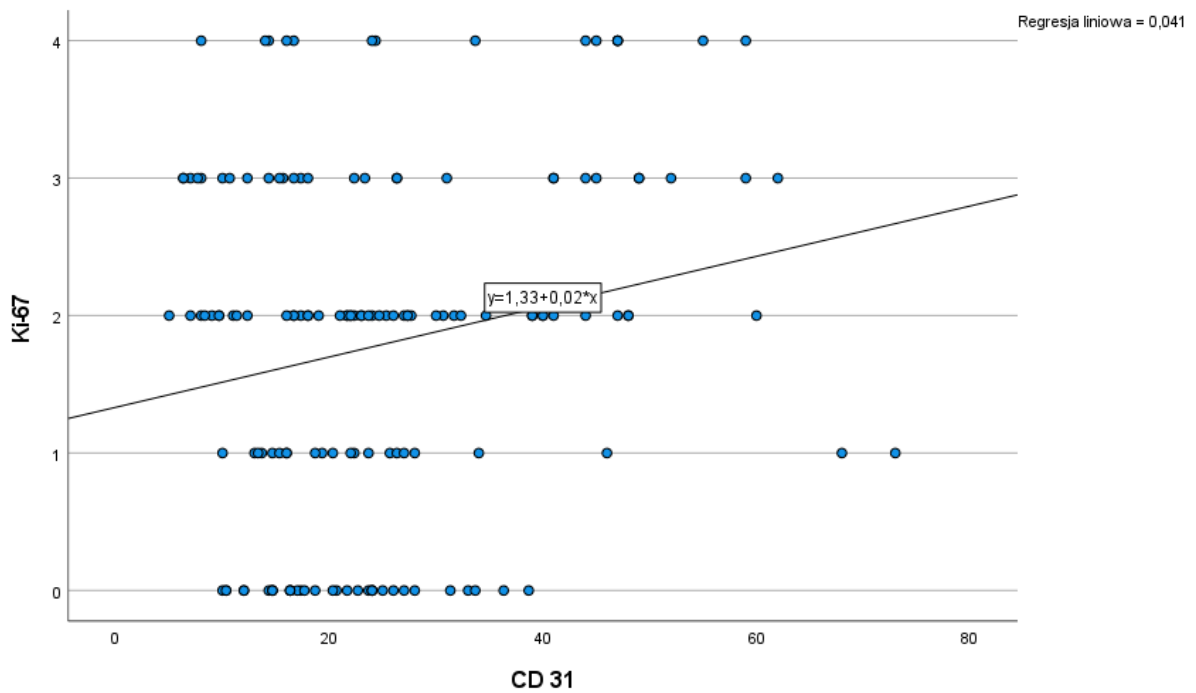
Ryc. 76. Wykres rozrzutu przedstawiający związek nestyny i CD34 w AK, BCC i SCC.



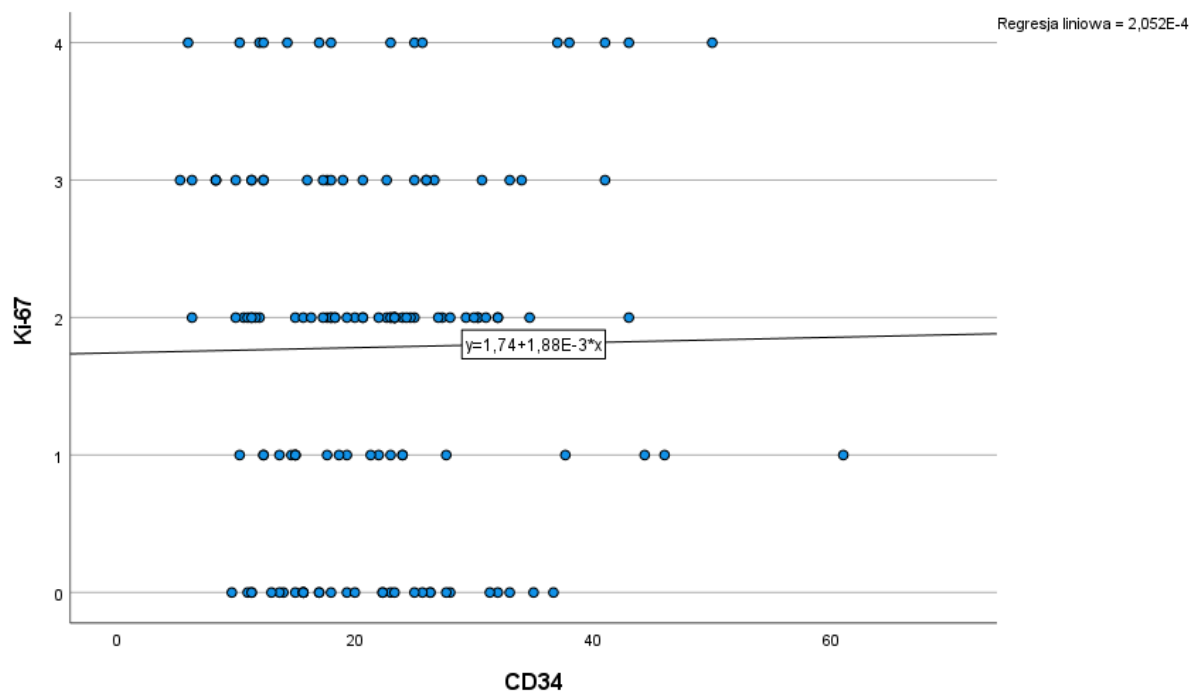
Ryc. 77. Wykres rozrzutu przedstawiający związek nestyny i CD 31 w AK, BCC i SCC.



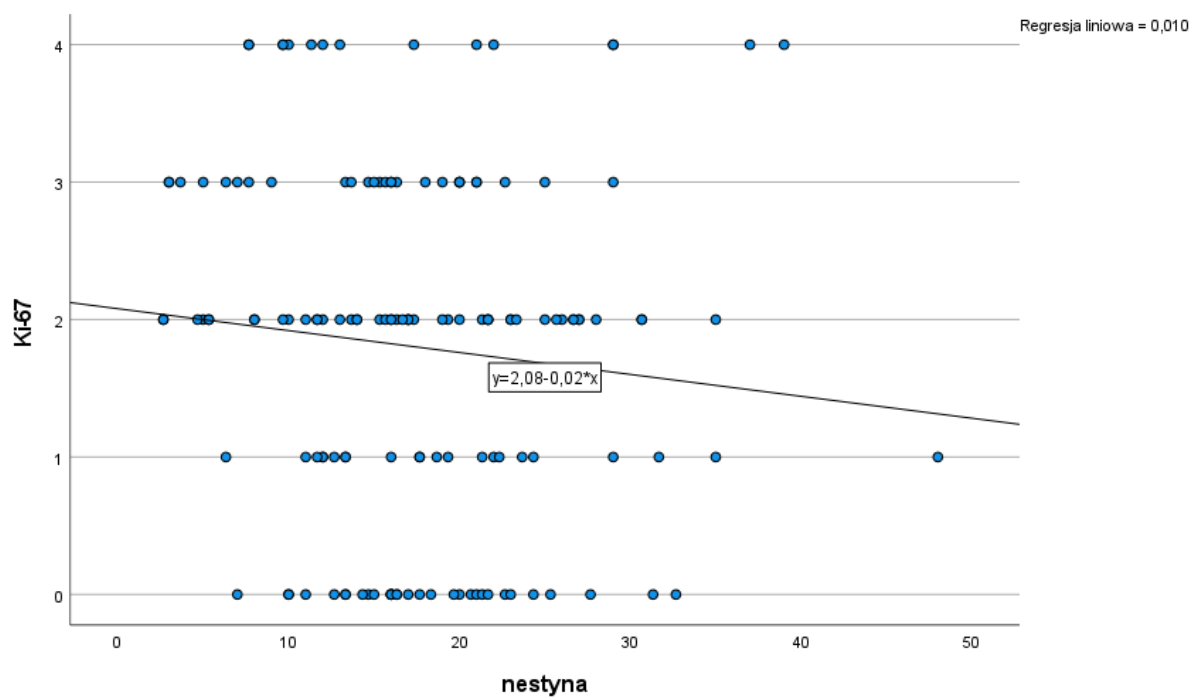
Ryc. 78. Wykres rozrzutu przedstawiający związek Ki-67 i CD 31 w AK, BCC i SCC.



Ryc. 79. Wykres rozrzutu przedstawiający związek Ki-67 i CD 34 w AK, BCC i SCC.

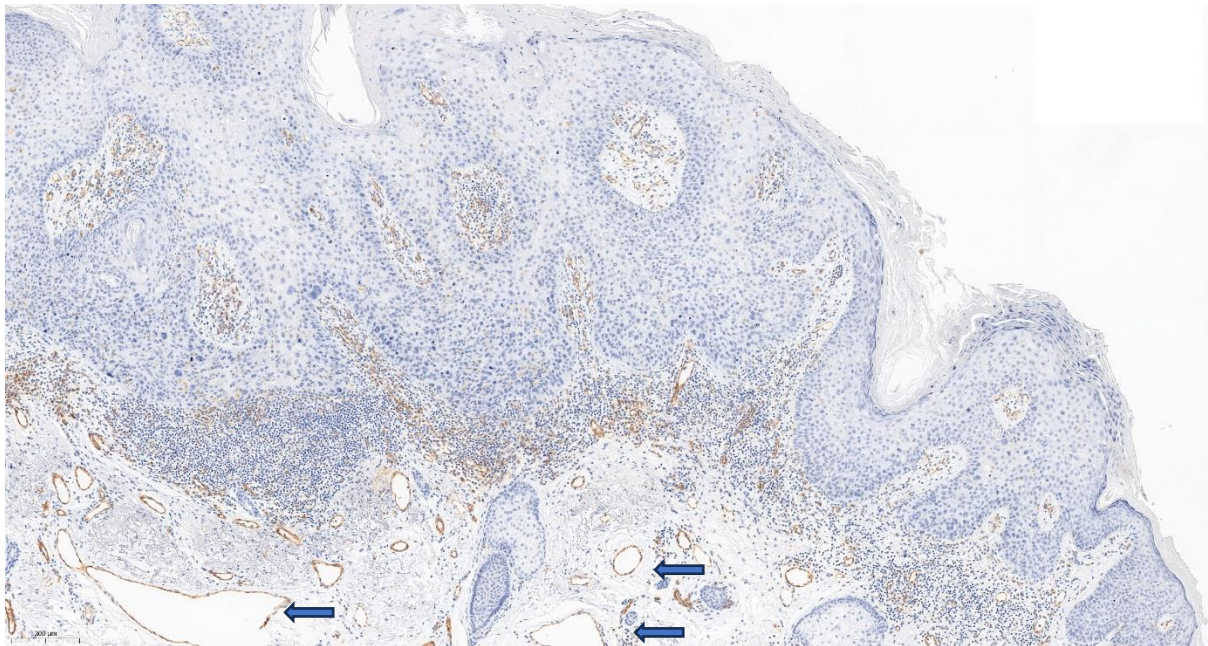


Ryc. 80. Wykres rozrzutu przedstawiający związek Ki-67 i nestyna w AK, BCC i SCC.



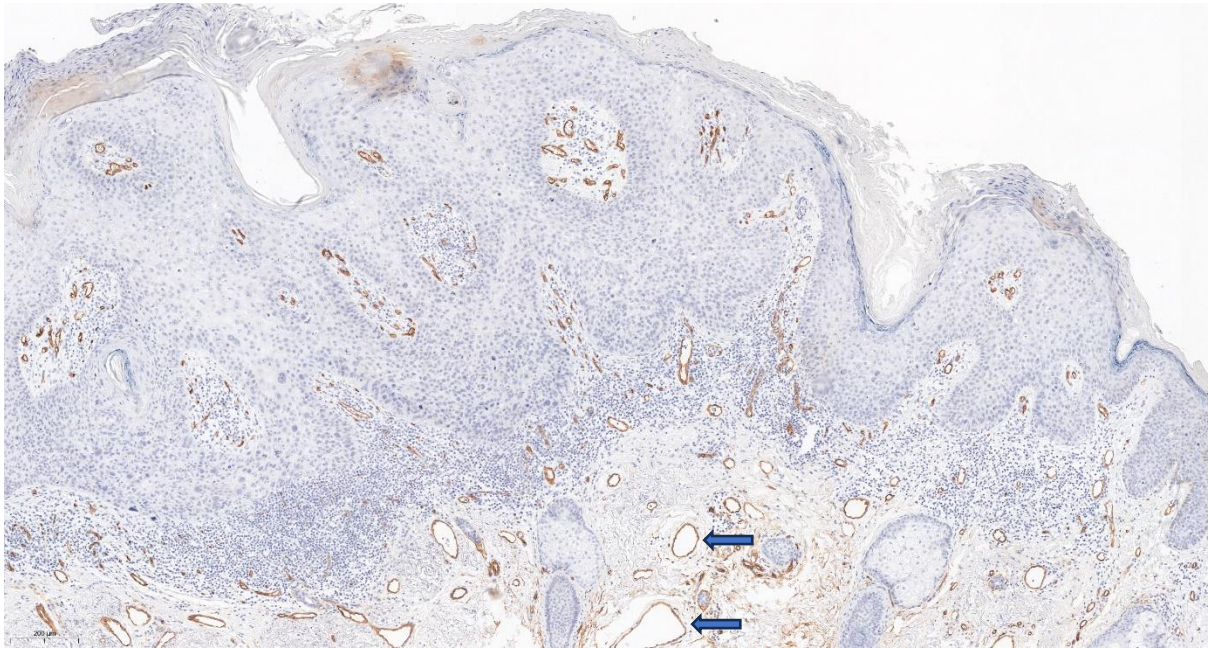
Ponadto podczas oceny preparatów zauważyłam, że nestyna ulegała ekspresji głównie w drobnych naczyniach krwionośnych, podczas gdy CD31 i CD34 ulegały ekspresji zarówno w drobnych jak i większych naczyniach. Średnia gęstość naczyń wykazujących ekspresję nestyny była niższa w stosunku do MVD CD31<sup>+</sup> i MVD CD34<sup>+</sup>. Powyższe obserwacje zaprezentowano na rycinach 81-83.

Ryc. 81. Ekspresja CD31 w naczyniach krwionośnych na przykładzie tego samego przypadku SCC. Powiększenie x 100.

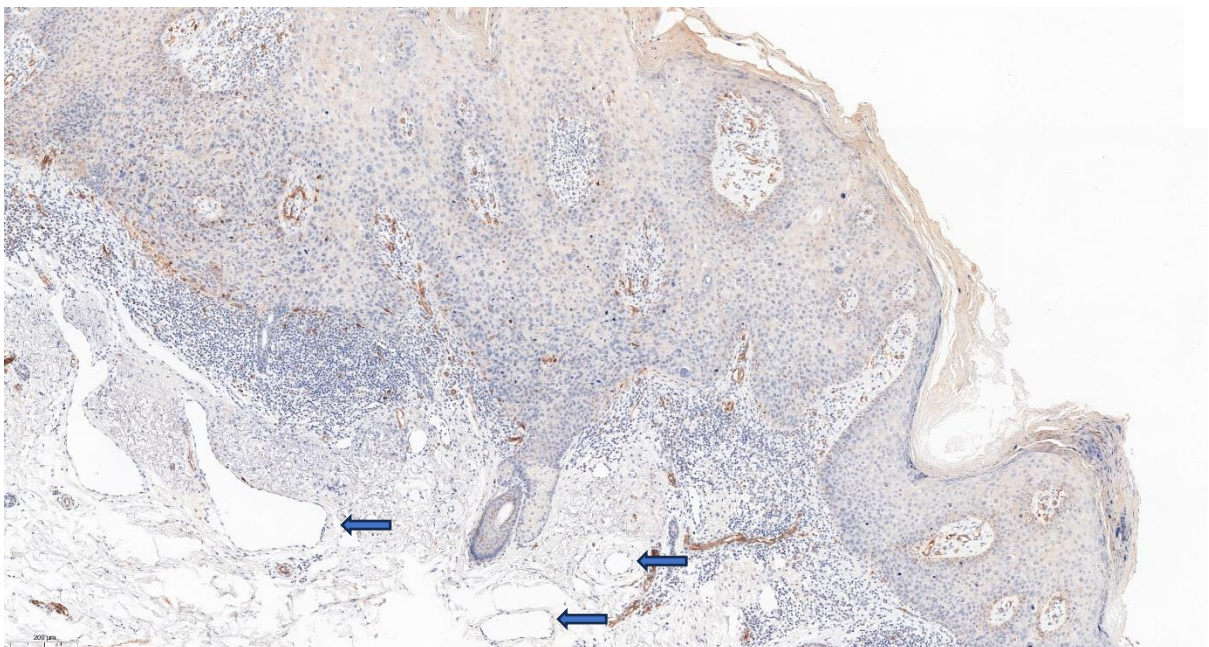




Ryc. 82. Ekspresja CD34 w naczyniach krwionośnych na przykładzie tego samego przypadku SCC. Powiększenie x 100.



Ryc. 83. Ekspresja nestyny w naczyniach krwionośnych na przykładzie tego samego przypadku SCC- brak ekspresji w dużych naczyniach krwionośnych. Powiększenie x 100.



## 5. Omówienie

Nieczerniakowe nowotwory skóry (NMSC) to grupa nowotworów skóry, w której dominują rak podstawnokomórkowy (BCC) i kolczystokomórkowy (SCC). Na całym świecie obserwuje się stały wzrost częstości występowania tych nowotworów, co stanowi istotny problem socjoekonomiczny. Wpływ na to ma zwiększona ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe, wynikająca m.in. z rekreacyjnego opalania, korzystania z solarium, częstszych i dalszych podróży, a także ze zmniejszenia warstwy ozonowej. Rośnie także średnia długość życia oraz liczba pacjentów poddanych leczeniu immunosupresyjnemu [17]. Ryzyko tworzenia przerzutów w przypadku BCC i SCC jest niskie, charakteryzują się też niską śmiertelnością, jednak wykazują miejscową złośliwość. Szerzą się miejscowo, doprowadzając do destrukcji okolicznych tkanek prowadząc do powstawania defektów estetycznych i obniżenia jakości życia. Dobór najodpowiedniejszej metody leczenia oparty o ocenę średnicy zmiany, jej lokalizację i naciekanie okolicznych struktur oraz ocenę ryzyka wznowy miejscowej może być niewystarczający, a uzupełnienie o diagnostykę immunohistochemiczną może być pomocne w podjęciu decyzji terapeutycznych.

Nestyna jest białkiem należącym do VI typu filamentów pośrednich, bierze udział w organogenezie i metabolizmie komórkowym, a także uczestniczy w organizacji cytoszkieletu [89]. Ekspresję nestyny stwierdzono pierwotnie w neuroepitelialnych komórkach macierzystych, a dalsze badania wykazały, że nestyna ulega ekspresji także w innych tkankach. Stwierdzono także, że odgrywa istotną rolę w patogenezie niektórych nowotworów oraz w procesie angiogenezy. Obecnie wiadomo, że nestyna bierze także udział w różnych procesach komórkowych, m.in. w migracji komórek, proliferacji czy apoptozie [90, 91].

Pierwsze badania nad ekspresją nestyny w nowotworach skóry prowadzone były już w 1994 roku i dotyczyły czerniaka. Zauważono wówczas, że nestyna ulega ekspresji w rozrostach melanocytarnych, natomiast nie stwierdza się jej w niezmiennych melanocytach [144]. Powyższe spostrzeżenia potwierdziły badania Brychtowej i wsp., w których oceniono 139 próbek czerniaka i porównano ekspresję nestyny w czerniakach guzkowych, czerniakach szerzących się powierzchownie, znamionach dysplastycznych oraz prawidłowych znamionach śródskórych oraz skórno- naskórkowych. Wykorzystując analizę immunohistochemiczną wykazano zwiększoną ekspresję nestyny w czerniakach, w stosunku do łagodnych znamion melanocytowych, a jej poziom korelował ze stopniem zaawansowania choroby. Zauważono także ekspresję nestyny w komórkach śródbłonna naczyń, zlokalizowanych w sąsiedztwie

zaawansowanych czerniaków [145]. Dalsze badania pokazały także zwiększoną ekspresję nestyny w komórkach zlokalizowanych na obwodzie czerniaka, odpowiedzialnych za ekspansję nowotworu, a także w śródbłonku naczyń na obwodzie zmiany [146]. Zwiększoną ekspresję nestyny wykazano także w przerzutach odległych czerniaka [147]. Dowiedziono także, że zwiększona liczba melanocytów wykazujących ekspresję nestyny w komórkach krwi obwodowej u pacjentów chorujących na czerniaka wiąże się ze złym rokowaniem [148]. Akiyama i wsp. wykorzystali strategię wyciszania genów, aby sprawdzić potencjalną skuteczność terapii ukierunkowanych na nestynę w leczeniu czerniaka. Stwierdzili, że zmniejszenie ekspresji nestyny w komórkach czerniaka zmniejsza wzrost komórek, ich migrację, inwazję *in vitro* oraz wzrost guza i zdolność tworzenia przerzutów *in vivo*. Nestyna wydaje się być zatem obiecującym celem terapeutycznym w leczeniu czerniaka złośliwego [149].

Niewiele jest natomiast prac dotyczących roli nestyny w rakach skóry i rogowaceniu słonecznym, dlatego stało się to dla mnie przesłanką do przeprowadzenia badań dotyczących tego zagadnienia. W związku z powyższym celem mojej pracy była ocena ekspresji nestyny w raku kolczystokomórkowym, podstawnokomórkowym oraz w raku rógowaceni słonecznym i skorelowanie otrzymanych wyników z parametrami klinicznymi, a także ocena angiogenezy w tych nowotworach.

Misago i wsp. oceniali ekspresję nestyny w komórkach podścieliska guzów: *trichoblastoma* (TB) oraz raka podstawnokomórkowego (BCC). Ekspresję nestyny w komórkach podścieliska obserwowano we wszystkich guzach *trichoblastoma* oraz w żadnym z ocenianych BCC. Zauważono jednak, że śródbłonek naczyń w obrębie podścieliska guzów wykazywał ekspresję nestyny w obu rodzajach nowotworów. Wysłunięto tezę, że nestyna może być markerem stosowanym w diagnostyce różnicowej tych nowotworów, a ekspresja nestyny w komórkach śródbłonka naczyniowego może wskazywać na jej rolę w neoangiogenezie [150].

Podobne dane otrzymali Abbas i wsp. którzy zbadali ekspresję nestyny w 20 próbkach BCC i 20 próbkach SCC, a także w 11 próbkach raka Merkla. Wykonano badania immunohistochemiczne skrawków parafinowych z wykorzystaniem przeciwciała przeciw nestynie w rozcieńczeniu 1:100 (MAB; Millipore, MA, USA). Jako wynik dodatni przyjęto jedynie barwienie cytoplazmatyczne. Wszystkie przypadki BCC były negatywne wobec nestyny. Autorzy uważają, że nestyna nie odgrywa roli w patogenezie raka

podstawnokomórkowego skóry. W raku kolczystokomórkowym ekspresja nestyny była obserwowana w 9 z 20 przypadków (45%). Według autorów takie wyniki świadczą o procesie odróżnicowywania w kierunku stanu komórek macierzystych, niezaangażowanych w proces terminalnej keratynizacji. W przypadkach raka Merkla nie wykazano ekspresji nestyny [151].

Sabet i wsp. porównywali ekspresję nestyny w 12 przypadkach czerniaka, 31 próbkach SCC oraz 55 rakach podstawnokomórkowych. Wszystkie badane próbki wykazywały ekspresję nestyny o zmiennym nasileniu. W badanych rakach podstawnokomórkowych w 30 przypadkach (55%) obserwowano słabą ekspresję, umiarkowaną w 24 przypadkach (44%) oraz silną w 1 przypadku (1%). W rakach kolczystokomórkowych słabą ekspresję wykazywało 12 przypadków (39%), umiarkowaną 16 przypadków (52%) oraz silną 3 przypadki (9%). W badanych czerniakach słaba ekspresja została stwierdzona w 2 przypadkach (17%), umiarkowana w 6 przypadkach (50%) i silna w 4 przypadkach (33%). W przypadkach SCC autorzy zauważyli, że w nowotworach o niskim stopniu zróżnicowania ekspresja nestyny była wyższa. W przypadkach BCC nie znaleziono związku ekspresji nestyny z cechami klinicznymi czy typem histologicznym zmiany. Ekspresja nestyny była wyższa w czerniakach, w porównaniu z niemelanocytowymi nowotworami skóry [152].

W kolejnym badaniu, przeprowadzonym przez Sellheyera i wsp. [153] porównywano ekspresję nestyny w 25 przypadkach BCC, 7 guzach *trichoblastoma* oraz 11 *trichoepithelioma*. W odróżnieniu od wcześniejszych badań autorzy zastosowali trzy przeciwciała przeciw nestynie w trzech różnych rozcieńczeniach (1:50, 1:100 i 1:200). Użyto przeciwciał klonu 10c2 Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany; klonu 10c2 Chemicon International, Temecula, CA, USA oraz przeciwciała poliklonalnego Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden. Zauważono, że przeciwciała poliklonalne Atlas i przeciwciała monoklonalne z Chemiconu były lepiej widoczne w porównaniu z przeciwciałem z Santa Cruz Biotechnology. Ekspresja nestyny wahała się w zależności od rozcieńczenia, ale była widoczna we wszystkich przypadkach. Ekspresja nestyny była obserwowana w fibroblastach podścieliska guza w bezpośrednim sąsiedztwie nabłonkowych gniazd nowotworowych we wszystkich badanych nowotworach. Ponadto ekspresję nestyny obserwowano w naczyniach podścieliska guzów oraz w obrębie komórek dendrytycznych zlokalizowanych wewnątrz gniazd komórek nowotworowych, które stanowiły kontrolę dodatnią. Za pomocą markera CD31 wykazano, że opisywane dodatnie komórki w okolicy guza w rzeczywistości są fibroblastami, a nie komórkami śródbłonka naczyń. W przypadku BCC fibroblasty były wrzecionowate i wydłużone. W przypadkach *trichoepithelioma* i *trichoblastoma* fibroblasty były bardziej

okrągłe i zbite, dając wrażenie silniejszej ekspresji. Autorzy uważają, że powyższy wzór ekspresji w nowotworach odpowiada wzorowi świecenia w niezmienionym mieszkcu włosowym. Wydłużone, wrzecionowate fibroblasty torebki łącznotkankowej pochewki włosa wykazują podobieństwo do komórek podścieliska obserwowanych w przypadkach BCC, podczas gdy okrągłe fibroblasty o obfitej cytoplazmie obserwowane w guzach *trichoepithelioma* i *trichoblastoma* imitują okrągłe fibroblasty obserwowane w brodawce włosa. Autorzy uważają, że nowotwory wywodzące się z przydatków odzwierciedlają embrionalny rozwój struktur przydatków, ale wydają się być zatrzymane na różnych etapach ich morfogenezy. BCC jest czasem postrzegany jako guz wywodzący się komórek zewnętrznej pochewki korzenia włosa [154, 155] a więc uzyskane wyniki mogą potwierdzać tę teorię.

W badaniu przeprowadzonym przez Leblebici i wsp. porównywano ekspresję nestyny w 27 próbkach BCC z 27 próbkami *trichoblastoma*. W 6 przypadkach BCC (22,2%) wykazano ogniskową ekspresję nestyny, w 13 przypadkach (48,1%) rozproszoną ekspresję, a w 8 przypadkach (29,6%) nie wykazano jej wcale. W przypadkach *trichoblastoma* 7 próbek (25,9%) wykazywało ogniskową ekspresję, 17 próbek (63%) rozproszoną ekspresję a 3 z nich (11,1%) nie wykazywało ekspresji. W tym badaniu nie wykazano statystycznej różnicy w ekspresji nestyny w powyższych nowotworach, co zaprzecza wcześniejszym doniesieniom o możliwości wykorzystania nestyny w diagnostyce różnicowej tych nowotworów [156].

Prezentowane w pracy wyniki dotyczące ekspresji nestyny w komórkach nowotworowych są spójne z doniesieniami literaturowymi. W 89,4% raków podstawnkomórkowych nie stwierdziłam ekspresji nestyny w komórkach guza, słabą ekspresję nestyny zaobserwowałam w 4 przypadkach (8,5%), a w 1 przypadku ekspresja nestyny była umiarkowana (2,1%). W przypadku raka kolczystokomórkowego ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych obserwowana była w 14 zmianach (43,75%), w 18 przypadkach (56,25%) nie wykazałam ekspresji. Nie stwierdziłam ekspresji nestyny w ogniskach rogowacenia słonecznego.

W swojej pracy stwierdziłam także, że ekspresja Ki-67 jest istotnie wyższa w BCC i SCC w porównaniu z AK. Nie wykazano natomiast istotnych różnic między BCC i SCC. Otrzymane wyniki zdają się potwierdzać charakter zmian. Rogowacenie słoneczne jako zmiany o charakterze łagodnym wykazują niski stopień ekspresji antygenu proliferacji Ki-67. Rak podstawnkomórkowy i kolczystokomórkowy jako nowotwory złośliwe wykazuje znacznie wyższą ekspresję Ki-67 niż AK. Podobne wyniki otrzymali Zhao i wsp. którzy oceniali m.in. ekspresję Ki-67 w 30 przypadkach BCC, 30 przypadkach SCC i 30 preparatach zdrowej skóry.

Stwierdzono istotnie wyższą ekspresję w BCC i SCC w porównaniu ze zdrową skórą ( $p < 0,05$ ), nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie różnicy między SCC i BCC [157].

Ekspresję Ki-67 w raku podstawnocomórkowym, kolczystocomórkowym i w *keratoacanthoma* badali także Zduniak i wsp. Z ich obserwacji wynika, że ekspresja Ki-67 była najwyższa w SCC (72,3%), niższa w BCC (47%), a najniższa w przypadku *keratoacanthoma* (18%), co autorzy wiążą ze stopniem złośliwości powyższych zmian [158].

Jednym z kluczowych procesów biologicznych, który wydaje się mieć znaczenie dla powstawania i prognozowania większości nowotworów, w tym raków skóry, jest angiogeneza. Istnieją nieliczne prace mające na celu scharakteryzowanie wzorca naczyniowego w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnocomórkowym i kolczystocomórkowym.

Proces angiogenezy polega na formowaniu naczyń z śródbłonna naczyń już istniejących. Angiogeneza odgrywa zasadniczą rolę w rozwoju guza nowotworowego, warunkując jego wzrost i tworzenie przerzutów. Tworzenie nowych naczyń włosowatych w guzie nowotworowym jest określane jako neoangiogeneza [159]. Do oceny stopnia angiogenezy stosuje się wskaźnik gęstości mikrokapilar (MVD), wykorzystując do oznaczania naczyń markery śródbłonkowe takie jak CD31, CD34 i czynnik VIII [160].

Newell i wsp. porównali mikrokrążenie w podścielisku raka podstawnocomórkowego z ogniskami rogowacenia słonecznego. Do oceny stopnia gęstości mikrokapilar zastosowano przeciwciało anti-CD34. Badania immunohistochemiczne wykazały znacznie wyższe gęstości mikronaczyń zarówno dla BCC, jak i AK w porównaniu ze zdrową skórą. Ponadto MVD w przypadku BCC był znacznie wyższy niż w przypadku AK [161]. Gęstsza sieć naczyń krwionośnych w okolicy guza świadczy o większej złośliwości BCC w porównaniu z AK.

Chin i wsp. podjęli się oceny różnic we wzorcach naczyniowych raka podstawnocomórkowego i kolczystocomórkowego skóry. Celem tego badania było zbadanie, czy charakterystyczny przebieg tych guzów, ich złośliwość i zdolność do przerzutowania można wytłumaczyć różnicami w ich mikrokrążeniu. W badaniu oceniono zarówno jakościowo, jak i ilościowo układ mikrokrążenia BCC ( $n=50$ ) i *trichoepithelioma* ( $n=33$ ) i porównano je ze skórą zdrową ( $n=6$ ) oraz z SCC ( $n=22$ ). Próbki wyznakowano przeciwciałem anti-CD31. Naczynia krwionośne zliczano w zrębie otaczającym guz, a także w masie guza. Wyniki uzyskane w podścielisku różniły się istotnie między SCC a BCC i *trichoepithelioma*. Podczas gdy wyznakowane naczynia można było znaleźć w masie guza, w przypadku SCC, nie zaobserwowano ich w guzkowym BCC ani w *trichoepithelioma*. Zauważono, że wzrost

inwazyjny korelował z odpowiedzią angiogenną w zrębie, podczas gdy potencjał przerzutowy korelował z obecnością mikronaczyń w masie guza [162].

Pastuchenko i wsp. porównali unaczynienie w 70 przypadkach BCC i 70 przypadkach SCC używając do tego celu markerów CD31 i CD105, a wyznakowane naczynia zliczali metodą Chalkleya. Stwierdzili większą ilość naczyń krwionośnych w podścielisku i w masie guza w przypadku SCC, w porównaniu z BCC [163].

W literaturze brak jest prac dotyczących możliwości wykorzystania nestyny jako markera angiogenezy w rakach skóry, tak więc obecna praca jest pierwszym doniesieniem oceniającym ekspresję nestyny w komórkach śródbłonka naczyniowego w rogowaceniu słonecznym i rakach skóry. Istnieją natomiast dość liczne doniesienia wskazujące na rolę nestyny w angiogenezie innych nowotworów. Mimo że znaczenie prognostyczne MVD zostało potwierdzone w badaniach, kontrowersje pojawiające się wokół tej kwestii wciąż są przedmiotem dyskusji. Jednym z argumentów jest fakt, że powszechnie stosowane markery śródbłonkowe wykrywają nie tylko nowo utworzone naczynia krwionośne, ale także dojrzałe, wcześniej istniejące [133, 164]. W kilku badaniach zaproponowano nestynę jako wiarygodny marker proliferujących komórek śródbłonka w tkankach, w których odbywa się proces neowaskularyzacji [136, 137].

W moich badaniach stwierdziłam ekspresję nestyny w śródbłonku naczyń krwionośnych w podścielisku rogowacenia słonecznego, raka podstawnkomórkowego i kolczystokomórkowego. Średnia gęstość naczyń wykazujących ekspresję nestyny była istotnie wyższa w przypadku raka podstawnkomórkowego i kolczystokomórkowego, w porównaniu z rogowaceniem słonecznym. Nie stwierdziłam natomiast istotnej różnicy między BCC i SCC. Podobne wyniki otrzymałam oceniając ekspresję CD31 i CD34 w powyższych zmianach skórnych. Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję CD31 i CD34 była istotnie wyższa w przypadku BCC i SCC w porównaniu z AK i podobnie jak w przypadku nestyny, nie stwierdziłam istotnej różnicy między BCC i SCC. Wykazano także silną korelację między ekspresją nestyny w śródbłonku naczyń z CD31 i CD34.

Średnia gęstość naczyń wykazujących ekspresję nestyny była nieznacznie niższa niż MVD oceniany przy użyciu przeciwciał przeciw CD31 i CD34. Obserwowany był trend ekspresji w drobnych naczyniach, podczas gdy duże naczynia pozostały niewyznakowane. Może to potwierdzać spostrzeżenia innych autorów, wskazujące na możliwe wykorzystanie nestyny jako markera neoangiogenezy. Zagadnienie to wymaga dalszych, bardziej szczegółowych

badania. Kim i wsp. oceniali korelację między średnią gęstością naczyń wykazujących ekspresję nestyny oraz gęstością naczyń z użyciem przeciwciała anti-CD34. MVD wyznakowany nestyną był istotnie wyższy i silnie związany z MVD określonym przez CD34 w gruczolakoraku żołądka ( $p < 0,001$ ) [165]. Teranishi i wsp. oceniali możliwość wykorzystania nestyny jako markera neoangiogenezy w raku jelita grubego. Nestynę zidentyfikowano w komórkach śródbłonna małych naczyń krwionośnych (mediana średnicy 6,30  $\mu\text{m}$ ), podczas gdy CD34 barwił również immunologicznie większe naczynia (mediana średnicy 8,82  $\mu\text{m}$ ) [166]. Ponadto istotna korelacja ekspresji nestyny z proliferacją komórek śródbłonna ( $p=0,002$ ), oceniona za pomocą ekspresji antygenu jądrowego komórek proliferujących (PCNA), podkreśla zdolność nestyny do wykrywania nowo powstałych, proliferujących mikronaczyń w raku trzustki [133].

Podsumowując, na podstawie własnych doświadczeń oraz nielicznych danych dostępnych w światowej literaturze wydaje się, że nestyna może być użytecznym wskaźnikiem angiogenezy w rakach skóry. Powyższa teoria wymaga jednak dalszych szczegółowych badań.



## 6. Wnioski

1. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłonna naczyń jest istotnie wyższa w raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym niż w rogowaceniu słonecznym, co wskazuje na bardziej złośliwy charakter zmian nowotworowych w porównaniu z rogowaceniem słonecznym.
2. Ekspresja Ki-67 w raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym jest wyższa niż w rogowaceniu słonecznym, nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy między BCC i SCC. Potwierdza to nasiloną proliferację w zmianach nowotworowych w porównaniu z rogowaceniem słonecznym.
3. Gęstość naczyń krwionośnych CD31<sup>+</sup> i CD34<sup>+</sup> jest istotnie wyższa w raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym w porównaniu z rogowaceniem słonecznym, nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy między BCC i SCC, co potwierdza, że nasilona angiogeneza pełni istotną funkcję w rozwoju nowotworów.
4. Nestyna może być znaczącym markerem neoangiogenezy, ponieważ ulega ekspresji w małych naczyniach krwionośnych, natomiast CD31 i CD34 wykazują ekspresję w małych i dużych naczyniach.
5. Wykazano dodatnią korelację między ekspresją nestyny a CD31 oraz CD34 w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym, dlatego wydaje się, że nestyna może być użytecznym markerem angiogenezy w AK, BCC i SCC.
6. Nestyna nie może być wykorzystywana jako marker komórek nowotworowych w SCC, BCC i AK.
7. Ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych była istotnie wyższa w przypadku SCC, w porównaniu z BCC i AK, co może wynikać z odmiennego charakteru zmian.
8. Nie wykazano wyższej ekspresji nestyny, Ki-67, CD31 i CD34 w zmianach mnogich, dlatego nie mogą one być wykorzystywane w ocenie ryzyka występowania mnogich zmian.

## 7. Streszczenie

### Wstęp

Raki skóry to grupa najczęściej występujących nowotworów złośliwych, a zapadalność na nie stale wzrasta, czemu sprzyja starzenie się społeczeństwa, zwiększona ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe związane ze zmianą stylu życia, zmniejszenie grubości warstwy ozonowej w atmosferze oraz rosnąca liczba pacjentów poddawanych leczeniu immunosupresyjnemu. Rak podstawnokomórkowy i kolczystokomórkowy stanowią istotny problem kliniczny, terapeutyczny i socjo-ekonomiczny. Rak podstawnokomórkowy to najczęściej występujący rak skóry, charakteryzuje się powolnym wzrostem, ale nieleczony ma tendencję do naciekania okolicznych struktur, co może prowadzić do destrukcji otaczających tkanek, prowadząc do szpecących zniekształceń i obniżenia jakości życia. Rak kolczystokomórkowy, drugi pod względem częstości występowania, w dużej mierze powstaje na podłożu stanów przedrakowych, wykazuje tendencję do inwazyjnego wzrostu i cechuje się wyższym potencjałem do tworzenia przerzutów. Ryzyko to szacuje się na około 10-30%. Rogowacenie słoneczne to zmiany skórne uważane kiedyś za stan przednowotworowy, według najnowszych danych powinny być uznawane za raka kolczystokomórkowego *in situ*, czyli raka nie przekraczającego błony podstawnej naskórka.

Nestyna jest białkiem należącym do VI typu filamentów pośrednich, bierze udział w organogenezie i metabolizmie komórkowym, uczestniczy w organizacji cytoszkieletu. Ekspresję nestyny stwierdzono pierwotnie w neuroepitelialnych komórkach macierzystych, a dalsze badania wykazały, że ulega ona ekspresji także w innych tkankach. Stwierdzono także, że odgrywa istotną rolę w patogenezie niektórych nowotworów oraz w procesie angiogenezy. W niezmienionej skórze nestyna ulega ekspresji w komórkach torebki łącznotkankowej mieszka włosowego oraz w brodawce włosa. W czerniaku zwiększona ekspresja wiąże się z agresywnym przebiegiem i gorszym rokowaniem. W niemelanocytowych nowotworach skóry wyniki badań są niejednoznaczne.

### Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji nestyny w masie ocenianych zmian oraz w naczyniach krwionośnych podścieliska rogowacenia słonecznego, raka podstawnokomórkowego i kolczystokomórkowego. Jako cel wyznaczono również

porównanie otrzymanych wyników z markerami śródbłonkowymi CD31 i CD34 oraz markerem proliferacji Ki-67.

## **Material i metody**

Do analizy włączono materiał tkankowy pobrany od 118 pacjentów leczonych w Katedrze i Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w latach 2015-2019. Badaną grupę stanowiło 32 pacjentów z potwierdzonym histologicznie rakiem kolczystokomórkowym skóry, 47 osób z rozpoznaniem raka podstawnokomórkowego. Grupę kontrolną stanowiło 39 pacjentów z rogowacieniem słonecznym. Po dokonaniu oceny histologicznej przeprowadzono badania immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał CD31 (nr kat. IR610, ready-to-use, Dako, Glostrup, Dania), CD34 (nr kat. IR632, ready-to-use, Dako), Nestin (nr kat. OBT1610, 1:100, BIO-RAD, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone) oraz Ki-67 (mysie, monoklonalne przeciwciało, nr kat. IR626, klon MIB-1, ready-to-use, Dako) w celu określenia ekspresji nestyny, oceny gęstości naczyń krwionośnych oraz oceny ekspresji antygenu Ki-67. Oceny ekspresji dokonano przy użyciu półilościowej skali wg Remmele (IRS) uwzględniającej natężenie reakcji barwnej i odsetek komórek wykazujących reakcję. Do oceny unaczynienia wykorzystano metodę poszukiwania 3 miejsc o największej gęstości naczyń i zliczania ich w wybranych „hot spotach”.

## **Wyniki**

Ekspresję nestyny w masie ocenianych zmian stwierdzono w 11% BCC oraz w 44% SCC, nie stwierdzono jej natomiast w żadnym przypadku rogowacenia słonecznego. Ekspresja nestyny w komórkach śródbłonka naczyń jest istotnie wyższa w raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym niż w rogowaceniu słonecznym, nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy między BCC i SCC. Ekspresja antygenu Ki-67 w raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym jest wyższa niż w rogowaceniu słonecznym, nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy między BCC i SCC. Podobnie gęstość naczyń krwionośnych CD31<sup>+</sup> oraz CD34<sup>+</sup> jest istotnie wyższa w raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym w porównaniu z rogowacieniem słonecznym, nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy między BCC i SCC. Wykazano dodatnią korelację między ekspresją nestyny a CD31 oraz CD34 w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym.

## **Wnioski**

Średnia gęstość naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję nestyny, CD31 i CD34 jest istotnie wyższa w raku podstawnocomórkowym i kolczystokomórkowym w porównaniu z rogowaceniem słonecznym. Nie wykazano natomiast różnicy między SCC i BCC. Podobnie ekspresja antygenu Ki-67 w raku podstawnocomórkowym i kolczystokomórkowym jest wyższa niż w rogowaceniu słonecznym, nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy między BCC i SCC. Powyższe wyniki potwierdzają korelację między nasiloną angiogenezą a stopniem złośliwości zmian. Dodatkowo wykazano dodatnią korelację między ekspresją nestyny a CD31 oraz CD34 w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnocomórkowym i kolczystokomórkowym, dlatego wydaje się, że nestyna może być użytecznym markerem angiogenezy w AK, BCC i SCC. Zauważono także, że nestyna ulega ekspresji w małych naczyniach krwionośnych, natomiast CD31 i CD34 wykazują ekspresję w małych i dużych naczyniach, dlatego wydaje się, że nestyna może być znaczącym markerem neoangiogenezy, ale teza ta wymaga dalszych badań.

## **8. Abstract**

### **Introduction**

Skin cancers are the most common type of malignancy, and its incidence continues to increase, driven by an aging population, increased exposure to ultraviolet radiation associated with lifestyle changes, the thinning of the atmospheric ozone layer and the increasing number of patients receiving immunosuppressive therapy. Basal cell and squamous cell carcinomas are a significant clinical, therapeutic, and socio-economic problem. Basal cell carcinoma is the most common skin cancer. It is characterized by slow growth, but if left untreated it tends to infiltrate surrounding structures, which can lead to the destruction of surrounding tissues, leading to disfiguring deformities and reduced quality of life. Squamous cell carcinoma, the second most common skin cancer, is most often formed on the basis of precancerous conditions, tends to grow invasively, and has a higher potential for metastasis. This risk is estimated at around 10-30%. Actinic keratosis are skin lesions that used to be considered as a pre-cancerous condition, according to the latest data they should be considered as squamous cell carcinoma in situ, i.e. cancer that does not cross the basement membrane of the epidermis.

Nestin is a protein belonging to the VI type of intermediate filaments, participates in organogenesis, cellular metabolism and cytoskeletal organization. Nestin was originally expressed in neuroepithelial stem cells, but further research has shown that it is also expressed in other tissues. It has also been found to play an important role in the pathogenesis of some cancers and in the process of angiogenesis. In intact skin, nestin is expressed in the cells of the connective tissue capsule of the hair follicle and in the hair papilla. In melanoma, increased expression is associated with an aggressive course and worse prognosis. In nonmelanoma skin cancers, research results are inconclusive.

### **Aim of the study**

The aim of the study was to evaluate the expression of nestin in the mass of the assessed lesions and in the blood vessels of actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. The aim was also to compare the obtained results with the endothelial markers CD31 and CD34 and the proliferation marker Ki-67.

### **Material and methods**

The analysis included tissue material collected from 118 patients treated at the Department and Clinic of Dermatology, Venereology and Allergology of the Medical University in Wrocław in 2015-2019. The study group consisted of 32 patients with histologically confirmed squamous cell carcinoma, 47 patients with a diagnosis of basal cell carcinoma. The control group consisted of 39 patients with actinic keratosis. Following histological evaluation, immunohistochemistry was performed using antibodies CD31 (cat. no. IR610, ready-to-use, Dako, Glostrup, Denmark), CD34 (cat. no. IR632, ready-to-use, Dako), Nestin (cat. no. OBT1610, 1:100, BIO-RAD, Hercules, California, USA) and Ki-67 (mouse monoclonal antibody, Cat. No. IR626, clone MIB-1, ready-to-use, Dako) to determine expression nestin, assessment of blood vessel density and assessment of expression of the Ki-67 antigen. Expression was assessed using a semi-quantitative Remmele scale (IRS) that considers the intensity of the color reaction and the percentage of cells showing a reaction. To assess vascularity, the method of searching for 3 places with the highest vascular density and counting them in selected "hot spots" was used.

### **Results**

Nestin expression in tumor cells was found in 11% of BCC and in 44% of SCC, but not in any case of actinic keratosis. Nestin expression in vascular endothelial cells was significantly

higher in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma than in actinic keratosis, but there was no significant difference between BCC and SCC. Ki-67 antigen expression in basal cell and squamous cell carcinoma was higher than in actinic keratosis, but there was no significant difference between BCC and SCC. Similarly, the density of CD31<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> blood vessels was significantly higher in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma compared to actinic keratosis, but there was no significant difference between BCC and SCC. A positive correlation has been shown between nestin expression and CD31 and CD34 in actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma.

## **Conclusions**

The average density of blood vessels expressing nestin, CD31 and CD34 was significantly higher in basal cell and squamous cell carcinoma compared to actinic keratosis. However, there was no difference between SCC and BCC. Similarly, expression of the Ki-67 antigen in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma was higher than in actinic keratosis, but there was no significant difference between BCC and SCC. The above results confirm the correlation between increased angiogenesis and level of malignancy. In addition, a positive correlation was found between nestin expression and CD31 and CD34 in actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma, therefore it seems that nestin may be a useful marker of angiogenesis in AK, BCC and SCC. It was also noted that nestin was expressed in small blood vessels, while CD31 and CD34 were expressed in small and large vessels, therefore it seems that nestin may be a significant marker of neoangiogenesis, but this thesis requires further research.

## 9. Bibliografia

1. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012 May;166(5):1069-80. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10830.x. PMID: 22251204.
2. Flohil SC, Seubring I, van Rossum MM, Coebergh JW, de Vries E, Nijsten T. Trends in Basal cell carcinoma incidence rates: a 37-year Dutch observational study. *J Invest Dermatol*. 2013 Apr;133(4):913-8. doi: 10.1038/jid.2012.431. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23190883.
3. Rogers HW, Weinstock MA, Feldman SR, Coldiron BM. Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer (Keratinocyte Carcinomas) in the U.S. Population, 2012. *JAMA Dermatol*. 2015 Oct;151(10):1081-6. doi: 10.1001/jamadermatol.2015.1187. PMID: 25928283.
4. Apalla Z, Lallas A, Sotiriou E, Lazaridou E, Ioannides D. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol Pract Concept*. 2017 Apr 30;7(2):1-6. doi: 10.5826/dpc.0702a01. PMID: 28515985; PMCID: PMC5424654.
5. Runger TM. How different wavelengths of the ultraviolet spectrum contribute to skin carcinogenesis: the role of cellular damage responses. *J Invest Dermatol*. 2007 Sep;127(9):2103-5. doi: 10.1038/sj.jid.5700988. PMID: 17700622.
6. Diepgen TL, Fartasch M, Drexler H, Schmitt J. Occupational skin cancer induced by ultraviolet radiation and its prevention. *Br J Dermatol*. 2012 Aug;167 Suppl 2:76-84. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.11090.x. PMID: 22881591.
7. Jasiel-Walikowska E, Placek W. Bezporednie i odległe efekty biologiczne działania promieniowania słonecznego na zdrową skóre. *Derm Estet*. 3, 1999, 120-8.
8. Bakowska A, Czyż P, Kaszuba A, Miękoś-Zydek B, Skrzypczyk M, Kijowski R. Assessment of the degree of expression of oncoprotein p53 in squamous and basal cell carcinomas. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*. 2007;24(4):178-182.
9. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Fincham S, Coldman AJ, McLean DI, Threlfall WJ. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 1995 Feb;131(2):157-63. PMID: 7857111.
10. Iannacone MR, Wang W, Stockwell HG, O'Rourke K, Giuliano AR, Sondak VK, Messina JL, Roetzheim RG, Cherpelis BS, Fenske NA, Rollison DE. Patterns and timing of sunlight exposure and risk of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin--a case-control study. *BMC Cancer*. 2012 Sep 20;12:417. doi: 10.1186/1471-2407-12-417. PMID: 22994655; PMCID: PMC3517361.
11. Stern RS; PUVA Follow-Up Study. The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: a 30-year prospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Apr;66(4):553-62. doi: 10.1016/j.jaad.2011.04.004. Epub 2012 Jan 20. PMID: 22264671.

12. Man I, Crombie IK, Dawe RS, Ibbotson SH, Ferguson J. The photocarcinogenic risk of narrowband UVB (TL-01) phototherapy: early follow-up data. *Br J Dermatol*. 2005 Apr;152(4):755-7. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06537.x. PMID: 15840109.
13. Levine JA, Sorace M, Spencer J, Siegel DM. The indoor UV tanning industry: a review of skin cancer risk, health benefit claims, and regulation. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Dec;53(6):1038-44. doi: 10.1016/j.jaad.2005.07.066. PMID: 16310065.
14. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer*. 2007 Mar 1;120(5):1116-22. doi: 10.1002/ijc.22453. Erratum in: *Int J Cancer*. 2007 Jun 1;120(11):2526. PMID: 17131335.
15. Cuperus E, Leguit R, Albrechts M, Toonstra J. Post radiation skin tumors: basal cell carcinomas, squamous cell carcinomas and angiosarcomas. A review of this late effect of radiotherapy. *Eur J Dermatol*. 2013 Nov-Dec;23(6):749-57. doi: 10.1684/ejd.2013.2106. PMID: 24153098.
16. Maalej M, Frikha H, Kochbati L, Bouaouina N, Sellami D, Benna F, Gargouri W, Dhraief S, Nasr C, Daoud J, Hajji M, Fazaa B, Souissi R, Mokhtar I, Kamoun MR. Radio-induced malignancies of the scalp about 98 patients with 150 lesions and literature review. *Cancer Radiother*. 2004 Apr;8(2):81-7. doi: 10.1016/j.canrad.2003.12.003. PMID: 15063875.
17. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff H.H i inni. *Dermatologia. Tom III*. s.l. : Czelej, 2010.
18. Ron E, Modan B, Preston D, Alfandary E, Stovall M, Boice JD Jr. Radiation-induced skin carcinomas of the head and neck. *Radiat Res*. 1991 Mar;125(3):318-25. PMID: 2000456.
19. Edwards MJ, Hirsch RM, Broadwater JR, Netscher DT, Ames FC. Squamous cell carcinoma arising in previously burned or irradiated skin. *Arch Surg*. 1989 Jan;124(1):115-7. doi: 10.1001/archsurg.1989.01410010125024. PMID: 2910238.
20. Bhattacharjee P, Banerjee M, Giri AK. Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ Int*. 2013 Mar;53:29-40. doi: 10.1016/j.envint.2012.12.004. Epub 2013 Jan 8. PMID: 23314041.
21. Rahaman MS, Rahman MM, Mise N, Sikder MT, Ichihara G, Uddin MK, Kurasaki M, Ichihara S. Environmental arsenic exposure and its contribution to human diseases, toxicity mechanism and management. *Environ Pollut*. 2021 Nov 15;289:117940. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117940. Epub 2021 Aug 10. PMID: 34426183.
22. Jabłońska S, Majewski S. *Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową*. Warszawa : Wydawnictwo lekarskie PZWL, 2006.
23. Griffith CF. Skin cancer in immunosuppressed patients. *JAAPA*. 2022 Feb 1;35(2):19-27. doi: 10.1097/01.JAA.0000805800.77311.4c. PMID: 34985005.
24. Accardi R, Gheit T. Cutaneous HPV and skin cancer. *Presse Med*. 2014 Dec;43(12 Pt 2):e435-43. doi: 10.1016/j.lpm.2014.08.008. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25451638.
25. Andersson K, Michael KM, Luostarinen T, Waterboer T, Gislefoss R, Hakulinen T, Forslund O, Pawlita M, Dillner J. Prospective study of human papillomavirus seropositivity and risk of nonmelanoma skin cancer. *Am J Epidemiol*. 2012 Apr 1;175(7):685-95. doi: 10.1093/aje/kwr373. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22419740.



26. Wu S, Li WQ, Qureshi AA, Cho E. Alcohol consumption and risk of cutaneous basal cell carcinoma in women and men: 3 prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr*. 2015 Nov;102(5):1158-66. doi: 10.3945/ajcn.115.115196. Epub 2015 Sep 30. PMID: 26423390; PMCID: PMC4625594.
27. Saladi RN, Nektalova T, Fox JL. Induction of skin carcinogenicity by alcohol and ultraviolet light. *Clin Exp Dermatol*. 2010 Jan;35(1):7-11. doi: 10.1111/j.1365-2230.2009.03465.x. Epub 2009 Sep 23. PMID: 19778305.
28. Li Y, Li WQ, Li T, Qureshi AA, Cho E. Eye color and the risk of skin cancer. *Cancer Causes Control*. 2022 Jan;33(1):109-116. doi: 10.1007/s10552-021-01508-z. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34687387.
29. Schierbeck J, Vestergaard T, Bygum A. Skin Cancer Associated Genodermatoses: A Literature Review. *Acta Derm Venereol*. 2019 Apr 1;99(4):360-369. doi: 10.2340/00015555-3123. PMID: 30653245.
30. Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med*. 1960 May 5;262:908-12. doi: 10.1056/NEJM196005052621803. PMID: 13851319.
31. Abuzahra F, Parren LJ, Frank J. Multiple familial and pigmented basal cell carcinomas in early childhood - Bazex-Dupré-Christol syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Jan;26(1):117-21. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04048.x. Epub 2011 Mar 24. PMID: 21435027.
32. Kraemer KH, DiGiovanna JJ. Forty years of research on xeroderma pigmentosum at the US National Institutes of Health. *Photochem Photobiol*. 2015 Mar-Apr;91(2):452-9. doi: 10.1111/php.12345. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25220021; PMCID: PMC4355260.
33. Broesby-Olsen S, Bygum A, Gerdes AM, Brandrup F. Multiple self-healing squamous epithelioma of Ferguson-Smith: observations in a Danish family covering four generations. *Acta Derm Venereol*. 2008;88(1):52-6. doi: 10.2340/00015555-0359. PMID: 18176752.
34. John AM, Schwartz RA. Muir-Torre syndrome (MTS): An update and approach to diagnosis and management. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Mar;74(3):558-66. doi: 10.1016/j.jaad.2015.09.074. PMID: 26892655.
35. Arora H, Chacon AH, Choudhary S, McLeod MP, Meshkov L, Nouri K, Izakovic J. Bloom syndrome. *Int J Dermatol*. 2014 Jul;53(7):798-802. doi: 10.1111/ijd.12408. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24602044.
36. Burger B, Itin PH. Epidermodysplasia verruciformis. *Curr Probl Dermatol*. 2014;45:123-31. doi: 10.1159/000356068. Epub 2014 Mar 17. PMID: 24643182.
37. Siegel JA, Korgavkar K, Weinstock MA. Current perspective on actinic keratosis: a review. *Br J Dermatol*. 2017 Aug;177(2):350-358. doi: 10.1111/bjd.14852. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27500794.
38. Holmes C, Foley P, Freeman M, Chong AH. Solar keratosis: epidemiology, pathogenesis, presentation and treatment. *Australas J Dermatol*. 2007 May;48(2):67-74; quiz 75-6. doi: 10.1111/j.1440-0960.2007.00339.x. PMID: 17535191.
39. Gupta AK, Cooper EA, Feldman SR, Fleischer AB Jr. A survey of office visits for actinic keratosis as reported by NAMCS, 1990-1999. National Ambulatory Medical Care Survey. *Cutis*. 2002 Aug;70(2 Suppl):8-13. PMID: 12353680.

40. Frost C, Williams G, Green A. High incidence and regression rates of solar keratoses in a queensland community. *J Invest Dermatol*. 2000 Aug;115(2):273-7. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00048.x. PMID: 10951246.
41. Włodarkiewicz A, Narbutt J, Adamski Z, et al. Actinic keratosis – state of art. Statement of experts of Polish Dermatological Society. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. 2014;101(2):156-167. doi:10.5114/dr.2014.42831.
42. Roewert-Huber J, Stockfleth E, Kerl H. Pathology and pathobiology of actinic (solar) keratosis - an update. *Br J Dermatol*. 2007 Dec;157 Suppl 2:18-20. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08267.x. PMID: 18067626.
43. Cockerell CJ, Wharton JR. New histopathological classification of actinic keratosis (incipient intraepidermal squamous cell carcinoma). *J Drugs Dermatol*. 2005 Jul-Aug;4(4):462-7. PMID: 16004019.
44. Torezan LA, Festa-Neto C. Cutaneous field cancerization: clinical, histopathological and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol*. 2013 Sep-Oct;88(5):775-86. doi: 10.1590/abd1806-4841.20132300. PMID: 24173184; PMCID: PMC3798355.
45. [www.onkologia.org.pl](http://www.onkologia.org.pl), Krajowy Rejestr Nowotworów. and 2018, available at: September.
46. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2007 Dec;157 Suppl 2:47-51. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08273.x. PMID: 18067632.
47. Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM, Tollefson MM, Otley CC, Weaver AL, Roenigk RK. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA*. 2005 Aug 10;294(6):681-90. doi: 10.1001/jama.294.6.681. PMID: 16091570.
48. Lesiak A., Sysa-Jędrzejowska A., Narbutt J. Rola ścieżki przekazywania sygnału sonic hedgehog w procesie skórnej kancerogenezy. *Pol Merk Lek* 2010, 29, 141-143
49. Ng JM, Curran T. The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 May 26;11(7):493-501. doi: 10.1038/nrc3079. PMID: 21614026; PMCID: PMC3576812.
50. Lesiak A, Czuwara J, Kamińska-Winciorek G, et al. Basal cell carcinoma. Diagnostic and therapeutic recommendations of Polish Dermatological Society. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. 2019;106(2):107-126. doi:10.5114/dr.2019.85572.
51. Schwartz RA. *Skin cancer- Recognition and Management*. Massachusetts : Blackwell Publishing, 2008.
52. Wozniak-Rito A, Zalaudek I, Rudnicka L. Dermoscopy of basal cell carcinoma. *Clin Exp Dermatol*. 2018 Apr;43(3):241-247. doi: 10.1111/ced.13387. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29341291.
53. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, Richards S, Paver R. Basosquamous carcinoma: treatment with Mohs micrographic surgery. *Cancer*. 2005 Jul 1;104(1):170-5. doi: 10.1002/cncr.21143. PMID: 15929123.
54. Robinson JK, Dahiya M. Basal cell carcinoma with pulmonary and lymph node metastasis causing death. *Arch Dermatol*. 2003 May;139(5):643-8. doi: 10.1001/archderm.139.5.643. PMID: 12756102.

55. Bieniek A, Woźniak Z. Rak skóry. Leczenie metodą Mohsa. Wrocław: Edra Urban & Partner, 2019.
56. Kaszuba A, Woźniak L, Zieliński KW. Atlas patologii złośliwych nowotworów skóry. Warszawa : PZWL Wydawnictwo Lekarskie, 2014.
57. R, Kordek. Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy. Gdańsk: Via Medica, 2007.
58. Lesiak A, Czuwara J, Kamińska-Winciorek G, et al. Squamous cell carcinoma and Merkel-cell carcinoma. Diagnostic and therapeutic recommendations of the Polish Dermatological Society. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. 2019;106(2):127-149. doi:10.5114/dr.2019.85573.
59. Bichakjian C, Olencki T, Aasi S, Alam M, Andersen J, Blitzblau R, et al. Squamous Cell Skin Cancer, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 14, 2016, 574-597.
60. Wąsik F, Baran E, Szepietowski J. Zarys dermatologii klinicznej. Wrocław : Volumed, 1995.
61. Rudnicka L, Olszewska M, Sar-Pomian M, Rakowska A. Współczesna dermatologia Tom 1. Warszawa: PZWL Wydawnictwo Lekarskie, 2022.
62. Cameron A, Rosendahl C, Tschandl P, Riedl E, Kittler H. Dermatoscopy of pigmented Bowen's disease. *J Am Acad Dermatol*. 2010 Apr;62(4):597-604. doi: 10.1016/j.jaad.2009.06.008. Epub 2010 Jan 15. PMID: 20079953.
63. Zalaudek I, Giacomel J, Schmid K, Bondino S, Rosendahl C, Cavicchini S, Tournalaki A, Gasparini S, Bourne P, Keir J, Kittler H, Eibenschutz L, Catricalà C, Argenziano G. Dermatoscopy of facial actinic keratosis, intraepidermal carcinoma, and invasive squamous cell carcinoma: a progression model. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Apr;66(4):589-97. doi: 10.1016/j.jaad.2011.02.011. Epub 2011 Aug 11. PMID: 21839538.
64. Lallas A, Pyne J, Kyrgidis A, Andreani S, Argenziano G, Cavaller A, Giacomel J, Longo C, Malvestiti A, Moscarella E, Piana S, Specchio F, Hofmann-Wellenhof R, Zalaudek I. The clinical and dermoscopic features of invasive cutaneous squamous cell carcinoma depend on the histopathological grade of differentiation. *Br J Dermatol*. 2015;172(5):1308-15. doi: 10.1111/bjd.13510. Epub 2015 Mar 9. PMID: 25363081.
65. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Squamous cell carcinoma and its precursors. *Biopsy Interpretation of the Skin: Primary Non-Lymphoid Cutaneous Neoplasia*. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2010.
66. Bichakjian CK, Nghiem P, Johnson T, Wright CL, Sober AJ. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th edn. Switzerland: Springer, 2017.
67. Bichakjian C, Olencki T, Aasi S, Alam M, Andersen J, Blitzblau R, et al. Basal Cell Carcinoma, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology wersja 1. [www.nccn.org](http://www.nccn.org) (2018), 2018 .
68. Schmults CD, Blitzblau R, Aasi SZ, Alam M, Andersen JS, Baumann BC, Bordeaux J, Chen PL, Chin R, Contreras CM, DiMaio D, Donigan JM, Farma JM, Ghosh K, Grekin RC, Harms K, Ho AL, Holder A, Lukens JN, Medina T, Nehal KS, Nghiem P, Park S, Patel T et al. NCCN Guidelines® Insights: Squamous Cell Skin Cancer, Version 1.2022. *J Natl Compr Canc Netw* . Dec;19(12), 2021, 1382-1394.

69. Macbeth AE, Grindlay DJ, Williams HC. What's new in skin cancer? An analysis of guidelines and systematic reviews published in 2008-2009. *Clin Exp Dermatol*. 2011 Jul;36(5):453-8. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04087.x. Epub 2011 Jun 14. PMID: 21671988.
70. Wilder RB, Kittelson JM, Shimm DS. Basal cell carcinoma treated with radiation therapy. *Cancer*. 1991 Nov 15;68(10):2134-7. doi: 10.1002/1097-0142(19911115)68:10<2134::aid-ncr2820681008>3.0.co;2-m. PMID: 1913451.
71. Pariser DM, Lowe NJ, Stewart DM, Jarratt MT, Lucky AW, Pariser RJ, Yamauchi PS. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol*. 2003 Feb;48(2):227-32. doi: 10.1067/mjd.2003.49. PMID: 12582393.
72. Morton CA, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, Jenkinson H, Kurwa H, Langmack K, McKenna K, Moseley H, Pearse AD, Stringer M, Taylor DK, Wong G, Rhodes LE. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol*. 2002 Apr;146(4):552-67. doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04719.x. PMID: 11966684.
73. Fantini F, Greco A, Del Giovane C, Cesinaro AM, Venturini M, Zane C, Surrenti T, Peris K, Calzavara-Pinton PG. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: clinical and pathological determinants of response. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011 Aug;25(8):896-901. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03877.x. Epub 2010 Nov 4. PMID: 21054566.
74. Zaar O, Fougelberg J, Hermansson A, Gillstedt M, Wennberg-Larkö AM, Paoli J. Effectiveness of photodynamic therapy in Bowen's disease: a retrospective observational study in 423 lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Aug;31(8):1289-1294. doi: 10.1111/jdv.14164. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28190258.
75. Quirk C, Gebauer K, De'Ambrosis B, Slade HB, Meng TC. Sustained clearance of superficial basal cell carcinomas treated with imiquimod cream 5%: results of a prospective 5-year study. *Cutis*. 2010 Jun;85(6):318-24. PMID: 20666194.
76. Arits AH, Mosterd K, Essers BA, Spoorenberg E, Sommer A, De Rooij MJ, van Pelt HP, Quaadvlieg PJ, Krekels GA, van Neer PA, Rijzewijk JJ, van Geest AJ, Steijlen PM, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW. Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: a single blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2013 Jun;14(7):647-54. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70143-8. Epub 2013 May 15. PMID: 23683751.
77. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Int*. 2007 Mar 15;7:2. doi: 10.1186/1475-2867-7-2. PMID: 17362521; PMCID: PMC1838897.
78. Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*. 1985 Dec;5(12):3310-28. doi: 10.1523/JNEUROSCI.05-12-03310.1985. PMID: 4078630; PMCID: PMC6565218.
79. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990 Feb 23;60(4):585-95. doi: 10.1016/0092-8674(90)90662-x. PMID: 1689217.
80. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol*. 2005 Apr;20(2):665-71. doi: 10.14670/HH-20.665. PMID: 15736068.

81. Chou YH, Khuon S, Herrmann H, Goldman RD. Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol Cell*. 2003 Apr;14(4):1468-78. doi: 10.1091/mbc.e02-08-0545. PMID: 12686602; PMCID: PMC153115.
82. Day K, Shefer G, Richardson JB, Enikolopov G, Yablonka-Reuveni Z. Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*. 2007 Apr 1;304(1):246-59. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.026. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17239845; PMCID: PMC1888564.
83. Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron*. 1994 Jan;12(1):11-24. doi: 10.1016/0896-6273(94)90148-1. Erratum in: *Neuron* 1994 Jun;12(6):following 1388. PMID: 8292356.
84. Jiang MH, Cai B, Tuo Y, Wang J, Zang ZJ, Tu X, Gao Y, Su Z, Li W, Li G, Zhang M, Jiao J, Wan Z, Deng C, Lahn BT, Xiang AP. Characterization of Nestin-positive stem Leydig cells as a potential source for the treatment of testicular Leydig cell dysfunction. *Cell Res*. 2014 Dec;24(12):1466-85. doi: 10.1038/cr.2014.149. Epub 2014 Nov 21. PMID: 25418539; PMCID: PMC4260348.
85. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001 Mar;50(3):521-33. doi: 10.2337/diabetes.50.3.521. PMID: 11246871.
86. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 12;102(15):5530-4. doi: 10.1073/pnas.0501263102. Epub 2005 Mar 31. PMID: 15802470; PMCID: PMC556262.
87. Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem*. 1995 Aug;43(8):843-7. doi: 10.1177/43.8.7542682. PMID: 7542682.
88. Ono N, Ono W, Mizoguchi T, Nagasawa T, Frenette PS, Kronenberg HM. Vasculature-associated cells expressing nestin in developing bones encompass early cells in the osteoblast and endothelial lineage. *Dev Cell*. 2014 May 12;29(3):330-9. doi: 10.1016/j.devcel.2014.03.014. PMID: 24823376; PMCID: PMC4083679.
89. Herrmann H, Aebi U. Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Nov 1;8(11):a018242. doi: 10.1101/cshperspect.a018242. PMID: 27803112; PMCID: PMC5088526.
90. Chung BM, Rotty JD, Coulombe PA. Networking galore: intermediate filaments and cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2013 Oct;25(5):600-12. doi: 10.1016/j.ceb.2013.06.008. Epub 2013 Jul 22. PMID: 23886476; PMCID: PMC3780586.
91. Etienne-Manneville S. Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2018 Oct 6;34:1-28. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062534. Epub 2018 Jul 30. PMID: 30059630.
92. Sahlgren CM, Mikhailov A, Vaittinen S, Pallari HM, Kalimo H, Pant HC, Eriksson JE. Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. *Mol Cell Biol*. 2003 Jul;23(14):5090-106. doi: 10.1128/MCB.23.14.5090-5106.2003. PMID: 12832492; PMCID: PMC162223.

93. Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, Chou YH, Lendahl U, Goldman RD, Eriksson JE. Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):16456-63. doi: 10.1074/jbc.M009669200. Epub 2001 Feb 1. PMID: 11278541.
94. Sahlgren CM, Pallari HM, He T, Chou YH, Goldman RD, Eriksson JE. A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J*. 2006 Oct 18;25(20):4808-19. doi: 10.1038/sj.emboj.7601366. Epub 2006 Oct 12. PMID: 17036052; PMCID: PMC1618100.
95. Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamahatsu K, Minamoto T, Arai T. Nestin phosphorylation at threonines 315 and 1299 correlates with proliferation and metastasis of human pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2017 Mar;108(3):354-361. doi: 10.1111/cas.13139. Epub 2017 Mar 7. PMID: 28002641; PMCID: PMC5378226.
96. Tschaharganeh DF, Xue W, Calvisi DF, Evert M, Michurina TV, Dow LE, Banito A, Katz SF, Kasthuber ER, Weissmueller S, Huang CH, Lechel A, Andersen JB, Capper D, Zender L, Longerich T, Enikolopov G, Lowe SW. p53-dependent Nestin regulation links tumor suppression to cellular plasticity in liver cancer. *Cell*. 2014 Jul 31;158(3):579-92. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.051. Erratum in: *Cell*. 2016 Jun 2;165(6):1546-1547. PMID: 25083869; PMCID: PMC4221237.
97. Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Hagio M, Arai T. Inhibition of nestin suppresses stem cell phenotype of glioblastomas through the alteration of post-translational modification of heat shock protein HSPA8/HSC71. *Cancer Lett*. 2015 Feb 28;357(2):602-11. doi: 10.1016/j.canlet.2014.12.030. Epub 2014 Dec 16. PMID: 25527454.
98. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1261-74. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009. PMID: 17604717; PMCID: PMC2756685.
99. Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):1886-1918. doi: 10.3390/ijms13021886. Epub 2012 Feb 10. PMID: 22408430; PMCID: PMC3291999.
100. Chen Z, Wang J, Cai L, Zhong B, Luo H, Hao Y, Yu W, Wang B, Su C, Lei Y, Bella AE, Xiang AP, Wang T. Role of the stem cell-associated intermediate filament nestin in malignant proliferation of non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e85584. doi: 10.1371/journal.pone.0085584. PMID: 24498263; PMCID: PMC3911905.
101. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012 Aug 23;488(7412):522-6. doi: 10.1038/nature11287. PMID: 22854781; PMCID: PMC3427400.
102. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Dec;7(12):961-7. doi: 10.1038/nrc2254. PMID: 17972889; PMCID: PMC2866167.
103. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*. 2010 Apr 2;584(7):1287-95. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.017. Epub 2010 Jan 18. PMID: 20083114; PMCID: PMC2846630.
104. Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci*. 2015 Jul;106(7):803-11. doi: 10.1111/cas.12691. Epub 2015 May 26. PMID: 25940879; PMCID: PMC4520630.

105. Neuzil J, Stantic M, Zobalova R, Chladova J, Wang X, Prochazka L, Dong L, Andera L, Ralph SJ. Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name? *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Apr 20;355(4):855-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.159. Epub 2007 Feb 6. PMID: 17307142.
106. Lv D, Lu L, Hu Z, Fei Z, Liu M, Wei L, Xu J. Nestin Expression Is Associated with Poor Clinicopathological Features and Prognosis in Glioma Patients: an Association Study and Meta-analysis. *Mol Neurobiol.* 2017 Jan;54(1):727-735. doi: 10.1007/s12035-016-9689-5. Epub 2016 Jan 14. PMID: 26768429.
107. Thomas SK, Messam CA, Spengler BA, Biedler JL, Ross RA. Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):27994-9. doi: 10.1074/jbc.M312663200. Epub 2004 Apr 26. PMID: 15117961.
108. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):396-401. doi: 10.1038/nature03128. PMID: 15549107.
109. Hussein D, Punjaruk W, Storer LC, Shaw L, Othman R, Peet A, Miller S, Bandopadhyay G, Heath R, Kumari R, Bowman KJ, Braker P, Rahman R, Jones GD, Watson S, Lowe J, Kerr ID, Grundy RG, Coyle B. Pediatric brain tumor cancer stem cells: cell cycle dynamics, DNA repair, and etoposide extrusion. *Neuro Oncol.* 2011 Jan;13(1):70-83. doi: 10.1093/neuonc/noq144. Epub 2010 Oct 25. Erratum in: *Neuro Oncol.* 2012 Dec;14(12):1528. Ottoman, Ramadan [corrected to Othman, Ramadhan]. PMID: 20978004; PMCID: PMC3018909.
110. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, Chou SH, Chien CS, Ku HH, Lo JF. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008 Jul 1;14(13):4085-95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4404. PMID: 18593985.
111. Sana J, Zambo I, Skoda J, Neradil J, Chlapek P, Hermanova M, Mudry P, Vasikova A, Zitterbart K, Hampl A, Sterba J, Veselska R. CD133 expression and identification of CD133/neslin positive cells in rhabdomyosarcomas and rhabdomyosarcoma cell lines. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2011;34(6):303-18. doi: 10.3233/ACP-2011-0018. PMID: 22156015; PMCID: PMC4605712.
112. Veselska R, Hermanova M, Loja T, Chlapek P, Zambo I, Vesely K, Zitterbart K, Sterba J. Nestin expression in osteosarcomas and derivation of nestin/CD133 positive osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer.* 2008 Oct 16;8:300. doi: 10.1186/1471-2407-8-300. PMID: 18925963; PMCID: PMC2588620.
113. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, Fazioli F, Pirozzi G, Papaccio G. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *FASEB J.* 2011 Jun;25(6):2022-30. doi: 10.1096/fj.10-179036. Epub 2011 Mar 8. PMID: 21385990.
114. Onisim A, Iancu M, Vlad C, Kubelac P, Fetica B, Fulop A, Achimas-Cadariu A, Achimas-Cadariu P. Expression of Nestin and CD133 in serous ovarian carcinoma. *J BUON.* 2016 Sept-Oct;21(5):1168-1175. PMID: 27837619.
115. Osman WM, Shash LS, Ahmed NS. Emerging Role of Nestin as an Angiogenesis and Cancer Stem Cell Marker in Epithelial Ovarian Cancer: Immunohistochemical Study. *Appl*

Immunohistochem Mol Morphol. 2017 Sep;25(8):571-580. doi: 10.1097/PAI.0000000000000338. PMID: 26945442.

116. Sal V, Kahramanoglu I, Bese T, Demirkiran F, Sofiyeva N, Soyman Z, Durmus S, Gelisgen R, Arvas M, Uzun H. Is serum level of nestin useful in detecting epithelial ovarian cancer? *J Obstet Gynaecol Res.* 2017 Feb;43(2):371-377. doi: 10.1111/jog.13220. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27995729.

117. Guzmán-Ramírez N, Völler M, Wetterwald A, Germann M, Cross NA, Rentsch CA, Schalken J, Thalmann GN, Cecchini MG. In vitro propagation and characterization of neoplastic stem/progenitor-like cells from human prostate cancer tissue. *Prostate.* 2009 Nov 1;69(15):1683-93. doi: 10.1002/pros.21018. PMID: 19644960.

118. Liu T, Xu F, Du X, Lai D, Liu T, Zhao Y, Huang Q, Jiang L, Huang W, Cheng W, Liu Z. Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. *Mol Cell Biochem.* 2010 Jul;340(1-2):265-73. doi: 10.1007/s11010-010-0426-5. Epub 2010 Mar 12. PMID: 20224986.

119. Liu C, Cao X, Zhang Y, Xu H, Zhang R, Wu Y, Lu P, Jin F. Co-expression of Oct-4 and Nestin in human breast cancers. *Mol Biol Rep.* 2012 May;39(5):5875-81. doi: 10.1007/s11033-011-1398-6. Epub 2011 Dec 30. PMID: 22207173.

120. Zhao Z, Lu P, Zhang H, Xu H, Gao N, Li M, Liu C. Nestin positively regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res.* 2014 Jul 24;16(4):408. doi: 10.1186/s13058-014-0408-8. PMID: 25056574; PMCID: PMC4220087.

121. Li S, Lai Y, Fan J, Shen C, Che G. Clinicopathological and prognostic significance of Nestin expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Med.* 2017 May;17(2):161-174. doi: 10.1007/s10238-016-0421-6. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27099933.

122. Dhingra S, Feng W, Brown RE, Zhou Z, Khoury T, Zhang R, Tan D. Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(8):733-41. Epub 2011 Oct 30. PMID: 22135720; PMCID: PMC3225784.

123. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):389-95. doi: 10.1038/74651. PMID: 10742145.

124. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature.* 2005 Sep 22;437(7058):497-504. doi: 10.1038/nature03987. PMID: 16177780.

125. Baluk P, McDonald DM. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1131:1-12. doi: 10.1196/annals.1413.001. PMID: 18519955.

126. Antosz H. Antygen CD34 i komórki CD34 pozytywne. *Post Biol Komórki.* 2004; 31(2);285-298.

127. Nerlich AG, Schleicher E. Identification of lymph and blood capillaries by immunohistochemical staining for various basement membrane components. *Histochemistry.* 1991;96(5):449-53. doi: 10.1007/BF00316003. PMID: 1748568.



128. Jankowska- Konsur A, Kobierzycki C, Dzięgiel P. Angiogeneza i limfangiogeneza w pierwotnie skórnych chłoniakach T-komórkowych. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015; 69: 1205-1214.
129. Hansen S, Grabau DA, Sørensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000 Jan;6(1):139-46. PMID: 10656442.
130. Arbiser JL, Byers HR, Cohen C, Arbeit J. Altered basic fibroblast growth factor expression in common epidermal neoplasms: examination with in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Am Acad Dermatol.* 2000 Jun;42(6):973-7. PMID: 10827398.
131. Bielenberg DR, Bucana CD, Sanchez R, Donawho CK, Kripke ML, Fidler IJ. Molecular regulation of UVB-induced cutaneous angiogenesis. *J Invest Dermatol.* 1998 Nov;111(5):864-72. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00378.x. PMID: 9804351.
132. Bowden J, Brennan PA, Umar T, Cronin A. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutan Pathol.* 2002 Nov;29(10):585-9. doi: 10.1034/j.1600-0560.2002.291003.x. PMID: 12453295.
133. Yamahatsu K, Matsuda Y, Ishiwata T, Uchida E, Naito Z. Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis. *Int J Oncol.* 2012 May;40(5):1345-57. doi: 10.3892/ijo.2012.1333. Epub 2012 Jan 13. PMID: 22246533.
134. Nowak A, Grzegorzółka J, Kmiecik A, Piotrowska A, Matkowski R, Dzięgiel P. Role of nestin expression in angiogenesis and breast cancer progression. *Int J Oncol.* 2018 Feb;52(2):527-535. doi: 10.3892/ijo.2017.4223. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29345290.
135. Chabowski M, Nowak A, Grzegorzolka J, Piotrowska A, Janczak D, Dziegiel P. Comparison of Microvessel Density Using Nestin and CD34 in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2018 Jul;38(7):3889-3895. doi: 10.21873/anticancerres.12673. PMID: 29970509.
136. Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Mastuzaki Y, Okano H. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem.* 2010 Aug;58(8):721-30. doi: 10.1369/jhc.2010.955609. Epub 2010 Apr 26. PMID: 20421592; PMCID: PMC2907277.
137. Mokry J, Cizkova D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolár Z, English D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev.* 2004 Dec;13(6):658-64. doi: 10.1089/scd.2004.13.658. PMID: 15684833.
138. Liang ZW, Wang Z, Chen H, Li C, Zhou T, Yang Z, Yang X, Yang Y, Gao G, Cai W. Nestin-mediated cytoskeletal remodeling in endothelial cells: novel mechanistic insight into VEGF-induced cell migration in angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015 Mar 1;308(5):C349-58. doi: 10.1152/ajpcell.00121.2014. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25500739.
139. Schiffer D, Annovazzi L, Caldera V, Mellai M. On the origin and growth of gliomas. *Anticancer Res.* 2010 Jun;30(6):1977-98. PMID: 20651342.
140. Dong J, Zhao Y, Huang Q, Fei X, Diao Y, Shen Y, Xiao H, Zhang T, Lan Q, Gu X. Glioma stem/progenitor cells contribute to neovascularization via transdifferentiation. *Stem Cell Rev Rep.* 2011 Mar;7(1):141-52. doi: 10.1007/s12015-010-9169-7. PMID: 20697979.
141. Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

2004 Sep 7;101(36):13291-5. doi: 10.1073/pnas.0405250101. Epub 2004 Aug 26. PMID: 15331785; PMCID: PMC516562.

142. Sellheyer K, Krahl D. Spatiotemporal expression pattern of neuroepithelial stem cell marker nestin suggests a role in dermal homeostasis, neovasculogenesis, and tumor stroma development: a study on embryonic and adult human skin. *J Am Acad Dermatol*. 2010 Jul;63(1):93-113. doi: 10.1016/j.jaad.2009.07.013. Epub 2009 Oct 27. PMID: 19864043.

143. Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987 May;8(3):138-40. German. PMID: 3303008.

144. Flørenes VA, Holm R, Myklebost O, Lendahl U, Fodstad O. Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res*. 1994 Jan 15;54(2):354-6. PMID: 8275467.

145. Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilková A, Brychta T, Hirnak J. Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol*. 2007 May;34(5):370-5. doi: 10.1111/j.1600-0560.2006.00627.x. PMID: 17448190.

146. Piras F, Perra MT, Murtas D, Minerba L, Floris C, Maxia C, Demurtas P, Ugalde J, Ribatti D, Sirigu P. The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma. *Oncol Rep*. 2010 Jan;23(1):17-24. PMID: 19956860.

147. Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2007 Jan;20(1):102-7. doi: 10.1038/modpathol.3800720. Epub 2006 Nov 24. PMID: 17143262.

148. Fusi A, Reichelt U, Busse A, Ochsenreither S, Rietz A, Maisel M, Keilholz U. Expression of the stem cell markers nestin and CD133 on circulating melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2011 Feb;131(2):487-94. doi: 10.1038/jid.2010.285. Epub 2010 Sep 30. PMID: 20882037.

149. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Inhibition of the stem cell marker nestin reduces tumor growth and invasion of malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 2013 May;133(5):1384-7. doi: 10.1038/jid.2012.508. Epub 2013 Feb 7. PMID: 23389394.

150. Misago N, Mori T, Narisawa Y. Nestin expression in stromal cells of trichoblastoma and basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Nov;24(11):1354-8. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03641.x. PMID: 20337823.

151. Abbas O, Bhawan J. Expression of stem cell markers nestin and cytokeratin 15 and 19 in cutaneous malignancies. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011 Mar;25(3):311-6. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03791.x. PMID: 20629844.

152. Sabet MN, Rakhshan A, Erfani E, Madjd Z. Co-expression of putative cancer stem cell markers, CD133 and Nestin, in skin tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(19):8161-9. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.19.8161. PMID: 25339000.

153. Sellheyer K, Krahl D. Does the peritumoral stroma of basal cell carcinoma recapitulate the follicular connective tissue sheath? *J Cutan Pathol*. 2011 Jul;38(7):551-9. doi: 10.1111/j.1600-0560.2011.01686.x. Epub 2011 Mar 2. PMID: 21366662.

154. Asada M, Schaart FM, de Almeida HL Jr, Korge B, Kurokawa I, Asada Y, Orfanos CE. Solid basal cell epithelioma (BCE) possibly originates from the outer root sheath of the hair follicle. *Acta Derm Venereol.* 1993 Aug;73(4):286-92. PMID: 7506469.
155. Krüger K, Blume-Peytavi U, Orfanos CE. Basal cell carcinoma possibly originates from the outer root sheath and/or the bulge region of the vellus hair follicle. *Arch Dermatol Res.* 1999 May;291(5):253-9. doi: 10.1007/s004030050405. PMID: 10367707.
156. Leblebici C, Bambul Sığircı B, Kelten Talu C, Koca SB, Huq GE. CD10, TDAG51, CK20, AR, INSM1, and Nestin Expression in the Differential Diagnosis of Trichoblastoma and Basal Cell Carcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2019 Feb;27(1):19-27. doi: 10.1177/1066896918781719. Epub 2018 Jun 25. PMID: 29938548.
157. Zhao H, Cao Y, Wang G, Luo Z. Expression of FOXC2, PinX1, Ki-67 and Cyclin D1 in cutaneous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2017 Jul;14(1):635-638. doi: 10.3892/ol.2017.6244. Epub 2017 May 24. PMID: 28693215; PMCID: PMC5494719.
158. Zduniak K, Agrawal S, Symonowicz K, Jurczyszyn K, Ziółkowski P. The comparison of nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate (NUCKS) with Ki67 proliferation marker expression in common skin tumors. *Pol J Pathol.* 2014 Mar;65(1):48-54. doi: 10.5114/pjp.2014.42669. PMID: 25119009.
159. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992 Jun 5;267(16):10931-4. PMID: 1375931.
160. Vieira SC, Zeferino LC, Da Silva BB, Aparecida Pinto G, Vassallo J, Carasan GA, De Moraes NG. Quantification of angiogenesis in cervical cancer: a comparison among three endothelial cell markers. *Gynecol Oncol.* 2004 Apr;93(1):121-4. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.01.033. PMID: 15047224.
161. Newell B, Bedlow AJ, Cliff S, Drysdale SB, Stanton AW, Mortimer PS. Comparison of the microvasculature of basal cell carcinoma and actinic keratosis using intravital microscopy and immunohistochemistry. *Br J Dermatol.* 2003 Jul;149(1):105-10. doi: 10.1046/j.1365-2133.2003.05325.x. PMID: 12890202.
162. Chin CW, Foss AJ, Stevens A, Lowe J. Differences in the vascular patterns of basal and squamous cell skin carcinomas explain their differences in clinical behaviour. *J Pathol.* 2003 Jul;200(3):308-13. doi: 10.1002/path.1363. PMID: 12845626.
163. Pastushenko I, Gracia-Cazaña T, Vicente-Arregui S, Van den Eynden GG, Ara M, Vermeulen PB, Carapeto FJ, Van Laere SJ. Squamous cell carcinomas of the skin explore angiogenesis-independent mechanisms of tumour vascularization. *J Skin Cancer.* 2014;2014:651501. doi: 10.1155/2014/651501. Epub 2014 May 6. PMID: 24891955; PMCID: PMC4033430.
164. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jun 19;94(12):883-93. doi: 10.1093/jnci/94.12.883. PMID: 12072542.
165. Kim HS, Kang HS, Messam CA, Min KW, Park CS. Comparative evaluation of angiogenesis in gastric adenocarcinoma by nestin and CD34. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002 Jun;10(2):121-7. doi: 10.1097/00129039-200206000-00005. PMID: 12051629.

166. Teranishi N, Naito Z, Ishiwata T, Tanaka N, Furukawa K, Seya T, Shinji S, Tajiri T. Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2007 Mar;30(3):593-603. PMID: 17273760.