

УДК 61:57.086:616-006:616.31

**И. С. Куликова¹, Н. П. Бгатова¹, Н. Б. Исакова², И. В. Качесов²
Ю. И. Бородин¹, В. И. Коненков¹**

¹ Институт клинической
и экспериментальной лимфологии СО РАМН
ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия

² Новосибирский областной онкологический диспансер
ул. Плахотного, 2, Новосибирск, 630108, Россия

E-mail: n_bgatova@ngs.ru

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ КРОВЕНОСНЫХ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ ПРИ РАКЕ ГУБЫ

Проведено сравнительное иммуногистохимическое исследование содержания кровеносных и лимфатических сосудов в биопсийном материале, полученном от 49 пациентов с неороговевающей и ороговевающей формой плоскоклеточного рака нижней губы, различающихся по скорости инфильтративного роста и метастатическому потенциалу. Использовали антитела к маркерам эндотелиоцитов кровеносных сосудов – CD34 и лимфатических сосудов – LYVE-1 и Podoplanin. При обеих формах рака нижней губы обнаружена большая выявляемость Podoplanin+-лимфатических сосудов по сравнению с LYVE-1+-сосудами. При плоскоклеточном неороговевающим раке нижней губы отмечены большие значения объемных плотностей внутриопухолевых CD34+-кровеносных и Podoplanin+-лимфатических сосудов по сравнению с ороговевающей формой рака, что может быть структурной основой для более выраженной пролиферации и метастазирования.

Ключевые слова: плоскоклеточный неороговевающий и ороговевающий рак нижней губы, LYVE-1+-сосуды, Podoplanin+-сосуды; CD34+-сосуды.

Актуальность проблемы определяется устойчивой тенденцией роста онкологической заболеваемости во всем мире. Поэтому чрезвычайно важной является ранняя диагностика и выявление злокачественного роста и метастазирования. Известно, что опухолевый процесс сопровождается развитием сосудистой сети – ангиогенезом и лимфангиогенезом. Выявлено, что одними из основных регуляторов развития кровеносной и лимфатической сосудистых систем являются факторы роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Факторы роста сосудов в опухоли синтезируются, главным образом, эндотелиоцитами, макрофагами и опухолевыми клетками [1], а мишенями являются клетки эндотелия сосудов. Из существующего семейства факто-

ров роста сосудов VEGF-A оказывает преимущественно влияние на ангиогенез, и его мишенями являются клетки эндотелия кровеносных сосудов, а VEGF-C – на лимфангиогенез, стимулируя пролиферацию эндотелиоцитов лимфатических капилляров [2]. Изменения, происходящие с кровеносными сосудами при развитии опухолевого процесса, связаны с реорганизацией существующих сосудов и их новообразованием [3]. Изменения, происходящие в лимфатической системе при прогрессии опухолей, изучены в гораздо меньшей степени. Открытие лимфатических эндотелиальных маркеров облегчило детальный анализ природы и структурной организации лимфатических сосудов и их роста [4]. Показано, что опухоли могут активно индуцировать формирование лим-

фатических сосудов и опухолевой лимфангиогенез коррелирует с метастазированием в лимфатический узел [2].

Ранее считалось, что рак губы является редким событием в онкологической практике, и, видимо, поэтому по данной патологии мало публикаций. Однако в последнее время частота данного заболевания значительно возросла [5]. В большинстве случаев опухоль имеет строение плоскоклеточного ороговевающего рака со сравнительно медленным ростом и малой инфильтрацией тканей. Более быстрым инфильтративным ростом и ранним метастазированием в регионарные лимфатические узлы (подбородочные, подчелюстные, в район яремной вены) характеризуется неороговевающий плоскоклеточный рак. При I стадии метастазы наблюдаются в 5–8 % случаев, при II – 15–20, при III – 35, при IV стадии – в 70 % случаев [6]. Известно, что рак губы диагностируется чаще всего на III–IV стадиях, поэтому актуальной является ранняя диагностика злокачественного роста, что позволит избежать травмирующих оперативных вмешательств и возможного метастазирования [7]. Диагностику опухолевого процесса целесообразно проводить не только стандартными способами, но и с помощью новых современных методов, что обеспечивает комплексный подход к характеристике опухолевого процесса. Новым подходом может стать изучение ангио- и лимфангиогенеза в пораженном участке по локализации кровеносных и лимфатических сосудов с использованием моноклональных антител.

Цель исследования – сравнительное иммуногистохимическое изучение содержания кровеносных (CD34) и лимфатических (LYVE-1, Podoplanin) сосудов при плоскоклеточном ороговевающем и неороговевающем раках нижней губы.

Материал и методы

В исследование включены две группы пациентов: 1-я группа представлена 15 больными с плоскоклеточным неороговевающим раком нижней губы I стадии ($T_1N_0M_0$), из них мужчин – 66,7 % ($n = 10$), средний возраст – $68,1 \pm 2,7$ года, женщин – 33,3 % ($n = 5$), средний возраст – $72,8 \pm 1,4$ года; 2-я группа образована 34 лицами с плоскоклеточным ороговевающим раком нижней губы I стадии ($T_1N_0M_0$), из них

мужчин – 79,4 % ($n = 27$), средний возраст – $66,6 \pm 3,5$ года, женщин – 20,6 % ($n = 7$), средний возраст – $72,6 \pm 4,3$ года.

В диагностических целях, до момента лечения, биоптаты нижней губы из первичного очага поражения фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, обрабатывали по стандартной гистологической методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и с использованием антител. Все этапы иммуногистохимической реакции (депарафинизация, демаскировка, инкубация с первичными антителами и т. д.) проводили в автоматическом режиме на аппарате BENCHMARK/XT («Ventana»). Применяли моноклональные антитела к LYVE-1 («DCS ImmunoLine»), Podoplanin («Monosan») и к CD34 («Novocastra»). Полученные препараты плоскоклеточного неороговевающего и ороговевающего рака нижней губы изучали в световом микроскопе Leica DM, фотографировали с помощью компьютерной программы Avigion. Микрофотографии морфометрировали с помощью компьютерной программы Image J. Оценивали объемную плотность CD34+, LYVE-1+ и Podoplanin+ лимфатических сосудов с использованием закрытой тестовой системы из 315 точек.

Цифровые данные обрабатывали с помощью общепринятых методов статистики, вычисляя среднюю арифметическую величину (M), ошибку репрезентативности средней величины (m) и уровень значимости отличий средних величин на основании t -критерия Стьюдента для уровня достоверности 95 % ($p < 0,05$).

Результаты исследования и обсуждение

В препаратах биопсийного материала, представленного плоскоклеточным неороговевающим и ороговевающим раком нижней губы, выявляли различные зоны в зависимости от локализации: зона воспалительного инфильтрата и опухолевой трансформации и периферия опухолевого роста. При анализе содержания кровеносных сосудов в биоптатах с плоскоклеточным неороговевающим раком нижней губы выявлено, что объемная плотность CD34+-кровеносных сосудов, расположенных по периферии опухолевого роста, была в 3 раза больше, чем их плотность в зоне воспалительного

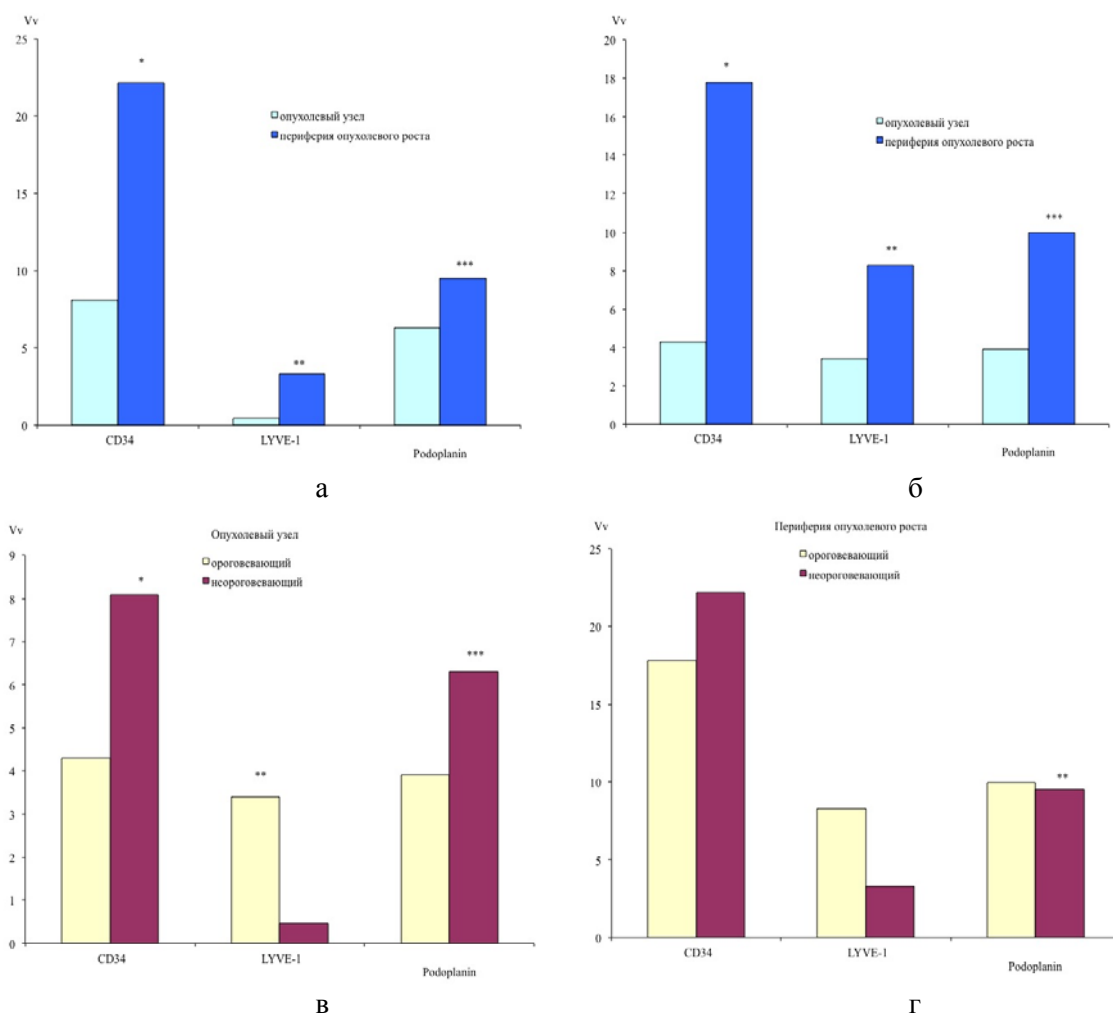


Рис. 1. Гемо- и лимфоциркуляция в области опухолевого роста при плоскоклеточном неороговевающем и ороговевающем раке нижней губы: *а* – объемная плотность кровеносных и лимфатических сосудов, расположенных в области опухолевого узла и по периферии опухолевого роста, при плоскоклеточном неороговевающем раке нижней губы; *б* – объемная плотность кровеносных и лимфатических сосудов, расположенных в области опухолевого узла и по его периферии, при плоскоклеточном ороговевающем раке нижней губы; *в* – объемная плотность кровеносных и лимфатических сосудов, расположенных в опухолевом узле при плоскоклеточном неороговевающем и ороговевающем раке нижней губы; *г* – объемная плотность кровеносных и лимфатических сосудов, расположенных по периферии опухолевого роста при плоскоклеточном неороговевающем и ороговевающем раке нижней губы. V_v – объемная плотность сосудов, %; CD34 – CD34+-кровеносные сосуды; LYVE-1 – LYVE-1+-лимфатические сосуды; Podoplanin – Podoplanin+-лимфатические сосуды; * – достоверные отличия между величинами объемных плотностей CD34+-кровеносных сосудов ($p < 0,05$); ** – достоверные отличия между величинами объемных плотностей LYVE-1+-лимфатических сосудов ($p < 0,05$); *** – достоверные отличия между величинами объемных плотностей Podoplanin+-лимфатических сосудов ($p < 0,05$)

инфильтрата и опухолевой трансформации (рис. 1, *а*). При этом внутри опухоли преобладали мелкие по размерам сосуды с щелевидными просветами, а по периферии располагались крупные сосуды большого диаметра (рис. 2, *а*).

Иммуногистохимическое окрашивание (ИГХ) биоптатов нижней губы при неороговевающей форме рака из очага поражения с использованием антител к маркерам эндо-

телицитов лимфатических сосудов LYVE-1 и Podoplanin выявило отличия в экспрессии данных маркеров. При сравнении количества LYVE-1+- и Podoplanin+-лимфатических сосудов установлено, что в опухолевом узле в большей степени выявляются Podoplanin+-, чем LYVE-1+-лимфатические сосуды. Объемная плотность Podoplanin+-лимфатических сосудов в зоне опухолевого роста была в 12 раз больше, чем величина соответ-

вующего показателя для LYVE-1+-лимфатических сосудов, а на периферии опухолевого роста в 3 раза больше, чем величины соответствующих показателей для LYVE-1+-лимфатических сосудов (см. рис. 1, а). Детальный анализ содержания лимфатических сосудов показал, что объемная плотность LYVE-1+-лимфатических сосудов в опухолевом узле была на 86 % меньше, чем на периферии опухолевого роста, а объемная плотность Podoplanin+-лимфатических сосудов в опухолевом узле – на 40 % меньше, чем на периферии опухолевого роста (см. рис. 1, а; 2, в, д).

ИГХ на маркер эндотелиоцитов кровеносных сосудов CD34 препаратов с плоскоклеточным ороговевающим раком нижней губы показало, что объемная плотность CD34+-кровеносных сосудов, расположенных по периферии опухолевого роста, была на 76 % больше, чем их плотность в зоне воспалительного инфильтрата и опухолевой трансформации (рис. 1, б). И так же, как и при неороговевающей форме рака, внутри опухоли преобладали мелкие щелевидные сосуды, а по периферии располагались сосуды большого диаметра с расширенными просветами (см. рис. 2, б).

При сравнении объемной плотности LYVE-1+- и Podoplanin+-лимфатических сосудов в зоне опухолевой трансформации и по периферии опухолевого роста не выявлено достоверных отличий в величинах исследуемых показателей (см. рис. 1, б). В каждой зоне в практически равной степени выявлялись Podoplanin+- и LYVE-1+-лимфатические сосуды. Однако в пределах каждого образца имело место отличие в содержании лимфатических сосудов в зависимости от локализации. Объемная плотность LYVE-1+-лимфатических сосудов в опухолевом узле была на 59 % меньше, чем на периферии опухолевого роста, а объемная плотность Podoplanin+-лимфатических сосудов в опухолевом узле – на 60 % меньше, чем на периферии опухолевого роста (см. рис. 1, б; 2, з, е).

При сравнении содержания кровеносных и лимфатических сосудов различной локализации в биоптатах при неороговевающей и ороговевающей формах рака губы выявлены отличия в экспрессии молекулярных маркеров. При неороговевающей форме рака нижней губы в опухолевом узле на 88 % была больше объемная плотность CD34+-

кровеносных сосудов. В то же время не выявлено достоверных отличий в величине объемной плотности Podoplanin+-лимфатических сосудов, а значение объемной плотности LYVE-1+-лимфатических сосудов оказалось снижено на 84 % по сравнению с соответствующим показателем при ороговевающей форме плоскоклеточного рака нижней губы (рис. 1, в). При сравнении объемных плотностей сосудов, расположенных по периферии опухолевого роста, отмечены отличия в экспрессии LYVE-1-маркера эндотелиоцитов лимфатических сосудов. Величина данного показателя была на 60 % меньше при неороговевающей форме, чем ороговевающей форме плоскоклеточного рака нижней губы. Объемные плотности CD34+-кровеносных сосудов и Podoplanin+-лимфатических сосудов достоверно не отличались (рис. 1, з).

Ключевым механизмом в развитии злокачественной опухоли является разрастание кровеносных сосудов. После того, как в опухоли начинает формироваться сеть микрососудов, новообразование активно прогрессирует. Происходит инфильтрация опухоли в соседние ткани и ее дальнейшее распространение [2; 3]. Известно, что более быстрым инфильтративным ростом и ранним метастазированием в регионарные лимфатические узлы характеризуется неороговевающий плоскоклеточный рак [6]. Полученные нами данные о том, что при неороговевающей форме рака нижней губы в опухолевом узле на 88 % больше объемная плотность CD34+-кровеносных сосудов по сравнению с неороговевающей формой рака, свидетельствуют о лучшем кровоснабжении опухолевых клеток в данном случае. Этот факт, по-видимому, является структурной основой для их более активной пролиферации и инвазивного роста.

Мы получили данные об отличии в экспрессии маркеров эндотелиоцитов лимфатических сосудов LYVE-1 и Podoplanin как в пределах опухолевого роста, так и по его периферии. Согласно современным представлениям, отличия в экспрессии наиболее используемых молекулярных маркеров эндотелиоцитов лимфатических сосудов (LYVE-1, Prox-1, Podoplanin) могут быть связаны с периодами развития организма, со структурой и функцией органа, условиями функционирования – в норме или при патологии. В частности, известно, что в течение

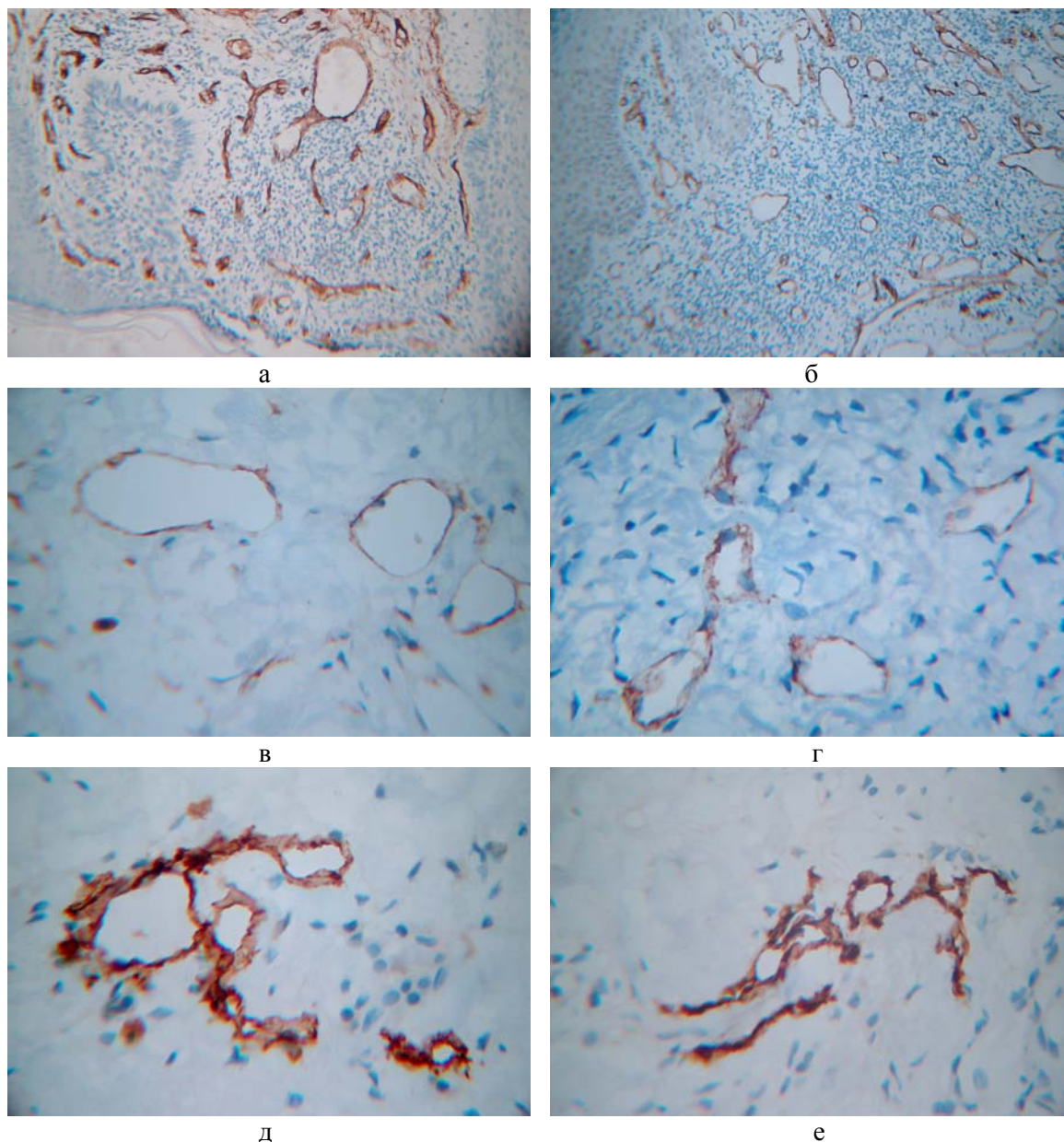


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление молекулярных маркеров эндотелиоцитов кровеносных и лимфатических сосудов в области опухолевого роста при плоскоклеточном неороговевающем и ороговевающем раке нижней губы: *a* – CD34+–кровеносные сосуды при неороговевающем плоскоклеточном раке нижней губы; *б* – CD34+–кровеносные сосуды при ороговевающем плоскоклеточном раке нижней губы; *в* – LYVE-1+–лимфатические сосуды при неороговевающем плоскоклеточном раке нижней губы; *г* – LYVE-1+–лимфатические сосуды при ороговевающем плоскоклеточном раке нижней губы; *д* – Podoplanin+–лимфатические сосуды при неороговевающем плоскоклеточном раке нижней губы; *е* – Podoplanin+–лимфатические сосуды при ороговевающем плоскоклеточном раке нижней губы. Увеличение 10×10 (*a, б*), 10×40 (*в–е*)

эмбрионального развития первым маркером лимфатических сосудов является LYVE-1 [8]. Впоследствии основным регулятором дифференцировки лимфатических эндотелиальных клеток становится Prox-1 [9]. На следующей стадии развития лимфатических сосудов эндотелиальные клетки экспрессируют Podoplanin, который играет существ-

венную роль в развитии лимфатической системы [8]. Накапливаются данные о том, что в условиях патологии (при воспалении или опухолевом росте) выявляются преимущественно Podoplanin+–лимфатические сосуды [10; 11]. Данный факт подтверждается и нашими исследованиями: при неороговевающей форме плоскоклеточного рака

нижней губы в большей степени выявлялись Podoplanin+-лимфатические сосуды.

До настоящего времени окончательно не ясно, какие именно лимфатические сосуды (внутриопухолевые или околоопухолевые) играют более важную роль в обсеменении опухолевыми клетками. Некоторые авторы полагают, что внутриопухолевые лимфатические сосуды не потенцируют метастазирования из-за высокого давления, обнаруживаемого внутри опухоли [12]. Напротив, при анализе лимфатических структур карциномы головы и шеи человека показано, что внутриопухолевые лимфатические сосуды играют существенную роль в предопределении появления рецидивов, тяжести болезни и чувствительности к терапии [13]. Присутствие внутриопухолевых лимфатических сосудов создает прямой путь опухолевым клеткам для достижения удаленных мест. Однако авторы [14; 15] отмечают, что наличие околоопухолевых лимфатических сосудов столь же эффективно может служить для транспорта клеток опухоли, так как они менее подвержены напряжению, сдавливанию и обеспечивают больший объем тока.

Наши данные по содержанию лимфатических сосудов в опухоли и по ее периферии свидетельствуют о том, что при неороговевающей форме плоскоклеточного рака нижней губы преобладают внутриопухолевые Podoplanin+-лимфатические сосуды, а при ороговевающей форме – Podoplanin+-лимфатические сосуды, расположенные по периферии опухолевого роста. Возможно, больший метастатический потенциал неороговевающей формы рака нижней губы связан именно с развитием внутриопухолевых лимфатических сосудов, что требует дальнейших исследований.

Заключение

ИГХ-окрашивание биологических образцов при плоскоклеточном неороговевающем и ороговевающем раке нижней губы с использованием антител к маркерам эндотелиоцитов кровеносных (CD34) и лимфатических сосудов (LYVE-1 и Podoplanin) выявило сходства и отличия в экспрессии данных маркеров. При обеих формах рака нижней губы обнаружено большее содержание Podoplanin+-лимфатических сосудов по сравнению с LYVE-1+-сосудами. При плоскоклеточном неороговевающем раке

нижней губы отмечены большие значения объемных плотностей внутриопухолевых CD34+-кровеносных сосудов и Podoplanin+-лимфатических сосудов по сравнению с ороговевающей формой рака, что может быть структурной основой для более активной пролиферации и метастазирования.

Список литературы

1. Raica M., Cimpean A. M., Ceausu R., Ribatti D. Lymphatic Microvessel Density, VEGF-C, and VEGFR-3 Expression in Different Molecular Types of Breast Cancer // *Anti-cancer Res.* 2011. Vol. 31, № 5. P. 1757–1764.
2. Коненков В. И., Бородин Ю. И., Бгатовва Н. П. Молекулярные маркеры лимфатических и кровеносных сосудов при развитии опухоли и мишени блокирования метастазов // *Вопр. онкологии.* 2011. Т. 57, № 3. С. 295–301.
3. Dvorak H. F. Rous-Whipple Award Lecture. How Tumors Make Bad Blood Vessels and Stroma // *Am. J. Pathol.* 2003. Vol. 162, № 6. P. 1747–1757.
4. Harrell M. I., Iritani B. M., Ruddell A. Tumor-induced Sentinel Lymph Node Lymphangiogenesis and Increased Lymph Flow Precede Melanoma Metastasis // *Am. J. Pathol.* 2007. Vol. 170, № 2. P. 774–786.
5. Marocchio L. S., Lima J., Sperandio F. F., Corrêa L., Sousa S. O. de. Oral Squamous Cell Carcinoma: An Analysis of 1,564 Cases Showing Advances in Early Detection // *J. Oral. Sci.* 2010. Vol. 52, № 2. P. 267–273.
6. Федяев И. М., Байриков И. М., Белова Л. П., Шувалова Т. В. Злокачественные опухоли челюстно-лицевой области. М., 2000.
7. Moretti A., Vitullo F., Augurio A., Pacella A., Croce A. Surgical Management of Lip Cancer // *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 2011. Vol. 31, № 1. P. 5–10.
8. Oliver G. Lymphatic Vasculature Development // *Nat. Rev. Immunol.* 2004. № 1. P. 35–45.
9. Hong Y. K., Harvey N., Noh Y. H., Schacht V., Hirakawa S., Detmar M., Oliver G. Prox-1 Is a Master Control Gene in the Program Specifying Lymphatic Endothelial Cell Fate // *Dev. Dyn.* 2002. № 3. P. 351–357.
10. Keichel S., Barcena de Arellano M.-L., Reichelt U., Riedlinger W. F. J., Schneider A., Kohler C., Mechsner C. Lymphangiogenesis in Deep Infiltrating Endometriosis // *Human Reproduction.* 2011. Vol. 26, № 10. P. 2713–2720.

11. Friedrich R. E., Bartel-Friedrich S., Hagel C. Expression of Podoplanin in Primary and Metastatic Poorly Differentiated and Undifferentiated Carcinomas of the Head and Neck // *Anticancer Res.* 2012. Vol. 32, № 5. P. 2019–2022.

12. Schaft D. W. van der, Pauwels P., Hulsmans S., Zimmermann M., Poll-Franse L. V. van de, Griffioen A. W. Absence of Lymphangiogenesis in Ductal Breast Cancer at the Primary Tumor Site // *Cancer Letters.* 2007. Vol. 254, № 1. P. 128–136.

13. Warburton G., Nikitakis N. G., Robertson P., Marinos N. J., Wu T., Sauk J. J., Ord R. A., Wahl Sh. M. Histopathological and Lymphangiogenic Parameters in Relation to Lymph Node Metastasis in Early Stage Oral Squamous

Cell Carcinoma // *J. of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2007. Vol. 65, № 3. P. 475–484.

14. Bono P., Wasenius V.-M., Heikkilä P., Lundin J., Jackson D.G., Joensuu H. High LYVE-1 – Positive Lymphatic Vessel Numbers Are Associated with Poor Outcome in Breast Cancer // *Clin. Cancer Res.* 2004. Vol. 10. P. 7144–7149.

15. Almedia A. S., Oliveira D. T., Pereira M. C., Faustino S. E. S., Nonogaki S., Carvalho A. L., Kowalski L. P. Podoplanin and VEGF-C Immunorexpression in Oral Squamous Cell Carcinomas: Prognostic Significance // *Anticancer Res.* 2013. Vol. 33, № 9. P. 3969–3976.

Материал поступил в редакцию 04.12.2013

**I. S. Kulikova, N. P. Bgatova, N. B. Isakova, I. V. Kachesov
Yu. I. Borodin, V. I. Konenkov**

IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF BLOOD AND LYMPHATIC VESSELS OF LIP CANCER

A comparative immunohistochemical research of the blood and lymphatic vessels content in biopsies from 49 patients with squamous cell carcinomas of lower lip, which differ in speed of infiltrative growth and metastatic potential were performed. Antibodies markers of endothelial cells of blood vessels – CD34 and lymphatic vessels – LYVE-1 and Podoplanin were used. In both studying form of lower lip cancer the greatest maintenance of Podoplanin+-lymphatic vessels, in comparison with LYVE-1+-vessels was revealed. In do not keratinizing squamous cell carcinomas of lower lip greater values of intra- tumor blood CD34+- and Podoplanin+-lymphatic vessels densities, as compared with keratinizing squamous cell carcinomas were marked, that can be a structural basis for a more pronounced proliferation and metastasis.

Keywords: squamous keratinizing and do not keratinizing lower lip cancer, LYVE-1, Podoplanin, CD34.