

JOANNA JELEŃ-KRZESZEWSKA¹, TOMASZ KRĘCICKI², MICHAŁ JELEŃ³, JAN WNUKIEWICZ¹

Badania nad angiogenezą w rakach czaszki twarzowej

Angiogenesis in Maxillofacial Cancers – Study

¹ Katedra i Klinika Chirurgii Twarzowo-Szczękowej AM we Wrocławiu

² Katedra i Klinika Otolaryngologii AM we Wrocławiu

³ Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Angiogeneza to proces powstawania nowych naczyń krwionośnych zarówno w tkankach zdrowych, jak i nowotworowych. Angiogeneza odgrywa istotną rolę we wzroście nowotworów oraz w procesie tworzenia przerzutów.

Cel pracy. Badania nad ekspresją wskaźników angiogenezy w nowotworach jamy ustnej i zatok szczękowych oraz określenie związku z klinicznym zaawansowaniem choroby oraz prognozą przebiegu choroby.

Materiał i metody. Badaniami objęto 43 pacjentów, w tym 32 chorych na raka jamy ustnej i 11 na raka zatok szczękowych (8 kobiet 35 mężczyzn). Badania immunohistochemiczne przeprowadzono na skrawkach parafinowych z użyciem odpowiednich przeciwciał.

Wyniki. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w czasie przeżycia pacjentów w zależności od pola powierzchni naczyń. Stwierdzono zależność między gęstością naczyń a cechą N (**Dent. Med. Probl. 2004, 41, 4, 625–630**).

Słowa kluczowe: angiogeneza, rak jamy ustnej i zatok przynosowych.

Abstract

Background. Angiogenesis is the process of new vessels formation. Many researches have demonstrated that a process like this is very important in neoplasm progress as well as in metastasis process.

Objectives. The goal of this study were researched on expression of angiogenesis markers in oral cavity and maxillary sinuses neoplasm.

Material and Methods. 43 patients were examined, 32 with oral cavity carcinoma, 11 with maxillary sinuses carcinoma. Immunohistochemical examination was performed on paraffin cutting using monoclonal antibody.

Results. We find correlation between vessels area and patient survival as well as correlation between number of vessels and feature N (**Dent. Med. Probl. 2004, 41, 4, 625–630**).

Key words: angiogenesis, oral cavity and maxillary sinuses carcinoma.

Angiogeneza to proces powstawania nowych naczyń krwionośnych zarówno w tkankach zdrowych, jak i nowotworowych. Jak wykazano w licznych badaniach, proces ten odgrywa istotną rolę w progresji nowotworów i w powstawaniu przerzutów [1, 2].

Indukcja angiogenezy przebiega w dwojaki sposób: 1) fizjologiczny (spotykany również w tkankach zdrowych), kiedy w warunkach niedotlenienia komórki wydzielają naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Czynnik ten działa stymulująco na migrację i podziały komórek śródbłonka. Niedotlenienie indukuje rów-

nież mechanizm apoptozy. W nowotworach jest zachwiana równowaga między tymi dwoma procesami; 2) przez powstanie tzw. fenotypu angiogenego, który powstaje na skutek mutacji wielu genów. Komórki nowotworowe mające taki fenotyp same wydzielają wiele czynników angiogennych [3, 4].

Wysoka zapadalność na nowotwory w obrębie głowy i szyi oraz niezadowolające wyniki leczenia skłaniają do poszukiwania nowych czynników prognostycznych związanych z biologią komórek guza. W piśmiennictwie można znaleźć doniesienia na temat zastosowania oznaczeń cząstek adhe-

zyjnych, wskaźników angiogenezy i produktów białkowych genów supresorowych w różnych typach nowotworów.

Celem pracy były badania nad ekspresją wskaźników angiogenezy w skrawkach parafinowych wycinków nowotworów jamy ustnej i zatok szczękowych oraz określenie ich związku z klinicznym zaawansowaniem choroby nowotworowej oraz prawdopodobnym przebiegiem choroby.

Material i metody

Badania obejmowały grupę 43 pacjentów, którzy byli leczeni w latach 1985–2000 w Katedrze i Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Akademii Medycznej we Wrocławiu. 32 pacjentów leczono z powodu raka jamy ustnej, a 11 z powodu raka zatok szczękowych. W grupie tej było 8 kobiet i 35 mężczyzn. U 37 pacjentów rozpoznano raka płaskonabłonkowego rogowaciejącego, u 6 raka płaskonabłonkowego nierogowaciejącego. U wszystkich pacjentów przeprowadzono ocenę kliniczną i pełną diagnostykę przedoperacyjną (TK, MR, USG szyi i jamy brzusznej, badanie fiberoskopowe jamy ustnej i gardła), na podstawie których podejmowano decyzję o metodzie leczenia operacyjnego. U 32 pacjentów wykonano częściową bądź całkowitą resekcję żuchwy z usunięciem węzłów chłonnych podżuchwowych wraz ze ślinianką podżuchwową jedno- lub obustronnie oraz usunięciem węzłów chłonnych szyjnych. U 11 pacjentów wykonano resekcję masywu szczękowego z usunięciem lokalnych węzłów chłonnych szyjnych.

Wszyscy pacjenci byli poddani radioterapii uzupełniającej w Dolnośląskim Centrum Onkologii. Czas od zabiegu operacyjnego do rozpoczęcia radioterapii wynosił około 4 tygodni, dawka całkowita wynosiła 60 Gy na tzw. pole twarzowe w dawkach podzielonych.

Pooperacyjne badania histopatologiczne były wykonywane we wszystkich przypadkach w Katedrze i Zakładzie Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Stopień zaawansowania był oceniany według klasyfikacji TNM

Na podstawie dokumentacji lekarskiej oraz danych uzyskanych w Urzędzie Wojewódzkim Miasta Wrocławia w Dziale Migracji i Ewidencji Ludności ustalono czas przeżycia badanej grupy pacjentów.

Metody immunohistochemiczne

Badania immunohistochemiczne przeprowadzano na skrawkach parafinowych grubości 4 μm . Do badania ekspresji antygenu CD34 przeprowadzano reakcję z użyciem przeciwciała Monoklonalnego

Mouse Anti-Human CD34 Class II N 1632 DAKO. Kontrolę negatywną wykonywano z pominięciem przeciwciała pierwotnego.

Preparaty mikroskopowe badano za pomocą mikroskopu Olympus BX 50 z torem wizyjnym sprzężonym z komputerem Celeron 800 i programu komputerowej analizy obrazu MultiScanBase 08.98.

Ocenę angiogenezy przeprowadzono po uprzednim wybarwieniu komórek endotelialnych przeciwciałem CD34. W preparacie histologicznym wybierano 5 tzw. gorących ognisk (*hot spots*), o największej gęstości naczyniowej. Naczynia liczono z zachowaniem zasady, że każda grupa komórek wybarwionych na brązowo jest traktowana jako osobne naczynie. Średnia z liczby naczyń policzonych w 5 polach stanowiła tzw. najwyższą gęstość naczyń h-MVD (*highest microvascular density*).

Analizę angiogenezy przeprowadzano również z zastosowaniem programu komputerowej analizy obrazu. Obrazy mikroskopowe (te same, w których oceniano h-MVD) przez kamerę CDD były przekazywane do pamięci komputera. W ocenie obrazu mikroskopowego zastosowano oryginalny system oceny obrazu opracowany przez inż. Wojciecha Tarnawskiego z Politechniki Wrocławskiej. Program umożliwia ocenę odsetka powierzchni preparatu zajmowanego przez komórki endotelialne.

Metody statystyczne

Do opracowania danych wykorzystano programy Sas oraz Statistica.

Na podstawie wyników testu normalności Shapiro-Wilka stwierdzono, że rozkłady liczby oraz powierzchni mikronaczyń obserwowanych u pacjentów znacznie odbiegają od rozkładu normalnego, dlatego do porównania ich średnich wartości w grupach o różnym stopniu zaawansowania procesu nowotworzenia zastosowano test Kruskala-Wallisa.

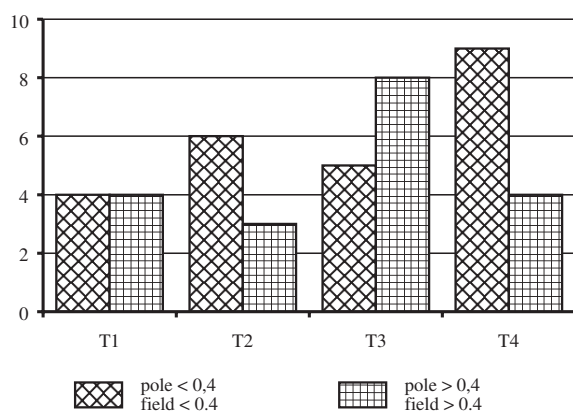
Zależność między cechami jakościowymi badano testem dokładnym χ^2 Pearsona. Dodatkowo wyliczono współczynnik korelacji Spearmana i zbadano jego istotność.

Do wyznaczenia krzywych przeżycia zastosowano estymator Kaplana-Meiera. Różnicę czasów przeżycia pacjentów dla różnych cech badano testem F Coxa.

Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną statystycznie.

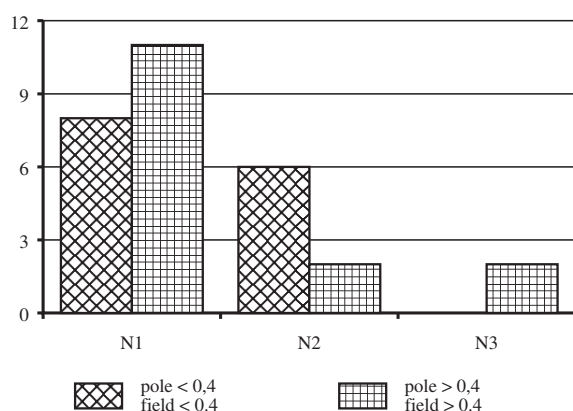
Wyniki

Średnia wartość pola powierzchni naczyń w preparacie wynosiła 0,46, a średnia liczba naczyń w preparacie 7,5.



Ryc. 1. Zależność między cechą T a polem powierzchni naczyń

Fig. 1. Relationship between the stands for tumor (T) and field of vessels surface



Ryc. 2. Zależność cechy N od pola powierzchni naczyń

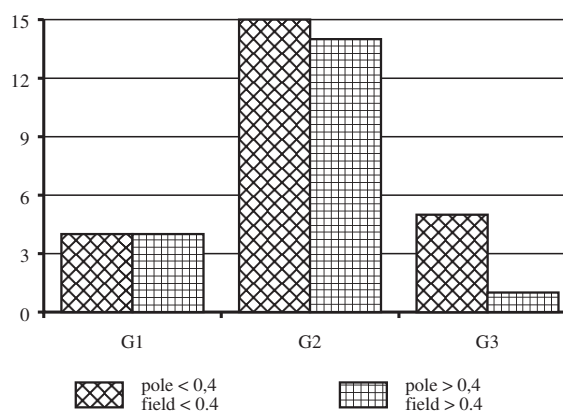
Fig. 2. Relationship between metastasis in the lymph nodes (N) and field of vessel surface

Na rycinach 1, 2 i 3 przedstawiono zależność między polem powierzchni naczyń a wielkością guza (T), liczbą przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych (N) i stopniem histologicznej złośliwości. Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności między tymi cechami nowotworu a powierzchnią naczyń. Wykazano natomiast istotne statystycznie różnice w czasie przeżycia pacjentów w zależności od pola powierzchni naczyń (ryc. 4).

Rycina 5 przedstawia badanie zależności między wielkością guza a liczbą naczyń (h-MVD). Największą gęstość naczyniową stwierdzono w T3 i T4, nie wykazano jednak istotności statystycznej w tym badaniu.

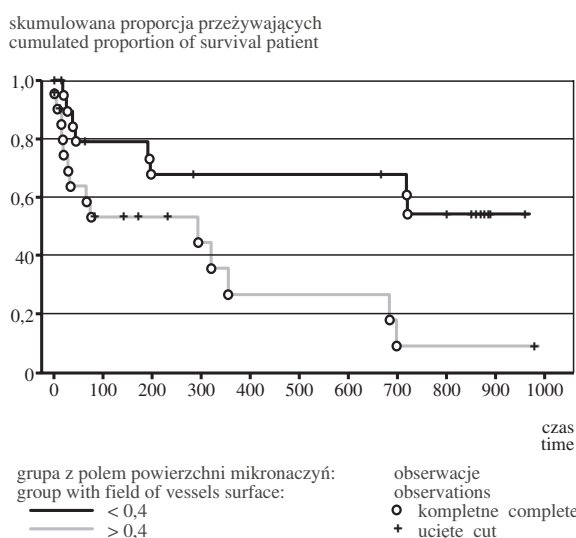
Na rycinie 6 przedstawiono badanie h-MVD w zależności od liczby przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych. Stwierdzono istotny statystycznie wzrost gęstości naczyniowej ($p = 0,018$) w miarę wzrostu cechy N.

Nie stwierdzono zależności istotnej statys-



Ryc. 3. Zależność stopnia histologicznej złośliwości od pola powierzchni naczyń

Fig. 3. Relationship between the histological malignancy and field of vessels surface



Ryc. 4. Krzywe Kaplana-Meiera w grupach pacjentów z polem powierzchni < 0,4 oraz $\geq 0,4$. Istotność różnic czasów przeżyć badano testem F Coxa ($p = 0,033$)

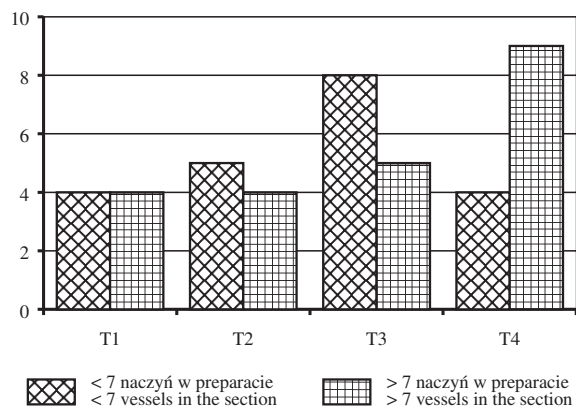
Fig. 4. Curves of Kaplan-Meier in the patients groups with field of vessels surface smaller than 0.4 and with larger 0.4. The significance of patient survival was examined by F Cox test ($p = 0.033$)

tycznie między stopniem histologicznej złośliwości a h-MVD (ryc. 7).

Omówienie

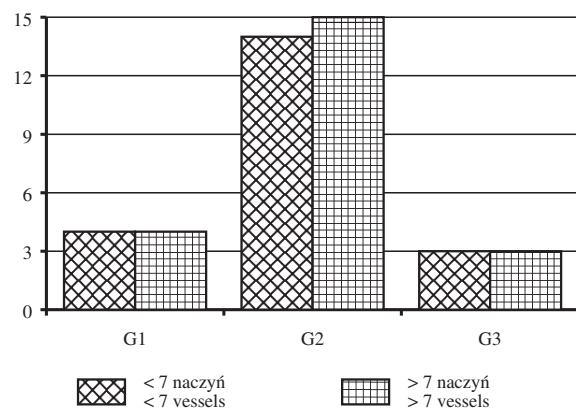
Przebieg kliniczny nowotworów głowy i szyi zależy od cech samego nowotworu oraz relacji między nowotworem a gospodarzem. Ważnymi czynnikami prognostycznymi są: lokalizacja guza oraz stadium TNM. Duże znaczenie ma również wiek i ogólny stan zdrowia pacjenta.

Postęp biologii molekularnej umożliwia poznanie nowych cech nowotworu, które mogą okre-



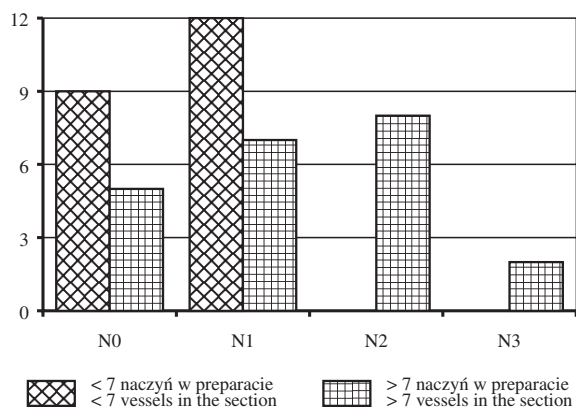
Ryc. 5. Zależność cechy T od h-MVD

Fig. 5. Relationship between the large of tumor (T) and highest microvascular density (h-MVD)



Ryc. 7. Zależność stopnia histologicznej złośliwości od h-MVD

Fig. 7. Relationship between the histological malignancy and highest microvascular density (h-MVD)



Ryc. 6. Zależność cechy N od h-MVD

Fig. 6. Relationship between metastasis in the lymph nodes (N) and highest microvascular density (h-MVD)

łać dynamikę wzrostu miejscowego oraz możliwości tworzenia przerzutów.

Wielu autorów podkreśla, że zwiększona liczba naczyń w tkance guza jest związana z szybką progresją choroby i gorszym rokowaniem [5–8]. Zjawisko to można wytłumaczyć wielorako. Po pierwsze, pierwotne guzy ze znaczną liczbą naczyń powinny mieć potencjalnie większą skłonność do tworzenia odległych przerzutów. Po drugie, guzy lite składają się z dwu składników, tj. komórek nowotworowych i podścieliska. Komórki endotelialne naczyń podścieliska mogą stymulować proliferację komórek guza. Po trzecie, przyjmuje się, że im większy przekrój naczyń w guzie, tym większa możliwość przedostawania się przez nie komórki guza. Poza tym uważa się, że komórki endotelialne pełnią aktywną rolę w tworzeniu przerzutów. Według Weidnera [2] prawdopodobnie wszystkie te czynniki jednocześnie odgrywają rolę w progresji choroby nowotworowej. Pazouki et al. [9] badali związek między wskaźnikami an-

giogenezy a progresją nowotworową w jamie ustnej. Zbadano 100 wycinków, które obejmowały prawidłowy nabłonek, zmiany dysplastyczne i raka płaskonabłonkowego. Jako markery angiogenezy oznaczano czynnik VIII, CD31 i integrinę. Stwierdzono, że liczba naczyń zwiększała się wraz z progresją zmian przez różne stadia dysplazji do raka inwazyjnego. Autorzy stwierdzają, że najlepszym wyznacznikiem angiogenezy jest analiza morfometryczna będąca odbiciem objętości naczyń.

W kilku pracach stwierdzono, że angiogeneza w raku krtani jest istotnym czynnikiem wskazującym na występowanie przerzutów w węzłach chłonnych [10–13]. Inni autorzy nie stwierdzili związku między wskaźnikami angiogenezy a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, wielkością i umiejscowieniem guza, stopniem złośliwości histologicznej oraz występowaniem wznowy w nowotworach głowy i szyi [14, 15].

Hannen et al. [16] badali wskaźniki angiogenezy z zastosowaniem komputerowego systemu analizy obrazu w grupie chorych na raka języka. Stwierdzono, co może zaskakiwać, że gęstość mikronaczyń (MVD) była większa w guzach, które nie tworzyły przerzutów niż w guzach, które dawały przerzuty. Wykazano jednocześnie, że w grupie guzów tworzących przerzuty przeważały naczynia o przekroju 10–15 μm . Autorzy sugerują, że tylko naczynia o średnicy > 10 μm odrywają rolę w procesie tworzenia przerzutów.

Gryczyński et al. [11] analizowali wskaźniki angiogenezy w grupie osób chorych na raka krtani, stwierdzając zależność między intensywnością angiogenezy a wielkością guza, powstawaniem przerzutów w węzłach chłonnych i stopniem zróżnicowania histologicznego guza. Hannen et al. [17] stwierdzili, że ocena liczby naczyń krwionośnych o przekroju < 5 μm w guzach języka ma du-

żą wartość w ocenie możliwości wystąpienia przerzutów. Dunphy et al. [18] badali wartość prognostyczną oceny mikrokrażenia (MVD) u pacjentów z zaawansowanymi guzami w obrębie głowy i szyi leczonych chemioterapią, nie stwierdzając zależności między wynikami oznaczeń MVD przed leczeniem a czasem remisji. Stwierdzono natomiast, że im większa była różnica MVD przed i po leczeniu, tym gorsze było rokowanie.

Hegde et al. [19] wykazali związek między wskaźnikiem angiogenezy (MVD – *microvessel density*) i mutacją genu *p53* u pacjentów z nowotworami w obrębie głowy i szyi. Autorzy nie

stwierdzili natomiast wartości prognostycznej oznaczeń MVD.

W badaniach własnych wykazano związek między liczbą mikronaczyń w preparacie histologicznym i stadiem N, co potwierdza wyniki obserwacji innych autorów (10–13, 16, 17). Badania związku między wskaźnikami angiogenezy i innymi cechami klinicznymi i patologicznymi guza nie wykazały istotnych zależności. Podobnie jak w pracach innych autorów [10, 20] wykazano, że powierzchnia mikronaczyń jest związana z czasem przeżycia pacjentów.

Piśmiennictwo

- [1] FOLKMAN J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J. Natl. Cancer Inst. 1990, 82, 4–6.
- [2] WEIDNER N.: Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. J. Pathol. 1998, 184, 119–122.
- [3] RADZIKOWSKI C.: Przerzuty nowotworowe – problem biologiczny, dylemat prognostyczny i terapeutyczny. Nowotwory 1995, 45, 184–201.
- [4] SZALA S., RADZIKOWSKI C.: Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. Nowotwory 1997, 47, 1–19.
- [5] ALBO D., GRANICK M. S., JHALA N., ATKINSON B., SALOMON M. P.: The relationship of angiogenesis to biological activity in human squamous cell carcinomas of the head and neck. Ann. Plast. Surg. 1994, 32, 588–594.
- [6] ALKSDE R. E., SHINTANI S., YOSHIHAMA Y., MATSUMURA T.: Cell proliferation and tumor angiogenesis in oral cavity tumors. Anticancer Res. 1995, 15, 1417–1422.
- [7] GASPARINI G., WEIDNER N., BEVILACQUA P.: Intratumoral microvessel density and p53 protein: Correlation with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. Int. J. Cancer 1993, 55, 739–744.
- [8] MIKAMI Y., TSUKADA M., MOCHIMATSU I., KOKATSU T., YAGO T., SAWAKI S.: Angiogenesis in head and neck tumors. Nip. Jib. Gak. Kai. 1991, 96, 645–650.
- [9] PAZOUKI S., CHISHOLM D. M., ADI M. M., CARMICHAEL G., FARQUHARSON M., OGDEN G. R., SCHOR S. L., SCHOR A. M.: The association between tumor progression and vascularity in the oral mucosa. J. Pathol. 1997, 183, 39–43.
- [10] BEATRICE F., CIUSTI U., BISCIARI T., CAMMAROTA R., NAVONE R., PALESRO G.: Microvessel count is predictive of patients survival in laryngeal squamous cell carcinoma. Int. J. Cancer 1996, 69, 426–427.
- [11] GRYCZYŃSKI M., KOBOS J., NIEWIADOMSKA H., PIETRUSZEWSKA W.: Ocena ekspresji antygenu proliferacji komórkowej Ki-67, białka związanego z apoptozą p-53 i intensywności angiogenezy w raku krtani. Otolaryngol. Pol. 2000, Supl. 31, 191–208.
- [12] KRĘCICKI T., DUŚ D., KOŹŁAK J., TARNAWSKI W., JELEŃ M., ZALESKA-KRĘCICKA M., SZKUDLAREK T.: Quantitative evaluation of angiogenesis in laryngeal cancer by digital image measurement of the vessel density. Auris Nasus Larynx 2002, 29, 271–276.
- [13] MURRAY J., CARLSON G., McLAUGHLIN K., PENNINGTON M., LYNN M., DE ROSE P., KERWIN W. J., COHEN C.: Tumor angiogenesis as prognostic factor in laryngeal cancer. Am. J. Surg. 1997, 174, 523–526.
- [14] DRAY T. G., HARDIN N. J., SOFFERMAN R. A.: Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 1995, 104, 724–729.
- [15] ZATTERSTROM U. K., BRUN E., WILLEN R., KJELLEN E., WENNERBERG J.: Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of head and neck. Head Neck 1995, 17, 312–318.
- [16] HANNEN E., VAN DER LAAK J., MANNI J., PAHLPLATZ M., FREIHOFFER H., SLOOTWEG P., KOOLE R., DE WILDE P.: Improved prediction of metastasis in tongue carcinomas, combining vascular and nuclear tumor parameters. Am. Cancer Soc. 2001, 92, 1881–1887.
- [17] HANNEN E., VAN DER LAAK J., MANNI J., PAHLPLATZ M., FREIHOFFER H., SLOOTWEG P., KOOLE R., DE WILDE P.: Computer assisted analysis of the microvasculature in metastasized and nonmetastasized squamous cell carcinomas of the tongue. Head Neck 2002, 24, 643–650.
- [18] DUNPHY F., STACK B. C., BOYD J. H., DUNLEAVY T. L., KIM H. J., DUNPHY C. H.: Microvessel density in advanced head and neck squamous cell carcinoma before and after chemotherapy. Anticancer Res. 2002, 22, 1755–1758.
- [19] HEGDE P. U., BRENSKI A. C., CARDARELLI D. D., HUTCHINSON J., PANJE W. R., WOOD N. B., LEURGANS S., PREISLER H. D., TAYLOR S. G., CARDALLERI L., COON J. S.: Tumor angiogenesis and p53 mutations: prognosis in head and neck cancer. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1998, 124, 80–85.
- [20] GALLO O., MASINI E., BIANCHI B., BRUSCHINI L., PAGLIERANI M., FRANCHI A.: Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Hum. Pathol. 2002, 33, 708–714.

Adres do korespondencji:

Joanna Jeleń-Krzeszewska
Katedra i Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej AM
ul. T. Chałubińskiego 5
50-368 Wrocław
e-mail: akrzesz@poczta.fm

Praca wpłynęła do Redakcji: 19.07.2004 r.

Po recenzji: 10.08.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 10.08.2004 r.

Received: 19.07.2004

Revised: 10.08.2004

Accepted: 10.08.2004