

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАСТАЗОВ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

Рева И.В.^{1,2}, Горькая А.Ю.¹, Валькович Э.И.³, Кожухарь В.Г.³, Фисенко А.Ю.⁴, Одинцова И.А.⁵, Верин В.К.⁶, Гордзиевская Я.В.¹, Калинин И.О.¹, Лукашук С.А.¹, Гармаш А.И.¹, Слесаренко М.В.¹, Волков А.Е.¹, Рева Г.В.^{1,2}.

¹ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, e-mail: RevaGal@yandex.ru

²Международный Медицинский Научно-образовательный Центр, (Ниигата, Япония, avers2@yandex.ru

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, e-mail: v.kojukhar@yandex.ru

⁴ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», Владивосток, e-mail: blood416@mail.ru

⁵Санкт-Петербургская военная медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, e-mail: odintsova.ia@yandex.ru

⁶ФГБОУ ВО Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ), Санкт-Петербург, e-mail: vladimir.verin@spbmapo.ru

Резюме. Меланома является наиболее агрессивной опухолью из всех существующих, рано метастазирует, иногда минуя регионарные лимфоузлы. Механизмы метастазирования на современном этапе неизвестны, ведётся поиск сигнальных молекул, являющихся мишенями для запуска малигнизации, дифференцировки и миграции опухолевых клеток. В литературе имеется множество работ, посвященных выявлению метастазов в органах, удаленных от первичных опухолей. Как правило, метастазы выявляются на фоне яркой клинической картины, связанной с нарушением функции органов. Чтобы понять механизмы метастазирования, необходимо изучить картину ключевых морфологических изменений тканей органов с метастазами. Изучение отдаленных метастазов меланомы кожи показало наличие в органах кроме типичного инфильтрата раковых клеток, идентификацию множества клеток, содержащих в цитоплазме пигментные включения. Предложены два возможных варианта появления клеток с пигментом. Первый вариант является следствием миграции меланобластов из зоны первичной малигнизации. Второй вариант, возможно, связан с дифференцировкой местных соединительнотканых клеток в пигмент накапливающие клетки вследствие фагоцитоза, или секретирующие самостоятельно под воздействием неизвестных факторов. Выявление причин процессов индукции на дифференцировку плюрипотентных клеток, как в первичных опухолях, так и в метастатических, лежит в основе выяснения механизмов малигнизации.

Ключевые слова: меланома, онкогенез, малигнизация, миграция, метастазы, гемопоз, ангиогенез, меланогенез, эндотелий, стволовые клетки, дифференцировка, факторы роста

MORPHOLOGICAL FEATURES OF METALASTASES OF MELANOMA

Reva I.V.^{1,2}, Gorkavaya A.Yu.¹, Valkovich E.I.³, Kozhukhar V.G.³, Fisenko A.Yu.⁴, Odintsova I.A.⁵, Verin V.K.⁶, Gordzиеvskaya Ya.V.¹, Kalinin I.O.¹, Lukaschuk S.A.¹, Garmash A.I.¹, Slesarenko M.V.¹, Volkov A.E.¹, Reva G.V.^{1,2*}.

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: RevaGal@yandex.ru;

² International Medical Research and Education Center, Niigata, e-mail: avers2@yandex.ru;

³St Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, e-mail: v.kojukhar@yandex.ru

⁴Pacific State Medical University, Vladivostok e-mail: blood416@mail.ru

⁵S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg e-mail: odintsova.ia@yandex.ru

⁶ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, e-mail: vladimir.verin@spbmapo.ru

Summary Melanoma is the most aggressive tumor of all existing, early metastasizes, sometimes bypassing the regional lymph nodes. The mechanisms of metastasis at the present stage are unknown; a search is under way for signaling molecules that are targets for triggering malignancy, differentiation and migration of tumor cells. In the literature there are many works devoted to the identification of metastases in organs remote from the primary

tumors. As a rule, metastases are detected on the background of a bright clinical picture associated with dysfunction of organs. To understand the mechanisms of metastasis, it is necessary to study the picture of key morphological changes in the tissues of organs with metastases. The study of distant metastases of melanoma of the skin showed the presence of cancer cells in organs other than a typical infiltrate, the identification of many cells containing pigment inclusions in the cytoplasm. Two possible variants of the appearance of cells with a pigment are proposed. The first option is a consequence of the migration of melanoblasts from the primary malignancy zone. The second option is possibly associated with the differentiation of local connective tissue cells into pigment accumulating cells due to phagocytosis, or secreting independently under the influence of unknown factors. Identifying the causes of induction processes on the differentiation of pluripotent cells, both in primary and metastatic tumors, forms the basis for elucidating the mechanisms of malignancy.

Key words: melanoma, oncogenesis, malignancy, migration, metastases, hematopoiesis, angiogenesis, melanogenesis, endothelium, stem cells, differentiation, growth factors

Актуальность. По данным ВОЗ, в структуре рака кожи меланома составляет 1%, занимая первое место по смертности. За последние 40 лет заболевание меланомой увеличилось в 15 раз. По данным American Cancer Society медиана выживаемости при меланоме пропорциональна стадии заболевания и метастазированию опухоли в отдалённые участки кожных покровов, отдалённые лимфоузлы, но не в другие органы. Узловая меланома является наиболее агрессивным типом опухолей кожи, характеризуется ранним метастазированием в лимфоузлы, лёгкие, печень, головной мозг, кости.

Метастазы, очаги малигнизации, развивающиеся на расстоянии от первичной опухоли, являются причиной смерти 90% пациентов, умерших от рака [1]. На протяжении столетия процесс метастазирования объяснялся в рамках приоритетной концепции малигнизации клеток, или теории соматических мутаций (SMT). Доказательство несостоятельности этого постулата о том, что рак является проблемой нерегулируемой пролиферации клеток, а малигнизация обусловлена частичной хромосомной перестройкой вследствие реакции на ее окружение, сменилось концепцией отсутствия апоптоза в аномальных клетках и теорией TOFT (Tissue Organization Field Theory). Ошибочные восприятия способствовали развитию представлений об «онкогенах», не имеющих биологической реальности, явившихся креационизмом в биологии. Молекулярно генетические исследования показали отсутствие вирусной ДНК в малигнизирующихся клетках. Апоптоз аномальных клеток свидетельствует о несостоятельности мутационной концепции рака. Безуспешность терапевтических подходов, основанных на тупиковых теориях, требует исследований в направлении поиска доказательств реальных механизмов канцерогенеза, изучения природы и свойств раковых клеток и сущности метастазирования [2]. Существуют большие трудности в дифференциальной диагностике меланомы от доброкачественных или злокачественных кожных новообразований [3]. Часто метастазы обнаруживаются раньше первичной опухоли, что не вписывается в рамки концепции формирования метастазов из пула клеток мигрантов из первичной опухоли. Несмотря на активные исследования динамики миграции раковых клеток, понимание процесса метастазирования остаётся противоречивым [4, 5, 6]. Признаны два способа миграции опухолевых клеток, утративших связь с первичной опухолью, в другие

органы: гематогенным и лимфогенным путями. Считают, что дозорный статус лимфатических узлов является сильным прогностическим фактором при меланоме [7]. Однако, отмечено, что при динамическом наблюдении у 21% лимфоузел-отрицательных пациентов развиваются отдаленные метастазы [8, 9]. Отсюда следует несостоятельность теории миграции раковых клеток из первичных опухолей в современной теории канцерогенеза. Наличие огромного количества данных по метастазам меланомы, собранных из различных органов, требует дополнительного анализа и решения вопроса, действительно ли раковые стволовые клетки (CSC) инициируют и поддерживают метастатический потенциал, избегая иммунобиологического надзора.

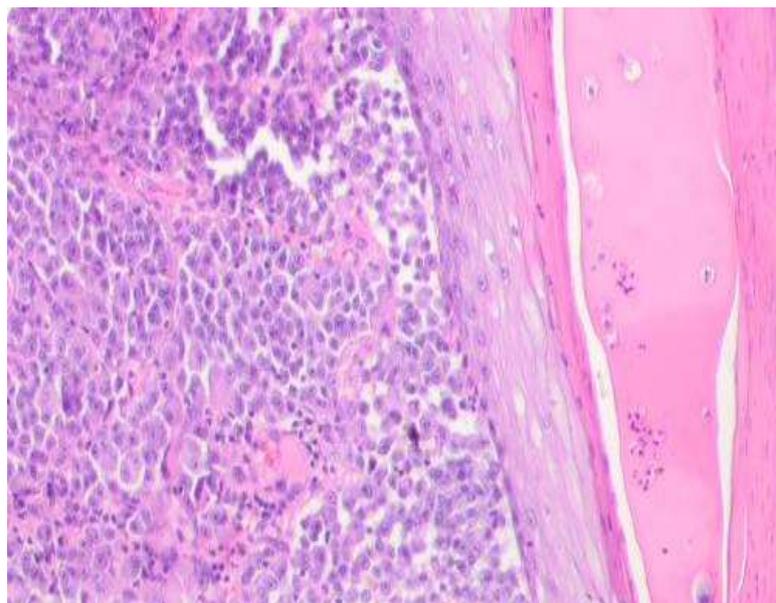
Целью исследования явилось установление морфологических особенностей метастазов меланомы в печени, почке, лёгких – органах, подвергающихся отдалённому метастазированию. Наши исследования были направлены на анализ гистологических подтипов метастазов по сравнению с первичной опухолью.

В связи с этим решались **задачи** провести сравнительный анализ особенностей строения первичной опухоли и метастазов меланомы в различных органах.

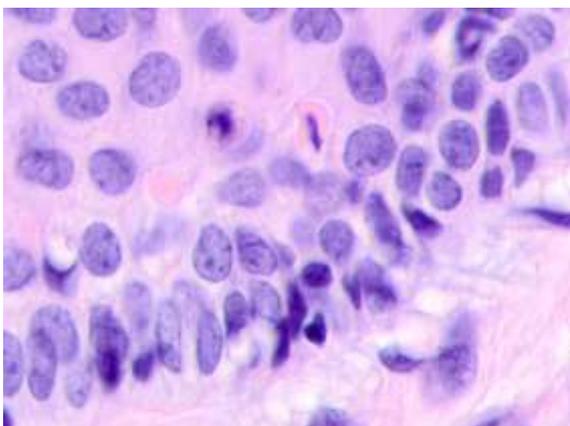
Материал и методы Исследования проведены на пациентах онкологической поликлиники г. Владивостока в соответствии с требованиями Минздравмедпрома РФ от 29.04.94 № 82 и согласно номенклатуре клинических лабораторных исследований МЗ РФ (приказ № 64 от 21.02.2000 г.) с учётом положений Хельсинской декларации (2013). В работе использован трупный материал лёгких, почек, кожи, печени, тонкого кишечника, простаты и надпочечников пациентов с метастазами меланомы. С помощью кластерного анализа исследованы потенциальные однородные подгруппы дермального и внутриорганного поражения метастазами меланомы в соответствии с принципами доказательной медицины. Использован классический морфологический метод исследования с окрашиванием срезов гематоксилином и эозином с последующим анализом полученного иллюстративного материала. Ретроспективная оценка поражений проводилась по морфологическим признакам, наблюдавшимся при использовании микроскопа Olympus Vx 52. Исследование проведено с разрешения Этического комитета ФГАОУ ВО ДВФУ.

Морфологические особенности первичной опухоли и метастазов рассматривались по наличию изменений в структуре эпидермиса и дермы, печени и почек, надпочечника, простаты и стенки тонкого кишечника, степени васкуляризации, топографии и количества лимфоцитов и меланоцитов в просвете сосудов и располагающихся перивазально, содержания недифференцированных клеток в поле зрения на срезах, по составу клеточных ансамблей опухолевых инфильтратов, степени целостности эндотелия сосудов.

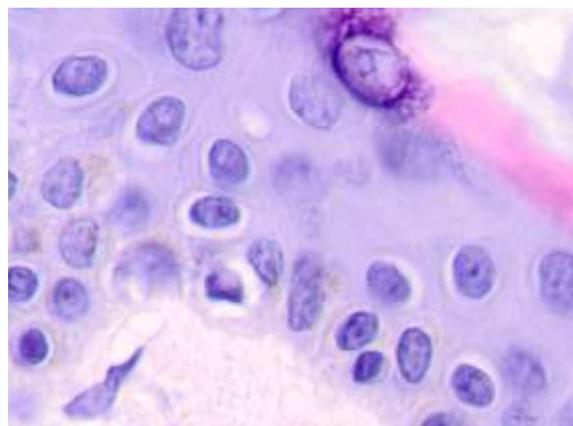
Результаты и их обсуждение. Нами был изучен материал пациентов с диагнозом узловой меланомы на стадии TN1M1b в соответствии с международной классификацией меланом по системе TNM 1997 года. Особое внимание уделяли морфологическим изменениям в структуре кожи, связанным с запрограммированной гибелью кератиноцитов, степени нарушения контактов в структуре эпидермиса, инфильтрации эпидермиса и дермы, а также опухолевой инвазии вглубь кожи с учетом коэффициентов малигнизации по Кларку и Бреслоу. Кроме этого были рассмотрены морфологические особенности элементов микроциркуляторного русла. Под малым увеличением микроскопа на препарате со срезами меланомы виден неравномерный слой утолщенного эпидермиса с обильным лимфоцитарным инфильтратом, расположенным под эпидермисом в виде яркой сплошной полосы, что отражает характерные диагностические признаки микроинвазии опухоли в дерму. Опухолевые меланоциты, единичные или в виде небольших групп, инфильтрируют все слои эпидермиса. Характерным для меланомы является отсутствие кожного рисунка на поверхности малигнизирующейся кожи (рис. 1, 2).



а



б



в

Рис. 1. Узловая меланома. Деструкция эпидермиса. Отсутствие кожного рисунка на поверхности меланомы. А) поверхность опухоли; б, в) ткань на границе опухоли. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото. Ув. а) x100; б, в) x400.

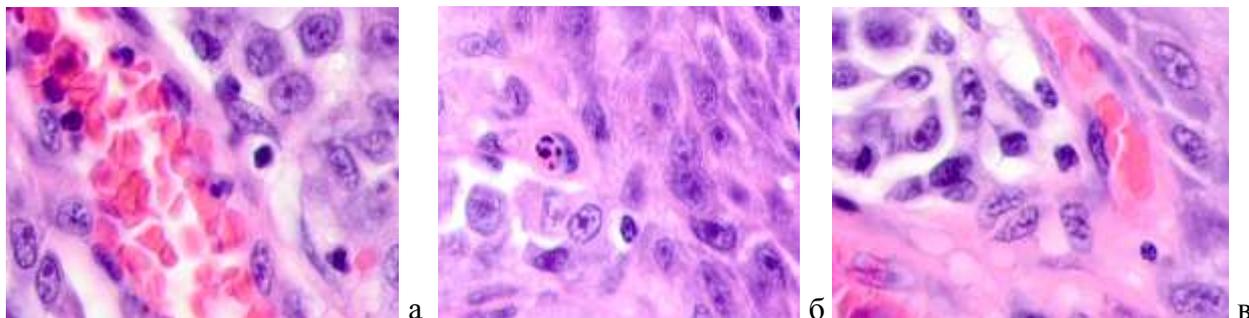


Рис. 2. Меланома кожи. Рост сосудов, апоптоз кератиноцитов, утрата межклеточных контактов в базальных слоях эпидермиса. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото. Ув. x400.

После операции у пациентов через 2 месяца увеличились лимфатические узлы, обнаружались метастазы печени и костей. Компоненты метастазов наблюдались и в лимфатических узлах, а также были повышены опухолевые маркеры, такие как ProGRP и pse. Пациентам была проведена комбинированная химиотерапия с цисплатином и этопозидом (ЭП). Всего больными получено 6 курсов химиотерапии. Через 4,5 месяцев после заключительного курса ЕР-химиотерапии клиника онкопатологии у всех пациентов восстановилась, появились метастазы в удаленных от опухоли органах. Морфологические особенности первичной опухоли и метастазов рассматривались по наличию изменений в структуре эпидермиса и дермы, печени, почек, надпочечника, простаты, лёгких и стенки тонкого кишечника. Была рассмотрена степень деструкции ткани органов, сопровождающая процесс инфильтрации ткани раковыми метастазами. При морфологической характеристике состава клеточных ансамблей опухолевых инфильтратов, степени целостности эндотелия сосудов было отмечено, что метастазы вызвали атрофию и некротические изменения в предсуществующей ткани. Выявлены патологические изменения в виде кальцификатов и склероза во всех органах. В печени отмечены стеатоз, цирроз и очаги некроза, идентифицировались подобные меланоцитам клетки.

В клинической картине было отмечено, что морфологические изменения привели к последующей утрате функции тканей исследуемых нами органов. В составе клеточных

ансамблей метастазов во всех образцах обнаруживались меланоциты (рис. 3).

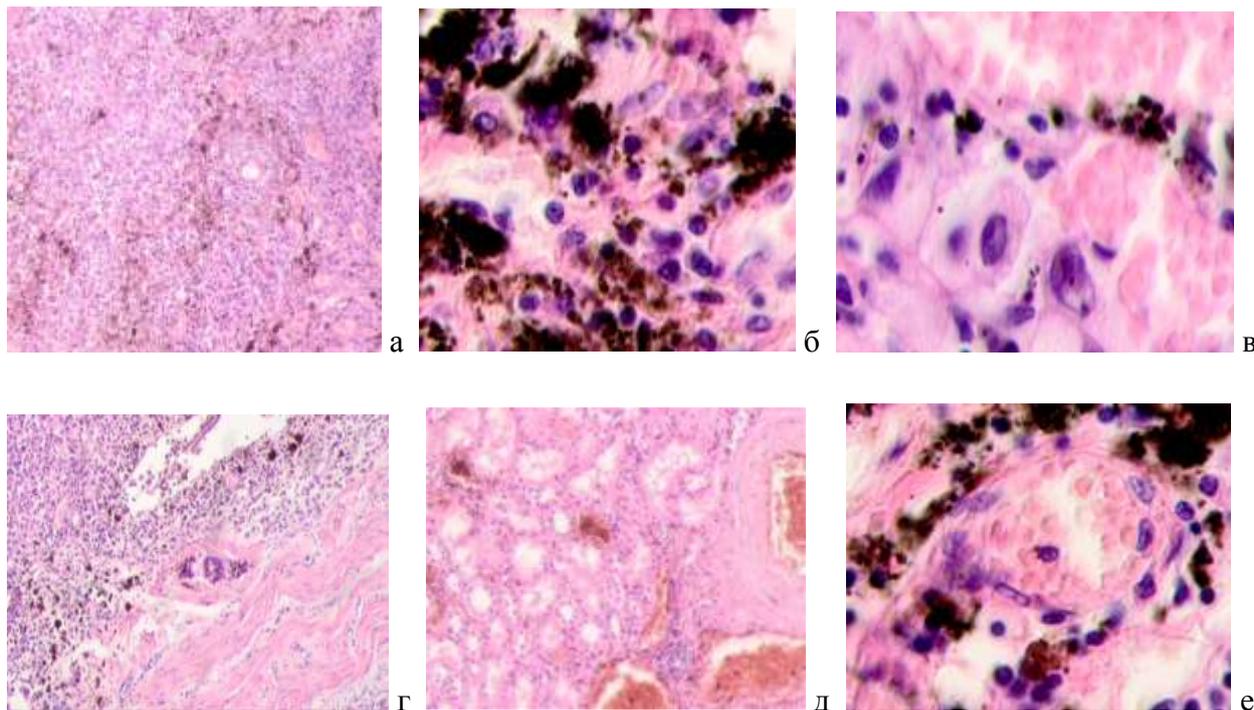


Рис. 3. Метастазы меланомы кожи а, б) в печень; в) надпочечник; г) простату; д, е) почку. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. а, г, д) x100; б, в, е) x400.

Стандартное лечение в случаях ранней диагностики меланомы хирургическое, оно имеет более низкую частоту метастазирования лимфатических узлов, но происходит отдаленное метастазирование, как предполагают, гематогенным способом через кровеносные сосуды. Этот вариант наблюдается чаще всего [10]. Статистика свидетельствует о низкой эффективности системной химиотерапии при меланоме с метастатическими осложнениями.

Известно, что метастазирование и инвазия являются основными признаками прогрессии опухоли и неблагоприятного прогноза не только при меланоме, но и при любом канцерогенезе. Инвазивный рост сопровождается миграцией опухолевых клеток с распространением сквозь тканевые барьеры. Опухоль начинает прорастать в соседние ткани вследствие биохимических и генетических изменений, развивающихся в клетках опухоли. Несомненным признаком злокачественности опухоли является инвазия клеток за пределы органа, попадание клеток в лимфоузлы и кровеносные сосуды, а также рост по периневральным щелям – инвазивный рак. Такой вид рака характеризуется достаточно быстрым ростом, способностью к диссеминации и метастазированию, инвазией опухолевых клеток в прилегающие органы. Идентифицируется распространение инвазивного рака по перисосудистым пространствам, вокруг лимфатических сосудов.

Нами отмечено, что во всех случаях метастазов меланомы пигментные клетки идентифицируются в паренхиме всех исследуемых органов, вокруг кровеносных сосудов (рис. 4).

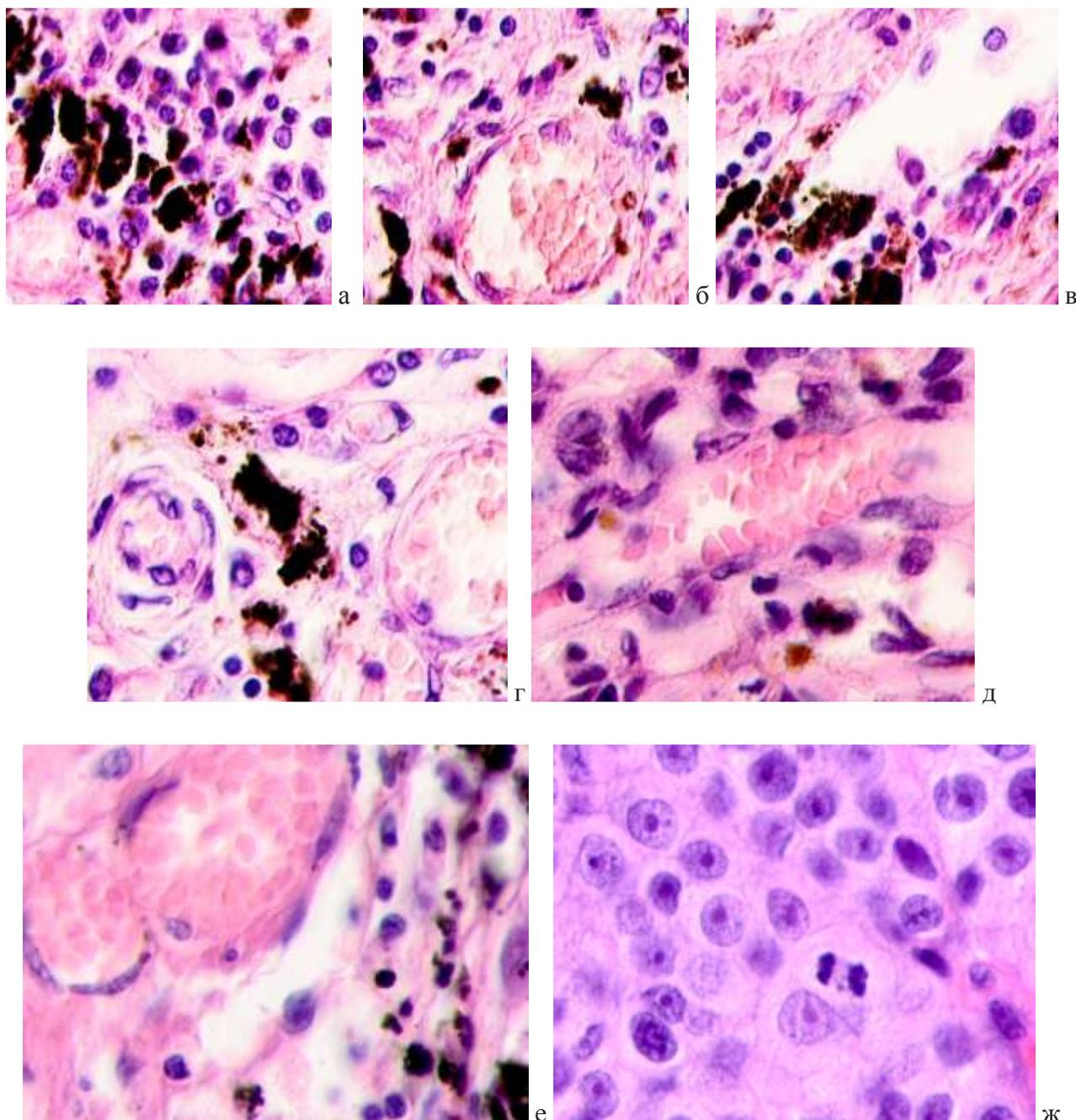


Рис. 4. Пигментные клетки а) в паренхиме печени; б, в, г, д, е) расположенные периартериально; ж) фигуры митоза в гепатоцитах на границе метастазов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Утрачивается балочная структура печени, дольчатое строение не идентифицируется. Наблюдаются митозы и амитозы (рис. 4 ж). Появление пигментных клеток в составе органа, удаленного от первичной опухоли меланомы, можно рассматривать как начальный регенеративный акт элементов соединительной ткани органа в ответ на атрофические изменения паренхимы. Отсутствие пигментных клеток или макрофагов, содержащих в своей цитоплазме гранулы пигмента, свидетельствует о местной дифференцировке соединительнотканых клеток в пигментосодержащие клетки. Кроме этого, в составе метастазов содержатся инфильтраты, состоящие из клеток, морфологически

соответствующих лимфоидному ряду. Такие инфильтраты могут служить выражением экстрамедуллярных процессов кроветворения [11]. Появление лимфоцитарно-плазматических инфильтратов является результатом процесса секреции антител плазматическими клетками, предшественниками которых являются В-лимфоциты, при участии макрофагов (рис. 5).

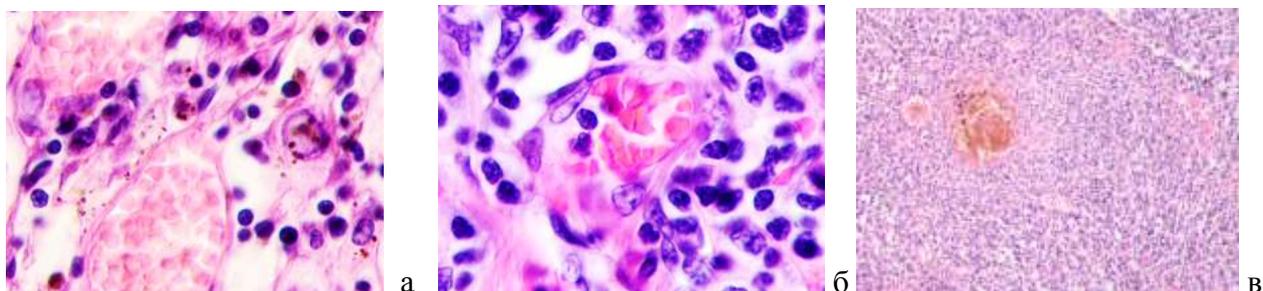


Рис. 5. Метастазы а) надпочечник; б) кожа; в) печень. Инфильтрат. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото. Ув. а, б) x400; в) x100.

Метастазы меланомы на коже могут быть темно-синего, черного, иногда розового цвета, склонны к быстрому росту, изъязвлению и распаду и консервативному лечению практически не поддаются. Метастазы в коже также характеризуются ещё и тем, что бывают разного цвета и консистенции.

Клетки инфильтрата в органах, удаленных от первичной опухоли, идентифицируются не только в паренхиме, но и в просвете кровеносных сосудов (рис. 6).

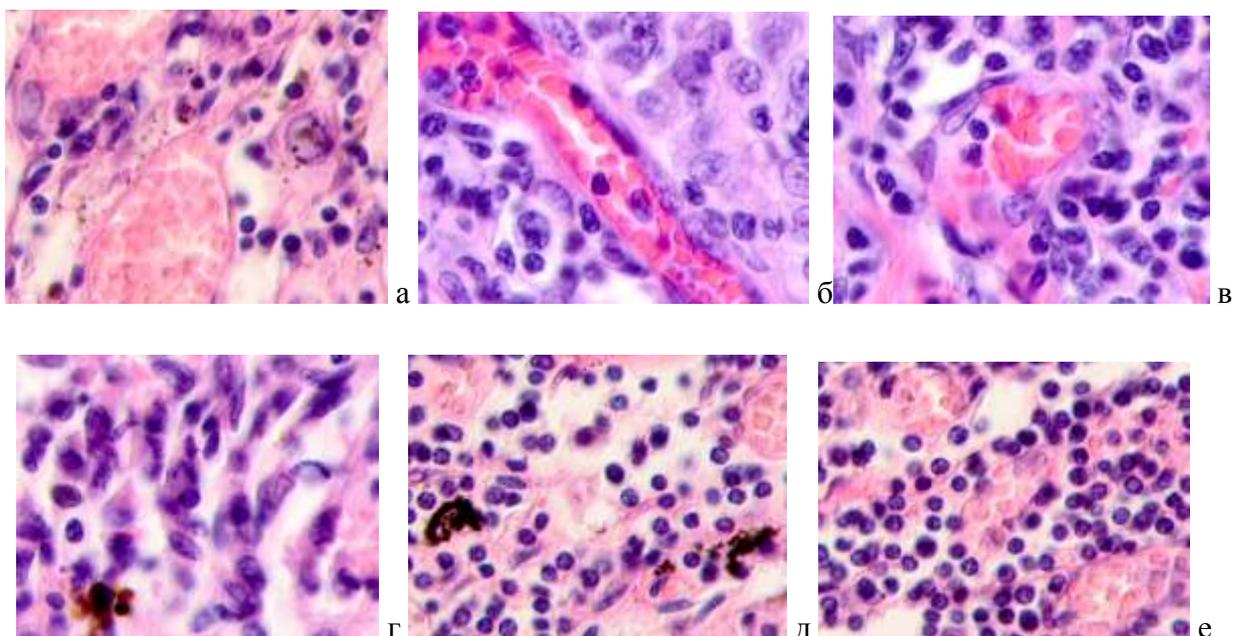


Рис. 6. Метастазы а) надпочечник; б) кожа; в) печень. Инфильтрат. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото. Ув. а, б) x400; в) x100.

Анализ результатов нашего исследования морфологии опухоли и метастазов позволил установить, что в зоне малигнизации, соответствующей первичной опухоли, идет изменение

структуры кожи с нарушением функции, инфильтрат распространяется в дерме. Закономерно возникает вопрос о том, с чем связано появление пигментных клеток в органах, удаленных от первичной опухоли. На основании того, что пигментные клетки в просвете кровеносных сосудов не идентифицируются, мы сделали предположение, что может быть два варианта для объяснения этого явления. Первый связан с тем, что клетки, содержащие пигмент в цитоплазме, являются местными, но получили неправильный сигнал для дифференцировки в меланоциты и к секреции и накоплению пигмента. Второй вариант предполагает, что это пришлые клетки, являющиеся прекурсорными, получившими программу развития и дифференцировки в направлении меланоцитов. Второй вариант предполагает более сложный путь развития, связанный с сигнальной индукцией миграции меланобластов, что требует дополнительного подтверждения, а затем с дифференцировкой меланобластов в меланоциты. Клетки инфильтрата опухоли идентифицируются как в просвете сосудов, так и вокруг сосудов, поэтому не исключается их миграция из первичной опухоли. Противоречит этому только отсутствие иногда первичной опухоли, метастазирование, минующее регионарные лимфатические узлы, быстрое развитие генерализованного метастазирования.

Нарушение функции органов характеризуется клинической картиной в зависимости от степени малигнизации органа. Проблемы метастазов в печени связаны не только со сдавливанием желчных протоков и нижней полой вены. Клинически у пациентов отмечается боль в верхнем подреберье, развитие острой желтухи и образование хронических отеков нижних конечностей, небольшие злокачественные островки деструкции легких. Метастатический рак почти не поддается полноценному излечению. На стадии формирования вторичных злокачественных очагов возможна только паллиативная и симптоматическая терапия, призванная продлить жизнь больного и улучшить её качество. Поэтому знание механизмов метастазирования позволит решить проблему профилактики этого грозного осложнения и разработать патогенетически обоснованные методы профилактики. Вторичные опухолевые узлы в кишечнике могут быть результатом рака печени, почек, поджелудочной железы, непосредственно кишечника и многих других онкологических заболеваний. Хирургическое лечение редко применяется на стадии метастазирования, но иногда операции могут быть выполнены с целью восстановления жизненно важных функций органа [12]. В остальных случаях применяют лучевую терапию, химиотерапию, симптоматическое лечение обезболивающими препаратами.

С ростом количества клеток в метастазах, в них начинают формироваться собственные системы кровоснабжения, что ведет к истощению организма вследствие перераспределения питательных веществ и кислорода в пользу вторичных очагов малигнизации. Это связано с кахексией и вторичным иммунодефицитом, наблюдаемых при раках любой локализации.

Средняя продолжительность жизни больных с метастазами в различные органы зависит от локализации: в печени – 6 месяцев, с метастазами в костной ткани при полноценном лечении – несколько лет, с метастазами в почках – от года до 3 лет, с метастазами в головном мозге – несколько недель.

Обсуждение. Результаты хирургического лечения при меланоме не являются гарантией полного излечения пациентов. Вопросы метастазирования первичных опухолей и установление причин способности к инвазии опухолевой клетки не только меланомы, но и других канцерогенозов, требуют разрешения этих вопросов. Вопрос истинных мишеней для консервативного лечения опухолей ждет своего решения. Поиск сигнальных молекул, индукторов дифференцировки и миграции клеток, на современном этапе является наиболее перспективным. Повышения эффективности хирургического метода лечения онкологических заболеваний можно добиться только при подавлении способности к инвазии раковых клеток, воздействуя на эти молекулы лекарственными средствами до и после операции. Пока не будет окончательно доказана природа раковых клеток, создание вакцин на основе дендритных клеток, экстракты из эмбриональных тканей и лекарственных препаратов к белкам-маркерам и генам-маркерам опухолевых клеток будет затруднительным.

Выводы Терапевтическая стратегия, основанная на правильном представлении процессов метастазирования и оценке того, какой клеточный компонент вызвал метастаз, важна в разработке методов патогенетически обоснованного лечения первичных и метастатических опухолей. Изучение процессов индукции на дифференцировку плюрипотентных клеток, как в первичных опухолях, так и в метастатических, лежит в основе выяснения механизмов малигнизации.

Работа выполнена при поддержке Научного фонда ДВФУ, в рамках государственного задания 17.5740/2017/6.7.

This work was supported by Science Foundation Far Eastern Federal University, in the framework of the state task from 17.5740/2017/6.7.

Список литературы

1. Deniffel D., Sauter A., Dangelmaier J., Fingerle A., Rummeny E.J., Pfeiffer D. Differentiating intrapulmonary metastases from different primary tumors via quantitative dual-energy CT based iodine concentration and conventional CT attenuation. //Eur. J. Radiol. 2019. vol. 111. no. 6-13. doi: 10.1016/j.ejrad.2018.12.015.
2. Kniep H.C., Madesta F., Schneider T., Hanning U., Schönfeld M.H., Schön G., Fiehler J., Gauer T., Werner R., Gellissen S. Radiomics of Brain MRI: Utility in Prediction of Metastatic Tumor Type. Radiology. 2019. vol. 290. no. 2. P. 479-487.
3. Tsuchihashi K., Arita S., Fujiwara M., Iwasaki K., Hirano A., Yoshihiro T., Nio K., Koga Y., Esaki M., Ariyama H., Kusaba H., Moriyama T., Ohuchida K., Nagai E., Nakamura M., Oda Y., Akashi K., Baba E.. Metastatic esophageal carcinosarcoma comprising neuroendocrine carcinoma, squamous cell

carcinoma, and sarcoma: A case report. //Medicine (Baltimore). 2018. vol. 97. no. 41. doi: 10.1097/MD.00000000000012796.

4. Horkovičová K, Markus J, Krčová I, Babál P, Kobzová D, Smolková B. The braf mutation and the possibilities of uveal melanoma metastasing prognostic markers identification. *Cesk Slov Oftalmol.* Fall. 2016. Vol.72. no. 4. P. 149-156.

5. Gugger A, Barnhill RL, Seifert B, Dehler S, Moch H, Lugassy C, Marques-Maggio E, Rushing EJ, Mihic-Probst D. Cutaneous Melanoma with Brain Metastasis: Report of 193 Patients with New Observations. //PLoS One. 2016. vol. 23. no. 11(5):e0156115. doi: 10.1371/journal.pone.0156115.

6. Tsuchihashi K, Arita S, Fujiwara M, Iwasaki K, Hirano A, Yoshihiro T, Nio K, Koga Y, Esaki M, Ariyama H, Kusaba H, Moriyama T, Ohuchida K, Nagai E, Nakamura M, Oda Y, Akashi K, Baba E. Metastatic esophageal carcinosarcoma comprising neuroendocrine carcinoma, squamous cell carcinoma, and sarcoma: A case report.//Medicine (Baltimore). 2018 Oct;97(41):e12796. doi: 10.1097/MD.00000000000012796.

7. Chaussende A., Hermant C., Tazi-Mezalek R., Favrolt N., Hureaux J., Fournier C., Lorut C., Paganin F., Ngo M.T., Vandemoortele T., Anevlavis S., Froudarakis M.E., Vergnon J.M.. Endobronchial metastases from melanoma: a survival analysis. *Clin Respir J.* 2017. vol. 11(6). P. 1006-1011.

8. Alessandro S., Magremanne M., Marbaix E., Reychler H., Mahy P. Axillary lymph node metastasis in second oropharyngeal cancer. *J. Stomatol. Oral. Maxillofac Surg.* 2018. vol. 31. P. 2468-7855(18)30222-2.

9. Chisthi M. M. Small Bowel Melanoma Metastasing to Inguinal Lymph Node - a Rare Case. *Indian J Surg. Oncol.* 2015. vol. 6(2). P.116-8.

10. Oku T., Ata N., Yonezawa K., Tokai H., Fujii H., Shinagawa A., Ohuchi E., Saiki I. Antimetastatic and antitumor effect of a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in murine melanoma models. *Biol Pharm Bull.* 1997. vol. 20(8). P. 843-9.

11. Alessandro S., Magremanne M., Marbaix E., Reychler H., Mahy P. Axillary lymph node metastasis in second oropharyngeal cancer. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2018. vol. 31. P. 2468-7855(18)30222-2.

12. Yin G.F., Guo W., Chen XH, Liu ZY, Huang ZG. Clinical characteristic and prognostic analyses of 117 cases of head and neck mucosal. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2018. vol. 7. no. 53(9). P. 668-674.