

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

R A D O V I

KNJIGA XL

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 15.



Urednik

PAVEL ŠTERN,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO
1970

E. I. GRIN I MELITA SVOB

ISPITIVANJE VEZIVNOG TKIVA KOD KARCINOMA KOŽE

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 12. V 1970.)

Promjene vezivnog tkiva u karcinomu kože, koje bi mogle biti u vezi sa prodiranjem tumoroznih ćelija u okolinu, predmet su ispitivanja mnogobrojnih autora i one su pripisivane raznim faktorima, kao na primjer djelovanju inflamatornog infiltrata (18, 20), proteolitičkim enzimima (6, 23, 8. 46, 47), lučenju posebnih materija (»spreading«-faktor) tumoroznih ćelija (7, 21), djelovanju ultravioletnih zraka (42. 43) i drugim poznatim ili hipotetičkim faktorima.

Osim ovako pasivne uloge vezivnog tkiva, postoji koncepcija o aktivnom učešću vezivnog tkiva u stvaranju bilo benignih ili malignih tumora, koja je potkrijepljena nizom eksperimentalnih radova.

Transplantacija tumora (27, 50) pokazala je uzajamnu stimulaciju rasta tumoroznih ćelija, kao i ćelija vezivnog tkiva, a eksperimentalna karcinogeneza (5, 38) ukazuje na značajnu ulogu promjene vezivnog tkiva u stvaranju i širenju karcinoma kože. Kultura tkiva i transplantacija embrionalnog mezenhima zajedno sa tumoroznim ćelijama (51, 52) također dokazuju stimulativnu ulogu vezivnog tkiva, a eksperimentalna ispitivanja (49) pokazala su da je prisustvo vezivne strome neophodno za transplantaciju bazocelularnog epitelioma.

Kod benignih adneksalnih tumora kože, kao i u bazocelularnog epitelioma zadržava se, po pravilu, u manjoj ili većoj mjeri vrlo prisan, donekle uravnotežen, organoidni odnos epitelijalne i vezivne komponente tumora 25 (31—39), dok je u spinocelularnog karcinoma ovaj odnos vidno poremećen i dolazi do nekontrolisanog, destruktivnog rasta i metastaziranja tumora.

U ovome radu ispitivali smo histokemijske promjene vezivnog tkiva u bazocelularnog epitelioma i spinocelularnog karcinoma, te prekanceroza kože, s osobitim naglaskom na prisustvo kiselih mukopolisaharida vezivnog ili epitelijalnog porijekla. Korelirajući ove promjene sa tipom tumoroznog rasta, količinom inflamatornog infiltrata, stepenom aktiničnih promjena, očuvanjem ili novim stvaranjem vezivnog tkiva u okolini tumora, željeli smo da doprinesemo rasvjetljavanju problema odnosa tumoroznih ćelija kože i vezivnog tkiva.

MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

Materijal koji je obrađivan sakupljen je u toku posljednje tri godine u Zavodu za kožne i venerične bolesti »dr Simo Milošević« u Sarajevu, i sastojao se od:

- 194 bazocelularna epitelioma,
 - 91 spinocelularnog karcinoma i
 - 15 prekanceroza
- U tome materijalu bilo je:
- a) 280 solitarnih tumora;
20 multiplih tumora;
 - b) 190 muških i
110 ženskih pacijenata;
 - c) 93,4% lezija bilo je na glavi, a
6,6% na drugim dijelovima tijela;
 - d) 68,3% lezija trajalo je manje od godinu dana, a
31,7% više od godinu dana;
 - f) Starost pacijenata u vrijeme uzimanja biopsije:

Godine života	Procenat oboljelih
0—20 godina	0,42%
20—30 „	1,71%
30—40 „	12,76%
40—50 „	16,7 %
50—60 „	22,56%
preko 60 godina	46,38%

Od toga sa spinocelularnim karcinomom bilo je:

- a) 77 muških i
14 ženskih pacijenata;
- b) 61 lezija je bila na donjoj usni,
30 lezija na drugim lokalizacijama, pretežno na glavi;
- c) od 61 lezije na donjoj usni, 59 bilo je u muškaraca, a samo 2 u žena;
- d) od 30 lezija spinocelularnog karcinoma sa drugih dijelova tijela,
18 bilo je u muškaraca, a 12 u žena;
- e) prema anamnestičkim podacima, trajanje lezije do uzimanja biopsije bilo je u preko 50% do 6 mjeseci, u 99% do 1 godine, a preko 1 godine 1%.

Biopsije su neposredno nakon uzimanja fiksirane u 10% neutralnom puferiranom formalinu, uklopljene uobičajenom tehnikom u parafin i rezane serijski na 5—7 mikrona.

Primijenjene su slijedeće histološke i histokemijske metode:

Hematoksilin-eozin; Van Gieson za vezivno tkivo; Weigert resorcin fuksin za elastiku; Gomori impregnacija za retikulin, Snook impregnacija sama i u kombinaciji sa PAS-metodom i Kernechtrot-bojenjem za prikazivanje retikulina i bazalne membrane; Giemsa bojenje za ćelije; PAS-metoda (Mac Manus); PAS-metoda u kombinaciji sa Mayer-hemalumom, Alcian blau pH 2,5 i 0,4, koloidalnim željezom; PAS-metoda nakon digestije dijastazom (0,1% 1 sat na 37°C); PAS-metoda nakon blokade 5% phenylhydrazinom; Alcian blau pH 2,5 u fosfatnom puferu; Alcian blau pH 0,4 u fosfatnom puferu; Alcian blau nakon digestije hijaluronidazom (0,05% pH 5,5 na 37°C) i ribonukleazom (0,1% pH 6,8 na 37°C); Alcian blau nakon metilacije zakiseljenim metanolom, nakon metilacije i saponifikacije (sa KOH) i nakon sulfacije; Alcian blau u kombinaciji sa PAS-metodom i safranin-bojenjem; Hale koloidalno željezo (modificirana Rinerhartova, Abu Haj i Mowry-metoda) i u kombinaciji sa PAS-metodom, i Kernechtrot, Safranin i Hematoksilin-bojenjem; Hale nakon digestije hijaluronidazom i ribonukleazom; Aldchyd fuksin (modificirana Gomori-metoda) pH 1,7 i 0,4; toluidin blau metodom za metahromatiju pH 2,5 i 1,5.

Ovim metodama i njihovim pogodnim kombinacijama uspjeli smo izdiferencirati prisustvo slijedećih komponenata u vezivnom tkivu:

retikulin, kolagen, degenerirani kolagen, mladi kolagen, elastin, osnovnu supstanciju, ćelije vezivnog tkiva: fibrocite, fibroblaste, mast ćelije i histiocite; ćelije inflamatornog infiltrata; glikogen, neutralne polisaharide, kisele mukopolisaharide: hijaluronsku kiselinu, dermatan sulfat (chondroitin sulfat B), heparin, sialomucine; alfa, beta i gamma metahromatske supstancije; bazalnu membranu, ribonukleinsku kiselinu, različite tipove tumoroznih ćelija i njihovu sposobnost keratinizacije, odnosno diferencijacije.

HISTOLOŠKA I HISTOKEMIJSKA ANALIZA

Histološka i histokemijska analiza ispitnog materijala pokazala je da postoje različite karakteristike u bazo- i spinocelularnog karcinoma, kao i različit odnos prema vezivnoj stromi samog tumora i prema okolnom vezivnom tkivu. Osim toga, našli smo razlike u raznih tipova bazalioma kako u histokemijskim reakcijama, tako i u odnosu prema vezivnom tkivu.

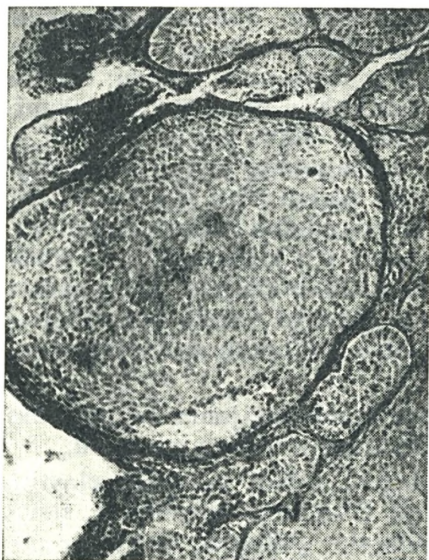
Analiza pojedinih komponenata vezivnog tkiva je pokazala:

1. Fibrozne komponente vezivnog tkiva

a) kolagena vlakna

U 90% ispitanih svih tumora nađena je aktinična elastoza. Ona je obično bila potisnuta na rubove lezije, ili je nađena između progredirajućih tumoroznih masa, a kod bazalioma kondenzirana cirkularno oko tumora (sl. 1). Od ovih promjena često je bio pošteđen samo uski rub

vezivnog tkiva neposredno ispod epidermisa, tzv. granična zona. I pored toga što gotovo cijeli dio kutisa može biti zahvaćen aktiničnom elastozom, ostaje u graničnoj zoni sačuvano i normalno (morfološki i tinktorijalno) vezivno tkivo. U našem materijalu mogli smo primijetiti da se tumorozno tkivo uglavnom širi u području aktinične elastoze, paralelno



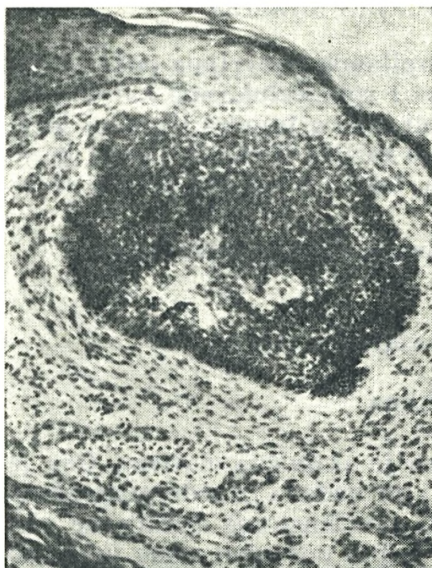
Slika 1.

Ostrva bazocelularnog epitelioma oko kojih se nalazi cirkularno rasporođeno, komprimirano vezivo aktinične elastoze. Weigert za elastično tkivo.

Basal cell epithelioma. Islands of tumour cells surrounded by circularly arranged actinic elastosis. Weigert.

sa epidermisom, i da ne prelazi kritičnu zonu normalnog veziva. Po pravilu se ne događa reinvazija epidermisa tumoroznim ćelijama koje su već jednom prodrle iz epidermisa u kutis ili se tamo razvile.

Destrukcija kolagena u okolini tumora opažena je u većem obimu u spinocelularnih negoli bazocelularnih tumora. Ove su promjene bile više



Slika 2.

Ostrvo bazalioma, još uvijek povezano sa epidermisom, koje je obavijeno mladim vezivnim tkivom cirkularnog rasporeda.

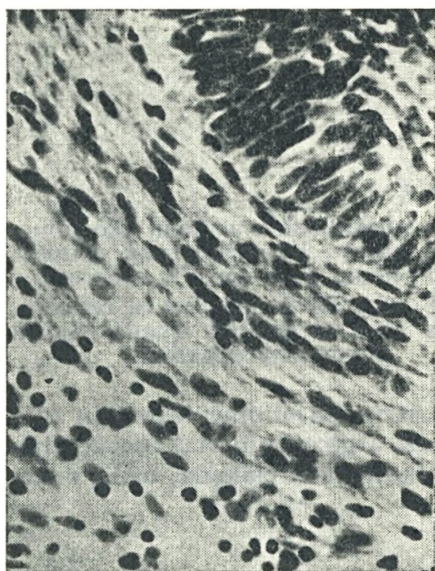
Hematoksilin — cozin.

Basal cell epithelioma. Tumour island connected with epidermis and embedded in young connective tissue. Hematoxylin-eosin.

izražene ukoliko je postojala jača inflamatorna reakcija. I tamo gdje nije više bilo inflamatornog infiltrata, kao što je u slučaju već napredovalih tumora sa relativno malo vezivnog tkiva, moramo pretpostaviti da je inflamatorni infiltrat postojao u ranijim fazama razvoja tumora.

Oko bazocelularnih epitelioma solidne građe, sa palisadnim perifernim rubom, obično smo nalazili širi ili uži rub cirkularno raspoređenih kolagenih vlakana sa brojnim vezivnim ćelijama vretenastog oblika (sl. 2 i 3). Tinkotrijalna i morfološka svojstva ovog vezivnog tkiva pokazivala su da se radi o relativno mladom vezivnom tkivu.

Međutim, u bazocelularnih epitelioma adenoidnog oblika mogla se opaziti vezivna stroma zajednička pojedinim adenoidnim grupacijama koje su obavijene cirkularnim vezivnim omotačem.



Slika 3.

Mlado vezivno tkivo cirkularnog rasporeda, izgrađeno od finih vezivnih vlakana i mnoštva vezivnih ćelija. Na slici se vidi palisadni rub ostrva bazalioma oko koga se ovo tkivo nalazi Hematoksilin-eozin.

Basal cell epithelioma. Young connective tissue with fine collagen fibers and many connective cells arranged in circular manner. Hematoxylin-eosin.

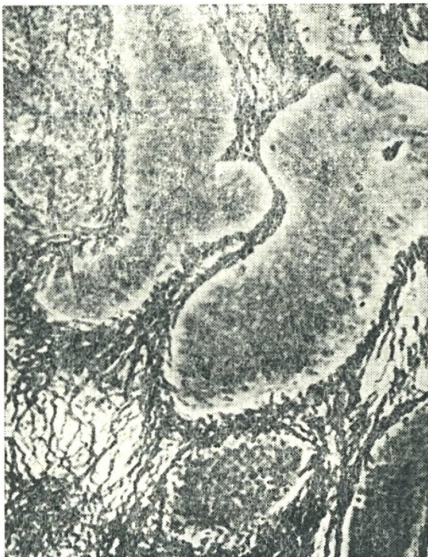
U slučajevima kada se tumorozne ćelije bazalioma u manjim ili većim, zbijenim skupinama probijaju između vezivnih vlakana i nemaju palisadnog ruba ni vezivnog omotača (skleroizirajući ili »morphea-like« tip bazalioma), a ne postoji ni inflamatorni infiltrat, nismo opazili ni razaranje vezivnog tkiva.

U cističnih oblika bazalioma obično se nalazi u centru tumoroznih ostrva raspadanuto vezivno tkivo bez osobitih morfoloških i tinktorijskih svojstava.

U spinocelularnog karcinoma mnogo teže se mogu pratiti promjene vezivnog tkiva i ono postoji u malom opsegu, a dominiraju spinocelularne, manje ili više diferencirane, ćelije karcinoma sa inflamatornim infiltratom. U polaganije rastućih spinocelularnih karcinoma, sa stvaranjem keratinskih perli, promjene vezivnog tkiva nisu bile jako razvijene, kao ni posebni omotač okolnog vezivnog tkiva.

b) Retikulinska vlakna

Metodama za prikazivanje retikulinskih vlakana na temelju njihove argirofilije (Gomori i Snook) ustanovili smo u bazocelularnih epitelioma kontinuiranu, bogatu mrežu argirofilnih vlakana koja dopire sve do samih granica tumoroznih ćelija, a u području bazalne membrane ona pokazuje naročiti raspored i kondenzaciju (sl. 4).



Slika 4.

Mreža retikulinskih vlakana oko tumoroznih ostrva bazocelularnog epitelioma. Snook, impregnacija srebrom.

Basal cell epithelioma. Net of reticular fibers around tumour islands. Snook silver impregnation.

U takvim preparatima tumorozna ostrva bazalioma izgledaju više kao šupljine ili svijetli prostori u toj mreži argirofilnih vlakana. Unutar tumoroznih ostrva nismo nalazili retikulinskih vlakana, osim pone-



Slika 5.

Ostrvo početnog bazalioma oko kojega nema elastičnih vlakana. U blizini ostrva vidi se intenzivno obojena vezivno tkivo ektinične elastoze. Weigert za elastično tkivo.

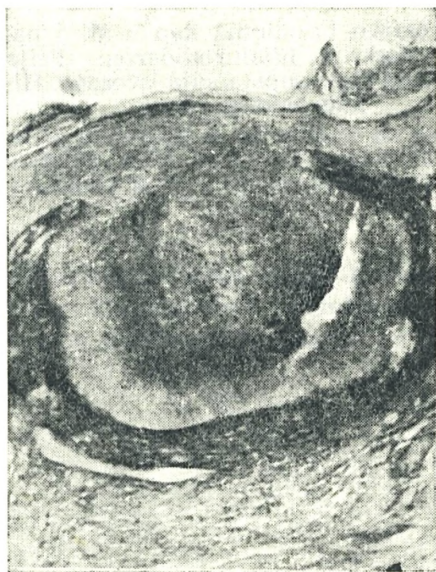
Incipient basal cell epithelioma with actinic elastosis and lacking normal elastic fibers. Weigert.

kad nekoliko fragmenata. U području aktinične elastoze uz normalna argirofilna vlakna mogu se vidjeti grublje i intenzivnije obojeni fragmenti vlakana.

Analizom cijelog materijala mogli smo utvrditi da je retikularno tkivo promijenjeno tumoroznim rastom ili inflamatornim infiltratom i da izgled kontinuirane i ujednačene mreže retikulinskih vlakana govori da se ne radi o novostvorenom tkivu .

c) Elastična vlakna

Bojenje elastičnih vlakana specijalnim metodama prikazali smo uz elastična vlakna i aktinično promijenjeni kolagen na rubovima lezija i između tumoroznih ostrva ispitivanih lezija. U samim ostrvima i u mladom vezivu oko njih nismo nalazili elastičnih vlakana (sl. 5). To govori ne samo o nedostatku zrelih elastičnih vlakana u okolini tumora, nego i o nepostojanju novostvorenih.



Slika 6.

Hale pozitivna supstancija u i oko ostrva bazocelularnog epitelioma Hale koloidalno željezo.

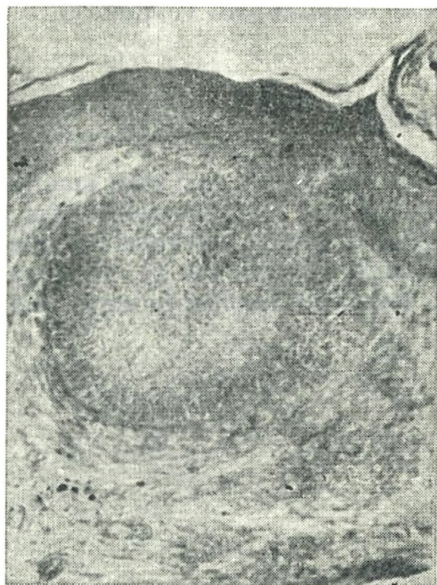
Hale positive material in connective tissue stroma within and around the basal cell tumour. Hale reaction.

2. Osnovna supstancija vezivnog tkiva

Analiza kiselih mukopolisaharida koji su glavni sastavni dio osnovne interfibrilarne vezivne supstancije pokazala je da se u najvećem broju slučajeva radi o povećanoj količini hijaluronske kiseline. Hijaluronsku kiselinu smo prikazivali bojenjem sa Alcian blau pH 2,5 i Hale koloidalnim željezom, a odstranjivali digestijom sa hijaluronidazom (sl. 6 i 7).

Hale-reakcija je bila intenzivnije izražena oko bazalioma adenoidne građe, kod kojih se nije nalazila samo oko tumora, već i u samoj stromi između tumoroznih ćelija. U ostalim oblicima bazalioma intenzivna Hale pozitivna reakcija vidjela se na područjima najvećeg prodiranja tumora.

U našim preparatima opazili smo da postoji razlika u distribuciji Hale pozitivne supstancije između bazocelularnog (sl. 6) i spinocelularnog karcinoma (sl. 8). U bazalioma se ta reakcija nalazi u vezivnoj stromi tumora i u vezivu neposredno oko tumora, dok se u spinocelularnih

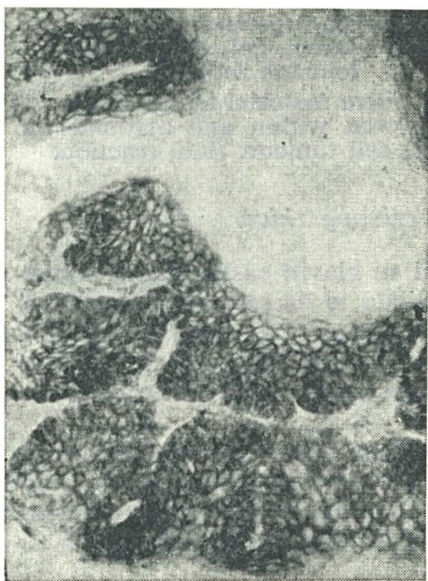


Slika 7.

Isto ostrvo bazalioma kao u sl. 6 nakon digestije hijaluronidazom. Prije pozitivna Hale supstancija iščezava. Hijaluronidaza, Hale.

The same tumour as in fig. 6, but after hyaluronidase digestion. Hale positive material dissapeared. Hyaluronidase, Hale.

karcinoma nalazi i intercelularnim prostorima samih tumoroznih ćelija u obliku tamnoplavo obojene mreže intercelularnih prostora, ali nedostaje u područjima keratinizacije, odnosno stvaranja keratinskih perli i diskeratoze.



Slika 8.

Hale pozitivna supstancija u intracelularnim prostorima ćelija spinocelularnog karcinoma u obliku mreže. U području keratinizacije supstancija nedostaje. Hale reakcija.

Squamous cell carcinoma. Net like Hale positive material within intercellular spaces of epidermal cells.

I u prekanceroza u hiperplastičnom epidermisu smo nalazili povećanu količinu Hale pozitivne materije u intercelularnim prostorima. Digestija sa hijaluronidazom je pokazala da se radi o hijaluronskoj kiselini, ali postoji mogućnost postojanja i drugih materija u intercelularnim prostorima.

Bojenje sa Alcian blau pH 2,5 nakon digestije hijaluronidazom pokazuje da ostaju reaktivni zidovi krvnih sudova, mast ćelije i dijelovi strome, osobito u adenoidnih bazocelularnih epitelioma. U području aktinične elastoze takođe se reakcija ne odstranjuje digestijom sa hijaluronidazom, te se, prema tome, radi o drugim supstancijama, osim hijaluronske kiseline (sl. 9).

Bojenje sa Alcian blau pH 0,4 pokazalo je da ostaju pozitivni mast-ćelije, zidovi krvnih sudova, ponešto papile dlaka, cistični prostori bazalioma i područje aktinične elastoze (sl. 10).



Slika 9.

Područje aktinične elastoze sa Hale pozitivnom i na hijaluronidazu rezistentnom materijom. Hijaluronidaza, Hale. Hale positive material after hyaluronidase digestion in areas of actinic elastosis. Hyaluronidase, Hale.

Količina i distribucija Hale pozitivne i Alcian blau pH 2,5 pozitivne supstancije nisu bile paralelne u našem materijalu.

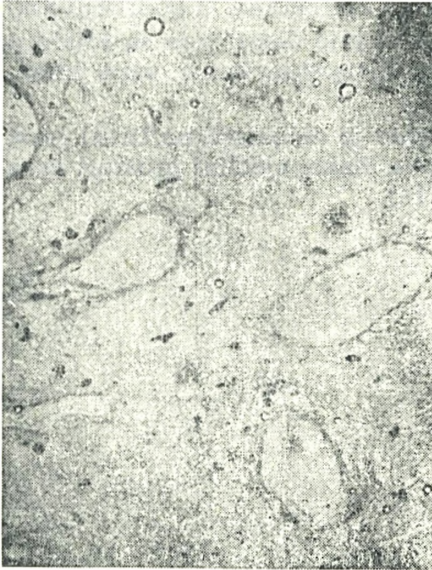
Metodom metilacije koja blokira alcianofiliju sulfatnih i karboksilnih grupa, praćenu saponifikacijom koja obnavlja samo alcianofiliju karboksilnih grupa, mogli smo utvrditi prisustvo sialomucina u područjima strome bazalioma sa adenoidnim rasporedom ćelija.

Metodom sulfacije kojom se blokiraju sulfatne grupe također smo ustanovili prisustvo nesulfatnih polisaharida koji nisu hijaluronska kiselina, i koji najvjerojatnije predstavljaju sialomucine. Ovo nam je potvrdila i paraldehyd fuksin pH 1,7 pozitivna reakcija.

Metodom toluidin blau pH 2,5 i 1,5 ustanovili smo prisustvo metahromatičnih supstancija u okolini tumoroznih ostrva bazalioma. Ova metahromazija je varirala od skupine do skupine tumoroznih ćelija i prema broju mast-ćelija koje su također bile gama-metahromatične.

3. Čelije vezivnog tkiva

Postoji jaka proliferacija fibroblasta u neposrednoj blizini, a katkada i dodirujući tumorozne ćelije. Tamo gdje postoji cirkularni periferni omotač vezivnog tkiva, vezivne ćelije su također cirkularno raspoređene (sl. 3). I u područjima inicijalne proliferacije tumoroznih ćelija,



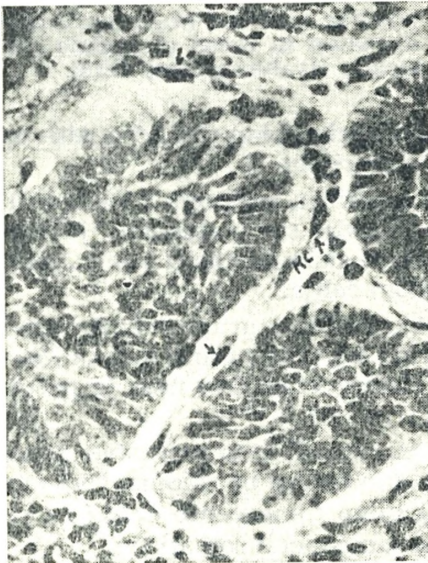
Slika 10.

Bazocelularni epiteliom. Alcian blau pH 0,4, prikazuje samo mukopolisaharide u mast ćelijama i zidu krvnih sudova. Alcian plavilo u fosfatnom puferu pH 0,4.

Basal cell epithelioma. Alcian blue pH 0,4 positive material found only in mast cells and walls of the vessels. Alcian blue.

osobito u stvaranju multiplih tumora, nalazi se u gornjem kutisu povećan broj vezivnih ćelija, najčešće difuzno razbacanih.

I broj mast-ćelija je povećan u području tumoroznog rasta bazalioma. One se mogu naći difuzno raspoređene ili u bliskom odnosu sa tumor-



Slika 11.

Mast ćelije u neposrednoj blizini tumoroznih elija bazocelularnog epitelioma. Giemsa bojenje.

Mast cells (MC) close to tumour cells of epithelioma basocellulare. Giemsa.

roznim ćelijama (sl. 11). Ovo se osobito dobro zapaža kod bazalioma izgrađenih od malih okruglih ostrva gdje i čine granicu između ostrvâ. Ukoliko postoji jaka inflamatorna reakcija, ćelije infiltrata potiskuju mast-ćelije na periferiju ili se sa njima izmiješaju.

U spinocelularnih karcinoma može se također naći povećan broj mast-ćelija, ali nismo opazili i njihovu posebnu relaciju sa tumoroznim ćelijama.

4. Bazalna membrana

Bazalna membrana, koja se prikazuje PAS-metodom, rezistentna je na diastazu i boji se Snookovim srebrnim bojenjem (sl. 4). Ona nedostaje na mjestima invazije tumora, na mjestima intenzivne inflamatorne reakcije i u tipovima bazalioma gdje nema palisadnog ruba i vezivnog omotača. U slučajevima arteficialnog odvajanja ostrva bazalioma od okolnog tkiva bazalna membrana ostaje uz tumorozne ćelije.

U našim preparatima nismo mogli pratiti rane promjene na bazalnoj membrani, ali smo stekli utisak da je za razaranje bazalne membrane, osim tumoroznih ćelija, od velike važnosti i inflamatorni infiltrat. Pošto se u našim preparatima gotovo uvijek radilo o stadijima tumora koji su imali već izraženu inflamatornu reakciju, ili su prošli kroz tu fazu, nismo mogli pratiti ulogu bilo tumoroznih, bilo inflamatornih ćelija u razaranju bazalne membrane.

5. Tumorozne ćelije

U analizi histoloških preparata sa dijagnozom bazocelularnog epitelioma vrlo često se moglo vidjeti i prisustvo ćelija tipa spinocelularnog karcinoma, koje bi, posmatrane izolirano, nužno bile klasificirane kao ćelije spinocelularnog karcinoma koje nisu dovoljno diferencirane.

Osim toga, u nekoliko tumora opazili smo izrazitu kombinaciju spinocelularnog i bazocelularnog karcinoma u istom preparatu. U takvim slučajevima obično u gornjim dijelovima tumora, povezanim sa epidermisom, ćelije tumora imaju karakteristike spinocelularnog karcinoma, dok se u dubljim dijelovima tumora nalazi tipična slika bazalioma. Ove promjene ne bi se mogle protumačiti ni kao pseudoepitelijalna hiperplazija, niti kao sekundarni spinocelularni karcinom.

U 90% analiziranih bazalioma mogli smo utvrditi u istom preparatu različite oblike bazalioma: od solidnog i adenoidnog do cističnog. Čak i inicijalni bazaliomi pokazivali su sklonost istovremene diferencijacije u adenoidne ili solidne, odnosno abortivne adneksalne strukture.

Često se na rubovima solidnih ostrva počinju stvarati trake adenoidnih formacija koje proliferiraju u okolno tkivo.

Od analiziranih kiselih mukopolisaharida izdiferencirali smo prisustvo hijaluronske kiseline, chondroitin sulfata B (dermatan sulfata), heparina i sijalomucina. Od ovih supstancija samo se nesulfatni sijalomucini mogu smatrati proizvodom epitelnih tumoroznih ćelija. Oni su prisutni u povećanoj količini kod adenoidno raspoređenih bazalioma.

I Hale pozitivna supstancija u intercelularnim prostorima, koja se ne odstranjuje hijaluronidazom, vjerojatno je proizvod samih epitelnih ćelija.

PAS-reakcija je bila često pozitivna u ostrvima bazalioma bilo solidnog, adenoidnog, ili cističnog oblika tumora. Ova je reakcija bila slabije izražena kod manje diferenciranih bazalioma.

Osim različitog oblika strukture tumoroznih ćelija bazalioma, mogli smo zapaziti da postoji različit stepen njihove diferencijacije i odnosa prema vezivnom tkivu i inflamatornom infiltratu unutar istih lezija.

6. Inflamatorni infiltrat

Intenzitet inflamatornog infiltrata varirao je od preparata do preparata i unutar istih lezija. Nismo mogli uočiti direktnu korelaciju između intenziteta inflamatornog infiltrata i invazivnosti tumora. Oko zao kruženih ostrva bazalioma bilo je manje inflamatorne reakcije, a više proliferacije vezivnog tkiva. Da li su inflamatorna reakcija i proliferacija vezivnog tkiva samo sukcesivne faze u defanzivnom mehanizmu i koja faza prethodi jedna drugoj, nismo mogli ustanoviti. U našem materijalu često smo opažali i u incijalnih i intraepidermalnih karcionoma da jednom dolazi više do inflamatorne, a drugi put do vezivnotkivne proliferacije.

U inflamatornom infiltratu najčešće su bili prisutni mali limfociti, histociti i plazma ćelije, dok su polimorfonuklearne i eozinofilne ćelije opažene više kod onih tumora koji su bili sekundarno inficirani.

Bojenje Gimzom je pokazalo povećan broj mast-ćelija, a Alcian plavilo koje veže i nukleinske kiseline otkrilo je različitu količinu i DNA i RNA u tumoroznim i inflamatornim ćelijama. Osobito metahromatskim bojenjem toluidin-plavilom mogla se vidjeti intenzivna gama-metahromazija mast-ćelija i beta-metahromazija ćelija infiltrata, koja je bila nejednolično raspoređena. Ovo ukazuje da se i u tzv. mononuklearnom, okruglo ćelijskom infiltratu oko tumora nalazi više vrsta ćelija, koje se običnim metodama ne mogu razlikovati.

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Promjene vezivnog tkiva u karcinoma kože, koje su opisane u literaturi, mogu se opaziti i u drugim raznim oboljenjima. Tako se, na primjer u buloznih dermatoza (Braun-Falco (8) nalazi povećana količina proteolitičkih enzima, u inflamatornih procesa razne geneze dolazi do razaranja veziva, u degenerativne atrofije (Zambal (54) nalaze se: povećana količina retikularnih vlakana, nedostatak stvaranja elastičnih vlakana i povećana količina osnovne supstancije. U eksperimentalnoj karcinogenezi (Dobson i Graffin (17) dolazi do razaranja veziva i akumulacije kiselih mukopolisaharida, a slične promjene opažene su i kod aktinične elastoze (Smith (44).

Ako se usporede bazaliomi s obzirom na ekspaniranost sunčanom zračenju onog dijela tijela gdje su se pojavili (Sams, Smith i Finlayson (41), zapaža se da ne postoji razlika što se tiče argirofilnih vlakana, dok se kiselih mukopolisaharidi u bazalioma nalaze u većoj količini sa ekspo-

niranih dijelova tijela, a elastična vlakna nedostaju u neeksponiranim dijelovima.

Mehregan, Staricco i Pinkus (29) u 5% ispitivanih bazalioma, bez obzira na lokalizaciju, nalaze neogenezu elastičnih vlakana, a Rudner, Mehregan i Pinkus (40) nalaze ovu pojavu u 9% bazalioma sa neeksponiranih dijelova tijela.

U našem materijalu nismo zapazili da dolazi do neogeneze elastičnih vlakana.

Argirofilna vlakna oko tumora kože opisana su u eksperimentalnoj karcinogenezi, u hidroadenomu. Sams, Smith i Finlayson (41) nalaze ih u bazocelularnom epiteliumu, a opisali su ih i Mehregan, Staricco i Pinkusa (29) u stromi bazalioma, kao i mnogi drugi autori. Većina ih smatra da se radi o novostvorenom, mladom kolagenu, nastalom kao rezultat fibrocitne proliferacije. Robb-Smith, međutim, vjeruje da postoje dva tipa retikulina: mladi u regeneraciji i zreli u papilarnom sloju normalne kože.

Naš nalaz kontinuirane, uniformne retikulinske mreže u lezijama bazocelularnog epiteliuma govori da se ne radi o novostvorenom kolagenu. Ova retikulinska mreža ne prati gusto i cirkularno poredana mlada vezivna vlakna oko tumoroznih ostrva, niti je gušća u područjima veće koncentracije vezivnih ćelija.

Najveće promjene u našim ispitivanjima uočene su u zrelom kolagenom tkivu, koje, s jedne strane, podliježe razaranju, a s druge strane — ubranom stvaranju novog tkiva proliferacijom fibroblasta. Razaranje vezivnog tkiva je veće pri intenzivnijoj inflamatornoj reakciji, ili nakon što je inflamatorna faza već prošla. U početnih bazalioma, ili bazalioma koji pokazuju tendenciju daljeg prodiranja, bez obzira na prisustvo ili odsustvo infiltrata, nalazili smo aktivaciju i proliferaciju fibroblasta i stvaranje novog vezivnog tkiva.

Poznata je činjenica da fibroblasti, osim u procesima sinteze svih fibrilarnih komponenata vezivnog tkiva (retikulinskih, kolagenih i elastičnih vlakana), učestvuju i u stvaranju dijela osnovne supstancije (hijaluronska kiselina, chondroitin sulfat B i drugi kiseli mukopolisaharidi). Smatra se, međutim, da fibroblasti, osim stvaranja, sudjeluju i u procesima razaranja i remodeliranja vezivnog tkiva. Postoji obratna korelacija između stvaranja fibrilarnih komponenata vezivnog tkiva i mukopolisaharida, i kada se smanjuje količina kolagena, raste proizvodnja kiselih mukopolisaharida (npr. u aktiničnoj elastozi). Ove promjene u odnosu produkcije vezivnog tkiva opažaju se ne samo u stvaranju tumora kože i sličnim procesima (procesima regeneracije, cikličkim promjenama dlačnog folikula i drugim prilikama), već i u embrionalno doba (Pinkus (33,37).

Prema tome, stimulans za proliferaciju vezivnog tkiva može biti različit. Među ostalim faktorima to može biti i uticaj epitelijalnih struktura, odnosno njihovih tumora. Odnos između epitelijalnih i mezenhimalnih komponenata je reverzibilan i smatra se da sazrijevanje vezivnog tkiva djeluje inhibitorno na epidermalnu proliferaciju (Dobson i Griffin).¹⁷

I mast-ćelije utječu na formiranje vezivnog tkiva izlučivanjem produkata kojima direktno ili indirektno djeluju na viskozitet i permeabi-

litet vezivnog tkiva, ali i stvaranjem nekih komponenata interfibrilarne supstancije (sulfatnih mukopolisaharida (Asboe Hansen (2, 3).

Povećan broj mast-ćelija u kožnih tumora zabilježen je i od strane drugih autora. Značenje ovog povećanja se različito tumači, među ostalim, inhibitornim djelovanjem na rast tumora. Tako je Fisher opazio inhibitorno djelovanje heparina na kulturu tkiva. Goerner na smanjen rast karcinoma, a Zakerzewski⁵⁵ na rast tkiva smanjenjem broja mitoz. Balasz i Holmgren (4) su našli da ne samo heparin, već i drugi sulfatni polisaharidi, kao hondroitin, sumporna kiselina i dr., djeluju inhibitorno na rast embrionalnih i tumoroznih ćelija.

Naši nalazi prisnog međusobnog odnosa mast-ćelija i tumoroznih ćelija u onih oblika bazalioma gdje nema izrazite tendencije invazivnosti i gdje je, izgleda, postignuta ravnoteža između tumora i okolnog tkiva govore u prilog takve defanzivne uloge mast-ćelija.

Promjene vezivnog tkiva u odnosu na smanjenje kolagena i povećanje kiselih mukopolisaharida opažene su kod aktinične elastoze (Smith i sur. (44) i kod eksperimentalne karcinogeneze (Dobson i Griffin (17), Orr (38). To govori u prilog pretpostavci da su te promjene bile izazvane ranije, a ne neposrednim djelovanjem tumoroznog tkiva na kutis. Međutim, kao specifično djelovanje epitelijalnih tumora mogla bi se smatrati njihova sposobnost indukcije mezenhimalne proliferacije koja rezultira u stvaranju novog vezivnog tkiva. Ova sposobnost naročito se očituje kod bazocelularnih epitelioma i može se pretpostaviti da dok postoji ravnoteža između epitelijalne i mezenhimalne komponente, invazivnost tumora je inhibirana. Međutim, u spinocelularnog karcinoma, ukoliko je moguće i postojala u početku ravnoteža između proliferacije epitela i veziva, ona se vrlo brzo gubi, možda čak i prije same invazije u kutis.

Postojanje ili razaranje bazalne membrane, koju mnogi autori smatraju osobito važnom u prodiranju tumora (Cawley (14, 15), Dobson i sur. (16, 17), Braun—Falco (10, 11) i drugi), moguće da je sekundarne prirode kao posljedica poremećenih odnosa epitela i veziva. Destrukciju bazalne membrane nalazimo i u drugih, osobito buloznih i inflamatornih oboljenja.

Kobayasi (26) opisuje na osnovu elektronsko-mikroskopskih ispitivanja prodiranje citoplazmatskih produžetaka karcinomskih ćelija na mjesto dislokacije bazalne membrane. Ovi produžeci karcinomskih ćelija prodiru duboko u kutis duž elastičnih vlakana, dok se sama ćelija još uvijek nalazi unutar epidermalnih granica. Ovaj podatak govori da je invazija kutisa započela ranije nego što se to običnim mikroskopskim preparatom može utvrditi, bez obzira što bazalna membrana izgleda intaktna. U svjetlu ovih činjenica bilo bi potrebno da se revidiraju terminologija i značaj tzv. »intraepidermalnog karcinoma«.

Analiza kiselih mukopolisaharida u našem materijalu je pokazala, osim sulfatnih mukopolisaharida i hijaluronske kiseline, da se kod adenoidnih oblika nalazi i sialomucin.

S obzirom da se smatra da epitelijalne sialomucine mogu izlučivati samo ćelije sa žljezdanom diferencijacijom, bez obzira na njihovu vrstu, neki autori čak smatraju (Johnson i Helwig (24) da njihovo prisustvo

pomaže u razlikovanju metastaza adenokarcionoma u koži od adenoidnih diferencijacija bazalioma, što se prema našim nalazima ne može prihvatiti.

Prema našem materijalu, prisustvo sialomucina treba tumačiti kao odraz pluripotencijalne sposobnosti matičnih epidermalnih i adneksalnih ćelija koje se mogu i postembrionalno razviti u različite, manje ili više sazrele, adneksalne strukture.

U prilog tome govori i istovremeni nalaz različitog načina organiziranja ćelija bazocelularnog epitelioma, tako da se istovremeno može opaziti adenoidni, solidni, cistični ili abortivni adneksalni oblik. Ovakova morfološka raznolikost vrlo vjerovatno je u međusobnom odnosu sa različitom količinom i sastavom izlučenih mukopolisaharida, kao i sa različitom inflamatornom i vezivnotkivnom reakcijom.

Može se pretpostaviti da ne samo urođena ekvi- i pluripotencijalna svojstva epidermalnih ćelija igraju određenu ulogu u nastajanju i širenju tumora kože, nego i njihov međusobni odnos sa promjenama vezivnog tkiva.

Pretpostavljamo da aktinična elastoza (o čemu govori i postojanje granične zone ispod epidermisa) dovodi ne samo do ireverzibilnih promjena fibroznih i drugih ekstracelularnih komponenata vezivnog tkiva, već i do promjena funkcije vezivnih ćelija, koje nisu više u mogućnosti da stvaraju odgovarajuće komponente vezivnog tkiva u fiziološki normalnim odnosima.

Na osnovu naših mnogobrojnih histokemijskih nalaza — koji pokazuju da postoji razlika u rasporedu Hale pozitivne supstancije između bazocelularnog epitelioma i spinocelularnog karcinoma, ali da nisu nađene signifikantne razlike u PAS-pozitivnoj reakciji između ovih tumora, kao i na osnovu utvrđenog prisustva sialomucina u adenoidnim oblicima bazocelularnog epitelioma, mijenja se u izvjesnoj mjeri dosadašnje tumačenje ovih reakcija kao sredstva za diferenciranje pojedinih oblika i vrsta kožnih karcinoma.

Postojanje spinocelularne diferencijacije u izvjesnom broju bazalioma, kao i kombinacija bazocelularnog epitelioma i spinocelularnog karcinoma u istoj leziji govore da histogenetski ne postoje razlike između ove dvije vrste tumora, već da se osnovna razlika nalazi, kako je to i Pinkus (25, 31—37, 39) sa saradnicima ukazao, u odnosu ovih tumora prema vezivnoj stromi.

E. I. GRIN AND M. ŠVOB

INVESTIGATIONS ON CONNECTIVE TISSUE IN CARCINOMAS OF THE SKIN

SUMMARY

Histological and histochemical investigations relating connective tissue have been carried out on 300 biopsies of squamous cell carcinomas, basal cell epitheliomas and praecancerous tumors of the skin.

The connective tissue of the investigated tumors displayed changes on elastic fibers, collagen and the ground substance.

The elastic fibers are showing destruction but no formation of new fibers could be seen.

The most extensive changes are found on mature collagen in basal cell epitheliomas which demonstrate on one side destruction and on the other intensive formation of young mesodermal cells with production of new collagen fibers, which are in close contact with the cells of the tumor with increased numbers of mast cells around them.

Reticulum fibers seem not to be destroyed in basal cell epitheliomas.

In the ground substance from the acid mucopolysaccharides increased is hyaluronic acid and in some types of basal cell epitheliomas also chondroitin sulphate B could be demonstrated.

In adenoid basal cell epithelioma also epithelial type of sialomucin could be found which is considered to be encountered in metastatic adenocarcinomas in the skin.

It is supposed that the pathological differences between squamous cell carcinoma and basal cell epithelioma are not related so much to the histogenetic factors involved but rather as the sequel of different relationships to the connective tissue.

The PAS positive diastasa removable material could be found more or less in both squamous cell carcinomas and basal cell epitheliomas. Consequently this reaction appears not be reliable for their differentiation.

There are distinctive differences in location of the Hale positive material between the squamous cell carcinomas and basal cell epitheliomas.

In basal cell epithelioma the Hale positive material is formed in the stroma of the tumor and in squamous cell carcinomas predominantly in the intercellular spaces of the tumor cells forming a fine blue stained net. Similar Hale positive net could be observed in the hyperplastic epidermis in precancerous conditions of the skin.

LITERATURA

1. Argyris T. S. and Argyris B. F.: Cancer Research, 22, 73, 1962.
2. Asboe-Hansen G.: Acta Derm. Venereol. 49, 1, 1969.
3. Asboe-Hansen G.: Connective tissue in health and disease, Copenhagen 1954.
4. Balasz A. und H. Holmgren: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. 72, k 42, 1949.
5. Bereblum I.: Carcinogenesis and tumor Pathogenesis. In Greenstein J. P. (ed) Advances in Cancer Research. Vol. II, pp 135, Academic Press, New York 1954.
6. Bierich R.: Klin. Wschr. 6, 1599, 1927.
7. Boyland E. and Mc Clean D.: J. Path. Bact. 51, 553, 1935.
8. Braun—Falco O.: Histochemical demonstration of LAP in normal and pathological skin. J. Cytochem. Histochem. 5, 94, 1957.
9. Billingham R. E. and W. K. Silvers: Mesodermal factors in maturation and proliferation of epidermis. XII Int. Congress of Derm. Excerpta medica 52.
10. Braun—Falco O.: VII Brown Univ. Sympos. »The biology of the Skin« Providence, R. I. (USA) 1958.
11. Braun—Falco O.: Arch. klin. exp. Derm. 206, 320, 1957.

12. Burstone M. S.: Enzyme Histochemistry and its application in the study of neoplasm. Bethesda/Maryland 1962.
13. Bereblum and Shubik: Brit. J. Cancer, 1, 383, 1947.
14. Cawley E. P. et. all.: Arch Derm. 97, 78, 1968.
15. Cawley E. P., Hsu Y. T., and Weary P. E.: Arch. Derm. 94. 712, 1966.
16. Dobson R. L.: J. Invest. Derm. 41, 475, 1963.
17. Dobson R. L. and Griffin M.: The histochemistry of cutaneous carcinogenesis. J. Invest. Derm. 39, 579, 1962.
18. Fisher B.: Münch. med. Wschr. 53, 2041, 1906.
19. Foulds L.: Some problems in differentiation and integration in neoplasia. In Biological organization at cellular and supercellular level.
20. Garschin W. G.: Arch. Biol. Nauk. 27, 101, 1927.
21. Gluzman F. A.: Medicinski journal, 20, 63, 1950.
22. Greene H. S. N.: Cancer Res, 9, 728, 1949.
23. Gopal—Ayengar A. R. and Sompson W. L.: Cancer Res. 7. 727. 1947.
24. Johnson W. C. and Helwig. E. B.: Ann. Acad. Sci. 106, 794, 1963.
25. Kligman A. M. and Pinkus H.: Arch. Derm. 81, 922, 1960.
26. Kobayasi T.: Acta Dem. Ven. 49, 5, 445, 1969.
27. Leighton J.: Cancer Res, k7, 929, 1957.
28. Ma, C. K.: Cancer Res. 9, 481, 1949.
29. Mehregan A. H., R. G. Staricco and H. Pinkus: Arch. Derm. 89, 33, 1964.
30. Montagna W.: The Structure and Function of Skin, Ed. 2, New York Acad. Press, 1962.
31. Pinkus H.: Biologic aspects of epidermal carcinoma. Proceedings of the 4 th National Cancer Conference, pp. 609, 1960.
32. Pinkus H.: Arch. Derm. 91, 46, 1965.
33. Pinkus H. The biology of hair growth. In Montagna W. and Ellis R. A. Academic Press, 1959.
34. Pinkus H.: Pathogenesis of premalignant and malignant conditions of the skin. I: Human integument: normal and abnormal, American association for Advancement of Science, Symp. of skin, Indianapolis, 1957.
35. Pinkus H.: The role of the mesoderm in Basaliomas. XIII. Congress Internat. Derm., München 1967.
36. Pinkus H.: Adnexal tumors, benign, not so bening and malignant. From: Advances in biology of skin. Vol. VII. Carcinogenesis, 1966.
37. Pinkus H.: Embriology of hair. In: The Biology of hair growth. Ed. by Montagna W. and Ellis R. Academic Press New York 1958, pp. 1.
38. Orr J. W.: The role of stroma in cutaneous carcinogenesis. In: Advances in biology of skin. Vol. VII. Carcinogenesis. W. Ellis R. Montagna and Ellios R., Pergamon Press, 1966.
39. Pinkus H.: Histogenesis of skin cancer. In Proceeding of the 12 the Int, congress of Dermatology, Washington, D. C. Excerpta Medica Int. Congress series № 55, 281, 1962.
40. Rudner E. J., Mehregan A. H. and Pinkus H.: Invest. Derm, 45, 70, 1965.
41. Sams W. M. Jr., Smith J. G. Jr. and Finlayson G. R.: J. Invest, Derm. 41, 457, 1963.
42. Smith. J. G. et all: J. Invest. Derm. 39, 3, 47, 1962.
43. Raab W.: Klin. exp. dermat. 234, 36, 1964.
44. Smith J. G., E. A. Davidson and R. W. Taylor: The effects of age and chronic sun damage: In: Aging VI. Montagna W. Advances in biology of skin pp 221.

45. Steingleder G. K. and Kamei Y.: Arch, klin. exp. Derm. 217, 457, 1963.
46. Sylven B. and Malmgren H.: Acta Radiol. (Stock) Supp 154, 1957.
47. Sylven B. and Holmgren: Exp. Cell Res. 8, 575, 1955.
48. Simpson W. L.: Ann N. Y. Acad. Sci. 52, 1125, 1950.
49. Van Scott E. J. and Reinertson R. P. J. Invest. Derm. 36, 102, 1961.
50. Vasiliev J. M.: Brit. J. Cancer. XII., 524, 1958.
51. Wolff. E. and Wolff E.: C. R. Acad. Sci. Paris, 246, 116, 1958.
52. Schleich. A.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 63, 849, 1956.
53. Zackheim H. S.: J. Invest. Derm. 38, 57, 1962.
54. Zambal Z.: Histokemijska istraživanja kože sa posebnim osvrtom na retikulin, Jug., akad. znan. i umj., Zagreb 1966.
55. Zakerzewski H.: Zschr. Krebsforsch. 36, 513, 1932.

