



© И.С. Греков

## Характеристика опухолевого ангиогенеза в различных гистологических типах карцином желудка

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Донецкий государственный медицинский университет имени М. Горького» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Донецк, Российская Федерация

© Ilya S. Grekov

## Characterization of Tumor Angiogenesis in Gastric Carcinomas at Different Stages of Their Progression

M. Gorky Donetsk National Medical University, Donetsk, the Russian Federation

**Введение.** Биологическое поведение опухоли во многом зависит от особенностей сосудистого русла и моделей опухолевого ангиогенеза. Изучение морфологии сосудов позволяет не только улучшить прогнозирование раннего метастазирования, но и разработать более эффективные методы лечения.

**Материалы и методы.** Изучено 55 случаев рака желудка (РЖ) различного гистологического строения по классификации P. Lauren. Для иммуногистохимического исследования использовались антитела к панцитокератину AE1/AE3, цитокератинам 17, 18, виментину, E-кадгерину, альфа-гладкомышечному актину ( $\alpha$ -ГМА), CD31, CD34, Ki67. Оценивалась длина, морфология и плотность сосудистого русла опухоли, количество, характер и особенности стромы. Выявили морфологические признаки эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ), полноту и распространенность данного процесса в опухоли, и сопоставили с ангиогенезом.

**Результаты.** В опухоли кишечного типа мало предсуществующих сосудов с полноценно построенными стенками. Обнаружен выраженный полиморфизм, большинство сосудов тонкостенные, синусоидного типа. Превалируют случаи с большой плотностью сосудистого русла. Не найдена связь между плотностью сосудистого русла и стадией заболевания ( $p = 0,779$  по критерию хи-квадрат). В опухоли преобладает очаговая неполная ЭМТ. В диффузном РЖ мало предсуществующих сосудов с полноценными стенками. В части сосудов эндотелий экспрессировал CD34 без экспрессии CD31. В эндотелии нет признаков пролиферативной активности. Во всех случаях ЭМТ чаще распространенная и неполная, реже обнаруживается полная ЭМТ. Строение сосудов в опухолях смешанного типа различное, мало сосудов с полноценно построенной стенкой. Чаще сосуды имели строение синусоид, тонкостенных щелей с просветами неправильной формы. В РЖ смешанного типа плотность русла была выше в участках недифференцированного рака, в сравнении с более дифференцированной аденокарциномой. Преобладают случаи с очаговой неполной ЭМТ.

**Заключение.** Сосуды отличаются большим разнообразием в морфологическом, функциональном и иммуноморфологическом профилях, что влияет на поведение опухоли в целом. В РЖ кишечного типа на инвазию опухоли в большей степени влияет плотность сосудистого русла, и менее — распространенность и полнота ЭМТ. В РЖ диф-

**Introduction.** The biological behavior of the tumor largely depends on the characteristics of the vascular bed and previous tumor angiogenesis models. Studying the morphology of vessels allows not only to improve the prediction of early metastasis, but also to develop more effective treatment methods.

**Materials and Methods.** We studied 55 cases of gastric cancer (GC) of various histological structures according to the the Laurén classification. Immunohistochemical study was performed using antibodies to pancytokeratin AE1/AE3, cytokeratins 17, 18, vimentin, E-cadherin, alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), CD31, CD34, Ki67. The length, morphology and density of the tumor vascular bed, the number, nature and features of the stroma were assessed. Morphological signs of epithelial-mesenchymal transition (EMT), the completeness and prevalence of this process in the tumor were identified and compared with angiogenesis.

**Results.** There are few pre-existing vessels with fully constructed walls in the intestinal-type tumor. The analysis revealed a pronounced polymorphism, with predominantly sinusoidal, thin-walled blood vessels. Cases with high vascular density prevail. We did not find any correlation between vascular bed density and tumor stage ( $p = 0.779$  by chi-square test). Focal incomplete EMT prevails in the tumor. There are few pre-existing vessels with full walls in diffuse GC. In part of the vessels, the endothelium expressed CD34 without expressing CD31. There are no signs of proliferative activity in the endothelium. In all cases, EMT is more often widespread and incomplete; complete EMT is less common. The vessels structure varies in mixed tumors, with few having a fully constructed wall. More often, the vessels had the structure of sinusoids, thin-walled with irregularly shaped openings. In mixed GC, bed density was higher in areas of undifferentiated cancer compared to well differentiated adenocarcinoma. Cases with focal incomplete EMT predominate.

**Conclusion.** The vessels are characterized by great morphological, functional, and immunomorphological diversity, which affects the tumor behavior. In intestinal-type GC, tumor invasion is influenced to a greater extent by the density of the bed, and less by the prevalence and completeness of EMT. In diffuse-type GC, vessel density plays a lesser role in

фузного типа плотность сосудов играет меньшую роль для инвазии, чем распространенность ЭМТ, а также большая частота полной ЭМТ. В смешанном РЖ на инвазию сосудов влияет большая плотность сосудистого русла и полнота ЭМТ.

**Ключевые слова:** морфология; строма; сосуды; ангиогенез; рак желудка; эпителиально-мезенхимальная трансформация

**Для цитирования:** Греков И.С. Характеристика опухолевого ангиогенеза в различных гистологических типах карцином желудка. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(2): 351-359.-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-2-351-359

✉ Контакты: Илья Сергеевич Греков, [ilya.grekov.1998@gmail.com](mailto:ilya.grekov.1998@gmail.com)

## Введение

Изучение особенностей сосудистой морфологии опухолей представляет большой интерес для понимания закономерностей опухолевого роста, даёт возможность, учитывая особенности кровоснабжения, выявить критерии прогноза и выбрать оптимальный вид лечебных мероприятий. На практике не всегда учитывается степень васкуляризации и особенности строения кровеносных сосудов в разных вариантах опухоли, мало изучено значение их для прогрессии и инвазивности рака.

Приобретение опухолевыми клетками способности к инвазии окружающих тканей и сосудов, метастазированию, развитию рецидивов, многие авторы связывают с возникновением в них различных клеточных транзиций. Так эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) лежит в основе прогрессии рака, вследствие приобретения клетками способности к движению, миграции, что создаёт предпосылки для усиленной инвазии и метастазирования опухолей [1, 2]. Это увеличивает выживаемость опухолевых клеток, повышает устойчивость к терапии, ведёт к плохому прогнозу, способствуя агрессивности течения заболевания. Существуют данные, доказывающие факт стимуляции ангиогенеза подобными трансформациями, поэтому изучение особенностей образования сосудов в условиях выраженности ЭМТ и особенностей морфологии сосудов в целом остаётся актуальным в настоящее время.

## Материалы и методы

Изучено 55 случаев рака желудка (РЖ) различного гистологического строения. 19 случаев РЖ кишечного типа, 24 случая РЖ диффузного типа, 12 случаев РЖ смешанного типа. За основу была взята классификация P. Lauren. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of

invasion than the prevalence of EMT, as well as the higher frequency of complete EMT. In mixed GC, vascular invasion is influenced by the high density of the vascular bed and the completeness of the EMT.

**Keywords:** morphology; stroma; vessels; angiogenesis; gastric cancer; epithelial-mesenchymal transformation

**For Citation:** Ilya S. Grekov Characterization of tumor angiogenesis in gastric carcinomas at different stages of their progression. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2024; 70(2): 351-359 (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-2-351-359

Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), обработку персональных данных и согласие на публикацию (№ 115 от 19.05.2023 г.).

Для иммуногистохимической оценки использовались мышинные моноклональные антитела к панцитокератину AE1/AE3, цитокератинам 17, 18, виментину, Е-кадгерину,  $\alpha$ -ГМА. Для выявления эндотелия сосудов использовали моноклональные антитела CD31 и CD34. Для определения пролиферативной активности клеток Ki67. Визуализацию первичных антител проводили с помощью полимерной системы детекции DAKO EnVision+.

Морфометрическая оценка плотности сосудистого русла проводилась по методу Г.Г. Автандилова с использованием окулярной сетки на срезах с экспрессией маркеров эндотелия CD31 и CD34. Все случаи были разделены на 4 группы: с малой, умеренной, большой и очень большой длиной сосудов. Плотность русла оценивалась по всей площади опухоли, в поле зрения увеличения  $\times 200$ . В группу с малой плотностью сосудов отнесены случаи, где насчитывалось до 20 концов срезов сосудов в поле зрения, с умеренной плотностью — 21–45 концов, большой плотностью — 46–90 концов и очень большой плотностью сосудистого русла — свыше 91 среза сосудов в поле зрения.

Количество стромы в опухоли оценивалось полуколичественно следующим образом: о большом количестве стромы говорили тогда, когда ее количество преобладало над паренхимой, в случае преобладания опухолевых клеток над соединительной тканью, количество стромы было расценено как малое. Наконец, при примерно равном количестве двух компонентов опухоли количество стромы определялось как умеренное. Морфологическим признаком ЭМТ служит обособление опухолевых клеток, потеря экспрессии маркера AE1/AE3 в тяжах эпителия, инвазирующих строму при сохранении его экспрессии в основном пласте клеток, исчезновение экспрессии цитокератина 18. При наличии экспрессии виментина говорим о полноте трансформации.

Если признаки ЭМТ были представлены диффузно во всем поле зрения, то говорили о распространенной ЭМТ.

Гистологические препараты были изучены под светооптическим микроскопом Olympus BX-40 с использованием объективов  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ , микрофотографирование произведено цифровой фотокамерой Olympus U-TV1X с программным обеспечением Olympus DP-Soft.

*Статистическая обработка* полученных результатов исследований произведена на персональном компьютере в пакете MedStat с применением базовых методов математической статистики. Определялась достоверность связи или различия показателей ( $p < 0,001$ ). В исследовании использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $R_o$ ), статистический критерий «хи-квадрат», поправка Йейтса, непараметрический ранговый критерий Крускала – Уоллиса.

### Результаты

РЖ кишечного типа гистологически был представлен аденокарциномой различной степени дифференцировки. Превалировали случаи высокодифференцированной аденокарциномы (ВДАК) —  $52,6 \pm 11,5$  %. Низкодифференцированная аденокарцинома (НДАК) выявлена в  $31,6 \pm 10,7$  % случаев, умереннодифференцированная аденокарцинома (УДАК) в  $15,8 \pm 8,4$  % случаев. Только в 3 случаях ( $15,8 \pm 8,4$  %), представленных ВДАК, кишечный РЖ был выявлен на ранней стадии, т. е. опухолевый рост ограничивался пределами слизистой оболочки желудка и подслизистой основой. В остальных случаях ( $84,2 \pm 8,4$  %) обнаружена продвинутая стадия заболевания. В центральных отделах опухоль была представлена ВДАК, а в области инвазивного фронта имела строение НДАК. Часто наблюдался переход от ВДАК к недифференцированному раку в пределах одного поля зрения, что может являться признаком быстрой опухолевой прогрессии.

Во всех случаях диффузного РЖ заболевание имело продвинутую стадию, когда опухоль прорастала слизистую оболочку, подслизистую основу и мышечный слой стенки желудка. Этот факт подтверждает более агрессивное течение диффузного РЖ. Диффузный РЖ в  $45,8 \pm 10,2$  % случаев имел строение перстневидноклеточного рака;  $33,4 \pm 9,6$  % случаев были отнесены к недифференцированному полиморфноклеточному раку. Недифференцированный мелкоклеточный рак составил  $20,8 \pm 8,3$  % случаев. В  $33,4 \pm 9,6$  % случаев диффузного РЖ мы находили в опухоли несколько различных типов опухолевых клеток. В зависимости от преобладания одного из них в опухоли, мы распределяли данные случаи по вышеуказанным гистологическим группам. Среди

доминирующих клеток опухоли клетки другого типа располагались в виде очагов.

Все случаи РЖ смешанного типа находились на продвинутой стадии заболевания. Группу смешанного РЖ составили те случаи, где опухоль одновременно была представлена участками, имеющими строение как кишечного, так и диффузного рака. Участки рака кишечного типа в  $58,4 \pm 14,2$  % случаев был представлен НДАК. УДАК и ВДАК выявлена в  $8,3 \pm 8,3$  % случаев смешанного РЖ. Очаги рака диффузного строения в опухоли преимущественно были представлены солидными полями недифференцированного полиморфноклеточного рака (НПКР). Участки перстневидноклеточного рака выявлены в  $25,0 \pm 12,5$  % случаев смешанного РЖ. Очаги недифференцированного мелкоклеточного рака найдены в  $8,3 \pm 8,3$  % случаев.

В 11 случаях ( $57,9 \pm 11,3$  %) РЖ кишечного типа выявлены комплексы опухолевых клеток в сосудах, в 8 случаях ( $42,1 \pm 11,3$  %) признаков инвазии сосудов не обнаружено. Не выявлено значимого различия в наличии комплексов опухолевых клеток в сосудах РЖ кишечного типа в зависимости от стадии заболевания ( $p = 0,304$  по критерию хи-квадрат). Опухолевые клетки в сосудах РЖ кишечного типа многочисленные, располагаются не только в зоне опухоли, но и далеко от границы опухоли в нормальных тканях, что подтверждает высокий метастатический потенциал опухоли.

В диффузном РЖ, по сравнению с кишечным РЖ, резко превалировали случаи с наличием комплексов опухолевых клеток в просвете сосудов ( $91,7 \pm 9,3$  %) над случаями без инвазии сосудов ( $8,3 \pm 9,3$  %). Таким образом, РЖ диффузного типа характеризуется наибольшей частотой случаев с наличием сосудов с комплексами опухолевых клеток в просвете.

В группе перстневидноклеточного рака в 10 случаях из 11 были выявлены комплексы опухолевых клеток в сосудах, в группе НПКР в 7 случаях из 8 обнаружена инвазия сосудов, и во всех 5 случаях недифференцированного мелкоклеточного рака была найдена инвазия сосудов комплексами опухолевых клеток. Однако мы не выявили статистически значимого различия частоты наличия инвазии сосудов в зависимости от особенностей гистологического строения диффузного РЖ ( $p = 0,56$  по критерию хи-квадрат).

В случаях перстневидноклеточного, полиморфноклеточного и мелкоклеточного рака, наблюдалась очень низкая тканевая дифференцировка, что дает основание думать о том, что на процесс инвазии сосудов большее влияние оказывает именно степень тканевой, а не клеточной дифференцировки опухоли.

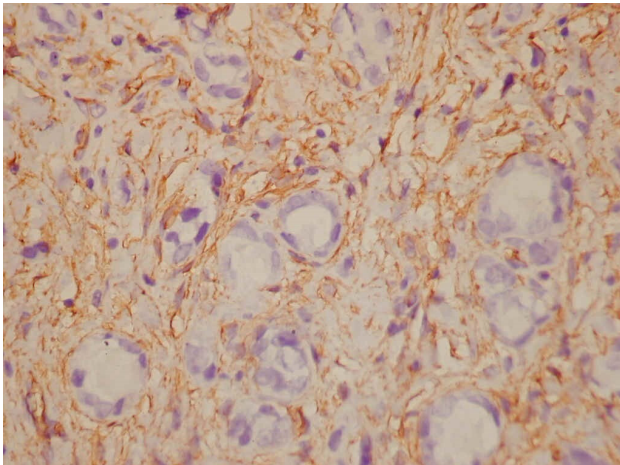


Рис. 1. Умеренно- и низкодифференцированная аденокарцинома желудка. Много сосудов на периферии опухоли в зоне инвазии, выраженный полиморфизм сосудов в очаге ЭМТ с обособленными, веретенообразной формы опухолевыми клетками. Экспрессия в стенках сосудов маркера эндотелия CD34. ИГХ метод, ув. 400  
 Fig. 1. Moderately and poorly differentiated gastric adenocarcinoma (PDGA). Numerous vessels are present at the periphery of the tumor in the invasion zone, with pronounced vascular polymorphism in the EMT focus with isolated, spindle-shaped tumor cells. CD34 surface marker expression in the walls of the blood vessels. IHC method,  $\times 400$

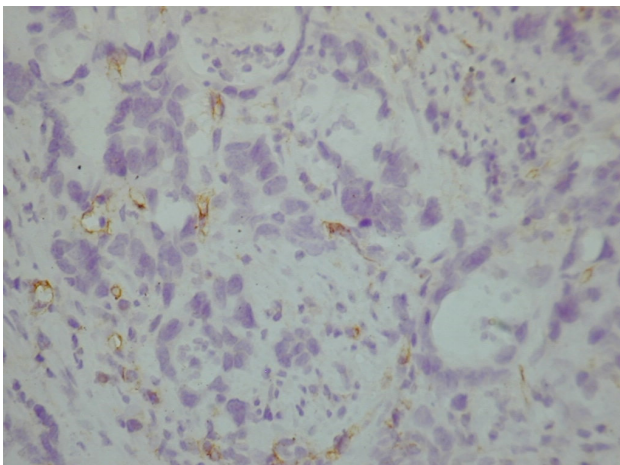


Рис. 2. Умеренно- и низкодифференцированная аденокарцинома желудка. Мало сосудов в центре опухоли, неравномерное их распределение. Экспрессия маркера CD31 в сосудах капиллярного типа. ИГХ метод, ув. 400  
 Fig. 2. Moderately and poorly differentiated gastric adenocarcinoma. Few vessels are present in the center of the tumor, with uneven distribution. CD31 marker expression in capillary-type vessels. IHC method,  $\times 400$

В большинстве случаев смешанного РЖ ( $83,3 \pm 10,8 \%$ ) в просвете сосудов были выявлены комплексы опухолевых клеток и только в  $16,7 \pm 10,8 \%$  случаев не выявлено инвазии сосудов опухолевыми клетками. Такие сосуды расположены как в центре опухоли, так и на границе инвазии, а также в слизистой, мышечной и серозной оболочках желудка в неизменных тканях. В 1 случае смешанного РЖ в составе комплекса опухолевых клеток в сосуде имелось до 30 % клеток с экспрессией маркера Ki67, что является доказательством сохранения пролиферативной активности клеток опухоли в процессе дистантного метастазирования.

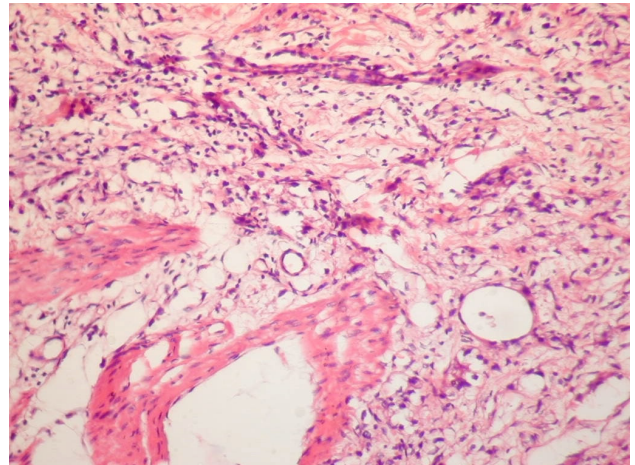


Рис. 3. Диффузный рак желудка. Выраженный полиморфизм сосудов в опухоли. Единичные преexistentующие сосуды, большое число сосудов материнского и капиллярного типа. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 200  
 Fig. 3. Diffuse gastric cancer. Marked vascular polymorphism of the tumor. Single pre-existing vessels, a large number of maternal and capillary type vessels. H&E staining,  $\times 200$

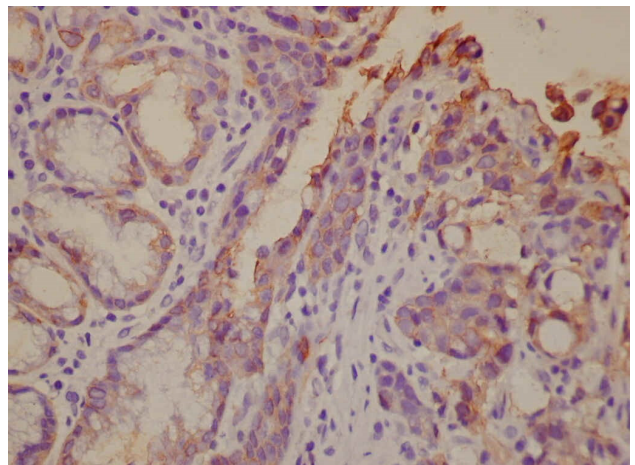


Рис. 4. Высоко-, умереннодифференцированная аденокарцинома желудка. Признак ЭМТ: в части опухолевых клеток снижение и потеря экспрессии маркера панцитокератина AE1/AE3. ИГХ метод, ув. 400  
 Fig. 4. Highly and moderately differentiated gastric adenocarcinoma. EMT features: decreased expression and loss of expression of the pan-cytokeratin (AE1/AE3) marker in a part of tumor cells. IHC method,  $\times 400$

Диффузный РЖ характеризовался максимальной частотой случаев с инвазией сосудов. В смешанном РЖ несколько ниже частота наличия комплексов опухолевых клеток в сосудах. На третьем месте следует группа сосудов в кишечном раке желудка. Во всех типах РЖ опухолевые клетки в сосудах располагались как мелкими группами, так и в виде крупных комплексов, иногда строящих подобия желез, либо в виде желез целиком. Выявлен выраженный полиморфизм опухолевых клеток в сосудах: наряду с клетками округлой формы, обнаружены вытянутые и отросчатые клетки с признаками ЭМТ, что облегчает процесс их проникновения в сосуд для быстрого метастазирования.

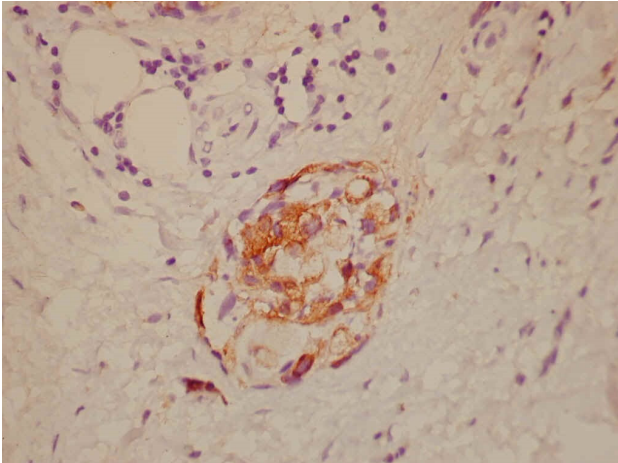


Рис. 5. Диффузный рак желудка. В просвете сосуда комплекс опухоли с наличием округлых клеток, экспрессирующих цитокератин 18 и фибробластоподобных вытянутых клеток без экспрессии цитокератина 18. ИГХ метод, ув. 400  
 Fig. 5. Diffuse gastric cancer. A tumor complex with rounded cells expressing cytokeratin 18 and fibroblast-like elongated cells without cytokeratin 18 expression is present in the lumen of the vessel. IHC method,  $\times 400$

Для оценки плотности сосудистого русла в опухоли мы проводили подсчет концов срезов сосудов в поле зрения микроскопа при увеличении  $\times 200$ . Сравнивали плотность микрососудов в центре и по инфильтративной границе опухоли. Во всех случаях РЖ плотность сосудистого русла на границе опухоли, в зоне инвазии была выше, чем в центре опухоли. В РЖ кишечного типа несколько чаще встречаются ( $47,3 \pm 11,5$  %) случаи, содержащие большую плотность сосудистого русла. В  $31,6 \pm 10,7$  % случаев кишечного РЖ выявлена умеренная, а в  $15,8 \pm 8,4$  % случаев малая плотность сосудистого русла. Только 1 случай ( $5,3 \pm 5,1$  %) характеризовался очень большой плотностью сосудов. В РЖ диффузного типа преобладали случаи с умеренной плотностью сосудистого русла ( $45,8 \pm 10,2$  %). Большая плотность сосудистого русла наблюдалась в  $33,3 \pm 9,6$  % случаев. Только 1 случай ( $4,2 \pm 4,2$  %) имел очень большую плотность сосудистого русла. Мало сосудов выявлено в  $16,7 \pm 7,6$  % случаев диффузного РЖ.

В смешанном РЖ преобладали случаи с большой плотностью сосудов ( $50,0 \pm 14,4$  %). В  $41,7 \pm 14,2$  % случаев обнаружена умеренная плотность сосудистого русла. Только в 1 случае ( $8,3 \pm 8,3$  %) найдена очень большая плотность сосудов. Не выявлено случаев с малой плотностью сосудистого русла в смешанном РЖ. В РЖ смешанного типа мы отметили факт, что плотность сосудистого русла выше в участках опухоли, имеющих строение недифференцированного рака, в сравнении с участками опухоли, имеющими строение дифференцированной аденокарциномы.

Также мы попытались определить признаки ЭМТ в исследуемом материале. В РЖ кишеч-

ного типа в 1 случае ( $5,3 \pm 5,1$  %) не выявлено признаков ЭМТ, в 18 случаях ( $94,7 \pm 5,1$  %) обнаружены признаки ЭМТ разной степени распространенности. Преобладали случаи ( $94,4 \pm 5,4$  %) очаговой ЭМТ, только 1 случай ( $5,6 \pm 5,4$  %) кишечного РЖ характеризовался наличием распространенной ЭМТ. В 17 случаях ( $94,4 \pm 5,4$  %) РЖ кишечного типа имелись признаки потери клетками опухоли только эпителиальных маркеров (т. е. неполная ЭМТ), в 1 случае ( $5,6 \pm 5,4$  %) ЭМТ была полной, когда потеря эпителиальных маркеров опухолью сопровождалась ещё и приобретением клетками маркера соединительной ткани виментина.

Во всех случаях диффузного РЖ выявлены признаки ЭМТ. В 3 случаях ( $12,5 \pm 6,8$  %) ЭМТ была очаговой, в 21 случае ( $87,5 \pm 6,8$  %) распространенной. Полная ЭМТ выявлена в  $25,0 \pm 8,8$  % случаев диффузного рака желудка, неполная обнаружена в  $75,0 \pm 8,8$  % случаев. В нашем материале признаки ЭМТ найдены во всех случаях смешанного РЖ. Очаговая ЭМТ выявлена в 11 случаях ( $91,65 \pm 10,8$  %), распространенная в 1 случае ( $8,35 \pm 8,3$  %). При этом неполная ЭМТ найдена в 10 случаях ( $83,3 \pm 10,8$  %), полная ЭМТ с наличием экспрессии виментина опухолевыми клетками наблюдалась в 2 случаях ( $16,7 \pm 10,8$  %).

В РЖ кишечного типа преобладали случаи очаговой неполной ЭМТ ( $94,4 \pm 5,4$  %). В диффузном раке желудка преобладали случаи распространенной ( $87,5 \pm 6,8$  %) неполной ( $75,0 \pm 8,8$  %) ЭМТ. Очаговая ЭМТ ( $91,6 \pm 10,8$  %) доминировала в смешанном РЖ, при этом в  $83,3 \pm 10,8$  % случаев она была неполной.

При расчете показателя ранговой корреляции Спирмена для всех пациентов найдена положительная корреляционная связь умеренной степени выраженности ( $r = 0,318$  статистически значимо отличается от 0,  $p < 0,05$ ) между распространенностью и полнотой ЭМТ опухолевых клеток. На основании этих данных можно судить о том, что чем выше распространенность ЭМТ (больше участков опухоли с наличием фибробластоподобных, подвижных опухолевых клеток), тем больше среди них клеток, претерпевших полную ЭМТ (полностью потерявших эпителиальный фенотип с приобретением мезенхимального фенотипа).

Проведена оценка выраженности строомобразования. РЖ кишечного типа содержит в основном малое ( $47,4 \pm 11,5$  %) и умеренное ( $36,8 \pm 11,1$  %) количество стромы. Много стромы выявлено лишь в  $15,8 \pm 8,4$  % случаев кишечного РЖ. В 12 случаях РЖ кишечного типа ( $63,2 \pm 11,1$  %) найдены участки с признаками активации стромы (альцианофилия, экспрессия

$\alpha$ -ГМА) разной степени выраженности и распространенности. Они наиболее часто встречались в очагах ЭМТ в зоне инвазии опухоли. Иногда в случаях кишечного РЖ наблюдался концентрический ход волокон стромы вокруг мелких комплексов опухолевых клеток. Можно предположить, что волокна соединительной ткани, окружая клетки опухоли, снижают их подвижность и тем самым препятствуют инвазии стенок сосудов и появлению опухолевых эмболов. Но в случаях, где наблюдался концентрический ход волокон стромы вокруг комплексов опухоли, мы обнаружили многочисленные сосуды с наличием опухолевых клеток в просвете, либо признаками инвазии стенок сосудов. В одном случае кишечного РЖ строма опухоли приобрела полипотентность в направлении дифференцировки, одновременно экспрессируя виментин, десмин и  $\alpha$ -гладкомышечный актин.

В большинстве случаев диффузного РЖ стромы было много ( $66,7 \pm 9,6$  %). Случаи с умеренным количеством стромы составили пятую часть всех случаев диффузного РЖ ( $20,8 \pm 8,3$  %), только 3 случая ( $12,5 \pm 6,8$  %) характеризовались малым количеством стромы. В диффузном РЖ мы не выявили статистически значимого различия количества стромы в зависимости от гистологических особенностей строения опухоли ( $p = 0,59$  по критерию хи-квадрат). Количество стромы могло значительно колебаться в пределах одного случая, наблюдали наличие большого количества коллагеновых волокон, имеющих концентрический ход вокруг клеток с признаками ЭМТ. При окраске альциановым синим находили очаги активации стромы, особенно вокруг клеток, претерпевших процесс ЭМТ.

В РЖ смешанного типа незначительно преобладали случаи с малым количеством стромы ( $50,0 \pm 14,4$  %) над случаями с умеренным стромогенезом ( $41,7 \pm 14,2$  %). Только 1 случай ( $8,3 \pm 8,3$  %) содержал много стромы. Статистически значимого различия между гистологическим типом смешанного РЖ и количеством стромы мы не выявили ( $p = 0,13$  по критерию хи-квадрат). В  $41,7 \pm 14,2$  % случаев смешанного РЖ найдены очаги активации стромы с наличием альцианофилии и молодых фибробластов. Отметим, что в смешанном РЖ вокруг опухолевых клеток округлой формы с более светлыми ядрами стромы было меньше, чем вокруг мелких вытянутых клеток с гиперхромными вытянутыми ядрами (т. е. имеющими признаки ЭМТ).

### Обсуждение

В нашем материале мы находили мало крупных сосудов с полноценно сформированными

стенками, в среднем от 1 до 10 концов срезов в поле зрения микроскопа ( $\times 200$ ). Распределение их было крайне неравномерным. Только в двух случаях перстневидноклеточного рака выявлено много предсуществующих сосудов со стенками равномерной толщины и просветами правильной округлой формы.

Во всех группах исследования выявлен резко выраженный полиморфизм новообразованных сосудов. Чаще всего в опухоли преобладали сосуды материнского типа: синусоиды с широкими просветами разнообразной формы, тонкостенные, либо со стенками неравномерной толщины, наличием слоя эндотелиальных клеток, экспрессирующих маркеры CD31 и CD34 (рис. 1, 2). Между комплексами опухолевых клеток встречались щели, выстланные только слоем эндотелиальных клеток с наличием в их просветах эритроцитов. В части сосудов синусоидного типа выявлен пролиферирующий двухслойный эндотелий, имеющий вид очень набухших клеток, вытянутой формы с наличием отростков, выступающих в просвет.

Кроме того, в опухоли в большом количестве встречались дочерние капилляры, преимущественно с мелкими, округлыми просветами, наличием эндотелиальной выстилки, часто очень ветвящиеся. Иногда они приобретали вид цепочек эндотелиальных клеток с экспрессией CD34, располагающихся среди клеток опухоли и не имеющих просветов. Это подтверждает факт способности клеток эндотелия к быстрому растяжению и распластыванию без дополнительного синтеза биомембран, что обеспечивает высокую скорость ангиогенеза в опухоли [1, 2, 3–6].

Некоторые сосуды характеризовались неравномерной экспрессией в стенках маркера соединительной ткани виментина и маркера гладкомышечной ткани  $\alpha$ ГМА, что позволило выявить различные дефекты строения стенок сосудов. Много сосудов с экспрессией эндотелиальных маркеров не экспрессировали виментин и  $\alpha$ ГМА, что подтверждает отсутствие в их стенках соединительнотканного и гладкомышечного компонентов и свидетельствует о незрелости сосудов. Вероятно, в результате отсутствия в стенках этих сосудов слоя соединительной ткани и гладких миоцитов просвет их резко расширяется.

Редко в строме опухоли мы встречали так называемые гломерулярные тельца в виде округлых скоплений эндотелиальных клеток без просветов с экспрессией маркера CD34.

Также редко встречались сосудистые мальформации, которые являются еще одной формой эволюции материнских сосудов, с асимметричной экспрессией виментина и  $\alpha$ ГМА в стенках и резким полиморфизмом просветов.

В трех случаях кишечного РЖ в эндотелии сосудов мы выявили экспрессию маркера пролиферативной активности клеток Ki67, что подтверждает факт возможности деления эндотелиальных клеток, хотя эти клетки являются высоко функционально дифференцированными и в зрелых неопухолевых сосудах не вступают в митоз. Выявленная нами пролиферативная активность эндотелия подтверждает данные литературы о том, что VEGF стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток в опухоли. В диффузном и смешанном РЖ не обнаружено экспрессии Ki67 в эндотелии опухолевых сосудов.

Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в эндотелии сосудов свидетельствует в пользу функциональной зрелости сосудистой стенки. В части опухолевых сосудов мы не выявили активности ЩФ, однако вне опухоли в стенках всех сосудов её активность была сохранена. При сопоставлении количества сосудов, выявленных при окраске на CD31 и CD34, с числом сосудов с наличием в эндотелии ЩФ мы обнаружили, что сосудов в опухоли, экспрессирующих маркеры эндотелия, больше, чем сосудов с активностью щелочной фосфатазы. В диффузном РЖ число сосудов с экспрессией маркеров эндотелия превышало в два раза количество сосудов с активностью ЩФ. В смешанном раке желудка общее количество сосудов в опухоли в среднем превышало в 3–4 раза количество сосудов с активностью ЩФ, в кишечном раке желудка в 4–5 раз, а в одном случае даже в 9 раз ( $p < 0,05$ ), что позволяет сделать заключение о превалировании в опухоли функционально незрелых сосудов.

Мы предположили, что чем глубже рост опухоли, тем выше должна быть степень васкуляризации стромы для обеспечения скорости инвазивного роста. В случаях кишечного РЖ в продвинутой стадии заболевания наблюдалась тенденция к более выраженному ангиогенезу. Ранний кишечный РЖ характеризовался равномерным распределением частоты случаев в группах с малой, умеренной и большой плотностью сосудистого русла. При этом мы не нашли статистически значимого различия плотности сосудистого русла в РЖ кишечного типа в зависимости от стадии заболевания ( $p = 0,779$  по критерию хи-квадрат). Следовательно, деление кишечного РЖ на раннюю и продвинутую стадию связано только с глубиной роста опухоли, которая, в свою очередь, не связана с выраженностью ангиогенеза, а зависит от агрессивности фенотипа опухолевых клеток и давности заболевания. В РЖ кишечного типа мы выявили, что в участках аденокарциномы с наличием атрофических опухолевых клеток меньше плотность сосудистого русла. Это подтверждает основную функцию

стромы, компонентом которой являются сосуды, заключающуюся в обеспечении гомеостаза микроокружения и трофики опухолевых клеток [4, 5, 7]. Можно было бы предположить, что чем ниже дифференцировка клеток опухоли, тем больше клетки синтезируют цитокинов, которые влияют на строму и стимулируют ангиогенез. Однако при проведении анализа статистически значимого различия плотности сосудистого русла в зависимости от особенностей гистологического строения диффузного РЖ не выявлено ( $p = 0,34$  по критерию хи-квадрат).

В кишечном и смешанном РЖ преобладают случаи с большой плотностью сосудистого русла, в диффузном РЖ доминируют случаи с умеренным ангиогенезом.

Мы сопоставили степень выраженности ангиогенеза с наличием опухолевых клеток в сосудах т. к. предположили, что чем выше плотность сосудистого русла, тем больше вероятность инвазии опухолевыми клетками стенок сосудов. Однако не выявлено статистически значимого различия между наличием комплексов опухолевых клеток в сосудах в зависимости от плотности сосудистого русла в кишечном ( $p = 0,292$ ), диффузном ( $p = 0,46$ ) и смешанном ( $p = 0,88$ ) РЖ. С учетом того, что сосуды являются основным по значению компонентом опухолевой стромы, в нашем материале мы сопоставили плотность сосудистого русла с выраженностью стромообразования, предполагая наличие прямой связи между этими характеристиками. При проведении анализа выявлено статистически значимое различие распределения плотности сосудистого русла в зависимости от количества стромы в кишечном раке желудка ( $p = 0,046$  по критерию хи-квадрат). В диффузном РЖ не выявлено связи ( $p = 0,64$  по критерию хи-квадрат) между этими показателями. В смешанном РЖ также нет четкой связи между выраженностью стромообразования и плотностью сосудистого русла ( $p = 0,39$  по критерию хи-квадрат).

В РЖ диффузного типа преобладают случаи с большим количеством фиброзной стромы ( $66,7 \pm 9,6$  %), это ведет к редукции сосудов (значительное преобладание частоты случаев с малой и умеренной плотностью сосудистого русла), затруднению и нарушению кровотока, развитию гипоксии и индукции ЭМТ, что подтверждается самой большой частотой, распространенной ЭМТ ( $87,5 \pm 6,8$  %) (рис. 3).

В одном случае смешанного РЖ в единичных опухолевых клетках обнаружена экспрессия десмина, что является показателем глубокой ЭМТ. Снижение экспрессии цитокератина наблюдалось не только в фибробластоподобных, отростчатых эпителиальных, опухолевых клетках, но и в клетках округлой формы без отростков. На

основании этого можно предположить разную последовательность появления признаков ЭМТ, клетки могут первоначально терять эпителиальные маркеры, а затем происходит изменение их формы и наоборот. Встречались в опухоли клетки фибробластоподобной формы с сохраненной экспрессией панцитокератина AE1/AE3, цитокератина 17, но с одновременным снижением или потерей экспрессии цитокератина 18, что согласуется с литературными данными о большей значимости для процесса ЭМТ именно потери экспрессии цитокератина 18 [4, 5, 6, 7].

В 3 случаях ( $12,5 \pm 6,8$ ) диффузного РЖ выявили интересный факт: высокодифференцированные в функциональном отношении перстневидные клетки экспрессировали мембранные маркеры эпителия, и при этом в части клеток выявлялась экспрессия виментина, что доказывает приобретение данными клетками мезенхимального фенотипа.

Выявлено наличие положительной корреляционной связи средней степени выраженности ( $r = 0,517$  статистически значимо отличается от 0,  $p < 0,05$ ) между распространенностью ЭМТ и количеством стромы опухоли. На основании этого можно говорить, что чем больше стромы в раке желудка, тем больше участков ЭМТ опухолевых клеток. Следовательно, компоненты стромы стимулируют процесс ЭМТ и наоборот фибробластоподобные клетки с признаками ЭМТ выделяют цитокины, участвующие в стимуляции стромогенеза (рис. 4, 5).

Существуют литературные данные об усилении интенсивности ангиогенеза в процессе ЭМТ, что необходимо для дальнейшей прогрессии опухоли [6, 7, 8]. Сущность прогрессии заключается в инвазии сосудов с развитием дистантного метастазирования. Клетки опухоли, претерпевающие ЭМТ, приобретают значительную подвижность и способность для инвазии сосудов [9, 10]. В нашем материале мы провели анализ соотношения плотности сосудистого русла с распространенностью и полнотой ЭМТ.

При проведении анализа не выявлено статистически значимой связи плотности сосудистого русла с наличием и полнотой ЭМТ в диффузном РЖ ( $p = 0,229$  по критерию хи-квадрат). Не найдено связи между полнотой ЭМТ в опухоли и плотностью сосудистого русла в РЖ смешанного типа ( $p = 0,88$  по критерию хи-квадрат).

### Заключение

Таким образом, в РЖ кишечного типа на инвазию опухоли в большей степени влияет плотность сосудистого русла, что предполагает большую вероятность контакта способных к инвазии опухолевых клеток со стенкой сосуда, а менее

значима распространенность и полнота ЭМТ. В РЖ диффузного типа плотность сосудов играет меньшую роль для инвазии, чем распространенность ЭМТ, дающая большую поверхность контакта способных к инвазии опухолевых клеток со стенкой сосуда, а также большая частота полнотой ЭМТ. В смешанном РЖ на инвазию сосудов влияет большая плотность сосудистого русла и полнота ЭМТ.

#### Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interest

The author declare no conflict of interest.

#### Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Все процедуры с вовлечением больных были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией по правам человека в редакции 2013 г. Протокол исследования № 115 от 19.05.2023 г. одобрен локальным этическим комитетом Донецкого государственного медицинского университета имени М. Горького. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании, обработку персональных данных и согласие на публикацию.

#### Compliance with patient rights and principles of bioethics

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of Declaration of Helsinki Protocol (2013). The study was approved by the ethics committee of the M. Gorky Donetsk National Medical University. Protocol № 115 dated 19.05.2023. All patients gave written informed consent to participate in the study.

#### Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного бюджетного финансирования.

#### Funding

The study was carried out within the framework of state budget funding.

Автор одобрил финальную версию статьи перед публикацией, выразил согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

Author have approved the final version of the article before publication, agreed to assume responsibility for all aspects of the work, implying proper review and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Radisky D.C. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2005; 1;118(19): 325-6.-DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.02552>.
2. Волкова Л.В., Шушвал М.С. Морфологическая характеристика диспластических процессов в слизистой оболочке, прилежащей к опухоли, при раке желудка кишечного типа. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2021; 10(3): 47-54.-DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.3.47-54>. [Volkova L.V., Shushval M.S. Morphological characteristics of dysplasia in the mucous membrane adjacent to the tumor in intestinal type gastric cancer. *Clinical and experimental morphology.* 2021; 10(3):



- 47-54.-DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.3.47-54>. (In Rus)].
3. Кондратьев Р.Б., Греков И.С., Янков А.М., et al. Роль эпителиально-мезенхимальной трансформации в раках различной локализации (Часть 1). *Новообразование*. 2021; 13(2): 91-95.-DOI: 10.26435/neoplas.v13i2.376. [Kon-dratyuk R.B., Grekov I.S., Jarkov A.M., et al. The role of epithelial-mesenchymal transformation in cancers of various localization (Part 1) *Neoplasms*. 2021; 13(2): 91-95.-DOI: <https://doi.org/10.26435/neoplas.v13i2.376>. (In Rus)].
  4. Chou M.Y. Interplay of immunometabolism and epithelial-mesenchymal transition in the tumor microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(18): 110-8.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22189878>.
  5. Christiansen J.J., Rajasekaran A.K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006; 66(17): 8319-26.-DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0410>.
  6. Василенко И.В., Кондратьев Р.Б., Греков И.С., Янков А.М. Эпителиально-мезенхимальный переход в основных типах рака желудка. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2021; 10(2): 13-20.-DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.2.13-20>. [Vasilenko I.V., Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M. Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma. *Clin Exp Morphology*. 2021; 10(2): 13-20.-DOI: <https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.2.13-20>. (In Rus)].
  7. Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease: Old views and new perspectives. *Int J Dev Biol*. 2009; 53(1): 1541-7.-DOI: <https://doi.org/10.1387/ijdb.072410mn>.
  8. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem*. 2018; 164 (4): 257-64.-DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvy047>.
  9. Ramesh V., Brabletz T., Ceppi P. Targeting EMT in cancer with repurposed Metabolic inhibitors. *Trends Cancer*. 2020; 6(11): 942-50.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.06.005>.
  10. Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transition in development of disease. *Cell*. 2009; 139(5): 871-90.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.

Поступила в редакцию / Received / 09.06.2023

Прошла рецензирование / Reviewed / 17.10.2023

Принята в печать / Accepted for publication / 19.10.2023

#### Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Илья Сергеевич Греков / Ilya S. Grekov / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6140-5760>.

